

**ANTIMICROBIANOS
POLIFENÓLICOS Y OLEOSÍDICOS
EN ALIMENTOS DERIVADOS
DE LA ACEITUNA**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alimentos obtenidos a partir de la aceituna	3
1.1.1. Aceite de oliva	3
1.1.2. Aceituna de mesa	3
1.2. Elaboración de aceite de oliva	9
1.3. Elaboración de aceitunas de mesa	12
1.3.1. Verdes al estilo español	12
1.3.2. Negras oxidadas.....	14
1.3.3. Negras naturales al estilo griego.....	16
1.4. Compuestos polifenólicos y oleosídicos en productos derivados de la aceituna	18
1.4.1. Fruto fresco.....	18
1.4.2. Aceite de oliva	21
1.4.3. Aceitunas de mesa	23
1.5. Compuestos antimicrobianos en alimentos	24
1.6. Compuestos antimicrobianos en productos y subproductos del olivo	27
1.6.1. Aceite de oliva	27
1.6.2. Aceitunas de mesa	29
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Determinación de cloruro sódico en salmueras	41
3.2. Análisis microbiológico de salmueras	41
3.3. Análisis químico de salmueras	41
3.4. Análisis de azúcares	41
3.5. Análisis de ácidos orgánicos en salmueras	43
3.6. Análisis de compuestos polifenólicos y oleosídicos	43
3.6.1. Preparación de la muestra.....	43
3.6.1.1. Fruto fresco.....	44
3.6.1.2. Aceite de oliva.....	44
3.6.1.3. Salmuera de aceitunas y jugo de aceitunas.....	45
3.6.2. Determinación mediante cromatografía de alta eficacia	45
3.6.2.1. Sistema cromatográfico para fenoles en pulpa.....	45
3.6.2.2. Sistema cromatográfico para fenoles en aceites, salmueras y jugo de aceitunas	46

3.7. Purificación de compuestos polifenólicos y oleosídicos y determinación de nuevas estructuras químicas	47
3.7.1. Aislamiento.....	47
3.7.2. Determinación por espectrometría de masas (EM)	48
3.7.3. Determinación por resonancia magnética nuclear (RMN)	49
3.7.4. Hidrólisis de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (HyEDA)	49
3.8. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	49
3.9. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	52
3.10. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva	52
3.10.1. Materia prima: aceites de oliva, bebidas y alimentos líquidos	52
3.10.2. Actividad antimicrobiana de aceites de oliva y otros aceites vegetales comestibles	53
3.10.3. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos del aceite de oliva frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	55
3.10.4. Comparación del efecto bactericida del aceite de oliva y otros alimentos líquidos.....	55
3.10.5. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de mayonesas	56
3.10.6. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de ensaladas	56
3.10.7. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva y de sus compuestos polifenólicos individuales frente a <i>Helicobacter pylori</i>	57
3.10.8. Simulación de la digestión estomacal de aceites de oliva	58
3.11. Compuestos antimicrobianos en aceitunas de mesa.....	59
3.11.1. Identificación de compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con NaOH y preparadas en condiciones asépticas.....	59
3.11.1.1. Materia prima y preparación de aceitunas en condiciones asépticas.....	59
3.11.1.2. Inoculación de salmueras preparadas y conservadas asépticamente con <i>Lactobacillus pentosus</i>	60
3.11.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros en salmueras asépticas frente a <i>L. pentosus</i> y otros microorganismos	60

3.11.2. Influencia de las sustancias antimicrobianas sobre la fermentación a escala piloto de aceitunas de mesa Gordal y Manzanilla.....	61
3.11.2.1. Materia prima y preparación de aceitunas.....	61
3.11.2.2. Inoculación y modificación de salmueras por adición de extracto de levadura y medio de cultivo	62
3.11.3. Relación entre la intensidad del tratamiento alcalino y la presencia de antimicrobianos durante la fermentación de aceitunas verdes estilo español.....	63
3.11.3.1. Materia prima y preparación de aceitunas verdes estilo español.....	63
3.11.3.2. Ensayo de la actividad bactericida del oleósido 11-metil éster	64
3.11.4. Compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con álcali. Experiencia industrial de conservación de aceitunas negras.....	64
3.11.4.1. Materia prima y almacenamiento industrial de aceitunas negras.....	65
3.11.4.2. Incubación de aceitunas negras, líquidos de conservación y compuestos puros	65
3.11.5. Antimicrobianos en diferentes variedades de aceitunas de mesa	66
3.11.5.1. Materia prima y preparación de aceitunas.....	66
3.11.5.2. Ensayo con extractos crudos de aceitunas.....	66
3.11.5.3. Experimento de pasterización de aceitunas.....	67
3.12. Compuestos antimicrobianos de la aceituna de mesa y otros desinfectantes comerciales	67
3.12.1. Sustancias químicas.....	67
3.12.2. Ensayo de la actividad bactericida de compuestos puros	68
3.13. Análisis estadístico.....	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
4.1. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva	73
4.1.1. Actividad antimicrobiana de aceites de oliva y otros aceites vegetales comestibles	73
4.1.2. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos del aceite de oliva frente a <i>L. monocytogenes</i>	88

4.1.3. Comparación del efecto bactericida del aceite de oliva y otros alimentos líquidos.....	89
4.1.4. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de mayonesas	95
4.1.5. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de ensaladas	97
4.1.6. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva frente a <i>Helicobacter pylori</i>	98
4.1.7. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos individuales del aceite de oliva frente a <i>Helicobacter pylori</i>	102
4.1.8. Simulación de la digestión estomacal de aceites de oliva	104
4.2. Compuestos antimicrobianos en aceitunas de mesa.....	110
4.2.1. Identificación de compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con NaOH y preparadas en condiciones asépticas.....	110
4.2.1.1. Análisis de azúcares, sal y acético en salmueras asépticas.....	110
4.2.1.2. Compuestos fenólicos y oleosídicos en salmueras asépticas.....	114
4.2.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros frente a <i>Lactobacillus pentosus</i> en salmuera	132
4.2.1.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros frente a diversos microorganismos	137
4.2.2. Influencia de las sustancias antimicrobianas sobre la fermentación a escala piloto de aceitunas de mesa Gordal y Manzanilla	139
4.2.3. Relación entre la intensidad del tratamiento alcalino y la presencia de compuestos antimicrobianos durante la fermentación de aceitunas verdes estilo español.....	145
4.2.4. Compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con álcali. Experiencia industrial de conservación de aceitunas negras.....	158
4.2.5. Antimicrobianos en diferentes variedades de aceitunas de mesa: análisis y formación.....	167
4.2.5.1 Antimicrobianos en salmueras asépticas de diferentes variedades	167
4.2.5.2. Formación de compuestos antimicrobianos	172
4.3. Compuestos antimicrobianos de la aceituna de mesa y otros desinfectantes comerciales	178

5. CONCLUSIONES	187
6. BIBLIOGRAFÍA	191
7. ABREVIATURAS	223

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El olivo es una de las plantas cultivadas más antiguas. Su origen se remonta a los años 4000-3000 antes de nuestra Era en la región de Palestina. El olivo, *Olea europaea* L., pertenece a la familia *Oleaceae* y es la única especie de la familia con fruto comestible. Alrededor del 90 % de las aceitunas producidas se destina a la obtención de aceite de oliva y el resto se consume directamente como aceitunas de mesa (COI, 2007).

Durante siglos, tanto el aceite de oliva como extractos de hojas de olivo se han empleado para tratar múltiples enfermedades, muchas de ellas de origen microbiano. Incluso en el Medievo, los alquimistas utilizaban el símbolo mostrado en la Figura 1 para designar al aceite de oliva como una entidad química distinta. En el siglo XIX usaban extractos de hojas de olivo para combatir la malaria y hoy son numerosas las empresas que comercializan estos extractos para el tratamiento, entre otros usos, de enfermedades de origen microbiano. Sin embargo, los productos más importantes que se obtienen del olivo, desde un punto de vista comercial, son las aceitunas de mesa y el aceite de oliva.

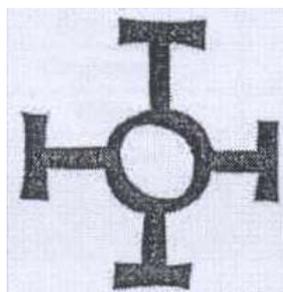


Figura 1: Símbolo utilizado por los alquimistas medievales para designar al aceite de oliva como una especie química distinta.

1.1. Alimentos obtenidos a partir de la aceituna

1.1.1. Aceite de oliva

Martínez y cols. (1975a) definen el aceite de oliva como “el zumo oleoso de las aceitunas separado de los demás componentes de este fruto. Cuando es extraído por sistemas mecánicos correctos y procede de frutos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones, frescos y con la adecuada madurez, el aceite de oliva posee excepcionales características de fragancia y sabor delicado y es prácticamente el único entre los aceites vegetales que puede consumirse crudo conservando íntegro su contenido en vitaminas,

ácidos grasos esenciales y otros productos naturales de importancia dietética”. Esta definición, no obstante, es adecuada sólo para determinados tipos de aceite de oliva. Un gran porcentaje de la producción de aceite de oliva se destina a la refinación debido a sus deficientes características químicas y organolépticas, con lo cual se originan diferentes categorías de aceite de oliva.

La Reglamentación Comunitaria actual (CE, 2001) distingue las siguientes categorías de aceites de oliva para consumo:

1. Aceites de oliva vírgenes: aceites obtenidos a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones que no ocasionen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolvente, mediante coadyuvante de acción química o bioquímica, o por procedimiento de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza.

Estos aceites serán objeto de la clasificación exhaustiva y de las denominaciones siguientes:

a) aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 0,8 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría;

b) aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 2 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría;

c) aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g por 100 g y/o cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

2. Aceite de oliva refinado: aceite de oliva obtenido mediante el refino de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a

0,3 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

3. Aceite de oliva – contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes: aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

4. Aceite de orujo de oliva crudo: aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos, o que corresponda, con excepción de algunas características determinadas, a un aceite de oliva lampante; con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

5. Aceite de orujo de oliva refinado: aceite obtenido mediante refinado de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

6. Aceite de orujo de oliva: aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.»

Es obvio que los aceites de oliva vírgenes son los que poseen las mejores propiedades químicas, organolépticas y nutricionales. Por tanto, estos aceites deben ser obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no impliquen alteración del aceite y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y el filtrado (Kiritsakis, 1998).

Las últimas estimaciones llevadas a cabo por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2007) sobre producción mundial de aceite de oliva para la campaña 2006/2007 son de aproximadamente 2.800.000 t, de las cuales 2.200.000 t corresponden a la Unión Europea y, en particular, 1.200.000 t a España. Por tanto, puede considerarse que España representa hoy día más del 40 % de la producción mundial de aceite de oliva.

Aunque prácticamente en todo el territorio nacional se produce aceite de oliva, son las comunidades de Andalucía, Castilla la Mancha, Extremadura, Cataluña y Valencia las principales productoras. Andalucía, y en particular las provincias de Jaén y Córdoba, es la mayor región oleícola de España (Civantos, 1999). Sólo en la provincia de Jaén se elabora alrededor de la mitad del aceite de oliva de toda España. La mayoría de los olivos de esta provincia son de la variedad ‘Picual’, por lo que aproximadamente el 45 % del aceite de España y 20-25 % mundial pertenece a esta variedad.

Los aceites de la variedad ‘Hojiblanca’ son los segundos en importancia a escala nacional y éstos son producidos mayoritariamente en las provincias de Córdoba, Málaga y Sevilla. Los terceros en importancia son los de la variedad ‘Cornicabra’ localizados fundamentalmente en Castilla-La Mancha y, en particular, en las provincias de Toledo y Ciudad Real.

No tanto por su producción, en continuo aumento, como por su aceptación comercial, son importantes los aceites de la variedad ‘Arbequina’, localizados sobre todo en Cataluña, en particular en la provincia de Lleida; aunque en los últimos años se ha incrementado bastante su presencia en Andalucía.

Otros aceites comercializados como monovarietales son los de las variedades ‘Lechín’ (Andalucía Occidental), ‘Empeltre’ (Aragón), ‘Picudo’ (Comarca de Baena), ‘Verdial’ (Huelva y Badajoz), ‘Manzanilla’ (Andalucía Occidental y Extremadura), ‘Blanqueta’ (Valencia), ‘Villalonga’, ‘Morrut’, etc.

No todo el aceite de oliva que se produce se puede comercializar como virgen, por lo que cierto porcentaje debe ser refinado. Cada año es menor este porcentaje debido a la mejora en los procesos de elaboración; sin embargo, un factor muy importante a tener en cuenta son las condiciones climáticas, en especial las heladas. Por ello, el aceite de oliva destinado a refinación depende mucho de la campaña y puede

oscilar entre el 20 y el 80 % del total obtenido. No obstante, es importante resaltar el objetivo marcado por la mayoría de las almazaras de conseguir aceites de calidad con vistas a su mejor comercialización.

El aceite de orujo de oliva representa un pequeño porcentaje del total de los aceites procedentes de aceitunas. Así, los datos aportados por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2007) para la campaña 2006/2007 indican una producción mundial de aproximadamente 150.000 t, de las cuales 60.000 t corresponden a España.

1.1.2. Aceituna de mesa

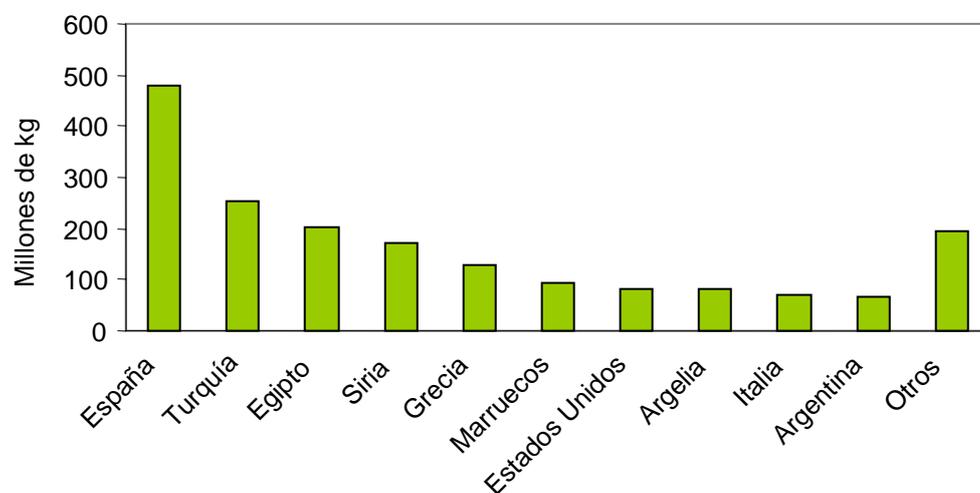
La aceituna de mesa es un alimento consumido durante más de 2000 años en los países de la cuenca mediterránea, siendo muy estimado hoy día en todo el mundo. Ya en el siglo I de nuestra era, el gaditano Columela (42), en su obra *De Re Rustica*, nos enseñaba que había variedades de aceitunas más apropiadas para su consumo directo que para la obtención de aceite y también explicaba diferentes métodos de preparación de aceitunas de mesa: en salmuera, aliñadas, etc.

Según la Norma de Calidad vigente emitida por el Consejo Oleícola Internacional (2004), se denomina “aceituna de mesa al producto preparado a partir de frutos sanos de variedades del olivo cultivado (*Olea europaea* L.) elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometidos a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservados mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, envasados con o sin líquido de gobierno”. Esta nueva Norma clasifica las aceitunas de mesa según su grado de madurez en tres tipos: verdes, de color cambiante y negras; y según su forma de preparación en: aderezadas, al natural, deshidratadas, ennegrecidas por oxidación y especialidades. La Reglamentación Técnico Sanitaria española (BOE, nº 279, 2001) coincide, en gran medida, con la Norma del COI.

Sin embargo, desde un punto de vista comercial son tres los principales tipos de aceitunas de mesa: verdes aderezadas al estilo español, negras oxidadas o al estilo californiano y negras naturales en salmuera o al estilo griego.

España es el principal país productor de aceitunas de mesa, seguido de Turquía, Egipto, Siria y otros (Figura 2). En particular, Andalucía representa alrededor del 70-80 % de la producción nacional y Sevilla alrededor del 60 % de la andaluza. La producción ha aumentado considerablemente en las últimas campañas, sobre todo la de aceitunas destinadas a negras oxidadas. España ocupa también el primer lugar mundial entre los países exportadores de este producto, destinándose más del 50 % a la Unión Europea y Estados Unidos. Asimismo, un elevado porcentaje de la producción de aceituna de mesa se vende envasada bajo numerosas formas de presentación comercial (deshuesadas, rellenas, en rodajas, etc.). El total de exportaciones representa aproximadamente 500 millones de euros anuales (Asemesa, 2007) y la elaboración de aceitunas de mesa supone unos 7000-8000 puestos de trabajo, lo cual representa el 27 % del empleo generado por el sector de conservas y preparados vegetales a nivel nacional.

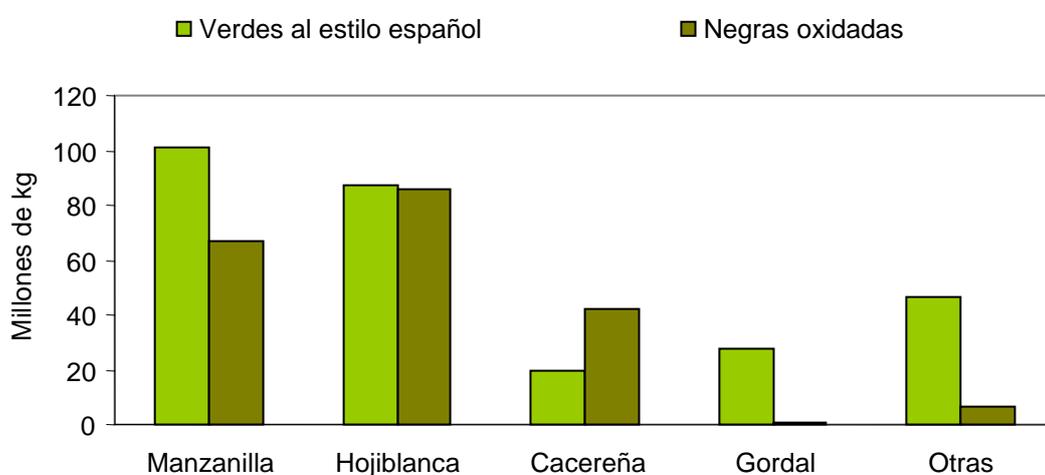
Figura 2. Producción media (millones de kg) de aceitunas de mesa durante las campañas 2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007.



Las principales variedades de aceitunas empleadas en España para su consumo de mesa son Manzanilla, Hojiblanca, Cacereña, Gordal, Morona, Aloreña y otras (Figura 3) y las dos formas comerciales más importantes en España son las verdes al estilo español y las negras oxidadas. Las primeras suponen el 58 % de las aceitunas exportadas y el resto corresponde a negras oxidadas.

En ambos tipos de aceitunas, la participación de microorganismos tanto en las etapas de elaboración como de conservación del producto es fundamental. La presencia de bacterias lácticas les confiere una estabilidad y características organolépticas muy demandadas por los consumidores, mientras que el desarrollo de otros microorganismos pueden alterar el producto.

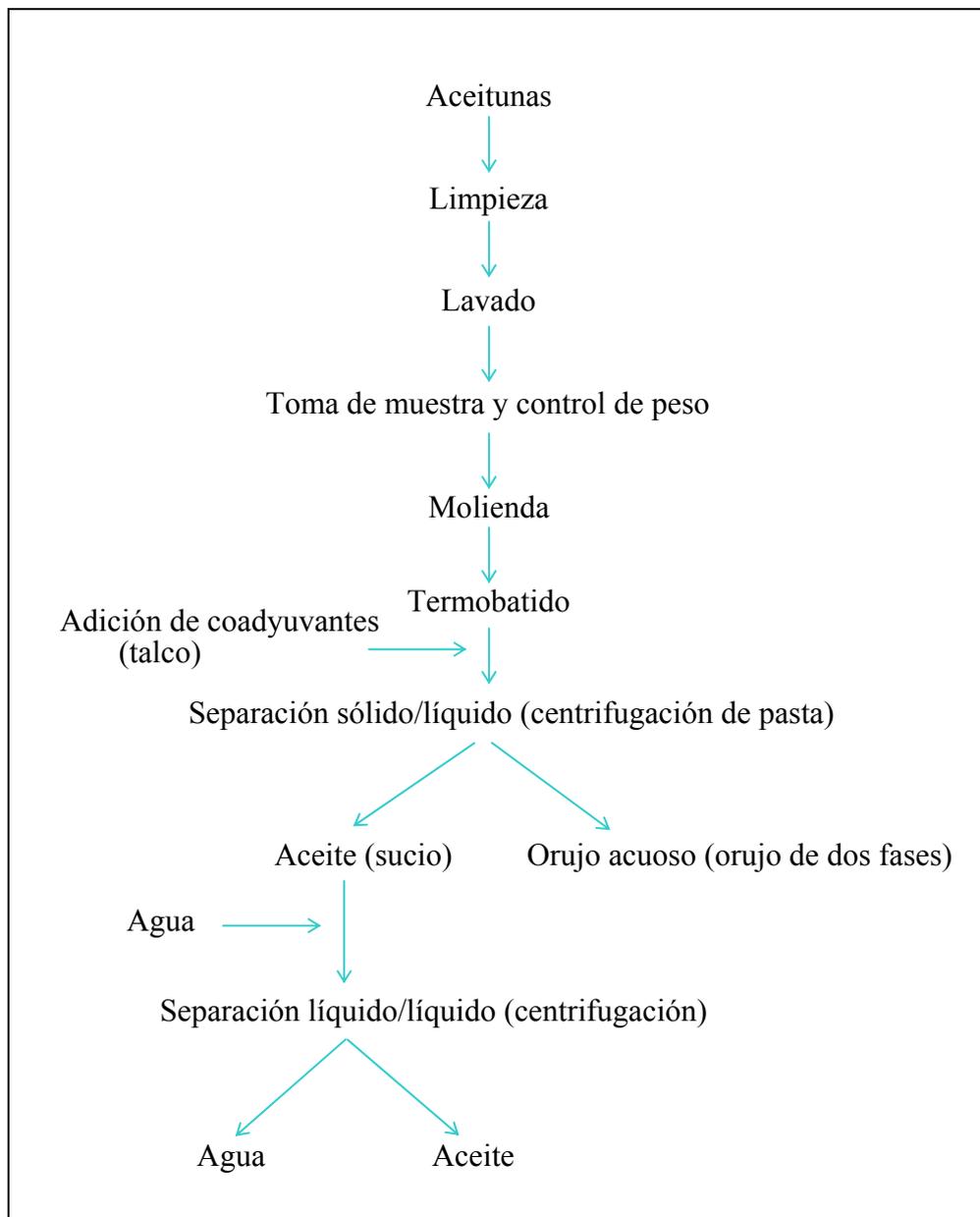
Figura 3. Producción (millones de kg) de aceitunas de mesa en España durante la campaña 2005/2006.



1.2. Elaboración de aceite de oliva

Los principios fundamentales de la extracción del aceite de oliva son los mismos que se utilizaban antes de nuestra Era: preparación de la pasta, mediante molturación y batido de las aceitunas, y separación física de la fase oleosa del resto. Se separan primero las fases sólida y líquida y de ésta se extrae el aceite. En la actualidad los sistemas modernos son los denominados continuos y el que se emplea en la gran mayoría de las almazaras de España es el conocido como de dos fases. Un esquema del proceso se recoge en la Figura 4 (Alba, 2001).

Figura 4: Elaboración de aceite de oliva por el sistema de extracción continuo de dos fases (Alba, 2001).



Los frutos suelen recogerse después de la aparición de compuestos antociánicos en los mismos y, por consiguiente, después de cambiar la coloración superficial de la aceituna hacia tonos más oscuros. En la actualidad, la recolección es un proceso muy mecanizado que permite en un número significativo de almazaras distinguir entre aceitunas procedentes de “suelo” (desprendidas del árbol) y de “vuelo” (unidas al árbol).

La aceituna que llega a las almazaras tiene un porcentaje variable de materias extrañas de muy diversa índole, tales como tierra, piedras, hojas, maderas, hierbas y restos metálicos de maquinaria agrícola, entre otros. La eliminación de estos elementos se lleva a cabo mediante el empleo de aire para los cuerpos ligeros y lavadoras con agua y cribas para los cuerpos más pesados que las aceitunas.

El primer paso necesario para obtener el aceite de oliva es la molturación de las aceitunas para destruir la estructura de los tejidos vegetales que permite la liberación de los glóbulos de aceite. (Catalano y Caponio, 1996).

El batido lento de la pasta de aceitunas es un complemento de cizallamiento de las partes insuficientemente tratadas en el molino y, sobre todo, consigue la coalescencia, en una fase oleosa continua, de las gotas de aceite dispersas en la pasta molida. (Salas y Sánchez, 1999; Angerosa y colbs., 2001).

En algunas ocasiones la estructura de la pasta dificulta la extracción del aceite (pastas difíciles), y para conseguir optimizar el proceso de extracción es necesario añadir coadyuvantes. El único permitido actualmente por la Unión Europea es el talco (silicato de magnesio hidratado), que no modifica las características químicas ni organolépticas del aceite (Cert y colbs., 1996). El empleo de ciertas formulaciones enzimáticas con alto contenido en enzimas pectinolíticas y celulolíticas da lugar también a un mayor rendimiento en el proceso de extracción de aceite de oliva aunque ello depende, en gran medida, de la variedad de aceituna, el estado de maduración de los frutos, etc. (Ranalli y Serraiocco, 1995; Ranalli y colbs., 1999c).

La separación sólido-líquido constituye una etapa fundamental en la elaboración de aceite de oliva. El sistema de dos fases origina de un lado un zumo oleoso y, de otra parte, una pasta acuosa (alperujo) constituida por el agua de vegetación (alpechín) y el resto sólido de la pulpa (orujo).

Desde muy antiguo, la separación de las fases líquidas del proceso de extracción de aceite de oliva formadas por un componente acuoso y otro oleoso se ha realizado por decantación natural en función de las diferencias de densidad que existe entre ellos. Sin embargo, este procedimiento ha sido sustituido en las almazaras actuales por las separadoras centrífugas verticales que permiten la separación de los líquidos de una

forma continua y rápida. En los sistemas de dos fases, la fase oleosa procedente del decantador centrífugo horizontal se tamiza y se somete a la acción de una centrífuga vertical donde se añade cierta cantidad de agua caliente (25-50°C) para facilitar la separación. La temperatura de este agua puede tener cierta influencia sobre la calidad del aceite obtenido (Cert y colbs., 1996).

Una vez extraído el aceite de oliva, debe conservarse hasta su comercialización, no más de 1-2 años. Hoy día esta es una práctica bastante extendida en las almazaras y la bodega en la que se conservan los aceites suele estar termostata a temperaturas entre 15-18 °C con vistas a evitar congelaciones del aceite a bajas temperaturas o aceleración de la oxidación del aceite debido a altas temperaturas (Alba, 2001).

Aunque un pequeño porcentaje del aceite de oliva virgen se comercializa “en rama”, es decir, se envasa directamente desde el depósito de almacenamiento, la mayor parte del mismo, y por supuesto todo el aceite de oliva, se somete a un proceso de filtración antes del envasado.

1.3. Elaboración de aceitunas de mesa

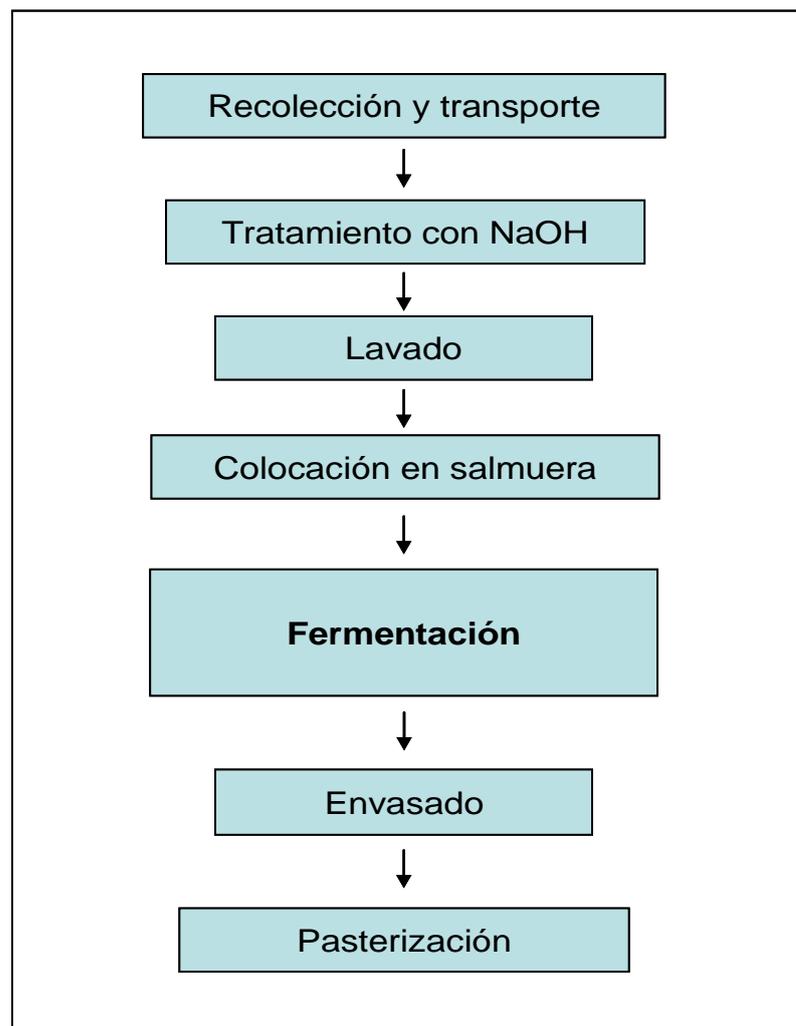
Aunque existen numerosos métodos de elaboración de aceitunas de mesa, son tres las principales preparaciones comerciales a escala mundial: verdes al estilo español, negras oxidadas y negras naturales al estilo griego.

1.3.1. Verdes al estilo español

Entre todos los tipos comerciales de aceitunas de mesa, las verdes estilo español son las más populares, siendo España el principal productor y la variedad Manzanilla la más empleada en este tipo de preparación (Garrido-Fernández y colbs., 1997). El proceso de elaboración de estas aceitunas se refleja en la Figura 5. Los frutos se recogen en los meses de septiembre y octubre cuando alcanzan una coloración verde-amarillenta y se colocan directamente en una solución alcalina de baja graduación (aprox. 2 %) o, a veces para determinadas variedades, se dejan en reposo durante unas horas antes de dicho tratamiento con objeto de evitar problemas de despellejado en el producto final.

El tratamiento con hidróxido sódico es una etapa fundamental puesto que (1) elimina el amargor de los frutos como consecuencia de la hidrólisis del glucósido oleuropeína (Brenes y de Castro, 1998), (2) permeabiliza la piel por lo que aumenta la velocidad de difusión de nutrientes a la salmuera de fermentación (Rodríguez-Borbolla y cols, 1956) y (3) transforma los compuestos clorofilicos favoreciendo la obtención de un color amarillo en el producto final (Mínguez y cols. 1989).

Figura 5. Proceso de elaboración de aceitunas verdes al estilo español



Después de dicho tratamiento alcalino, las aceitunas se sumergen en agua durante 10-15 horas y, a continuación, se colocan en una solución salina de 10-11 % de cloruro sódico (p/v). Es en esta salmuera donde se produce el desarrollo de una serie de microorganismos característicos del proceso de elaboración de aceitunas verdes al estilo español. Durante los primeros días crecen distintas especies de bacilos Gram- negativos

pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. A continuación, cuando el pH alcanza alrededor de 7 unidades, comienza el crecimiento exponencial de lactobacilos, en especial *Lactobacillus pentosus*, desarrollándose también distintas levaduras cuya presencia se mantiene hasta el final de la fermentación (Rodríguez-Borbolla y Rejano, 1979). Una vez completada la fermentación, se procede a su envasado como aceitunas enteras, deshuesadas, rellenas, etc., siendo habitual una pasterización final.

El crecimiento de bacterias lácticas en las salmueras de fermentación es fundamental para la obtención de un buen producto final. Sin embargo, a veces su desarrollo está limitado por una elevada concentración de sal en el medio y por el tipo de tratamiento alcalino. Está bien documentado que el empleo de una concentración baja de hidróxido sódico provoca la inhibición del crecimiento de las bacterias lácticas (Rodríguez-Borbolla y cols., 1969; Rodríguez-Borbolla y Rejano, 1979), lo cual se ha relacionado con la presencia de compuestos inhibidores en las mismas que no han sido eliminados por el tratamiento con hidróxido sódico.

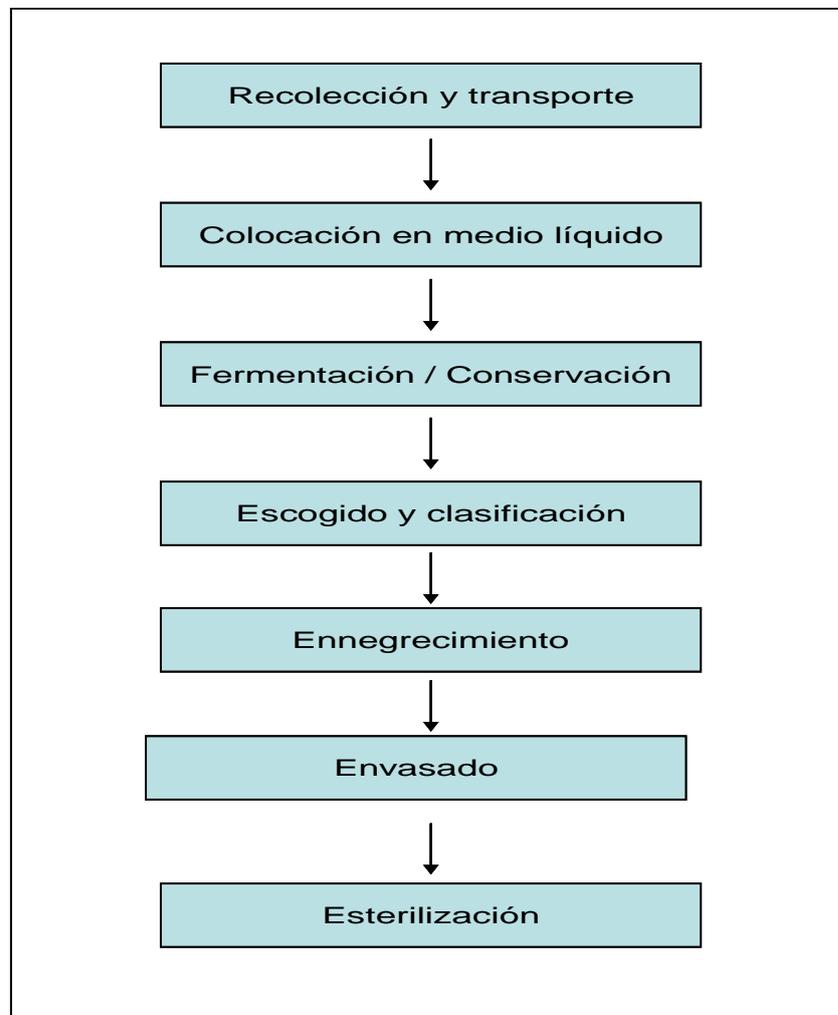
Existe una cierta inquietud científica y comercial hacia la preparación de aceitunas verdes sin tratamiento alcalino mediante el empleo de bacterias lácticas capaces de destruir/hidrolizar los compuestos responsables del amargor de los frutos (Ciafardini y cols., 1994; Ciafardini y Zullo, 2000; Servili y cols., 2006). No obstante, la presencia de inhibidores del crecimiento de estos microorganismos limita su desarrollo industrial.

1.3.2. Negras oxidadas

Son aceitunas obtenidas en los meses de octubre y noviembre de frutos con coloración superficial amarilla con ciertas tonalidades rosáceas. En la Figura 6 se refleja el proceso de elaboración de este producto. La recolección suele llevarse a cabo mediante máquinas vibradoras y los frutos se lavan y se les quitan las hojas una vez que llegan a las empresas. A continuación, se sumergen en una solución acidificada con ácido acético donde se conservan durante meses hasta la siguiente etapa, que consiste en un tratamiento con hidróxido sódico de las aceitunas y su posterior oxidación mediante aireación hasta conseguir el color negro característico de esta forma de elaboración, que se fija mediante un tratamiento con una sal ferrosa. Finalmente, el producto se envasa y

se esteriliza, ya que su baja acidez ($\text{pH} > 4,6$) no permite su comercialización sin este tratamiento térmico.

Figura 6. Proceso de elaboración de aceitunas negras oxidadas.



El líquido de conservación empleado en España durante muchos años en este tipo de elaboración de aceitunas, ha sido una salmuera acidificada con acético, mantenida bajo condiciones aeróbicas (Brenes y cols., 1986). Sin embargo, los problemas medioambientales que genera el empleo de cloruro sódico ha incitado al estudio de métodos alternativos sin la presencia de sal, aunque para ello es necesario el uso de mayores concentraciones de ácido acético (de Castro y cols., 2007).

Con ambos sistemas, los microorganismos que se desarrollan en los líquidos de conservación son levaduras (Sánchez y cols., 2006). A veces, cuando la concentración

de sal y ácido son muy bajas, y dependiendo de la variedad, también crecen bacterias lácticas (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1971).

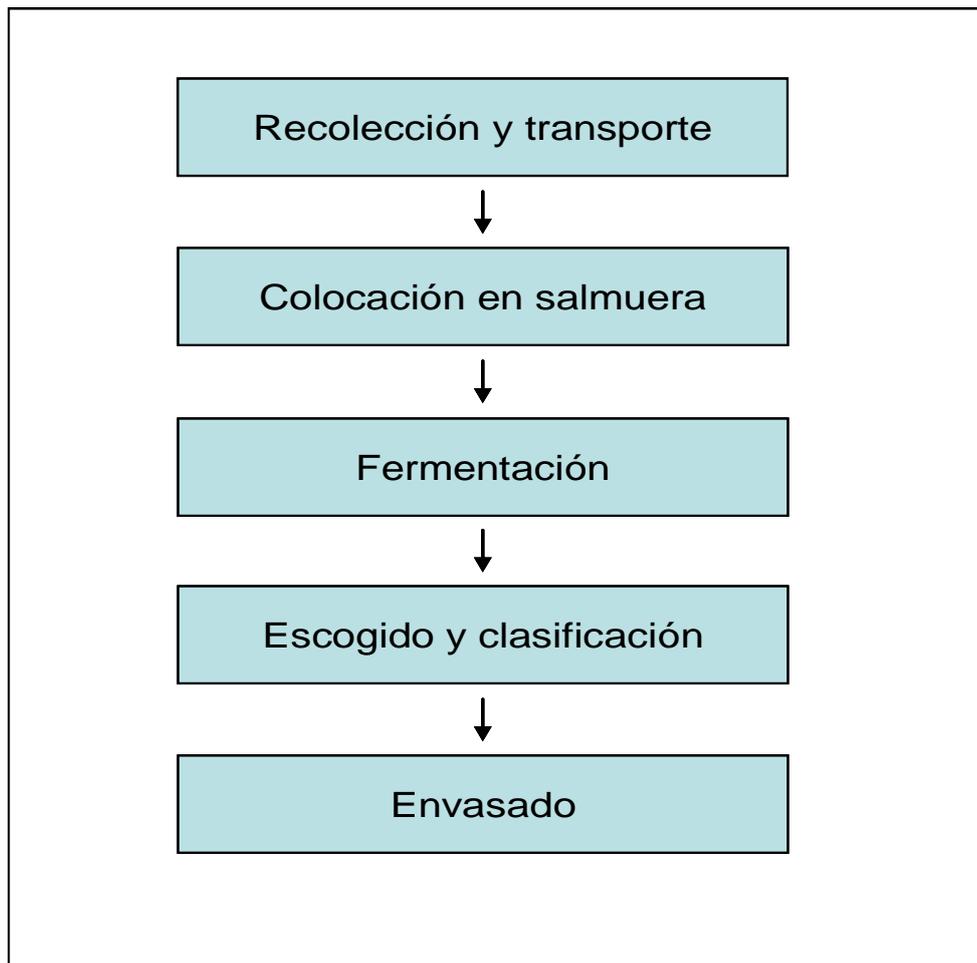
Por tanto, una alternativa al uso de sal y concentraciones elevadas de ácido para la conservación/fermentación de estas aceitunas podría ser el desarrollo de bacterias lácticas que originen una cantidad suficiente de ácido para mantener la estabilidad del producto.

Los estudios llevados a cabo hasta ahora indican que el crecimiento de bacterias lácticas en aceitunas no tratadas con hidróxido sódico y concentraciones bajas de sal es posible para algunas variedades tales como Aloreña (García y colbs., 1992), Gordal (Durán y colbs., 1991) y Conservolea (Panagou y colbs., 2003). Sin embargo, es mucho más difícil y variable para las variedades Manzanilla y Hojiblanca (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1971; Durán y colbs., 1993), probablemente debido a la presencia de compuestos inhibidores para dichas bacterias en los medios líquidos.

1.3.3. Negras naturales al estilo griego

La producción de este tipo de aceitunas es baja en España, aunque es un producto muy apreciado por los consumidores mediterráneos. Hay que indicar que este tipo de aceitunas es el tercero en importancia a escala internacional. Se les denomina naturales en muchos países puesto que son las únicas que no son sometidas a tratamiento con hidróxido sódico y desarrolla color negro de manera natural. Se recogen cuando tienen un color negro superficial y tonalidades moradas hasta casi la mitad de la pulpa. Por tanto, son unas aceitunas con una concentración baja de oleuropeína ya que la concentración de este glucósido disminuye en las aceitunas con el avance de la maduración (Amiot y colbs., 1986)

Los frutos se colocan directamente en una salmuera ligeramente acidificada con ácido acético (Figura 7). Los principales microorganismos que se desarrollan durante su permanencia en salmuera son levaduras, estando limitado el crecimiento de bacterias lácticas por la concentración de cloruro sódico empleada (Tassou y colbs., 2002). A continuación, los frutos se envasan enteros (con hueso), bien en salmueras acidificadas o al vacío, rajados, con vinagre, aceite y/o pasterizados.

Figura 7. Elaboración de aceitunas negras naturales al estilo griego.

Cuando la concentración de sal en la salmuera es muy baja, pueden crecer bacterias lácticas que acidifican el medio, bajan el pH y provocan una intensificación de las tonalidades rojas del producto frente a las negras/oscuras demandadas por los consumidores (García y cols., 1982). Aún así, se ha estudiado el crecimiento de bacterias lácticas durante la conservación/fermentación de estas aceitunas con objeto de hidrolizar la oleuropeína, acelerar el proceso fermentativo (Servili y cols., 2006) y conseguir la estabilidad del producto. De hecho, en diversos países (Australia, Perú, etc.) se persigue una fermentación láctica de estas aceitunas con vistas a evitar alteraciones producidas por otros microorganismos durante el proceso de fermentación.

1.4. Compuestos polifenólicos y oleosídicos en productos derivados de la aceituna

1.4.1. Fruto fresco

Se describió en aceitunas y hojas de olivo la presencia de un compuesto amargo al que se denominó oleuropeína con propiedades químicas parecidas a las de los taninos (Bourquelot y Vintilesco, 1908). Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XX cuando se descubrió la completa estructura de dicha sustancia (Panizzi y colbs., 1960). Como se puede observar en la Figura 8, la oleuropeína está formada por una molécula de glucosa unida mediante enlace glucosídico al ácido elenólico y éste mediante un enlace éster al ortodifenol hidroxitirosol.

La oleuropeína se considera el compuesto polifenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas (Amiot y colbs., 1986), aunque su concentración disminuye con la maduración de los frutos a la vez que aumenta la de hidroxitirosol 4-glucósido, que llega incluso a ser mayoritario en aceitunas negras maduras (Romero y colbs., 2002a).

Otros glucósidos identificados en pulpa de aceitunas son demetiloleuropeína (Ragazzi y Veronese, 1973), ligustrósido (Kubo y Matsumoto, 1984), verbascósido (Amiot y colbs., 1986), oleurósido (Kuwajima y colbs., 1988) y salidrósido (Maestro y colbs., 1994). Estas sustancias se encuentran no sólo en las aceitunas sino en la mayoría de las Oleáceas.

Entre los fenoles simples, además de hidroxitirosol y tirosol, se ha descrito la presencia en pulpa de aceitunas de los ácidos cafeico, *p*-cumárico y vanílicico (Brenes y colbs., 1992). Son numerosos también los flavonoides encontrados en pulpa fresca aunque los más ampliamente descritos han sido luteolina 7-glucósido, apigenina 7-glucósido y rutina (Vázquez y colbs., 1974). Otros flavonoides coloreados son las antocianinas, que al aumentar su concentración con la maduración de los frutos, provocan el cambio de color de amarillo a violeta y negro. En la pulpa de aceitunas maduras se han descrito diferentes tipos de antocianinas, siendo las más importantes cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido (Vázquez y Maestro, 1970, Romero y colbs., 2002b). Asimismo, nuzenida y salidrósido son dos de los compuestos fenólicos mayoritarios de la semilla de aceitunas (Maestro y colbs., 1994).

Figura 8. Estructuras químicas de compuestos fenólicos y oleosídicos presentes en aceitunas

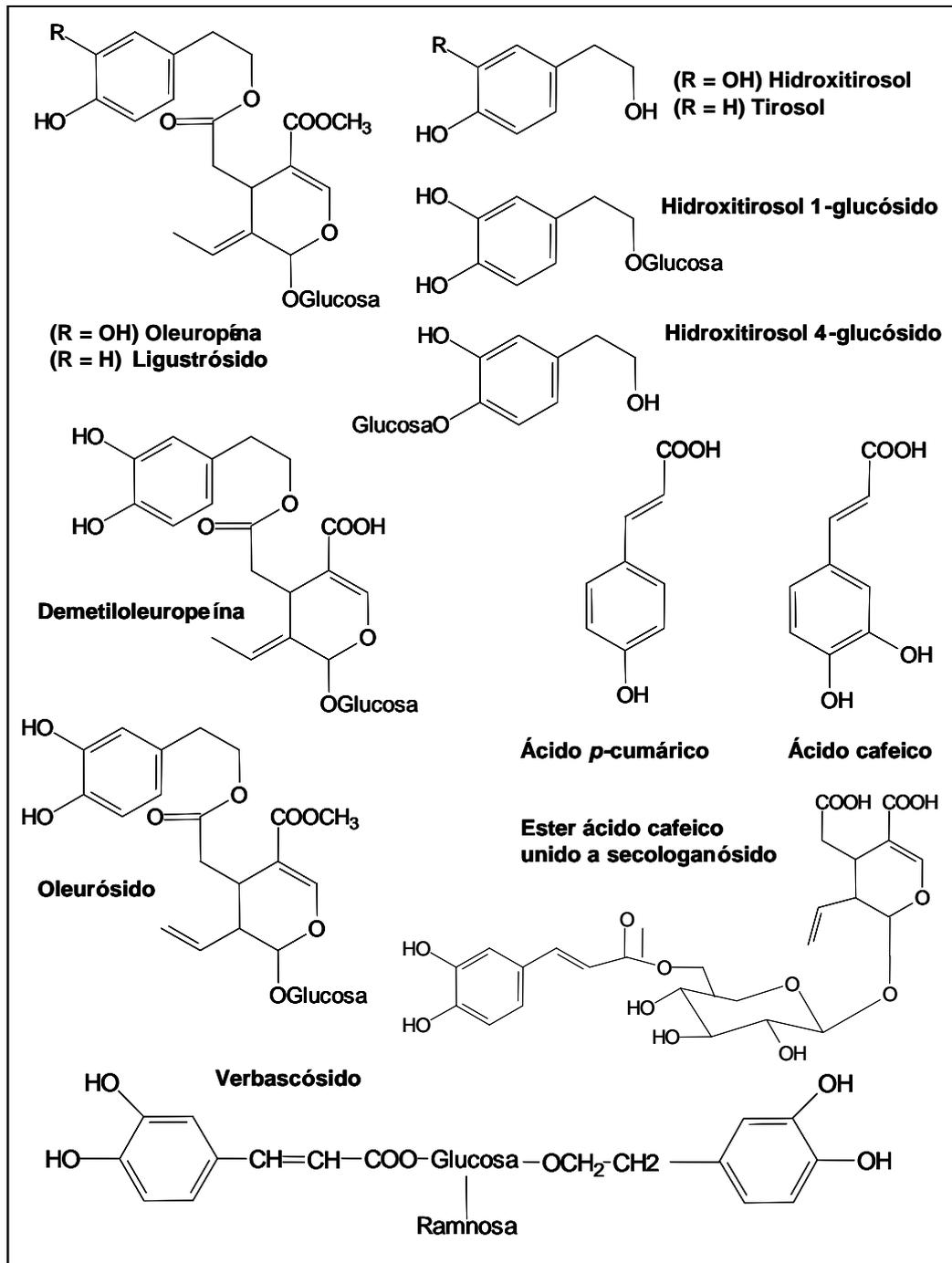
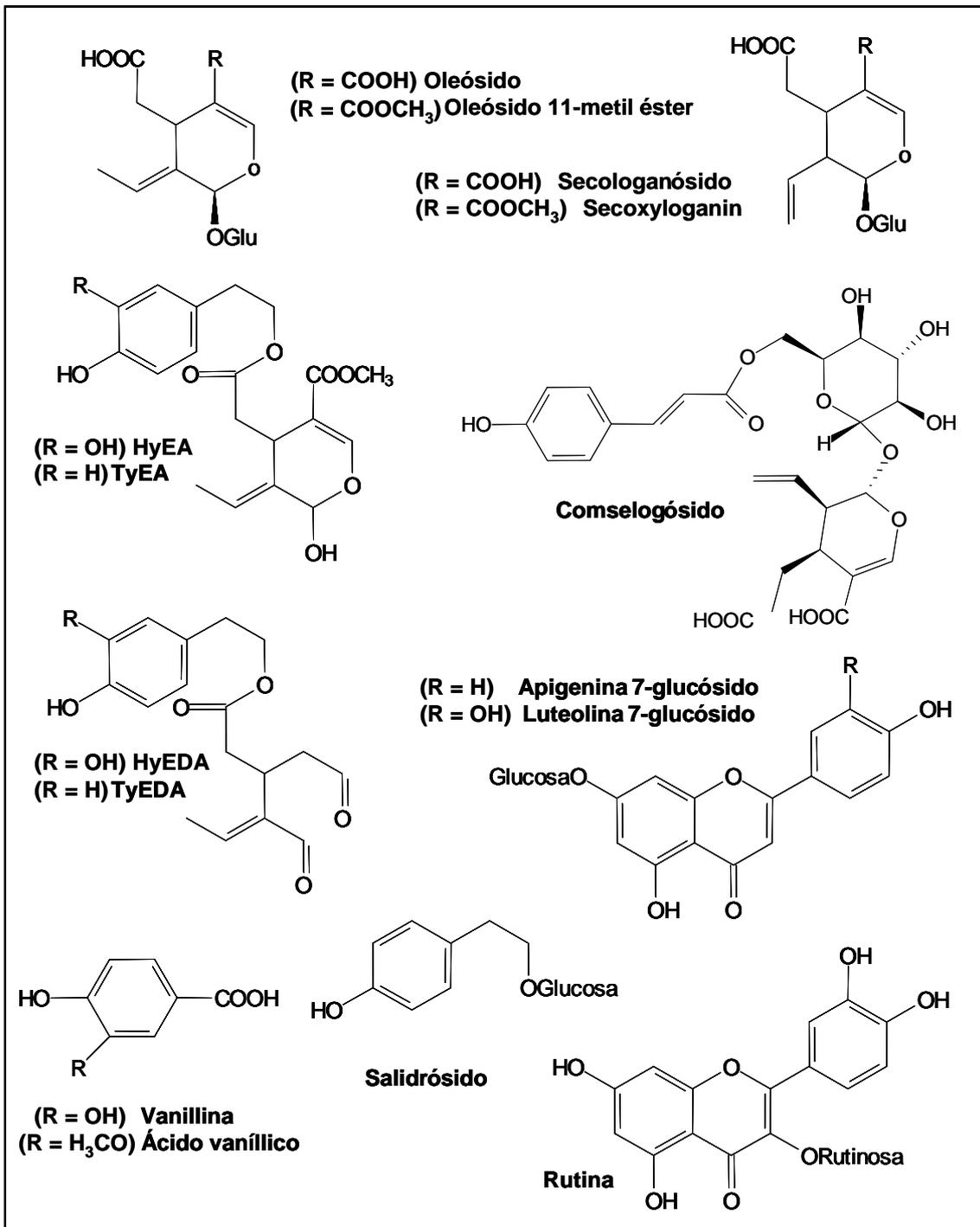


Figura 8 cont.



Igualmente, compuestos polifenólicos encontrados en pequeñas cantidades en aceitunas son vanillina, hidroxitirosol glicol y catecol (Bianchi y Pozzi, 1994; Romero y colbs., 2004b).

Recientemente se han identificado otros compuestos en aceitunas como comselogósido (Karioti y colbs., 2006), hidroxitirosol aciclodihidroelenolato (Obied y colbs., 2007), el éster del ácido cafeico unido a secologanósido (Innocenti y colbs., 2006), glucósidos de oleuropeína y dímeros de oleuropeína (Cardoso y colbs., 2006)

Asimismo, las Oleáceas contienen un elevado número de compuestos oleosídicos con o sin molécula polifenólica en su estructura. Todos proceden de la ruta del ácido mevalónico, loganin y secologanin (Damtoft y colbs., 1993). Los cuatro oleósidos sin naturaleza fenólica más ampliamente descritos en aceitunas son el oleósido 11-metil éster, oleósido, secoxyloganin y secologanósido.

1.4.2. Aceite de oliva

Los primeros experimentos realizados para la determinación cuantitativa de polifenoles en el aceite de oliva se deben a Cantarelli (1961). Estableció un método analítico colorimétrico de polifenoles totales basado en su oxidación con permanganato potásico y comprobó la influencia de la maduración de los frutos ,y de los sistemas de extracción, sobre el contenido de los aceites en dichas sustancias, así como su posible actividad antioxidante (Montedoro y Cantarelli, 1969).

En 1970, Vázquez y Maestro, establecieron un método de determinación colorimétrica de polifenoles en pulpa de aceitunas basado en la reacción con el reactivo de Folin-Denis, mucho más específico para la determinación de polifenoles que el basado en la reacción con permanganato potásico. Este método fue adaptado para polifenoles del aceite una vez extraídos mediante una solución metanólica (Vázquez y colbs., 1973).

Posteriormente, Gutfinger (1981) mejoró el método propuesto por Vázquez y colaboradores mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu. Además, propuso un método colorimétrico para analizar en los aceites sólo los compuestos ortodifenólicos.

Sobre la naturaleza de los polifenoles presentes en el aceite de oliva, los primeros estudios indicaron la posible presencia de ácido cafeico y protocatéquico mediante su identificación por cromatografía en capa fina (Montedoro y Cantarelli, 1969). Posteriormente, Ragazzi y Veronesse (1973), usando columnas de poliamida identificaron en la fracción principal el tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol). Vázquez y colbs. (1976) mediante cromatografía en capa fina indicaron la presencia de las flavonas luteolina y apigenina, además de los ácidos vanílicico y *p*-cumárico. Solinas y colbs. (1978) mediante identificación por cromatografía en capa fina encontraron en los aceites aglucona de oleuropeína.

La aparición de la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en la década de los 80 introdujo la posibilidad de separar todos los componentes fenólicos presentes en el aceite de oliva (Graciani y Vázquez, 1981). Sin embargo, no fue hasta la década de los 90 cuando el grupo de investigación liderado por el profesor G. F. Montedoro descubrió la estructura de los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva (Montedoro y colbs., 1992; Montedoro y colbs., 1993). Estos investigadores utilizaron CLAE asociada a columnas C₁₈ para la separación de los compuestos, columnas semipreparativas para aislarlos, y para su identificación usaron resonancia magnética nuclear (RMN). Como resultado de esta metodología, concluyeron que los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva eran las agluconas de oleuropeína y ligustrósido (Figura 8), junto con la forma dialdehídica de ácido elenólico decarboximetilada unida a hidroxitirosol. Posteriormente, mediante cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas Cortesi y colbs. (1995b), confirmaron la presencia en el aceite de los compuestos ya identificados y encontraron además la aglucona de ligustrósido en su forma monoaldehídica. Finalmente, Rovellini y colbs. (1997) detectaron la presencia de luteolina y apigenina en los aceites mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

En los últimos años, se ha informado de la presencia de otros compuestos fenólicos en el aceite de oliva (ácidos siríngico, homovanílicico y *o*-cumárico (Tsimidou y colbs., 1996), glucósidos de hidroxitirosol (Bianco y colbs., 1998) e incluso oleuropeína (Perri y colbs., 1999); aunque no han sido confirmados por diferentes investigadores.

1.4.3. Aceitunas de mesa

En aceitunas de mesa, por el contrario, son pocos los trabajos llevados a cabo sobre los distintos polifenoles y oleósidos, y su implicación en los procesos de elaboración, a diferencia del número elevado de trabajos sobre la importancia de estos compuestos en el aceite de oliva, alpechines y alperujos.

Una de las etapas fundamentales del proceso de elaboración de aceitunas verdes al estilo español es el tratamiento con hidróxido sódico. Éste implica la hidrólisis del enlace éster de la oleuropeína y la liberación del polifenol hidroxitirosol y el glucósido del ácido elenólico (oleósido 11-metil éster) (Brenes y colbs., 1995). Después, y debido a las condiciones ácidas generadas durante el proceso fermentativo, el oleósido es hidrolizado en ácido elenólico y glucosa (Brenes y de Castro, 1998).

Los principales cambios detectados durante la conservación/fermentación de aceitunas destinadas a negras oxidadas son la difusión de los compuestos polifenólicos desde la pulpa al medio líquido y su hidrólisis ácida (Brenes y colbs., 1993). Así, estos medios líquidos se enriquecen en hidroxitirosol, tirosol y verbascósido, entre otros. Posteriormente, el tratamiento con hidróxido sódico hidroliza la oleuropeína residual de la pulpa y el verbascósido (Brenes y colbs., 1992). Finalmente, la aireación en medio alcalino de las aceitunas provoca la oxidación y polimerización de compuestos ortodifenólicos, dando lugar al color negro característico de esta forma de preparación comercial.

En aceitunas negras naturales, los cambios en los compuestos polifenólicos durante su fermentación en salmuera son muy parecidos a los comentados para las negras oxidadas (Romero y colbs., 2004a). Es interesante resaltar la hidrólisis paulatina en el medio líquido acidificado del hidroxitirosol 4-glucósido y de las agluconas secoiridoides en la fase oleosa de la pulpa de las aceitunas.

En aceitunas verdes al estilo español, negras oxidadas y negras naturales envasadas se han encontrado como polifenoles más representativos en el jugo de los frutos hidroxitirosol, tirosol, salidrósido y verbascósido (Romero y colbs., 2004b). Por otra parte, en la fase oleosa de estas aceitunas los polifenoles más importante fueron

hidroxitirosol, tirosol, catecol, vanillina, ácido vanílico, hidroxitirosol acetilado, pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol. No se detectó la presencia de los flavonoides luteolina y apigenina ni de las agluconas secoridoides características del aceite de oliva (García y colbs., 2003), esto es, las agluconas de oleuropeína (HyEA) y ligustrósido (TyEA) y las formas dialdehídicas decarboximetiladas de las agluconas de oleuropeína (HyEDA) y ligustrósido (TyEDA).

Además de los compuestos polifenólicos y oleosídicos comentados con anterioridad, investigadores italianos han encontrado en aceitunas no tratadas con hidróxido sódico la presencia de oleósido 11-metil éster y agluconas de oleuropeína y ligustrósido (Marsilio y colbs., 2006), entre ellas la forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona de la oleuropeína (Servili y colbs., 2006).

1.5. Compuestos antimicrobianos en alimentos

A pesar del incremento en la higiene y el avance tecnológico en la elaboración de alimentos, siguen produciéndose numerosos casos de toxiinfecciones alimentarias debidas a microorganismos patógenos. Los alimentos comercializados son generalmente seguros, en cambio, los productos caseros son más sensibles a una posible contaminación microbiológica. Recientemente se han detectado patógenos virulentos, incluso en productos acidificados (Miller y colbs., 1994). Asimismo, los consumidores están evitando continuamente el consumo de productos que contengan conservantes químicos, por lo que la demanda de conservantes naturales y seguros está en aumento (Draughon, 2004).

Algunas plantas, hierbas, especias y ciertos alimentos contienen sustancias que poseen actividad antimicrobiana. Entre ellos, el vino y el té son dos de los productos con mayor actividad bactericida atribuida. Se ha evaluado la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium, *Shigella sonnei* y *Escherichia coli* en diversas bebidas (cola, cerveza, leche y vino) (Sheth y colbs., 1988) y fue el vino el que presentó mayor actividad bactericida. El etanol ha sido descartado como responsable de esta actividad al poner en contacto diversos patógenos con vino tinto y blanco durante 20 minutos de contacto (Weisse y colbs., 1995). Sin embargo, otros investigadores han atribuido esta actividad al efecto combinado del etanol, ácidos orgánicos y bajo pH (Møretø y colbs.,

2004). También se ha encontrado actividad bactericida frente a *Listeria* en el mosto de uva tinta, libre de etanol y conservantes, lo que se relacionó con la composición fenólica, en particular la fracción fenólica polimérica (Rhodes y cols., 2006). Incluso algunos fenoles simples del vino y de la uva, como ácido gálico, flavonoides, antocianinas y otros (Papadopoulo y cols., 2005; Wen y cols., 2003), han demostrado actividad antimicrobiana *in vitro*.

El té es otro de los alimentos al que se le atribuye una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y en menor medida frente a Gram-negativas (Toda y cols., 1989). Asimismo, varios estudios revelan que fracciones purificadas de catequinas procedentes de té verde y negro inhiben el crecimiento de muchas especies bacterianas (Ikigai y cols., 1993; Yam y cols., 1997). Además, las teflavinas procedentes de té negro muestran un fuerte efecto antimicrobiano frente a *Bacillus cereus* (Friedman y cols., 2006). Por tanto, parece ser que la actividad bactericida del té está relacionada con el nivel de catequinas y teflavinas.

Del mismo modo, se ha indicado que extractos de café presentan una potente acción antibacteriana frente a un amplio espectro de microorganismos (Okabe y cols., 2003; Toda y cols., 1989). La cerveza se ha considerado un producto seguro desde hace décadas frente a patógenos debido a su bajo pH y contenido en etanol (L'Anthoën y Ingledew 1996), aunque también podrían estar implicados ciertos compuestos en su estabilidad. La leche posee un sistema antimicrobiano natural, el sistema lactoperoxidasa, que ha sido utilizado en varias ocasiones para preservar la calidad de la leche cruda (Seifu y cols., 2005). Finalmente, el vinagre, debido a su alto contenido en ácido acético, es muy efectivo para prevenir el crecimiento bacteriano en alimentos (Entani y cols., 1998; Wu y cols., 2000).

Además de microorganismos responsables de enfermedades transmitidas por los alimentos, se ha demostrado *in vitro* una elevada actividad bactericida frente a *Helicobacter pylori* por parte de alimentos, hierbas y aceites esenciales (Bergonzelli y cols., 2003; Chum y cols., 2005; Stamatis y cols., 2003; Tabak y cols., 1996). Este microorganismo es el causante de la mayoría de úlceras y cánceres de estómago. Diversos alimentos han presentado actividad frente a *H. pylori in vitro*, entre otros, vino tinto, (Mahady y cols., 2003; Marimon y cols. 1998), brotes de guisantes (Ho y cols.,

2006), té verde (Matsubara y colbs., 2003) y zumo de arándanos (Burger y colbs., 2000). En muchos casos, la actividad bactericida de estos extractos de hierbas y alimentos ha sido relacionada con su contenido fenólico, en particular flavonoides (Fukai y colbs., 2002; Kim y colbs., 2006; Mabe y colbs., 1999), resveratrol (Mahady y colbs., 2003) y taninos hidrolizables (Funatogawa y colbs., 2004). El mecanismo por el cual los compuestos fenólicos afectan al crecimiento de *H. pylori* es desconocido, pero se han propuesto diferentes teorías, por ejemplo, la inhibición de la actividad ureasa (Lin y colbs., 2005), adhesión al moco gástrico humano (Burger y colbs., 2000), desintegración de la membrana externa (Nohynek y colbs., 2006) o la inhibición de la citoxina VacA que causa el desarrollo de la inflamación y la ulceración en pacientes (Ruggiero y colbs., 2006; Yahiro y colbs., 2005).

Sin embargo, estudios *in vivo* con ajo (McNulty y colbs., 2001), jalapeño (Graham y colbs., 1999), extractos de canela (Nir y colbs., 2000), brócoli (Opekun y colbs., 2005) y zumo de arándanos (Zhang y colbs., 2005) fracasaron para erradicar la infección por *H. pylori* en contra de los resultados positivos obtenidos en experimentos *in vitro*. A pesar de esto, los investigadores recomiendan el consumo de estos alimentos naturales como agentes preventivos (Mahady y colbs., 2003) o en combinación con antibióticos para combatir la infección bacteriana. (Yanagawa y colbs., 2003).

Una de las causas de la poca efectividad de estos alimentos *in vivo* frente a *H. pylori* pueden ser los cambios que sufren los compuestos fenólicos durante el tránsito estomacal. Se ha encontrado que el ambiente ácido es capaz de hidrolizar las procianidinas del cacao (Spencer y colbs., 2000), aunque también una gran estabilidad en el jugo gástrico (Ríos y colbs., 2002). El enlace éster del ácido clorogénico es asimismo estable a los valores de pH encontrados en el estómago (Olthof y colbs., 2001). Los principales compuestos fenólicos en el aceite de oliva son las agluconas secoiridoides de la oleuropeína y el ligustrósido, los cuales se hidrolizan durante el almacenamiento del aceite de oliva en fenoles simples como hidroxitirosol y tirosol (Brenes y colbs., 2001). Estos dos últimos compuestos y la oleuropeína parecen ser estables en el jugo gástrico (Gikas y colbs., 2006; Vissers y colbs., 2002) aunque no sus agluconas (Burger y colbs., 2000).

1.6. Compuestos antimicrobianos en productos y subproductos del olivo

1.6.1. Aceite de oliva

El aceite de oliva virgen es uno de los pocos aceites vegetales que se consumen sin refinar, lo que implica que, además de su contenido en triglicéridos, contiene una cantidad significativa de compuestos minoritarios bioactivos como esteroides, vitaminas, escualeno, polifenoles, etc. Entre ellos, son los compuestos fenólicos los que recientemente han recibido una atención especial debido a sus beneficios sobre la salud (D'Angelo y cols., 2005; Tuck y cols., 2002; Visioli y cols., 2005).

Se ha descubierto que estas sustancias ejercen *in vitro* una potente actividad antioxidante y pueden reducir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Visioli y cols., 2005), aunque los resultados obtenidos *in vivo* fueron contradictorios (Vissers y cols., 2004). También se han encontrado otras bioactividades como la prevención de ciertos tipos de cáncer (D'Angelo y cols., 2005; Hamdi y cols., 2005), acción anti-inflamatoria (Beauchamp y cols., 2005) y antimicrobiana (Keceli y Robinson, 2002).

A pesar del conocimiento de la actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes en el fruto del olivo (Fleming y cols., 1973), alpechín (Capasso y cols., 1995; Pérez y cols., 1992) y hojas de olivo (Markin y cols., 2003; Korukluoglu y cols., 2008), hay muy pocos estudios en el campo del aceite de oliva (Keceli y Robinson, 2002; Radford y cols., 1991). Además, estos investigadores han analizado solo los polifenoles minoritarios del aceite (fenoles simples), pero no las agluconas secoiridoides de la oleuropeína y ligustrósido y los lignanos, los cuales son los componentes mayoritarios (Montedoro y cols., 1993; Brenes y cols., 2000). Asimismo, hay numerosos artículos que describen la actividad antimicrobiana de la oleuropeína (Tassou y Nychas, 1994; Tassou y Nychas, 1995; Zanichelli y cols., 2005; Bisignano y cols., 1999; Furneri y cols., 2002), el compuesto fenólico mayoritario en el fruto de la aceituna aunque presente en muy baja cantidad en el aceite de oliva (Montedoro y cols., 1993).

Se ha atribuido también actividad microbicida a los ácidos grasos y monoglicéridos de diversos aceites frente a un amplio espectro de bacterias y levaduras

(Bergsson y colbs., 2001), lo cual podría suceder también con el aceite de oliva. Asimismo, aldehídos α , β -insaturados de cadena larga en aceitunas y en los componentes del flavor del aceite de oliva han demostrado una notable actividad frente a patógenos del tracto intestinal y del respiratorio (Kubo y colbs., 1995; Trombetta y colb., 2002; Bisignano y colbs., 2001; Battinelli y colbs., 2006).

Numerosos estudios proponen a determinados alimentos y sus compuestos fenólicos como moduladores de la microbiota del intestino, incrementando el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos y disminuyendo bacterias dañinas como los clostridios (Lee y colbs., 2001; Koo y Cho, 2004; Park y colbs., 2005). La ingestión de aceite de oliva puede por tanto contribuir a un buen equilibrio en la microbiota intestinal, si se demuestra la intervención de los compuestos polifenólicos en el crecimiento o inhibición de dichos microorganismos. A pesar del gran número de artículos publicados sobre el aceite de oliva y sus polifenoles y sus propiedades sobre la salud, ninguno se ha enfocado en la inhibición de *H. pylori*. Estudios recientes han detectado que la sustitución de grasa animal por aceite de oliva en la dieta produce una reducción significativa de úlceras gástricas en pacientes (Tait, 1986), y otros trabajos relacionan el consumo de aceite de oliva con la reducción en la secreción de jugo gástrico (Serrano y colbs., 1997).

Hoy en día, sigue siendo necesario disponer de nuevos métodos para reducir o eliminar patógenos de los alimentos y, además, cada vez son más demandados los bioconservantes procedentes de plantas, alimentos naturales (Draughon, 2004) y aceites esenciales (Burt, 2004). El aceite de oliva puede consumirse bien directamente en pan y en ensaladas frescas o bien en la preparación de platos caseros (mayonesas (Lock y colbs., 1996), pasteles, otros), atún en lata (Caponio y colbs., 2003), aliños de ensaladas (Paraskevopoulou y colbs., 2005), en alimentos cárnicos (Kayaardi y Gok, 2004), en la conservación de quesos y pescados (Tassou y colbs., 1996). Además de esto, el aceite de oliva ha sido utilizado durante siglos como conservante alimentario, en medicina tradicional y en cosmética (Anchisi y colbs., 2001), permaneciendo sus compuestos bioactivos aún sin descubrir.

1.6.2. Aceitunas de mesa

Son varios los factores limitantes del crecimiento de microorganismos en aceitunas de mesa. En primer lugar la disponibilidad de nutrientes, en especial de hidratos de carbono que actúan como sustratos de la conveniente fermentación láctica. La aceituna es un fruto con bajo contenido en azúcares, aunque suficiente para el desarrollo de microorganismos en las soluciones de conservación y fermentación de aceitunas de mesa (Montaño y cols., 1993; Garrido y cols., 1993). Sin embargo, son pocos los datos disponibles sobre el contenido pormenorizado de carbohidratos en las variedades españolas de aceitunas destinadas a mesa. Algunos investigadores han relacionado la intensidad del proceso fermentativo de las aceitunas verdes al estilo español con el contenido de azúcares en las salmueras, en concreto la mayor facilidad de fermentación láctica de las aceitunas de la variedad Gordal frente a Manzanilla (Vaughn y cols., 1943); no obstante, estudios sobre el contenido de azúcares en pulpa indican que el contenido en estas sustancias es muy similar para ambas variedades, por lo que no parece ser el factor determinante para las diferencias encontradas en el desarrollo de bacterias lácticas (Rodríguez-Borbolla y cols., 1956; García y cols., 1995). Por otra parte, la cantidad de aminoácidos (Montaño y cols., 2000) y vitaminas (Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 1995) en las salmueras de fermentación de aceitunas tampoco se considera un factor limitante para el desarrollo de estos microorganismos.

Además de los ácidos orgánicos presentes en la pulpa de aceitunas frescas y los generados en los procesos fermentativos, está permitido en aceitunas de mesa el uso de los ácidos láctico, acético, cítrico, ascórbico, sórbico y benzoico. Las formas sin ionizar de dichos ácidos y el pH que originan constituyen uno de los factores más utilizados en la industria del aderezo para controlar el desarrollo de microorganismos. Por ejemplo, el uso de elevadas cantidades de ácido acético durante la conservación de aceitunas negras oxidadas (de Castro y cols., 2007), o de los ácidos láctico y cítrico en el envasado de las aceitunas verdes al estilo español (Rodríguez-Borbolla y González-Pellisó cols., 1972). En ambos casos, el efecto combinado del pH y la acidez limitan el crecimiento de las bacterias lácticas y de otros microorganismos.

El contenido en cloruro sódico y su influencia sobre la actividad de agua (a_w) es también uno de los factores fundamentales para el control del desarrollo microbiano en

aceitunas de mesa (Tassou y colbs., 2007). La deshidratación de aceitunas negras con cloruro sódico reduce la actividad de agua a niveles inferiores a 0,80 y consigue la estabilidad microbiológica de este producto durante meses (Panagou, 2006). También, el desarrollo de microorganismos potencialmente alterantes (bacterias propiónicas) se inhibe en aceitunas verdes al estilo español mediante el incremento de la concentración de cloruro sódico después del proceso fermentativo láctico principal (Rejano y colbs., 1978). Por otra parte, existe una relación muy estrecha entre el contenido en cloruro sódico de las soluciones de conservación de aceitunas destinadas a negras oxidadas y el desarrollo de bacterias lácticas en estas salmueras (Durán y colbs., 1993). Valores bajos de sal permiten en algunas ocasiones el desarrollo de estos microorganismos (Tassou y colbs., 2002), por lo que durante la conservación de aceitunas negras se podría conseguir una fermentación láctica utilizando soluciones libres de sal y acidificadas con una baja concentración de ácido acético (Durán y colbs., 1994b).

Indudablemente uno de los parámetros más importantes para el crecimiento microbiano es la temperatura y, por ello, tiene una importancia fundamental en la elaboración de aceitunas de mesa. Así, por ejemplo, es determinante en el crecimiento de la microbiota presente en aceitunas negras al estilo griego (Tassou y colbs., 2002).

Asimismo, compuestos excretados por los microorganismos contribuyen al control de la microbiota en salmueras de aceitunas. Se ha demostrado que el crecimiento de determinadas bacterias lácticas en salmueras de fermentación de aceitunas verdes se ve favorecido por su producción de bacteriocinas, que influyen sobre el resto de la microbiota del medio (Ruiz-Barba y colbs., 1994), al igual que sucede con la producción de factor “killer” por levaduras (Llorente y colbs., 1997).

Es bien sabido que la variedad de aceituna juega un papel muy importante en la fermentación en salmuera de frutos no tratados con NaOH. Se ha estudiado que los lactobacilos son capaces de crecer en salmueras de algunas variedades de aceitunas como Gordal (Durán y colbs., 1992), Aloreña (García y colbs., 1992), Conservolea (Panagou y colbs., 2003), Leccino, (Servilli y colbs., 2006) y Ascolana tenera (Marsilio y colbs., 2005). Por otra parte, no se encuentra crecimiento de bacterias lácticas en salmueras de aceitunas de la variedad Hojiblanca (Fernández y colbs., 1992) y

Manzanilla (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1971) durante la etapa de conservación de aceitunas negras.

Finalmente, la acidificación con HCl de aguas de lavado y salmueras de fermentación de aceitunas verdes al estilo español también provoca la formación de un polímero en dichas soluciones que dificulta el crecimiento de bacterias lácticas (de Castro y colbs., 2005).

Además de todos los factores comentados anteriormente que influyen en el crecimiento de las bacterias lácticas en las salmueras y líquidos de fermentación de las aceitunas de mesa, existe la sospecha desde los inicios del aderezo de aceitunas de la presencia en estos medios de compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de los frutos (Vaughn y colbs., 1943).

Investigadores de Estados Unidos (Etchells y colbs., 1966) sugirieron a finales de los años 60 que existe un inhibidor de la fermentación láctica de aceitunas verdes al estilo español y en 1967 demostraron *in vitro* que extractos obtenidos de aceitunas Manzanillas tenían actividad antimicrobiana (Fleming y Etchells, 1967). Un año después, investigadores israelitas encontraron que existía un inhibidor de la fermentación láctica en aceitunas no tratadas con hidróxido sódico (Juven y colbs., 1968a) y lo relacionaron con la oleuropeína (Juven y colbs., 1968b). Sin embargo, Fleming y colbs. (1969) demostraron que los productos de la hidrólisis de la oleuropeína poseían mayor actividad antimicrobiana que esta misma. Ese mismo año, científicos españoles (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1969) observaron que la presencia de inhibidores en las salmueras de fermentación de aceitunas verdes al estilo español estaba estrechamente relacionada con el empleo de una concentración baja de hidróxido sódico, inferior a 1,8 %.

Las investigaciones continuaron en los años 70, y Juven y Henis (1970) comprobaron que la aglucona de la oleuropeína ejercía una mayor actividad antimicrobiana que el glucósido, hecho que confirmaron Fleming y colbs. (1973) tres años más tarde. Estos investigadores encontraron que tanto la oleuropeína como el hidroxitirosol no tenían actividad antibacteriana, a diferencia de la aglucona y el ácido elenólico. Sin embargo, no lograron detectar estos últimos inhibidores en las salmueras

de aceitunas no tratadas con hidróxido sódico. Garrido y Vaughn (1978) incluso demostraron *in vitro* que algunos microorganismos, entre ellos bacterias lácticas, podían crecer en presencia de elevadas concentraciones de oleuropeína y utilizarla como sustrato metabólico.

En 1971 Rodríguez-Borbolla y colbs. observaron con muestras de la industria que, en general, aceitunas sin tratamiento alcalino de la variedad Gordal podían fermentar por bacterias lácticas mientras que las Manzanillas no permitían el crecimiento de estos microorganismos. Asimismo, la concentración de sal en estas aceitunas no tratadas con hidróxido sódico era muy determinante para el desarrollo de la fermentación láctica. De nuevo, sugirieron la presencia de inhibidores en estas salmueras aunque su efecto podía estar modulado por la concentración de sal del medio y la variedad de aceitunas.

Los estudios sobre inhibidores de la fermentación láctica de aceitunas continuaron en los años 80 y, así, Federici y Bongi (1983) y Kubo y colbs. (1985) confirmaron *in vitro* que tanto la aglucona de la oleuropeína como el ácido elenólico tenían mayor actividad antibacteriana que la oleuropeína. No obstante, estos estudios se llevaron a cabo con extractos de aceitunas frescas y no a partir de salmueras.

Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz (1989) observaron un efecto bactericida por parte de salmueras de aceitunas Hojiblancas no tratadas con hidróxido sódico, el cual no disminuyó por el hecho de calentar dichas salmueras a 121°C durante 15 minutos. Aislaron posteriormente mediante CLAE diversos compuestos polifenólicos de estas salmueras no tratadas con hidróxido sódico (Ruiz-Barba y colbs., 1990), y encontraron actividad bactericida para el hidroxitirosol, el cual era el compuesto mayoritario en dichas salmueras. Estos resultados eran contradictorios con los obtenidos por Fleming y colbs. (1973) y la explicación dada para la actividad bactericida del hidroxitirosol era que los investigadores americanos emplearon en sus estudios medios ricos en proteínas que podían reaccionar con los compuestos polifenólicos y, así, impedir la acción antimicrobiana.

Las últimas investigaciones llevadas a cabo para intentar explicar la inhibición del crecimiento de bacterias lácticas en salmueras de aceitunas no tratadas con

hidróxido sódico se han realizado con compuestos puros aislados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (Ruiz-Barba y colbs., 1993). De la comparación entre los cromatogramas de salmueras tratadas con hidróxido sódico y no tratadas con el álcali se dedujo que luteolin-7-glucósido, verbascósido y oleuropeína eran los compuestos polifenólicos presentes en las no tratadas que podían explicar el fenómeno inhibitor. Sin embargo, los resultados *in vitro* no atribuyeron a ninguno de estos compuestos dicha actividad. Por el contrario, se confirmó de nuevo la actividad bactericida de hidroxitirosol y tirosol, aunque estos dos compuestos están presentes tanto en aceitunas tratadas como no tratadas con el álcali y, por tanto, no pueden explicar por sí solos el efecto antibacteriano de las salmueras de aceitunas no tratadas con hidróxido sódico. Los compuestos antimicrobianos de estas salmueras seguían sin ser descubiertos.

Actividad antibacteriana en los alpechines se conoce desde los años 50 (De Caro y Ligori, 1959) aunque su relación con determinados compuestos polifenólicos es más reciente (Pérez y colbs., 1992; Capasso y colbs., 1995). Sin embargo, los estudios llevados a cabo no han sido exhaustivos y no se ha correlacionado dicha actividad antimicrobiana con algún compuesto en particular o grupo de polifenoles. También se le atribuye una elevada actividad antimicrobiana a los extractos de hoja de olivo (Markin y colbs., 2003; Korukluoglu y colbs., 2008), aunque tampoco se ha demostrado cuales son los compuestos responsables de dicha actividad.

Aparte de su efecto sobre la fermentación, son numerosas las investigaciones realizadas con polifenoles de las aceitunas, principalmente oleuropeína e hidroxitirosol, con vistas a su utilización en alimentación o salud. Se ha demostrado que la oleuropeína, a concentraciones elevadas, posee actividad antibacteriana *in vitro* frente a patógenos alimentarios tales como *Salmonella enteritidis* (Tassou y Nichas, 1995) y *Staphylococcus aureus* (Zanichelli y colbs., 2005). También se ha encontrado actividad antimicrobiana frente a bacterias y virus patógenos por parte de oleuropeína e hidroxitirosol (Bisignano y colbs., 1999; Lee-Huang y colbs., 2007). Por ello, se han propuesto en numerosas ocasiones estos dos compuestos como posibles conservantes naturales de los alimentos. Hay que indicar, no obstante, que la oleuropeína tiene un sabor amargo muy intenso, lo que limitaría su uso alimentario.

2. OBJETIVOS

A lo largo de los siglos se ha estudiado el aceite de oliva y extractos de hojas de olivo para el tratamiento de múltiples enfermedades, entre ellas algunas de origen microbiano. Sin embargo, no fue hasta finales de los años 60 del siglo XX cuando los investigadores empezaron a identificar actividad antimicrobiana con determinados compuestos de las aceitunas de mesa, en primer lugar con el principio amargo llamado oleuropeína. Los estudios llevados a cabo hasta ahora, no obstante, han ofrecido resultados contradictorios sobre los compuestos inhibidores de la fermentación de las aceitunas. De otra parte, son muy escasos los trabajos sobre actividad antimicrobiana del aceite de oliva.

Debido a la demanda creciente de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud y de sustancias antimicrobianas de origen natural, los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral fueron:

- a) Identificar los compuestos con mayor actividad antimicrobiana del aceite de oliva y aceitunas de mesa.
- b) Comparar la importancia de su actividad frente a la de otros compuestos (naturales y sintéticos) y alimentos.
- c) Explicar los problemas de inhibición del crecimiento de bacterias lácticas en aceitunas de mesa.
- d) Identificar una fuente importante de compuestos antimicrobianos de origen natural en los alimentos derivados de las aceitunas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Determinación de cloruro sódico en salmueras

Se determina valorando la concentración del ión cloruro en la salmuera. Para ello, se emplea una solución de nitrato de plata (0,086 N) (Panreac, Barcelona, España), exactamente valorada, siendo necesario utilizar material de color topacio, y una solución indicadora de cromato potásico al 5 % (p/v) en agua destilada.

Se valoran 0,5 mL de salmuera, a los que se añaden 100 mL de agua destilada, con la solución de nitrato de plata, usando como indicador la solución de cromato potásico (Panreac).

3.2. Análisis microbiológico de salmueras

Las muestras de salmueras y las correspondientes diluciones decimales (en agua de peptona 0,1 % estéril) se sembraron utilizando un sembrador en espiral Spiral System model DS (Interscience, Saint Nom La Breteche, France). El recuento de Enterobacteriáceas se realizó en cristal violeta rojo neutro bilis glucosa agar VRBD (Merck, Darmstadt, Germany) con una incubación a 37 °C. El recuento de lactobacilos se realizó en MRS y el de levaduras en OGYE agar (Oxoid), ambos con una incubación a 32 °C. Las colonias se contaron a las 24, 48 o 72 horas de incubación usando un Counterstat V.3.1. (IUL Instruments, Barcelona, España).

3.3. Análisis químico de salmueras

Para la medida de acidez libre, pH y acidez combinada de las salmueras se utiliza un titulador Metrohm 670 Titroprocessor (Herisau, Switzerland). La acidez libre se determina titulando con NaOH 0,2 N hasta pH 8,3 y se expresa como porcentaje (p/v) de ácido láctico. La acidez combinada se determina con HCl 2 N hasta alcanzar un valor de 2,6 y se expresa como equivalentes de hidróxido sódico por litro.

3.4. Análisis de azúcares

Se pesan 25,0 g de pulpa de aceituna y se tritura en un vaso de batidora junto con 40-50 mL de agua destilada hirviendo y 5 mL del patrón interno (sorbitol al 7,5 %).

Se bate durante unos minutos hasta que la muestra esté completamente triturada y homogeneizada. La mezcla se distribuye en 2 tubos de teflón de 50 mL y se centrifuga a 9000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se filtra a vacío con papel de filtro a través de un embudo Büchner. Los restos de pasta que quedan en el vaso y la batidora se lavan con otros 40-50 mL de agua destilada caliente, repitiendo la misma operación descrita anteriormente. Las porciones filtradas en el kitasato se vierten en un matraz aforado de 125 mL y, finalmente, se enrasa con agua destilada. Para eliminar la posible grasa que se haya extraído, se deja reposar el extracto en frío (5 °C) hasta que se separe la fase oleosa formando una capa definida en la parte superior del matraz. Se toma una fracción de la fase acuosa, donde se encuentran los azúcares, y se hace pasar a través de un filtro de nylon de 0,20 µm de tamaño de poro.

Tanto los extractos acuosos de la pulpa de aceitunas como las salmueras se purifican mediante una resina catiónica (Amberlite IR-120) y otra resina aniónica (Amberlite IRA-96) como paso previo a su determinación mediante cromatografía de alta eficacia. Las resinas se preparan previamente, lavándolas varias veces con agua destilada (3-4 lavados) y filtrándolas al vacío a través de un kitasato.

La purificación consiste en poner en contacto 1g de resina catiónica, 1 g de resina aniónica y 2 mL de muestra para el extracto de pulpa; y 1,5 mL de muestra más 0,5 mL de patrón interno (sorbitol 0,5 %) en el caso de las salmueras. Se agita varias veces durante 30 minutos aproximadamente. Se recoge el líquido, se centrifuga 5 minutos a 9000 x g y se pasa a través de un filtro de nylon de 0,20 µm de tamaño de poro.

El sistema cromatográfico está compuesto por un equipo Waters 2695 Alliance que incluye una bomba cuaternaria, inyector automático y horno en el mismo equipo, todo el proceso controlado por el programa Millennium 32 (Waters Inc., Milford, Ma).

La columna utilizada para la separación de los compuestos fue una Phenomenex Rezex RCM-Monosaccharide Ca⁺ (8%) de tamaño 300 x 7,8 mm. La detección se realiza con un detector de índice de refracción Waters 410 durante 30 minutos. El volumen de inyección fue de 20 µL, el flujo empleado 0,6 mL/min., la temperatura de la columna 85 °C y la temperatura interna del índice de refracción 40 °C. La separación se

realiza de forma isocrática, siendo la fase móvil 100 % de agua desionizada. La cuantificación se realiza mediante el empleo de rectas de calibrado obtenidas a partir de patrones comerciales de glucosa, fructosa, sacarosa, manitol y etanol, empleando como patrón interno sorbitol. Los resultados se expresan en concentración mM.

3.5. Análisis de ácidos orgánicos en salmueras

Se diluye la salmuera 1:1 con agua destilada. Se centrifuga 5 minutos a 9000 x g y se hace pasar a través de filtros de nylon de 0,20 µm de tamaño de poro.

El sistema cromatográfico está constituido por un equipo Waters 2695 Alliance que incluye una bomba cuaternaria, inyector automático y horno en el mismo equipo, todo el proceso controlado por el programa Millennium 32 (Waters Inc., Milford, Ma).

La columna utilizada para la separación de los compuestos fue una Lichrospher 100 de 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro interno (Merck). El flujo empleado fue de 1,2 mL/min., la temperatura de la columna 28 °C y se inyectan 20 µL de muestra. La detección se realiza con un detector de fotodiodos Waters 996, controlado con el programa Millennium. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 220 nm.

La separación se realizó bajo un gradiente de elución donde las fases móviles fueron agua acidificada con ácido fosfórico (1,5 mL/L) ajustada a pH= 2,5 (A) y metanol (B). El gradiente de elución empleado fue:

Tiempo	A (%)	B (%)
0	100	0
15	100	0
20	0	100
25	0	100
30	100	0
35	100	0

3.6. Análisis de compuestos polifenólicos y oleosídicos

3.6.1. Preparación de la muestra

3.6.1.1. Fruto fresco

Se utilizó el método propuesto por Romero y cols. (2002a). Se basa en la obtención de los compuestos fenólicos presentes en los frutos mediante extracción con disolvente, purificación en columnas C₁₈ y posterior separación y análisis por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por absorbancia al ultravioleta.

Se parte de una muestra de 40-50 frutos que se tritura en un mortero bajo nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo homogéneo. Se toman 2-3 gramos de polvo y se trata 6 veces con 30 mL de una mezcla metanol: agua (80:20 v/v) a 0°C a la que se le añaden 100 ppm de la sal sódica del ácido dietilditiocarbámico.

El extracto recogido después de su separación por centrifugación (12000 x g, 5 min.) se concentra en un matraz de vidrio de 250 mL a 30 °C bajo vacío en rotavapor, el residuo acuoso se introduce en una matraz aforado de 25 mL y se enrasa con agua desionizada.

Se acondiciona una columna C₁₈ de 5 g de relleno (Waters Inc.) haciéndole pasar 30 mL de metanol seguidos de 80 mL de agua desionizada. La elución de los disolventes se facilita mediante una corriente de nitrógeno.

Se carga 1,5 mL del residuo acuoso en la columna, se lava con 100 mL de agua y se eluyen los compuestos fenólicos con 200 mL de etanol. El disolvente se evapora bajo vacío en rotavapor y se solubiliza el extracto en 1,5 mL de la mezcla metanol: agua (1:1 v/v). A continuación, se añaden 0,1 mL del patrón interno (ácido siríngico 0,2 mM en agua) a 0,4 mL del extracto. Se hacen pasar los 0,5 mL de muestra a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se inyectan 20 µL en el sistema cromatográfico.

3.6.1.2. Aceite de oliva

Se utilizó el método desarrollado por (Brenes y cols. 2002). Se pesan 0,6 g de aceite en un tubo (eppendorf) de 2 mL de capacidad, se añaden 0,6 mL de DMF (*N,N*-dimetilformamida) y se agita en vortex durante 1 minuto. Se centrifuga la mezcla a

8000 x g durante 5 minutos y con una microjeringa se recoge el extracto del fondo del tubo que se vierte en otro tubo de centrífuga de 10 mL de capacidad donde previamente se han añadido 0,5 mL de patrón interno (ácido siríngico 0,2 mM en DMF). La extracción se repite dos veces más.

Se lava el extracto final dos veces con 2 mL de hexano, se agita en vortex durante 1 minuto, se centrifuga a 8000 x g durante 5 minutos y finalmente el extracto limpio se mantiene 10 minutos bajo burbujeo de nitrógeno para eliminar los restos de hexano. Se hace pasar a través del filtro de nylon de 0,45 μm de tamaño de poro y 20 μL se inyectan en el cromatógrafo.

Para el análisis de los polifenoles en los extractos en tampón fosfato salino (PBS) de aceite de oliva se mezcla 1,5 mL del extracto acuoso con 0,41 mL de un tampón de acetato sódico 110 mM (a pH 4) conteniendo un patrón interno de ácido siríngico a 0,2 mM y se inyecta directamente la solución en el sistema cromatográfico después de haber pasado por un filtro de nylon de 0,45 μm de tamaño de poro.

3.6.1.3. Salmuera de aceitunas y jugo de aceitunas

Se mezclan 250 μL de salmuera con 250 μL de patrón interno (ácido siríngico 2 mM en agua) y 500 μL de agua desionizada. Se hace pasar a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.

3.6.2. Determinación mediante cromatografía de alta eficacia (CLAE)

3.6.2.1. Sistema cromatográfico para fenoles en pulpa

El sistema cromatográfico esta constituido por un cromatógrafo Waters 2690 Alliance que incluye una bomba cuaternaria, inyector automático y horno en el mismo equipo, todo el proceso controlado por el programa Millennium³² (Waters Inc., Milford, MA). La columna analítica es Lichrospher 100, C₁₈, (Merck, Darmstadt, Germany) de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm . El flujo es de 1 mL/min., la temperatura del horno de 35 °C y la detección se realiza con un detector de fotodiodos Waters 996 a $\lambda = 280 \text{ nm}$.

La separación se realiza bajo gradiente de elución, donde las fases móviles fueron agua acidificada con ácido fosfórico ajustada a pH= 2,5 (A) y metanol (B).

Tiempo	A (%)	B (%)
0	90	10
10	70	30
20	70	30
30	60	40
35	60	40
40	50	50
45	50	50
50	40	60
55	30	70
60	0	100
65	90	10
75	90	10

3.6.2.2. Sistema cromatográfico para fenoles en aceites, salmueras y jugo de aceitunas

El sistema cromatográfico se compone de una bomba Waters 600E, inyector automático Waters 717 plus autosampler y horno Waters (Waters Inc. Milford, MA). La columna utilizada para la separación de compuestos fue una Spherisorb analítica ODS-2 (Tecnokroma, Barcelona) de 5 μ m de tamaño de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

La separación se llevó a cabo con gradiente de elución. Las fases móviles fueron agua acidificada con ácido fosfórico (1,5 mL/L) ajustado a pH 2,5 (A) y metanol (B). El flujo de elución fue de 1 mL/min., la temperatura del horno 35 °C y se inyectó 20 μ L de muestra. El gradiente de elución empleado es el mismo que el descrito anteriormente para las pulpas.

Para la detección de compuestos fenólicos con el sistema analítico se usó un detector de fotodiodos Waters 996 y un detector de fluorescencia Jasco FP – 920 (Jasco, Tokyo, Japan) conectados en serie y controlados por el programa Millennium³² (Waters Inc.).

Para los compuestos Hy-EDA y Ty-EDA la absorbancia se midió en el ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm, luteolina y apigenina se observaron a una longitud de onda de 340 nm, 240 nm para los compuestos oleosídicos, y para el resto de compuestos fenólicos por fluorescencia a una longitud de onda de excitación a 280 nm y de emisión a 320 nm.

La cuantificación se realiza mediante el empleo de rectas de calibrado obtenidas a partir de patrones comerciales o aislados por cromatografía líquida semipreparativa, empleando como patrón interno ácido siríngico (2 mM en salmueras y jugos y 0,2 mM en aceites).

3.7. Purificación de compuestos polifenólicos y oleosídicos y determinación de nuevas estructuras químicas

3.7.1. Aislamiento

Aceites

Los polifenoles fueron extractados de un aceite de oliva virgen usando agua/metanol por el método descrito por Montedoro y cols. (1993). La columna analítica, fases móviles, gradiente y equipos fueron los mismos que para el análisis de polifenoles excepto la fase móvil acuosa que esta vez fue acidificada con HCl a pH 4. Se inyectan en el sistema 20 μ L de muestra y se colecta pico a pico las fracciones de interés. Para el control, se recoge las fracciones de una muestra de metanol. La solución obtenida de cada compuesto se evapora a vacío hasta sequedad y el residuo se resuspende en agua desionizada. Finalmente la pureza y concentración de cada compuesto fenólico se mide mediante CLAE. Se obtiene, además, un control inyectando metanol y recogiendo todas las fracciones del análisis. Se evaporan y concentran igual que para cada pico individual.

Salmueras

El aislamiento de los compuestos se hace a partir de una salmuera de aceitunas Manzanilla preparadas de manera aséptica. Se inyectan 20 μ L de salmuera en el sistema

cromatográfico y se recogen las fracciones correspondientes a los picos de interés. Esta operación se realiza las veces necesarias para obtener finalmente una solución individual de cada compuesto que se concentra a sequedad o a un mínimo volumen para obtener la concentración deseada en un rotavapor mediante bomba de vacío.

El sistema cromatográfico consta de una bomba Waters 600E con horno interno (35 °C), inyector automático Waters 717 plus autosampler, detector dual de ultravioleta Waters 2487 y colector de fracciones Waters fraction collector II (Waters Inc. Milford, MA).

Se utilizó una columna Spherisorb analítica ODS-2 (Tecnokroma, Barcelona) de 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

El volumen de inyección fue de 20 µL. El flujo de 1 mL /min., y las fases móviles fueron agua acidificada con ácido clorhídrico 2N (522 µL/L) (A), y metanol (B). El gradiente empleado fue similar al descrito en el apartado 3.7.2.

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm en el caso de los compuestos fenólicos y a 240 nm para los compuestos oleosídicos.

3.7.2. Determinación por espectrometría de masas (EM)

El sistema cromatográfico se compone de una bomba Waters 600E, horno Waters (35° C) y un detector de diodos Waters 996 acoplado a un equipo ZMD 4000 (Waters Inc.) con analizador de cuadrupolos, interfase CLAE de ionización con sonda tipo Electrospray (ESI).

La columna utilizada para la separación de compuestos fue una Spherisorb analítica ODS-2 (Tecnokroma, Barcelona) de 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, se inyectó 20 µL de muestra. El flujo generado por la bomba cuaternaria y empleado en la detección por UV fue de 1 mL/min. y de solo 0,2 mL/min. en el espectrómetro de masas. El equipo se controló mediante el programa Masslynk NT 3.4 (Waters Inc.).

La separación se llevó a cabo con un gradiente de elución similar al descrito en el apartado 3.6.2. Las fases móviles fueron agua acidificada con ácido acético (2 mL/L) ajustado a pH 3,5 (A) y metanol (B).

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm en el caso de los compuestos fenólicos y a 240 nm para los compuestos oleosídicos.

Los espectros de masas se obtuvieron en modo ión negativo con las siguientes condiciones: voltaje del capilar 3 kV; voltaje de cono 10 V; voltaje de extracción 12 V; temperatura de solvatación 250 °C y temperatura de la fuente 120 °C.

3.7.3. Determinación por resonancia magnética nuclear (RMN)

Se utilizó un equipo Bruker Ac-300P (Karlsruhe, Germany). Se inyectan compuestos puros previamente aislados. Los espectros de ^1H y ^{13}C se obtuvieron a 300 y 75,4 MHz respectivamente para todos los compuestos estudiados.

3.7.4. Hidrólisis de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA)

Una solución conteniendo la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA), obtenida como se describe en el apartado 3.7.1., se mezcla con ácido clorhídrico 4N en relación 1:1. Esta mezcla se mantiene durante 5 minutos al baño maría y posteriormente se enfría. La solución se inyecta en el CLAE antes y después de la hidrólisis.

3.8. Microorganismos y condiciones de cultivo

En la Tabla 1 se recogen los microorganismos utilizados. La mayoría de las cepas fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en Burjassot, Valencia. Otras cepas se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC) en Rockville, Maryland; y de la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG) en Gent, Bélgica. El resto de las cepas fueron aisladas de salmueras industriales de fermentación de aceitunas y de muestras de pacientes

hospitalizados. Las cepas de colecciones de cultivo fueron seleccionadas por ser las Tipos (^T) de la especie, por estar indicadas para el estudio de resistencia a antimicrobianos, o por su importancia como patógeno o alterante.

Tabla 1. Relación de cepas, origen y medios de cultivo de los microorganismos empleados.

CEPA	ORIGEN	MEDIO	CONDICIONES	T ^a (°C)
<i>Bacteroides</i> sp. 667	Hospital de Valme	BHI	Anaerobiosis	37
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CECT 870 ^T	Burjassot, Valencia	MRS	Anaerobiosis	32
<i>Candida albicans</i> CECT 1472	Burjassot, Valencia	YM	Aerobiosis	26
<i>Clostridium perfringens</i> CECT 376 ^T	Burjassot, Valencia	LB y SPS	Anaerobiosis	45
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 684 ^T	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	30
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481 ^T	Burjassot, Valencia	BHI	Aerobiosis	37
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 410 ^T	Burjassot, Valencia	BHI	Aerobiosis	37
<i>Escherichia coli</i> CECT 434	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CECT 4267	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CECT 5947	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Helicobacter pylori</i> V1	Hospital de Valme	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> V2	Hospital de Valme	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> V3	Hospital de Valme	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> V5	Hospital de Valme	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> V7	Hospital de Valme	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> LMG 18041 ^T	Gent, Belgium	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> LMG 19449 ^T	Gent, Belgium	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Helicobacter pylori</i> LMG 8775	Gent, Belgium	BB-SBF	Microaerofilia	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT 903 ^T	Burjassot, Valencia	MRS	Aerobiosis	32
<i>Lactobacillus brevis</i> BP	Salmueras industriales	MRS	Aerobiosis	32
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041 ^T	Rockville, USA	MRS	Aerobiosis	32
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	Rockville, USA Salmueras	MRS	Aerobiosis	32
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LM 51	industriales	MRS	Aerobiosis	32
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 ^T	Burjassot, Valencia	BHI	Aerobiosis	37
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032	Burjassot, Valencia	BHI	Aerobiosis	37
<i>Pichia membranifaciens</i> CECT 10482 ^T	Burjassot, Valencia	YM	Aerobiosis	26
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378 ^T	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	29
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	Rockville, USA	YM	Aerobiosis	26
<i>Salmonella enterica</i> sv. Enteritidis CECT 4156	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Salmonella enterica</i> sv. Enteritidis CECT 4300	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Shigella sonnei</i> JCP	Hospital de Valme	BHI	Aerobiosis	37
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 239	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 86 ^T	Burjassot, Valencia	CN	Aerobiosis	37
<i>Streptococcus mutans</i> CECT 479 ^T	Burjassot, Valencia	BHI	Aerobiosis	37
<i>Yersinia</i> sp. 5057655	Hospital de Valme	BHI	Aerobiosis	37

Los medios de cultivo empleados para las distintas cepas son los recomendados por las colecciones de origen. Así, para el crecimiento de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium* se emplea el caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) de la firma Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, U.K.). La infusión de cerebro-corazón (caldo BHI, Oxoid) se utiliza para *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Listeria*, *Shigella*, *Streptococcus* y *Yersinia*, mientras que las cepas de *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Staphylococcus* se cultivan en caldo nutritivo (CN) conteniendo, por litro, 5 g de extracto de carne (Lab-lemco powder, Oxoid), 10 g de peptona de carne (Pronadisa, Madrid, España) y 5 g de cloruro sódico (Panreac, Barcelona, España). En el caso de las levaduras se desarrollan en caldo YM (Difco, Sparks, MD). Para *Clostridium* se empleó un caldo de hígado (Liver Broth, Oxoid).

El aislamiento de cepas de *Helicobacter* a partir de biopsias gástricas, se lleva a cabo en el medio Columbia sangre agar (CM331, Oxoid) con un 5 % de sangre y un suplemente selectivo para *Helicobacter* (Dent, SR147, Oxoid). La identificación de los aislamientos se hace en base a la tinción de Gram, oxidasa +, catalasa + y ureasa + (Cavallaro, 2006). El crecimiento rutinario de todas las cepas de *Helicobacter* se realiza en Brucella Broth (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD 21152) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (PAA Laboratories GmbH, A-4061 Pasching, Austria) y 1,5 % de agar (Medio BB – SBF).

Para el cultivo en medio sólido se emplean los mismos caldos añadiéndoles agar al 1,5 % (Panreac), salvo para clostridios que se empleó el medio SPS (Merck). Todas las cepas se conservaron a -80 °C en sus respectivos caldos de cultivo con 20-25 % de glicerol.

Para las condiciones de anaerobiosis se utilizan jarras o cajas de anaerobios con sobres de Anaerogen (Oxoid). Las condiciones de microaerofilia para el crecimiento de *Helicobacter* se consigue mediante generadores GENbox microaer (bioMérieux). Además, la incubación de *Helicobacter* se realiza bajo condiciones de saturación de agua.

Antes de cada experimento, los microorganismos se refrescan cultivándolos dos veces durante 18-24 h a la temperatura adecuada, sembrándolos asimismo en medios sólidos para comprobar la pureza del cultivo. Para el inóculo de salmueras, los últimos caldos de cultivo con el microorganismo a estudiar incluían cloruro sódico al 3 %, con objeto de preadaptar las poblaciones al ambiente salino.

3.9. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

Las cepas de *H. pylori* fueron sometidas a pruebas de resistencia a antibióticos usando E-test (AB Biodisk, Sweden) en medio BB-SBF y COH, (Columbia agar con 5% de sangre de caballo (bioMérieux)) bajo condiciones de incubación en microaerofilia y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los antibióticos recomendados (Alarcón y cols. 2004) y probados fueron amoxicilina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina. Se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para todos los antibióticos, esto es, la concentración mínima a la cual el microorganismo interrumpe su crecimiento.

3.10. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva

3.10.1. Materia prima: aceites de oliva, bebidas y alimentos líquidos

Se han empleado aceites de diferentes vegetales y de oliva adquiridos en distintos locales comerciales. Los diferentes aceites y claves se recogen en la Tabla 2. Durante el desarrollo de las experiencias los aceites fueron almacenados en oscuridad y a temperatura ambiente.

Los alimentos utilizados se compraron en un supermercado comercial. Los productos empleados en las experiencias fueron zumos de melocotón, piña y naranja (todos con pH 4), leche de vaca (pH 7), yogurt líquido (pH 4,6), Coca-cola (pH 2,7), cerveza con 5 % de alcohol (pH 4,6), cerveza sin alcohol (pH 4,3), vino tinto (pH 3,7 y 13 % de alcohol), vino blanco (pH 3,3 y 11,5 % de alcohol), vinagre (pH 2,9 y 5 % de ácido acético), café normal y descafeinado, té verde y negro.

Tabla 2. Aceites vegetales utilizados

Aceite	Clave	Muestras
Aceite de oliva virgen variedad Picual	AOVP	3 ^a
Aceite de oliva virgen variedad Arbequina	AOVA	3
Aceite de oliva virgen variedad Manzanilla	AOVM	3
Aceite de oliva virgen variedad Cornicabra	AOVC	3
Aceite de oliva virgen variedad Hojiblanca	AOVH	3
Aceite de oliva	AO	3
Aceite de orujo de oliva	AOO	3
Aceite de girasol	AG	2
Aceite de maíz	AM	2
Aceite de colza	AC	2
Aceite de soja	AS	1
Aceite de algodón	AA	1

^a Marcas diferentes.

Para la preparación de las soluciones de café se mezcla 1,5 gramos de café o de café descafeinado soluble en polvo, con 160 mL de agua hirviendo. Los valores de pH de las suspensiones de café y café descafeinado fueron 5,3 y 5,7 respectivamente.

Las infusiones de té verde y té negro se realizaron por maceración de 2 gramos de hojas en 160 mL de agua hirviendo durante 5 minutos. Los valores de pH fueron 7,0 para el té verde y 6,0 para el té negro.

Extractos acuosos de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva se obtuvieron mezclando 5 gramos de aceite con 5 mL de solución salina (0,85 % NaCl) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifuga 5 minutos a 8000 x g, y la fase acuosa se recoge con una pipeta Pasteur. Los valores de pH para los extractos de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva fueron 3,8 y 4,1 respectivamente.

3.10.2. Actividad antimicrobiana de aceites de oliva y otros aceites vegetales comestibles

El ensayo de la actividad bactericida se basa en el método descrito por Friedman y colbs. (2003). El modelo experimental consiste en 2 mL de tampón fosfato salino (PBS, pH 7) con Tween 20 (PBST) esterilizado que se inocula con 0,1 o 0,2 mL de la cepa diana previamente diluida con solución salina (0,85 % NaCl), obteniendo inóculos iniciales de 5×10^4 y 1×10^5 UFC/mL en el caso de bacterias, y 1×10^2 , 1×10^3 y $1 \times$

10^4 UFC/mL para *Candida albicans*. El PBST se prepara mezclando 100 mM de fosfato sódico dibásico con 100 mM de fosfato sódico monobásico en una proporción 2:1, después se mezcla 1:1 con una solución de NaCl 150 mM. Finalmente el Tween 20 se le incorpora para obtener una concentración final de 0,25 % (p/p). Posteriormente, 2 mL del aceite a ensayar se le añade al tampón inoculado en el tubo de ensayo, y se mantiene durante 1 hora a 32 °C en agitación a 450 rpm en un agitador orbital GFL 3005.

Para las cepas anaeróbicas se realiza primero la mezcla tampón-aceite y los tubos de ensayo se sellan con tapones de goma. Se inyecta gas nitrógeno para desplazar el oxígeno del tubo y finalmente el inóculo se inyecta con una jeringa a través del tapón.

El recuento de células después del tratamiento se determina por siembra de las mezclas en su medio sólido apropiado, extendiendo 0,1 mL en la superficie de la placa y sembrando la dilución 10^{-1} (en agua de peptona al 0,1%) con el sembrador en espiral. Se realiza un control sin aceite, y todos los ensayos se hacen por duplicado.

Este test antimicrobiano, mezclas PBST:aceite (1:1) fue llevado a cabo frente a *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. mutans*, *L. monocytogenes*, *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. perfringens*, *Yersinia sp.*, *Bacteroides sp.*, y *S. sonnei*. Los aceites utilizados fueron los siguientes descritos en la Tabla 2: AOVP2, AOVA2, AO2, AOO1, AG1, AM1.

Además, la cepa de *S. sonnei* se ensayó frente a mezclas de tampón-aceite en las siguientes proporciones: 1:1, 1:2, y 1:4, siguiendo el mismo método. Esta experiencia fue llevada a cabo con los aceites AO2 y AOO1.

Con *E. coli* se testaron todos los aceites, y con *S. Enteritidis* también se testaron todos los aceite de oliva virgen monovarietales en la proporción tampón: aceite 4:1 (3,2 mL de tampón y 0,8 mL de aceite).

Aparte del efecto de las mezclas, se estudió el efecto antimicrobiano que ejerce la fase acuosa obtenida después de la mezcla de los aceites (AOO1 y AO2) con el tampón PBS frente a la cepa de *S. Enteritidis*. Después de 1 hora en agitación de la mezcla de 2 mL de aceite con 2 mL de tampón, se deja decantar durante 30-40 minutos

para retirar la fase acuosa libre de aceite mediante una pipeta Pasteur. Este extracto se inocula de la misma manera que anteriormente descrito (5×10^4 y 1×10^5 UFC/mL) y se mantiene en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se realiza la siembra. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.10.3. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos del aceite de oliva frente a *Listeria monocytogenes*

El efecto de los compuestos aislados y sus mezclas se ensayó frente a *L. monocytogenes* CECT 4031. De un cultivo de 18-20 horas se hacen diluciones en PBS 2x. Se añade 0,1 mL de la dilución 10^{-3} a un vial eppendorf que contiene 0,1 mL de cada compuesto aislado, se agita en vortex y se deja la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C aprox.). El recuento de células se hizo mediante la extensión directa en placa de 90 μ L y la siembra en espiral de la dilución 10^{-1} . Las placas se incuban a 37 °C en la estufa, y se cuentan las colonias a las 24 horas. El experimento se llevo a cabo por duplicado a la concentración media para cada compuesto fenólico encontrada en el extracto en tampón de los aceites de oliva vírgenes estudiados. También se prueban todos los compuestos a una concentración 250 μ M.

3.10.4. Comparación del efecto bactericida del aceite de oliva y otros alimentos líquidos

Se parte de un caldo de cultivo de 18-20 horas del que se hacen diluciones en solución salina, tomando 100 μ L como inóculo que se añaden a 4 mL de cada alimento líquido. Se mantiene en agitación ocasional en el vortex durante 5 minutos a temperatura ambiente. Estudios preliminares revelaron que la mayoría de los alimentos probados presentaban una baja actividad bactericida (zumos, productos lácteos, cervezas, Coca-Cola, cafés, té y extractos de aceite de oliva), por lo que el inóculo inicial fue $\approx 10^5$ UFC/mL en estos alimentos. Para el resto (extractos de aceite de oliva virgen, vinagre y vinos) el inóculo inicial fue de $\approx 10^6$ UFC/ml.

Se realizaron experimentos independientes con dos cepas de las especies *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. En el caso de *S. sonnei* y *Yersinia* sp. se usó una cepa de cada.

Después de 5 minutos de contacto se realiza el recuento de microorganismos mediante siembra en placa en el medio apropiado para cada uno, extendiendo 0,1 mL en superficie y sembrando en espiral la dilución 10^{-1} (en agua de peptona al 0,1 %).

3.10.5. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de mayonesas

Para la preparación de mayonesas de leche se añaden en un vaso de precipitado estéril 300 mL de aceite (aceite de girasol, aceite de oliva o aceite de oliva virgen), 150 mL de leche de vaca, 11 mL de zumo de limón natural y 1 mL de un caldo diluido de *L. monocytogenes* para alcanzar un tamaño de inóculo de 2×10^3 UFC/mL. Los componentes se mezclan usando una batidora de mano Braun MR 5000 M (Braun Española S. A., Barcelona, Spain) hasta que el aceite se emulsiona. A los 10 y 30 minutos, se toman muestras de 0,1 g que se extienden en la superficie de placas BHI agar que se incuban 48 horas a 37 °C antes de hacer el recuento.

En la preparación de mayonesas de huevo la elaboración se hace de la misma manera salvo que la leche se sustituye por dos huevos crudos enteros, y es *S. Enteritidis* el microorganismo inoculado. También se estudiaron mayonesas de huevo sin zumo de limón. Los recuentos de las células supervivientes se hicieron tras incubación de placas de agar nutritivo sembradas con 0,1 g, dejando tiempo suficiente (hasta 5 días) para confirmar ausencias de desarrollo.

3.10.6. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de ensaladas

La preparación de ensaladas se realiza con las hojas centrales de lechugas comerciales. Con el fin de eliminar del vegetal la posible microbiota epifita, se realiza un primer lavado con agua del grifo y posteriormente se sumergen en una solución de hipoclorito sódico (230 ppm) a 30-35 °C durante 15 minutos. Se corta asépticamente en tiras 50 gramos de lechuga y se mezcla con 27,5 mL de aceite (aceite de girasol, aceite de oliva o aceite de oliva virgen), 25 mL de solución salina (0,85 % NaCl) conteniendo el inóculo y 2,5 mL de zumo de limón, vinagre o agua en el caso del control. El microorganismo inoculado es *L. monocytogenes* a una concentración inicial de 2×10^3

UFC/gramo de ensalada. Todos los ingredientes se mezclan minuciosamente a mano con la ayuda de tenedores autoclavados. Después de 30 minutos desde su elaboración, la ensalada se introduce en una bolsa de un aparato homogeneizador junto a 100 mL de solución salina (0,1 % NaCl) y se agita durante 1 minuto a alta velocidad en un Seward 400 Stomacher (Seward Medical Ltd., London, U. K.). El recuento de células viables se determina sembrando en espiral 50 y 100 μ L de la fase líquida en placas BHI; tras incubación durante 48 horas a 37 °C.

3.10.7. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva y de sus compuestos polifenólicos individuales frente a *Helicobacter pylori*

Se parte de 10 g de aceite de oliva virgen (variedad Manzanilla) que se mezcla con 10 mL de PBS (pH 7) a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación ocasional. Después se centrifuga a 9000 x g 5 minutos y se recoge la fase acuosa que se empleará en el ensayo. El extracto al 5 %, 10 % y 20 % se mezcla con una suspensión bacteriana en tampón PBS de cada cepa. La densidad celular del inóculo fue de 1×10^5 UFC/mL. A los 5 minutos de contacto a temperatura ambiente, se hace un recuento en placa de BB-SBF después de una incubación de 3-6 días bajo condiciones microaerófilas a 37 °C. Cada ensayo se realiza por duplicado. También se realizan duplicados y controles sin extracto de aceite de oliva.

Con la cepa tipo de *H. pylori* LMG 19449 se realiza una curva de supervivencia a lo largo del tiempo (de 0 a 60 minutos) sometida a concentraciones de extractos de aceite de oliva al 0%, 1% y 5 %.

Por otra parte, la cepa LMG 19449 se resuspende en tampón PBS 2x y se mezcla 1:1 con los compuestos puros obtenidos por CLAE. Cada compuesto fue probado al 5 % de su concentración recogida en la Tabla 10. Después de 1 hora a temperatura ambiente se realiza el recuento en placa de BB-SBF tras incubación de 3-6 días bajo condiciones microaerófilas a 37 °C.

3.10.8. Simulación de la digestión estomacal de aceites de oliva

Para estudiar la difusión y la hidrólisis de los polifenoles del aceite de oliva, se incuban 10 g de aceite de oliva virgen Picual con 10 mL de agua acidificada con HCl alcanzando un pH 2. Esta mezcla se vierte en 6 tubos de centrifuga de 50 mL y se agita a 450 rpm en un agitador orbital GFL 3005 a una temperatura de 37 °C. Se toman 2 tubos después de 0,5, 1 y 4 horas de agitación, se centrifuga a 9000 x g durante 5 minutos, y se recoge la fase acuosa con una pipeta Pasteur. Además, se le añade a dos tubos 7400 unidades de pepsina procedente de mucus estomacal de porcino (Sigma, M.O.) y se deja durante 4 horas.

La simulación durante 30 minutos sin adición de pepsina se repitió con aceites de Arbequina, Cornicabra, Manzanilla y Hojiblanca.

Para comprobar el efecto del pH en la difusión e hidrólisis de los compuestos polifenólicos, se llevaron a cabo incubaciones durante 30 minutos a 37 °C en agua acidificada con HCl a pH 2, en un tampón de acetato sódico a pH 4 y en un tampón de fosfato sódico a pH 7.

Con objeto de simular la dilución progresiva que sufren los alimentos en el estómago, se realiza otro experimento para estudiar la influencia de la relación aceite:agua en el fenómeno de la difusión y la hidrólisis. 5 g de aceite de oliva Picual se incuba con 5 mL de agua acidificada con HCl a pH 2 durante 30 minutos a 37 °C, y se recoge una muestra de 0,1 mL. Posteriormente, 5 mL de agua acidificada se añade a la mezcla y se incuba durante otros 30 minutos a 37 °C. Se retira una nueva muestra de 0,1 mL y la secuencia se repite hasta que la relación aceite:agua es 1:4.

Inmediatamente después de cada experimento, se mezcla 1,5 mL del extracto acuoso con 0,41 mL de un tampón acetato sódico 110 mM (pH 4) conteniendo un patrón interno de ácido siríngico 0,2 mM y se mantiene a -30 °C hasta el análisis de los compuestos fenólicos. La fase oleosa también se almacena a -30 °C hasta su análisis.

3.11. Compuestos antimicrobianos en aceitunas de mesa

3.11.1. Identificación de compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con NaOH y preparadas en condiciones asépticas

3.11.1.1. Materia prima y preparación de aceitunas en condiciones asépticas

Se recogieron por recolección manual aceitunas en la provincia de Sevilla de las variedades Gordal (G1-G4) y Manzanilla (M1-M4) con un color verde-amarillento en la superficie del fruto. Se recogieron 4 partidas distintas para cada variedad procedentes de fincas diferentes durante los meses de septiembre y octubre. De cada partida de aceitunas se escogen los frutos totalmente sanos, desechando los partidos, deteriorados, pequeños o con marcas superficiales.

Con objeto de eliminar lo más posible la microbiota superficial, los frutos seleccionados se lavan en primer lugar con agua del grifo (vigorosamente, al chorro e inmersión) y posteriormente se sumergen en una solución de hipoclorito sódico (50 mg/L de cloro activo) a 35 °C durante 15 minutos (Beuchat, 1998). Para eliminar los restos de hipoclorito, se procede a dos lavados de los frutos con agua del grifo esterilizada en autoclave.

A continuación, en cabina de flujo laminar, las aceitunas se introducen en frascos ISO de 500 mL (350 g de fruto/frasco aprox.) previamente esterilizados en autoclave, los cuales se completan con salmuera estéril al 5 % de cloruro sódico y 0,5 % de ácido acético.

Se prepararon de esta forma cuatro frascos de cada una de las partidas de aceitunas, que se mantuvieron durante dos meses a temperatura ambiente antes de guardar las muestras de cada salmuera en botes estériles de 50 mL que se congelan a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para confirmar la ausencia de crecimiento microbiano en las salmueras, se realizaron siembras en superficie de 0,1 mL de muestra en medios de cultivos Plate Count Agar (Oxoid) y PBL (glucosa 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L y agar 15 g/L).

3.11.1.2. Inoculación de salmueras preparadas y conservadas asépticamente con *Lactobacillus pentosus*

En tubos estériles con 4 mL de salmuera obtenida como se explica en el apartado anterior, se inocula *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 con un tamaño de inóculo inicial entre 5,5 y 6,0 log UFC/mL, obtenido diluyendo los cultivos origen en MRS-sal con solución salina 0,85 %. El volumen de inóculo fue siempre de 0,1 mL.

A las 24 y a las 48 horas de incubación a 32 °C, se realizan siembras en MRS agar. De los tubos que no presentaban turbidez, se hace una siembra en superficie de 0,1 mL de muestra, y de las salmueras que presentaban crecimiento microbiano se siembra la dilución 10^{-4} mediante el sembrador en espiral.

3.11.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros en salmueras asépticas frente a *L. pentosus* y otros microorganismos

Los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana se realizaron en viales eppendorf estériles, donde 100 μ L de salmuera aséptica de aceitunas Gordal (G1) inoculada con el microorganismo de interés, se mezclaron con 50 μ L de una solución acuosa del compuesto a investigar.

Los microorganismos diana fueron *Enterobacter aerogenes* CECT 684, *Escherichia coli* CECT 434, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, *Pichia membranaefaciens* CECT 10482, *Leuconostoc mesenteroides* LM51, *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Enterococcus faecium* CECT 410 y *Enterococcus faecalis* CECT 481. El inóculo inicial en los 150 μ L finales fue entre 5,1 y 6,2 log UFC/mL para bacterias y entre 3,6 y 3,7 log UFC/mL para levaduras.

La mezcla se incubó 48 h a 32 °C, determinándose los microorganismos supervivientes por recuento en placa en el medio apropiado para cada uno, sembrando en superficie, por un lado, 50 μ L de muestra y, por otro lado, la dilución 10^{-1} con sembrador en espiral.

Los experimentos se realizaron al menos por duplicado y en todos ellos se incluyó un control positivo, que contenía 100 μL de salmuera de Gordal (G1) y 50 μL de un blanco obtenido por CLAE, y un control negativo con 100 μL de salmuera de Manzanilla (M1) y 50 μL de un blanco obtenido por CLAE. La obtención del blanco se realizó en las mismas condiciones que los picos aislados, recogiendo un volumen similar y sufriendo el mismo proceso de evaporación y concentración.

Con la cepa de *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, se investigaron todos los compuestos aislados: hidroxitirosol, hidroxitirosol 1-glucósido, hidroxitirosol 4-glucósido, tirosol, la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA), oleuropeína, desconocido 1, desconocido 2, oleósido, la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA), secoxyloganin, secologanósido y oleósido 11-metil éster.

Con las demás cepas, se estudiaron los compuestos: oleuropeína, hidroxitirosol y la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA). A las salmueras inoculadas con *E. coli* y *E. aerogenes* se les ajustó el pH entre 6 y 7 añadiéndoles una gota de hidróxido sódico 7 M, ya que al pH original de la salmuera (4,4) no es adecuado para su crecimiento.

3.11.2. Influencia de las sustancias antimicrobianas sobre la fermentación a escala piloto de aceitunas de mesa Gordal y Manzanilla

3.11.2.1. Materia prima y preparación de aceitunas

Se colocaron en fermentadores aceitunas de las variedades Manzanilla y Gordal con un color verde-amarillento en la superficie. En el caso de las aceitunas tratadas con NaOH, se cubren aproximadamente 1700 g de aceitunas con 1200 mL de una solución de NaOH al 1,8 % para las Gordales y 2 % para las Manzanillas, y se mantiene en la solución alcalina durante 9 h y 40 min para las aceitunas Gordales y 6 h 40 min para las Manzanillas hasta que la lejía penetra 2/3 partes de la distancia de la piel al hueso. Después del tratamiento alcalino, todas las aceitunas se lavan con agua de red durante 16 horas y luego se cubren con una salmuera del 10 % de NaCl. Por otra parte, se colocan aceitunas de las mismas partidas en fermentadores y se cubren con salmuera,

sin recibir el tratamiento con lejía. Se utilizaron dos tipos de salmuera, una con una baja concentración de sal (5 % NaCl) y otra de alta concentración (10 % NaCl). A los 7 días en salmuera, se procede a retirar 50 mL de salmuera de cada uno de los fermentadores, para la posterior modificación e inoculación en el laboratorio. Periódicamente se realizaron análisis químicos y microbiológicos de las salmueras.

Los fermentadores de aceitunas no tratados con NaOH se inocularon a los 7 días de su estancia en salmuera con una mezcla de microorganismos. Para ello, se prepararon cultivos de 18-20 h en caldos MRS con *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 14917, *L. brevis* BP y *L. mesenteroides* LM51. Posteriormente, se procede a una centrifugación del caldo, se resuspende el pellet en solución salina, y se repite la operación con objeto de lavar las células de restos del medio de cultivo. De las suspensiones finales se inocularon 5 mL de cada uno en todos los fermentadores, consiguiendo una población inicial conjunta de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL en cada fermentador. Los caldos MRS fueron modificados con NaCl para la adaptación a las condiciones salinas de los microorganismos. Se utilizó una concentración del 3 % de NaCl para inocular aquellos fermentadores con sal baja, y una concentración del 5 % de NaCl para los de sal alta.

3.11.2.2. Inoculación y modificación de salmueras por adición de extracto de levadura y medio de cultivo

A los fermentadores de aceitunas Manzanilla sin tratamiento alcalino y con sal baja citados en el apartado anterior, se les retiró salmuera a los 7 días (antes de ser inoculado), las cuales se modificaron adicionándoles diferentes cantidades de extracto de levadura para alcanzar concentraciones de 0,3; 0,6 y 2 % en la salmuera final. De la misma manera se añadió medio de cultivo MRS para obtener concentraciones en la solución final de 0,10; 0,25; 0,5 y 1 %.

Se inocularon las salmueras, modificadas o no, con *L. pentosus* ATCC 8041 para obtener poblaciones iniciales de microorganismos de $1,3 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Las salmueras se incubaron en una estufa a 32 °C. Los recuentos de las células viables se realizaron a las 48 horas mediante siembra en placa de MRS agar de 100 µL de la solución con el sembrador en espiral.

3.11.3. Relación entre la intensidad del tratamiento alcalino y la presencia de antimicrobianos durante la fermentación de aceitunas verdes estilo español

3.11.3.1. Materia prima y preparación de aceitunas verdes estilo español

Se realizaron dos experimentos (A y B) correspondientes a dos años consecutivos de campaña.

Experimento A. Se colocan en cuatro fermentadores de PVC aceitunas de la variedad Manzanilla con un color verde-amarillento en la superficie. En dos se cubren 5 kg de aceitunas con 4 L de una solución de NaOH al 2 % y se mantienen en la solución alcalina durante 7 horas hasta que la lejía penetra 2/3 partes de la distancia de la piel al hueso (cocido normal). Se preparan otros dos fermentadores con aceitunas en los que se mantienen las condiciones alcalinas durante 3,5 horas (la lejía sólo penetra hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso). La temperatura osciló entre 22 y 24 °C. Después del tratamiento alcalino, todas las aceitunas se lavan con agua de red durante 16 horas y luego se cubren con una salmuera (11 % NaCl). Cuando el pH de las salmueras pasa a estar por debajo de 7 (5 días después) se inoculan con un cultivo iniciador de *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 previamente adaptado a las condiciones de sal y lavado con solución salina. La población inicial del inóculo en cada fermentador fue $2,8 \times 10^6$ UFC/mL. Las condiciones anaerobias se alcanzan cubriendo la superficie de la salmuera con un tapón-flotador.

Experimento B. Se recogen aceitunas de la variedad Manzanilla con color verde-amarillento de una finca diferente a las del experimento A con objeto de confirmar los resultados debido a la variabilidad en la fermentación de las aceitunas de unas campañas a otras. También se utilizan dos concentraciones de NaOH para estudiar su efecto en la fermentación de los frutos, los cuales se pusieron en 8 fermentadores de PVC similares a los del Experimento A.

Se estudiaron cuatro tratamiento alcalinos diferentes: 2,2 % NaOH durante 6,5 h (la lejía penetra hasta 2/3 la distancia de la piel al hueso), 2,2% NaOH durante 4,5 h (la lejía penetra hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso), 1,7 % NaOH durante 9 h (la lejía

penetra hasta 2/3 la distancia de la piel al hueso), y 1,7 % NaOH durante 6,5 h (la lejía penetra hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso). La temperatura osciló entre 22 y 24 °C. Los siguientes pasos fueron iguales a los realizados en el Experimento A.

Dos fermentadores adicionales de PVC se llenan de aceitunas y se cubren con una salmuera acidificada (5 % NaCl y 0,5 % ácido acético) sin ningún tratamiento alcalino.

3.11.3.2. Ensayo de la actividad bactericida del oleósido 11-metil éster

Este compuesto se aisló de tres salmueras diferentes del Experimento B: (i) salmuera de aceitunas sin tratamiento con NaOH; (ii) salmuera de aceitunas tratadas con 1,7 % de NaOH con una penetración de la lejía de las 2/3 partes de la distancia de la piel al hueso; (iii) salmuera de aceitunas tratadas con 1,7 % de NaOH con una penetración de lejía hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso. Se tomaron las muestras a los 5 días de estancia en salmuera.

El aislamiento del oleósido 11-metil éster se efectuó con el mismo procedimiento descrito para el resto de los compuestos (apartado 3.7.1.).

La actividad antimicrobiana del compuesto aislado se ensayó en salmueras preparadas de manera aséptica a los dos meses de almacenamiento procedentes de aceitunas de la variedad Gordal, procedimiento descrito anteriormente. Se inocula 100 µL de salmuera de Gordal con una dilución de un cultivo en caldo MRS de 18-20 h de *Lactobacillus pentosus* para obtener, después de la adición de 50 µL del compuesto aislado, una población inicial de 6,2 log UFC/mL. La mezcla se incubó a 32 °C durante 48 horas. El recuento de supervivientes se realiza por extensión directa de 50 µL y la siembra de la dilución 10⁻¹ (en agua de peptona al 0,1 %) con el sembrador en espiral. La concentración del compuesto aislado de las distintas fuentes fue de 0,86 mM y el ensayo control se realizó con el extracto control obtenido por CLAE.

3.11.4. Compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con álcali. Experiencia industrial de conservación de aceitunas negras

3.11.4.1. Materia prima y almacenamiento industrial de aceitunas negras

Se almacenaron aceitunas de la variedad Hojiblanca, recogidas entre los meses de octubre y noviembre con una coloración verde-amarillenta, en tanques enterrados de poliéster y fibra de vidrio con una capacidad de 10000 kg de frutos y 5000 L de líquido de conservación. Las condiciones aeróbicas se consiguieron instalando una columna de aireación (De Castro y cols. 2007). Se utilizaron tres métodos de conservación: (i) 4 % NaCl (p/v), 1,2 % ácido acético (p/v) y condiciones aeróbicas (aeróbico y sal); (ii) 1,6 % (p/v) de ácido acético y condiciones aeróbicas (aeróbico); (iii) 2,4 % de ácido acético (p/v) y condiciones anaeróbicas (anaeróbico). Las aceitunas fueron conservadas en 24 tanques localizados en tres cooperativas diferentes de encurtidos de aceitunas. Los frutos se mantuvieron durante un año sin adición química alguna, salvo antes del verano que se añadió sal a los líquidos de conservación hasta alcanzar 4-5 % (p/v) de NaCl. Las muestras se tomaron periódicamente para el análisis de ácidos orgánicos y compuestos polifenólicos y oleosídicos.

3.11.4.2. Incubación de aceitunas negras, líquidos de conservación y compuestos puros

Las muestras de aceitunas conservadas para negras del apartado anterior y sus líquidos de conservación procedentes de 3 tanques, a los 7 meses de almacenamiento, se obtuvieron en el mes de mayo. Los frutos fueron almacenados en una solución acidificada libre de sal bajo condiciones aeróbicas (aeróbico). Se llenan dos frascos de 0,5 L de capacidad con aceitunas y líquido de conservación y se cierran con una tapa ajustada para reducir la evaporación del líquido y permitir el intercambio gaseoso. Además, dos muestras de líquido de conservación de aceitunas se microfiltran y nanofiltran a través de 0,22 μm y 3000 daltons de tamaño de poro respectivamente. Estas soluciones filtradas se vierten en eppendorf de 2 mL cerrados bajo condiciones asépticas. Todos los frascos y viales eppendorf se incuban en una cámara termostática a 32 °C durante 5 meses. Se toman muestras periódicamente para el análisis de fenoles y oleosidos.

A partir de uno de los líquidos de conservación de aceitunas almacenados durante 5 meses, se aíslan los compuestos EDA y Hy-EDA mediante CLAE. El procedimiento es el mismo que para el aislamiento de compuestos puros procedentes de una salmuera comentado en el apartado 3.8.1. Las fracciones recogidas de cada pico se evaporan bajo vacío hasta sequedad y el residuo se resuspende en una salmuera estéril acidificada (5 % NaCl, y 0,5 % ácido acético). Las salmueras se vierten en eppendorfs de 2 mL y se incuban de la misma manera que el comentado para las aceitunas y líquidos de conservación. Se toman muestras periódicas bajo condiciones de asepsia.

3.11.5. Antimicrobianos en diferentes variedades de aceitunas de mesa

3.11.5.1. Materia prima y preparación de aceitunas

Se recogieron frutos en las provincias de Sevilla y Córdoba. Aceitunas de las variedades Ascolana, Domat, Aloreña, Arbequina, Morona, Conservolea, Gordal, Picual, Hojiblanca, Leccino, Koroneiki, Verdial, Picholine, Cacereña, Kalamata, Galega y Manzanilla se recogieron con un color en la superficie del fruto verde-amarillento procedente de dos fincas diferentes durante los meses de septiembre y octubre. Los frutos se prepararon asépticamente de la misma manera que se describe en el apartado 3.11.1.1.

Además, se pasterizaron frutos de la variedad Manzanilla con un color verde-amarillento a 80 °C durante 5 minutos y se enfriaron en un baño con agua estéril a temperatura ambiente. Se prepararon de manera aséptica tanto aceitunas calentadas como no calentadas. Los frascos se almacenaron a temperatura ambiente durante 1, 3 y 6 meses.

3.11.5.2. Ensayo con extractos crudos de aceitunas

Frutos congelados de las variedades Gordal, Aloreña, Picual, Manzanilla, Cacereña y Kalamata se descongelan a temperatura ambiente durante 1 hora y se deshuesan. Inmediatamente, 5 g de pulpa obtenidos a partir de 10 aceitunas se mezclan con 5 mL de agua destilada, se trituran en el ultraturrax y se mantienen con agitación magnética durante 5 minutos. A continuación, la mezcla se centrifuga a 9000x g 5

minutos a 5 °C. El sobrenadante se pasa a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro, y una alícuota de 20 µL se inyecta en el cromatógrafo.

Por otra parte, aceitunas congeladas de las variedades Manzanilla, Cacereña y Kalamata se pasterizaron en un baño 90 °C durante 10 minutos, se deshuesaron y procesaron de la misma manera que las aceitunas no pasterizadas.

3.11.5.3. Experimento de pasterización de aceitunas

Se calentaron frutos de la variedad Manzanilla con un color verde-amarillento en un baño a 80 °C durante 5 minutos, y se enfriaron en de agua estéril a temperatura ambiente. Se prepararon aceitunas calentadas y no calentadas bajo condiciones asépticas como se ha comentado anteriormente, se pusieron en frascos estériles con una salmuera acidificada estéril. Los frascos se almacenaron a temperatura ambiente durante 1, 3 y 6 meses. Posteriormente, las salmueras se analizaron y se ensayó el crecimiento de microorganismos como se describe en el apartado 3.10.3.2.

3.12. Compuestos antimicrobianos de la aceituna de mesa y otros desinfectantes comerciales

3.12.1. Sustancias químicas

Los compuestos tirosol, catequina, epicatequina, timol, eugenol, carvacrol, trans-2-nonenal, ácido carnósico, glutaraldehído (GTA) y orto-ftalaldehído (OPA) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Mo). Todos ellos fueron disueltos en tampón fosfato salino (PBS, pH 7), excepto eugenol y timol que fueron disueltos en etanol y luego diluidos en PBS (4 % de alcohol). Nonenal fue disuelto en dimetilsulfósido (DMSO) y luego diluido en PBS (10 % DMSO).

La oleuropeína y el hidroxitirosol se obtuvieron de Extrasynthese (Genay, Francia) y también fueron disueltos en PBS.

Los antimicrobianos de las aceitunas se aislaron mediante CLAE analítica, según se recoge en el apartado 3.7.1. EDA y Hy-EDA se aislaron de una salmuera aséptica de aceituna Manzanilla almacenada durante 2 meses (Medina y cols., 2007), y Ty-EDA de un extracto de aceite de oliva virgen (Montedoro y cols., 1992).

3.12.2. Ensayo de la actividad bactericida de compuestos puros

Los compuestos anteriores se ensayaron frente a *P. fluorescens* CECT 378, *S. aureus* CECT 239, *E. coli* CECT 434 y *E. faecalis* CECT 481.

Se inocularon 100 μ L de las soluciones de los compuestos con 50 μ L de la dilución en PBS de un cultivo en caldo de 18-20h del microorganismo diana para obtener una población inicial entre 5×10^5 y 1×10^6 UFC/mL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se hizo una siembra de la dilución 10^{-1} (0,1 % de agua de peptona) con un sembrador en espiral.

Las soluciones de hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína se prepararon para alcanzar concentraciones finales desde 0 a 20 mM. Catequina, epicatequina, timol, eugenol y carvacrol se probaron a concentraciones entre 0 y 5 mM, y nonenal y ácido carnósico de 0 a 4 mM. También se incluyeron los controles con PBS, PBS con etanol (4 % alcohol) y PBS con DMSO (10 % DMSO).

La concentración mínima bactericida (CMB) del GTA, OPA, EDA, Hy-EDA y Ty-EDA bajo estas condiciones experimentales (5 minutos de contacto) se determinó como la concentración más baja donde no se detectaron células viables. La actividad bactericida de OPA (0,05 mM) y Hy-EDA (0,075 y 0,09 mM) también se comprobó durante 15 minutos de contacto con la cepa *S. aureus*.

Con el fin de investigar la influencia de las proteínas sobre la eficacia antimicrobiana de GTA, OPA, Hy-EDA y Ty-EDA, se modificó el procedimiento descrito anteriormente, añadiéndole 0,3 g/L ó 3 g/L de albúmina de suero bovino (BSA) a la suspensión bacteriana se *S. aureus*, simulando condiciones limpias y sucias respectivamente (European Standar EN 1276, 1997).

3.13. Análisis estadístico.

Los datos se sometieron a análisis estadístico mediante el programa Statistica (Statistica for Windows, Tulsa, OK). Los estadísticos calculados fueron medias, desviaciones estándar y errores estándar y rectas de regresión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva

4.1.1. Actividad antimicrobiana de aceites de oliva y otros aceites vegetales comestibles

La pequeña diferencia entre las poblaciones microbianas iniciales y tras una hora de contacto con los aceites, indica que ninguno de los aceites de semilla estudiados (maíz, colza, girasol, algodón y soja) mostró actividad antimicrobiana frente a los organismos ensayados (Tabla 3). Sólo en el caso de los aceites obtenidos de la aceituna se obtuvieron diferencias mayores de tres unidades logarítmicas, lo que demuestra su carácter microbicida. Indudablemente, la composición en ácidos grasos de los aceites de oliva y otros aceites vegetales de semilla es diferente y podría pensarse en esta variable como responsable de sus diferencias en actividad antimicrobiana ya que se ha encontrado dicha actividad por parte de ácidos grasos libres (Bergsson y cols., 2001). Sin embargo, la actividad bactericida mostrada por los aceites de oliva fue mayor para los aceites de oliva vírgenes, seguida por los aceites de oliva y los de orujo de oliva, el mismo orden en el que decrecen los componentes minoritarios de estos aceites, lo que apoya la participación de dichos compuestos en su actividad bactericida.

Entre los microorganismos ensayados, *C. albicans* fue el único que no se vio afectado después del tratamiento con aceites de oliva, incluso cuando la concentración inicial del inóculo fue sólo de 10^2 UFC/mL. Sorprendentemente, se ha propuesto una mezcla de miel, aceite de oliva y cera de abeja para tratar problemas de dermatitis provocados por esta levadura (Al-Waili y cols., 2005). Asimismo, un extracto de la hoja del olivo fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* después de un día de contacto (Markin y cols., 2003). Por consiguiente, cabe la posibilidad de que los compuestos activos del extracto de la hoja del olivo, principalmente compuestos fenólicos, sean diferentes a los del aceite de oliva empleados en este experimento. Sin embargo, hay que decir que el extracto de hoja de olivo fue más inhibidor contra *E. coli* que contra *C. albicans*. También se ha descrito que el aceite de oliva fue efectivo en la conservación de queso de yogur inoculado con otra levadura, *Kluyveromyces marxianus* (Keceli y cols., 1999), aunque este hecho fue atribuido a las condiciones anaerobias creadas por el aceite, ya que otros aceites vegetales también conservaron dicho queso de yogur. Por tanto, parece que el crecimiento de levaduras no es inhibido en gran medida por los compuestos fenólicos del aceite de oliva.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana (Log N₀/N₁)^a de diferentes aceites vegetales comestibles

Microorganismo ^b	Control	Aceite de oliva virgen Picual AOV2	Aceite de oliva virgen Arbequina AOVA2	Aceite de oliva AO2	Aceite de orujo de oliva AOO1	Aceite de girasol AG1	Aceite de maíz AM1
<i>L. acidophilus</i>	<0,01	>4,59	>4,59	>4,59	>4,59	<0,01	<0,01
<i>L. monocytogenes</i>	0,13 (0,03) ^c	>4,82	>4,82	>4,82	>4,82	0,07 (0,01)	0,12 (0,01)
<i>S. mutans</i>	0,24 (0,07)	>4,79	>4,79	>4,79	>4,79	0,22 (0,01)	0,31 (0,03)
<i>B. bifidum</i>	0,71 (0,07)	>4,95	>4,95	>4,95	3,81 (2,08)	0,68 (0,05)	0,70 (0,06)
<i>E. faecium</i>	0,07 (0,02)	>4,84	>4,84	>4,84	0,71 (0,10)	0,05 (0,01)	0,10 (0,01)
<i>E. faecalis</i>	<0,01	>4,94	>4,94	>4,94	3,71 (0,33)	0,07 (0,01)	0,06 (0,01)
<i>S. aureus</i>	<0,01	>4,60	>4,60	>4,60	>4,60	<0,01	<0,01
<i>C. perfringens</i>	0,36 (0,01)	>5,38	>5,38	>5,38	4,28 (0,34)	0,86 (0,01)	0,12 (0,01)
<i>S. sonnei</i>	0,07 (0,05)	2,43 (0,13)	3,47 (0,75)	1,79 (0,01)	0,31 (0,14)	0,04 (0,01)	0,04 (0,02)
<i>Bacteroides</i> sp.	<0,01	>5,11	>5,11	>5,11	>5,11	0,06 (0,03)	0,19 (0,08)
<i>Yersinia</i> sp.	0,09 (0,01)	>4,58	>4,58	>4,58	0,08 (0,03)	0,02 (0,01)	0,04 (0,02)
<i>E. coli</i>	<0,01	1,76 (0,01)	1,22 (0,01)	0,72 (0,01)	0,39 (0,07)	0,15 (0,01)	0,18 (0,01)
<i>S. Enteritidis</i>	0,44 (0,05)	>5,11	>5,11	2,67 (0,16)	0,59 (0,04)	0,58 (0,01)	0,56 (0,01)
<i>C. albicans</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

^a N₀= UFC/ml inoculado; N₁= UFC/ml después de 1 hora. ^b El inóculo inicial fue aprox. 10⁵ UFC/ml para todos los microorganismos excepto *C. albicans* que fue 10² UFC/ml. ^c Desviación estándar.

En cuanto a las bacterias, la mayor parte de éstas no sobrevivieron después de una hora de contacto con los aceites de oliva vírgenes de las variedades Picual y Arbequina (Tabla 3). Sólo dos Gram-negativas, *S. sonnei* y *E. coli*, lograron sobrevivir aunque disminuyó su número. De los datos recogidos en la Tabla 3 se deduce también una tendencia a ser más activos los aceites de oliva frente a microorganismos Gram-positivos que frente a Gram-negativos. De hecho, hay datos contradictorios en la literatura científica cuando se ensayaron compuestos naturales frente a un amplio espectro de microorganismos. Por ejemplo, los compuestos fenólicos procedentes de extractos de baya inhibieron preferentemente el crecimiento de bacterias Gram-negativas (Puupponen-Pimiä y cols., 2001), y lo contrario sucedió para los fenoles de aceites esenciales (Burt y cols., 2004).

Por otra parte, los aceites de oliva mostraron actividad bactericida frente a *E. coli* y *C. perfringens*, microorganismos que crecen en el tracto intestinal y que no se consideran especialmente beneficiosos para la salud humana. Muchos extractos de plantas (Park y cols., 2005) y alimentos como el té (Koo y Cho, 2004) pueden mejorar la microbiota intestinal inhibiendo microorganismos dañinos pero también promoviendo y manteniendo los beneficiosos como las bacterias productoras de ácido láctico. No obstante, los aceites de oliva también ejercieron actividad bactericida frente a los microorganismos beneficiosos *L. acidophilus* y *B. bifidum*. A pesar de que estos resultados hayan sido obtenidos *in vitro*, y los componentes inhibidores del aceite de oliva se pueden transformar durante la digestión, este hecho sugiere que el crecimiento de la microbiota intestinal, incluyendo *Bacteroides* sp., puede verse influenciado por el consumo de aceite de oliva, aunque, desde luego, ello dependerá de la cantidad de aceite ingerido. Parte, al menos, de los compuestos bioactivos como los polifenoles son absorbidos antes de alcanzar el colon (Scalbert y cols., 2002; D'Angelo y cols., 2001; de la Torre-Carbot y cols., 2007) y éstos incluso son transformados por la microbiota intestinal (Simons y cols., 2005).

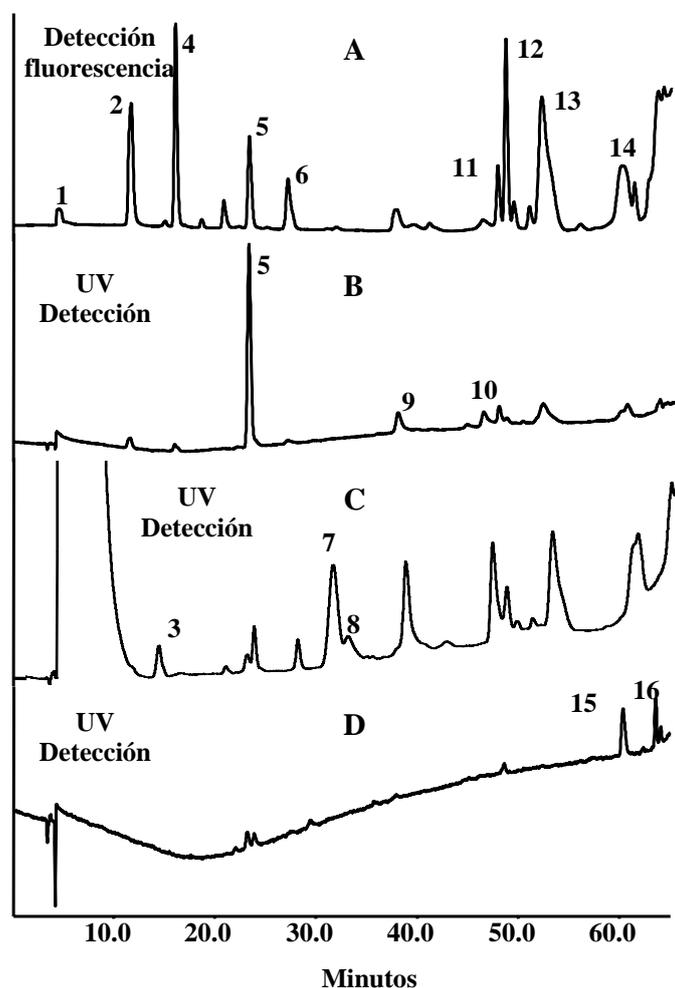
Entre los alimentos que pueden inhibir el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* se ha citado el té (Koo y Cho, 2004) y muy recientemente el aceite de oliva (Pretty y cols., 2003). Los investigadores han encontrado que un dentífrico, con aceite de oliva en su formulación, podría disminuir tanto el crecimiento bacteriano como la adherencia de los microorganismos. En nuestro caso, se ha observado un potente efecto

bactericida de todos los tipos de aceite de oliva frente a *S. mutans* (Tabla 3), incluso el aceite de orujo de oliva eliminó a las bacterias inoculadas. Pretty y cols. (2003) propusieron la necesidad de nuevos estudios a largo plazo para correlacionar mejor el uso de un dentífrico con aceite de oliva en su formulación con la salud gingival. Sin embargo, a la vista de los resultados, pensamos que este estudio debería ser llevado a cabo directamente con aceite de oliva ya que su simple consumo podría influir en la microbiota oral.

Otro objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite de oliva frente a patógenos presentes en los alimentos. En este sentido, el aceite de oliva virgen, el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva mostraron un efecto bactericida significativo frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Yersinia* sp., y más débil frente a *S. Enteritidis* y *S. sonnei* (Tabla 3). Estos resultados confirman las presuntas propiedades antimicrobianas del aceite de oliva que científicamente no habían sido demostradas. Por lo tanto, se abre la posibilidad de usar los aceites de oliva como conservantes de alimentos para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos o retrasar la caducidad de alimentos. Raford y cols. (1991) y Lock y Board. (1996) relacionaron la inhibición del crecimiento de patógenos en alimentos con el empleo del aceite de oliva. En estos trabajos, ellos observaron un índice de mortalidad más rápido para *S. Enteritidis* en mayonesa hecha con aceite de oliva virgen que en la preparada con aceite de girasol, aunque atribuyeron este efecto a la elevada acidez así como a los polifenoles totales del aceite de oliva. Sin embargo, estos estudios se realizaron antes de que fueran descubiertos los compuestos fenólicos principales en el aceite de oliva: las agluconas secoiridoides de oleuropeína y ligustrósido (Montedoro y cols., 1993) y los lignanos (Brenes y cols., 2000), por lo que no fueron analizados.

Teniendo en cuenta la elevada actividad antimicrobiana detectada *in vitro* para los diferentes aceites de oliva y que ésta fue mayor en los vírgenes que en los de oliva o de orujo, las investigaciones se centraron en los compuestos polifenólicos como responsables de dicha actividad. Hay que tener en cuenta que los polifenoles son sustancias a las que se les atribuye en la literatura científica una elevada actividad antimicrobiana (Toda y cols., 1989; Ikigai y cols., 1993; Yam y cols., 1997; Wen y cols., 2003).

Figura 9. Cromatograma obtenido por CLAE de compuestos fenólicos y oleosídicos de un aceite de oliva virgen de variedad Hojiblanca. La detección por fluorescencia fue a 320 nm (excitación a 280 nm) (A) y la detección al ultravioleta fue a 280 nm (B), 240 nm (C) y 320 nm (D). Picos: (1) hidroxitirosol glicol; (2) hidroxitirosol; (3) ácido elenólico A; (4) tirosol; (5) patrón interno, ácido siríngico; (6) hidroxitirosol acetato; (7) ácido elenólico B; (8) ácido elenólico oxidado; (9) forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona de la oleuropeína; (10) forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona del ligustrósido; (11) 1-acetoxipinoresinol; (12) pinoresinol; (13) aglucona de oleuropeína; (14) aglucona del ligustrósido; (15) luteolina; (16) apigenina.



El análisis de los polifenoles en los diferentes tipos de aceite de oliva se realizó por CLAE (Figura 9). La mayoría de ellos han sido previamente caracterizados en aceite de oliva (Montedoro y colbs., 1993; Brenes y colbs., 2000, Artajo y colbs., 2006) excepto el hidroxitirosol glicol (3,4-dihidroxifenilglicol) (Visioli y Galli, 2002). Este

compuesto fue el primero detectado en el agua de vegetación de los frutos de aceituna (Bianchi y cols., 1994), aunque nunca antes en aceite de oliva. Este pico eluye a 4,2 minutos con un máximo de absorbancia a 280 nm como el hidroxitirosol y en el espectro de masas muestra el ión molecular a 167 y un fragmento a 151 uma. Todos estos datos fueron comparados con el de un estándar comercial y la presencia de hidroxitirosol glicol fue confirmada en la mayoría de los aceites.

Otros compuestos identificados en aceite de oliva por CLAE-EM, y con propiedades antimicrobianas (Renis y cols., 1970) fueron los oleósidos del ácido elenólico A (m/z 241) y B (m/z 241), y el ácido elenólico oxidado (m/z 258). Todos ellos mostraron un espectro de absorbancia al UV con un máximo entre 230 y 240 nm. Éstos han sido detectados antes en el aceite de oliva usando CLAE-EM (Rovellini y Cortesi, 2002), aunque su caracterización estructural completa es difícil de obtener debido a su inestabilidad.

Como cabría esperar, los principales compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen fueron las agluconas de oleuropeína y ligustrósido (Tabla 4), seguido por los fenoles simples hidroxitirosol, tirosol, hidroxitirosol acetato y lignanos (García y cols., 2003). El hidroxitirosol glicol, identificado recientemente, fue encontrado a una concentración menor a 35 $\mu\text{mol/kg}$ aunque mayor que las detectadas para los flavonas luteolina y apigenina.

Asimismo, se encontraron grandes diferencias en la composición fenólica entre aceites de diferentes variedades de aceitunas y por supuesto diferencias significativas entre aceites de oliva virgen, aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. El aceite de orujo de oliva tuvo una concentración significativamente menor en polifenoles totales que el resto de los aceites (test de Duncan de rango múltiple), seguido del aceite de oliva, aunque no estadísticamente diferente de la concentración en los aceites de Hojiblanca y Arbequina. Los aceites de oliva virgen de las variedades Manzanilla y Cornicabra presentaron una significativa mayor concentración en los polifenoles totales que otros aceites de oliva monovarietales. Estos resultados explican la necesidad de especificar el tipo de aceite de oliva e incluso la composición fenólica de los aceites cuando se ensayen frente a microorganismos.

Tabla 4. Compuestos fenólicos ($\mu\text{mol/kg}$) en los aceites de oliva estudiados

Aceite	Compuesto												Total
	Hy	Ty	Hy-EDA	Ty-EDA	Hy-Ac	Hy-EA	Ty-EA	1-AcPinor	Pinor	Luteolina	Apigenina	Hy-G	
AOVP1 ^a	176,8	52,3	923,4	202,6	500,4	622,7	253,6	18,7	154,2	6,3	1,4	26,9	2939,3
AOVP2	147,3	75,0	437,6	157,6	51,5	783,5	454,5	8,7	109,1	9,4	2,4	31,9	2268,5
AOVP3	14,4	56,1	41,6	167,2	37,8	391,3	348,2	3,9	144,3	5,3	1,3	14,6	1226,0
AOVA1	95,4	43,4	385,7	164,7	198,7	87,4	21,1	187,1	116,7	14,7	3,7	12,3	1330,8
AOVA2	179,6	59,9	559,4	179,8	202,6	85,0	17,5	133,9	107,6	13,7	4,4	14,3	1557,8
AOVA3	44,5	26,2	443,8	48,4	440,0	84,5	13,4	269,1	132,8	29,1	5,9	32,9	1570,7
AOVM1	145,8	65,2	802,7	209,0	105,4	1217,6	644,3	6,4	101,0	8,3	3,8	11,4	3320,9
AOVM2	479,6	159,4	740,5	283,5	130,8	535,8	249,6	72,2	52,7	12,0	5,2	8,8	2730,0
AOVM3	317,2	158,4	1427,0	364,0	213,7	852,2	355,2	83,1	52,4	11,7	5,4	10,1	2850,5
AOVC1	164,1	54,1	1332,7	427,1	1,5	778,6	497,2	9,2	104,4	1,3	0,5	10,8	3381,3
AOVC2	295,4	128,6	420,2	216,9	27,7	293,7	168,8	25,5	127,7	3,5	1,3	26,0	1731,3
AOVC3	342,7	123,5	559,8	258,1	ND	558,0	181,2	39,1	158,9	11,3	1,5	22,8	2256,9
AOVH1	116,6	33,6	337,7	110,4	95,4	373,9	179,5	53,3	46,0	10,2	3,9	12,9	1373,3
AOVH2	159,2	121,6	296,2	160,2	51,9	454,2	240,8	54,4	86,0	11,9	5,1	16,4	1657,9
AOVH3	87,9	34,1	358,1	101,9	64,9	309,6	145,8	52,7	76,5	8,5	2,0	2,8	1244,8
AO1	137,7	55,3	216,3	122,4	76,4	402,9	213,6	5,4	63,5	3,0	0,8	31,7	1328,8
AO2	91,6	53,9	248,1	116,7	58,5	390,5	173,3	50,5	105,2	7,3	2,0	ND ^c	1297,7
AO3	89,9	29,3	196,8	101,7	135,5	204,9	111,6	4,5	63,0	2,5	0,8	12,6	953,3
AOO1	23,5	8,7	13,3	17,2	7,1	68,1	41,3	0,1	8,2	ND	ND	ND	187,6
AOO2	ND	ND	ND	ND	ND	16,8	10,1	20,8	1,9	6,2	0,9	0,4	57,3
AOO3	1,2	ND	ND	ND	ND	16,2	7,9	4,6	3,4	5,4	0,9	0,4	40,0

^a Ver **Tabla 2** para la identificación de los aceites. ^c No detectado.

Pues bien, los efectos bactericidas de todos los aceites vegetales frente a *E. coli* y de los aceite de oliva virgen frente a *S. Enteritidis* se representa en las Figuras 10 y 11 respectivamente.

Figura 10. Efectos de diferentes aceites vegetales en la viabilidad de células de *E. coli* después de una hora de contacto con la mezcla de tampón/aceite (1:1). Las barras indican los errores estándar del valor. Ver Tabla 2 para la identificación de los aceites.

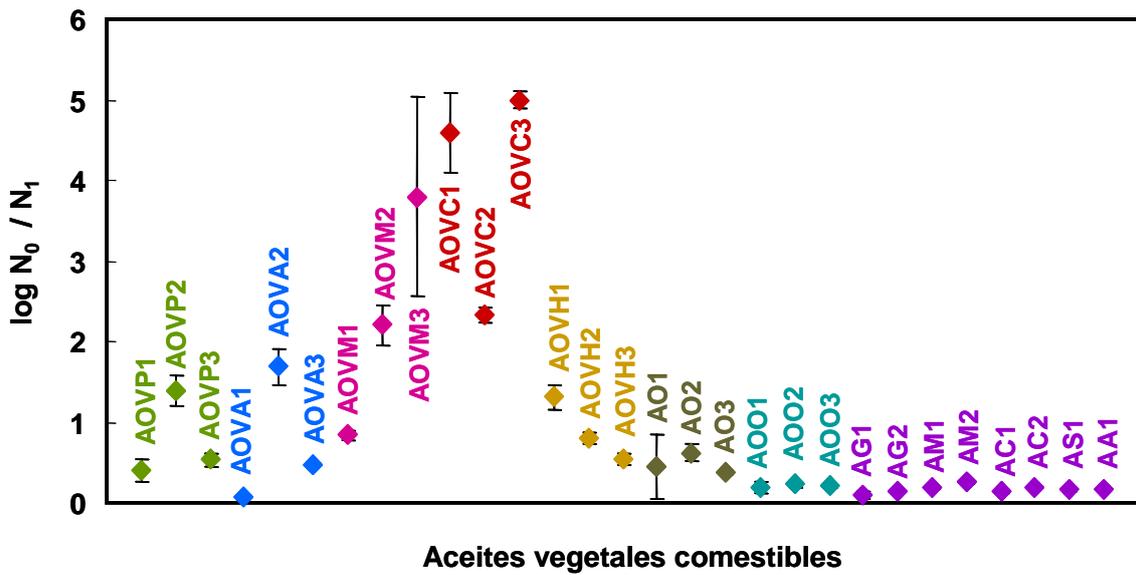
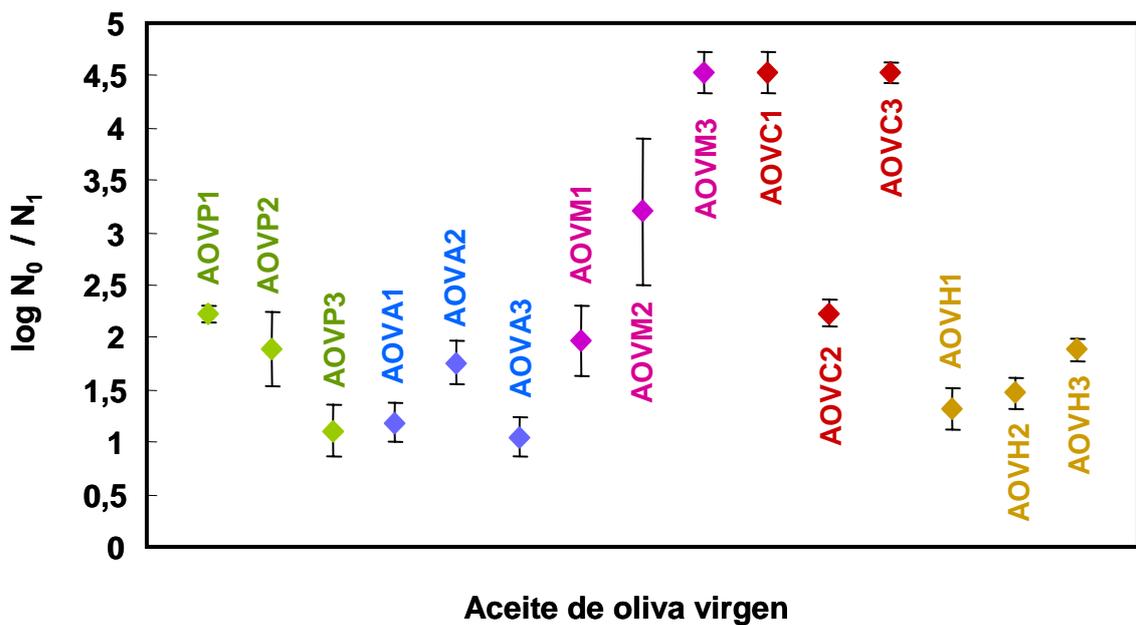


Figura 11. Efecto de diferentes aceites de oliva virgen en la viabilidad de *S. Enteritidis* después de una hora de contacto con la mezcla tampón/aceite (4:1). Las barras indican los errores estándar del valor. Ver Tabla 2 para la identificación de los aceites.



El aceite de oliva virgen, y en particular ciertos aceites monovarietales, mostraron la mayor actividad, seguidos de los de oliva, los cuales pierden sus compuestos fenólicos durante la refinación. Los que menor o nula actividad mostraron fueron los de semilla (girasol, soja, algodón, maíz y colza). Estos datos, junto con la composición fenólica de cada aceite de oliva, fueron utilizados para correlacionar cada compuesto fenólico con la viabilidad de *E. coli* (Tabla 5) y *S. Enteritidis* (Tabla 6) mediante regresión lineal. Se calculó el coeficiente de determinación (R^2) para cada uno de los compuestos fenólicos.

Tabla 5. Resultados del análisis de regresión lineal llevado a cabo entre los datos de la viabilidad celular de *E. coli* reflejadas en la Figura 10 y los compuestos fenólicos presentes en los aceites (Tabla 4) o difundidos al tampón (Tabla 7).

Compuesto	Polifenoles en aceite		Polifenoles en buffer	
	(R^2) coeficiente de determinación	Probabilidad	(R^2) coeficiente de determinación	Probabilidad
Ty-EDA	0,40	$p < 0,01$	0,58	$p < 0,01$
Hy-EDA	0,47	$p < 0,01$	0,64	$p < 0,01$
Hidroxitirosol	0,47	$p < 0,01$	0,55	$p < 0,01$
Tirosol	0,40	$p < 0,01$	0,49	$p < 0,01$
Hy-EA	0,22	$p > 0,01$	0,27	$p > 0,01$
Ty-EA	0,14	$p > 0,01$	0,39	$p < 0,01$
Hy-Ac	0,04	$p > 0,01$	0,02	$p > 0,01$
1-AcPinor	0,01	$p > 0,01$	0,01	$p > 0,01$
Pinoresinol	0,07	$p > 0,01$	0,15	$p > 0,01$
Luteolina	0,01	$p > 0,01$	0,01	$p > 0,01$
Apigenina	0,01	$p > 0,01$	0,02	$p > 0,01$
Hy-G	0,02	$p > 0,01$	0,03	$p > 0,01$
Suma de polifenoles	0,40	$p < 0,01$	0,58	$p < 0,01$
Suma de Hy + Ty + Hy-EDA+ Ty-EDA	0,69	$p < 0,01$	0,79	$p < 0,01$

Entre los compuestos fenólicos, la forma dialdehídica decarboximetilada del ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA) y unido a tirosol (Ty-EDA), junto con hidroxitirosol y tirosol mostraron correlación significativa con la viabilidad celular ($p < 0,01$), en particular los dos primeros compuestos.

Tabla 6. Resultados del análisis de regresión lineal llevado a cabo entre los datos de la viabilidad celular de *S. Enteritidis* reflejadas en la Figura 11 y los compuestos fenólicos presentes en los aceites (Tabla 4) o difundidos al tampón (Tabla 7).

Compuesto	Polifenoles en aceite		Polifenoles en buffer	
	(R ²) coeficiente de determinación	Probabilidad	(R ²) coeficiente de determinación	Probabilidad
Ty-EDA	0,77	$p < 0,01$	0,70	$p < 0,01$
Hy-EDA	0,60	$p < 0,01$	0,74	$p < 0,01$
Hidroxitirosol	0,46	$p < 0,01$	0,62	$p < 0,01$
Tirosol	0,33	$p > 0,01$	0,42	$p < 0,01$
Hy-EA	0,24	$p > 0,01$	0,29	$p > 0,01$
Ty-EA	0,12	$p > 0,01$	0,24	$p > 0,01$
Hy-Ac	0,06	$p > 0,01$	0,02	$p > 0,01$
1-AcPinor	0,10	$p > 0,01$	0,02	$p > 0,01$
Pinoresinol	0,01	$p > 0,01$	0,10	$p > 0,01$
Luteolina	0,10	$p > 0,01$	0,19	$p > 0,01$
Apigenina	0,05	$p > 0,01$	0,08	$p > 0,01$
Hy-G	0,03	$p > 0,01$	0,02	$p > 0,01$
Suma de polifenoles	0,54	$p < 0,01$	0,74	$p < 0,01$
Suma de Hy + Ty + Hy-EDA + Ty-EDA	0,83	$p < 0,01$	0,88	$p < 0,01$

Es interesante comentar que la aglucona de la oleuropeína y del ligustrósido (Hy-EA y Ty-EA), los cuales son los principales compuestos fenólicos en la mayoría de los aceites, no mostraron correlación con la viabilidad celular, ni el hidroxitirosol acetato, flavones o lignanos. Tampoco los diferentes oleósidos analizados,

correlacionaron con la viabilidad celular. Cabe destacar que los compuestos Hy-EDA e hidroxitirosol poseen actividad antioxidante, y que Ty-EDA y tirosol no.

Por tanto, se encontró una buena relación entre la suma de los cuatro compuestos Hy-EDA, Ty-EDA, hidroxitirosol y tirosol, y la viabilidad celular de *E. coli* ($R^2=0.69$) y *S. Enteritidis* ($R^2=0.83$). Keceli y Robinson (2002) estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos fenólicos procedente de aceite de oliva virgen y no encontraron relación con la viabilidad celular para ningún compuesto individual. De hecho, detectaron solamente hidroxitirosol, tirosol y otros componentes minoritarios en dichos extractos.

Por consiguiente, por primera vez la actividad antimicrobiana del aceite de oliva ha sido atribuida a los compuestos fenólicos Hy-EDA y Ty-EDA. Durante muchos años, los investigadores habían focalizado sus estudios en la actividad antimicrobiana de la oleuropeína (Fleming y colbs., 1973; Tassou y Nichas, 1995; Ma y colbs., 2001), la cual está presente en el aceite de oliva en muy poca cantidad (Perri y colbs., 1999), también en la aglucona de la oleuropeína (Kubo y colbs., 1985) e hidroxitirosol (Furneri y colbs., 2004), aunque nunca sobre los compuestos Hy-EDA y Ty-EDA. El hecho de que solo hidroxitirosol, tirosol, Hy-EDA y Ty-EDA correlacionen con la viabilidad celular, nos permitió pensar que este efecto podría estar relacionado con la polaridad fenólica y, por lo tanto, con su difusión a la fase acuosa (tampón PBST).

Varios estudios han demostrado una buena correlación entre el coeficiente de partición de los polifenoles del aceite de oliva, determinado por el método de octanol/agua, y su tiempo de elución durante el análisis por CLAE (Paiva-Martins y colbs., 2003; Fogliano y colbs., 1999). Como muestra la Figura 9, los cuatro polifenoles mencionados eluyen al principio del cromatograma (entre 15 y 30 minutos), en contraste con hidroxitirosol glicol e hidroxitirosol acetato, que también son compuestos polares y rápidamente eluyen de la columna, pero estos no se correlacionan con la viabilidad celular. Para confirmar esta sospecha, se analizó la composición fenólica de la solución tampón después de una hora de contacto con los diferentes aceites de oliva (Tabla 7). Cuanto más polar es el compuesto, mayor es la cantidad difundida del aceite al tampón.

Tabla 7. Compuestos fenólicos ($\mu\text{mol/l}$) en el tampón después de una hora de contacto entre el aceite y el tampón (1:1).

Aceite	Compuesto												Total
	Hy	Ty	Hy-EDA	Ty-EDA	Hy-Ac	Hy-EA	Ty-EA	1-AcPinor	Pinor	Luteolina	Apigenina	Hy-G	
AOVP1 ^a	314,3	58,5	657,8	74,3	380,9	179,7	28,0	7,2	32,3	6,1	0,7	31,0	1770,8
AOVP2	284,7	86,9	281,3	56,9	30,7	173,2	40,7	4,3	19,6	7,7	1,0	30,2	1017,2
AOVP3	106,3	73,3	ND ^c	54,8	22,8	96,9	31,9	1,8	27,4	4,5	0,7	37,2	457,4
AOVA1	47,7	51,6	177,7	24,6	52,6	10,7	2,4	28,9	11,3	11,8	1,3	9,6	299,1
AOVA2	164,4	30,2	290,8	47,5	105,9	18,5	4,2	35,1	18,6	10,2	1,4	10,8	751,7
AOVA3	83,5	24,7	169,0	11,0	199,5	18,4	2,1	59,9	20,4	21,0	1,9	16,1	627,5
AOVM1	449,6	92,3	571,8	74,6	62,8	313,7	58,1	4,7	20,3	7,3	1,6	21,6	1678,5
AOVM2	485,8	164,9	447,6	86,3	71,9	135,9	28,0	23,2	10,0	10,3	2,4	8,9	1457,9
AOVM3	450,6	142,7	880,9	105,3	114,7	184,5	30,8	29,3	9,7	9,7	1,7	14,5	1973,1
AOVC1	353,7	79,6	1180,2	256,1	ND	216,4	49,2	7,2	23,2	1,2	0,2	15,9	2182,8
AOVC2	338,9	127,1	346,7	114,6	16,9	98,3	42,1	10,1	27,0	3,5	0,5	18,4	1144,2
AOVC3	471,9	139,2	634,9	155,1	ND	168,5	50,1	11,0	29,8	3,5	0,4	22,6	1686,9
AOVH1	157,1	39,9	191,4	31,4	47,4	70,4	15,6	15,2	7,9	8,1	1,5	17,0	603,0
AOVH2	217,9	118,2	172,6	59,9	30,1	113,3	31,3	19,0	16,6	7,2	1,6	19,7	807,4
AOVH3	161,2	68,0	245,5	36,4	41,1	79,8	16,9	18,4	16,5	8,9	1,6	7,5	676,2
AO1	148,0	41,5	94,3	30,8	30,5	71,4	18,8	2,2	8,6	1,9	0,3	23,9	472,1
AO2	136,9	46,3	133,1	27,6	24,0	69,4	14,2	12,4	16,0	4,9	0,5	9,0	494,3
AO3	91,8	22,6	74,1	15,5	55,2	37,3	11,0	1,3	8,9	1,6	0,2	9,5	329,1
AOO1	31,6	7,8	ND	ND	2,4	15,7	5,2	0,5	1,0	ND	ND	1,8	66,0
AOO2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,8	ND	ND	ND	ND	ND	1,8
AOO3	2,1	0,3	ND	ND	0,8	1,5	1,9	ND	0,2	ND	ND	0,8	8,0

^a Ver Tabla 2 para la identificación de los aceites. ^c No detectado.

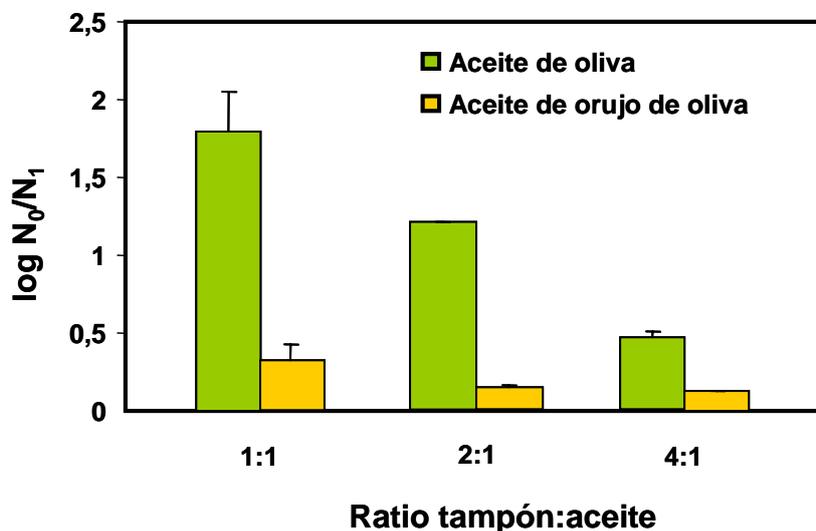
De esta manera, se difunde casi todo el hidroxitirosol y tirosol, alrededor de un 40-60 % de Hy-EDA y Ty-EDA, y solo un 15-30 % de Hy-EA y Ty-EA. Cabe destacar que la concentración de hidroxitirosol y tirosol es aún más alta en el tampón que en el aceite original antes de ponerlo en contacto, probablemente debido a las reacciones de hidrólisis de las agluconas secoiridoides.

También se hizo un nuevo análisis de regresión lineal con los datos de los compuestos fenólicos en el extracto en tampón y la viabilidad celular, y de nuevo, sólo el hidroxitirosol, tirosol, Hy-EDA y Ty-EDA mostraron una buena correlación con la supervivencia bacteriana (Tablas 5 y 6). De hecho, los coeficientes de determinación eran más altos que aquellos obtenidos con los compuestos fenólicos del aceite de oliva original. La suma de los cuatro compuestos mostró coeficientes de determinación (R^2) de 0.79 y 0.88 para *E. coli* y *S. Enteritidis* respectivamente.

Se conoce que la actividad antioxidante y antimicrobiana de compuestos fenólicos en emulsiones aceite/agua depende de la polaridad y de la estructura química (Friedman y cols., 2003). En este caso, los cuatro compuestos que correlacionan con la viabilidad celular también difunden a la fase acuosa del tampón, en gran medida, dando lugar a una alta concentración en el extracto acuoso. Sin embargo, hay algunas excepciones, por ejemplo la concentración de hidroxitirosol acetato (Hy-Ac) y la aglucona de la oleuropeína (Hy-EA) que son, en general, similares al tirosol y Ty-EDA, no se correlacionan con la viabilidad celular, lo que probablemente indica que la estructura química influye sobre la actividad antimicrobiana de los polifenoles del aceite.

A continuación, se llevaron a cabo dos nuevos experimentos para demostrar la influencia de la difusión de fenoles sobre la supervivencia bacteriana. Los resultados del primer experimento confirmaron que la supervivencia de *S. sonnei* aumenta con una proporción tampón: aceite creciente tanto para el aceite de oliva como para el aceite de orujo de oliva, aunque fuera significativo estadísticamente para el aceite de oliva y no para el aceite de orujo de oliva (test de Duncan de rango múltiple) (Figura 12).

Figura 12. Efecto de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva en la supervivencia de *Shigella sonnei* después de la exposición a diferentes mezclas tampón/aceite. Las barras indican los errores estándar del valor.



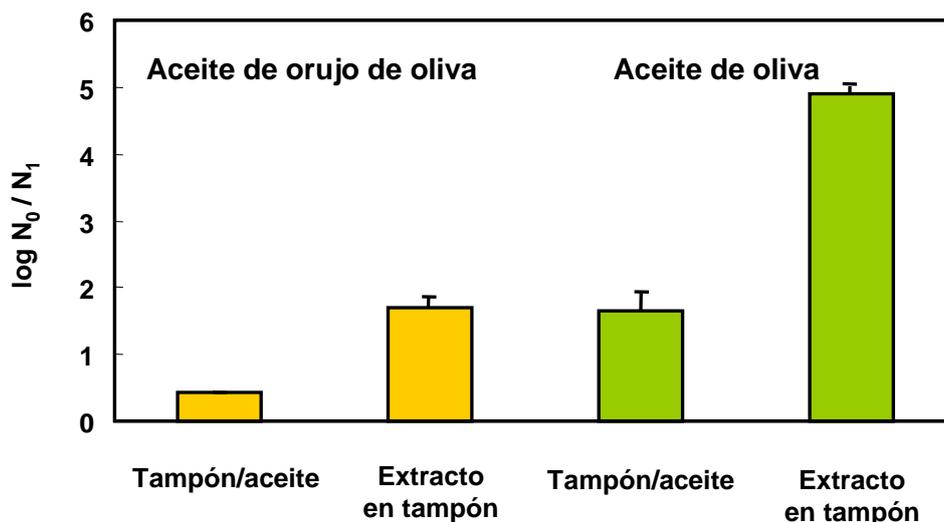
De manera similar, la concentración de polifenoles decrece en el tampón cuando se incrementa la proporción tampón: aceite, apoyando que estos compuestos están implicados en la actividad antimicrobiana.

En el segundo experimento, se realizó una comparación de la actividad bactericida entre la emulsión tampón/aceite y el extracto en tampón obtenido después de una hora de contacto con los aceites (aceite de oliva y aceite de orujo de oliva). La supervivencia de *S. Enteritidis* en el extracto fue estadísticamente menor (test de Duncan de rango múltiple) que la observada para la emulsión (Figura 13). Es decir, el extracto fenólico ejerció una mayor actividad bactericida que la emulsión aceite/tampón.

Por tanto, todos los datos encontrados apuntan que son los compuestos fenólicos, y no los ácidos grasos, ni otros componentes del aceite los responsables de la actividad bactericida del aceite. Además, parece que el contacto entre microorganismos y estas sustancias es más eficaz cuando el aceite no está presente en la matriz. Por lo tanto, es necesario un medio acuoso en contacto con el aceite de oliva para mostrar la propiedad antimicrobiana del aceite, y en consecuencia de los polifenoles del aceite de oliva, lo que puede explicar esta bioactividad antimicrobiana independientemente de los

ácidos grasos (Bergsson y colbs., 2001) o aldehídos alifáticos del aroma del aceite (Bisignano y colbs., 2001).

Figura 13. Comparación del efecto bactericida de una mezcla tampón/aceite y el extracto en tampón frente a *S. Enteritidis*. N_0 = UFC/ml inoculado; N_1 =UFC/ml después de una hora. Las barras indican los errores estándar del valor.



No obstante, hay que indicar que el aceite de oliva posee una fuerte actividad antimicrobiana debido a su contenido en compuestos fenólicos, y en particular Hy-EDA, Ty-EDA, hidroxitirosol y tirosol (Medina y colbs., 2006). También, la difusión de estas sustancias en un medio acuoso es necesaria para mostrar esta actividad. Por lo tanto, el consumo de aceite de oliva podría influir en la microbiota intestinal. Pero, como se ha demostrado, inhibe el crecimiento tanto de bacterias beneficiosas como dañinas. Además, la mitad de los compuestos fenólicos del aceite son absorbidos antes de alcanzar el colon (Vissers y colbs., 2002).

Sin embargo, se debe resaltar también que el aceite de oliva ejerce un potente efecto bactericida frente a patógenos presentes en alimentos, incluso aunque la actividad del polifenol puede verse influenciada por factores como el pH, proteínas o la actividad de agua de alimento (Cono y colbs., 1999), por lo que dicha actividad podría utilizarse para emplearlo como conservante en alimentos o reducir el número de patógenos cuando se ingieren alimentos contaminados junto con aceite de oliva en la dieta.

4.1.2. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos del aceite de oliva frente a *Listeria monocytogenes*

Se ha demostrado de forma indirecta la participación de los compuestos polifenólicos en el efecto bactericida del aceite de oliva. A continuación, se llevaron a cabo experiencias con compuestos puros, bien comerciales o aislados mediante CLAE.

El efecto bactericida de cada compuesto fenólico aislado se estudió frente a *L. monocytogenes* de la manera descrita en el apartado 3.10.3. Debido al amplio rango de concentración encontrado para estos compuestos en los aceites de oliva virgen, se eligió la concentración media de cada compuesto en el extracto acuoso (Tabla 7) para llevar a cabo el experimento. También se ensayó el efecto bactericida de todos ellos se ensayo a una única concentración de 250 μ M. Los resultados recogidos en la Tabla 8 revelan que el compuesto Ty-EDA muestra el mayor efecto bactericida seguido del compuesto Hy-EDA.

Tabla 8. Efecto de compuestos fenólicos individuales sobre la viabilidad de *L. monocytogenes*

Compuesto	Concent, ^a (μ M)	Log N_0/N_1 ^b	Concent, (μ M)	Log N_0/N_1
Hidroxitirosol glicol	18,7	<0,01	250	<0,01
Hidroxitirosol	272,5	<0,01	250	<0,01
Tirosol	86,5	<0,01	250	<0,01
Hy-Ac	78,5	<0,01	250	<0,01
Hy-EA	125,2	<0,01	250	<0,01
Ty-EA	28,8	<0,01	250	<0,01
1-AcPinor	18,4	<0,01	250	<0,01
Pinoresinol	19,4	<0,01	250	<0,01
Hy-EDA	416,6	0,12	250	<0,01
Ty-EDA	79,3	0,39	250	0,82
Suma de Hy, Ty, Hy-EDA y Ty-EDA	272,5; 86,5; 416,6; 79,3	1,45		

^aValor medio en extractos acuosos (Tabla 7), ^b N_0 = UFC/mL inoculado; N_1 = UFC/mL después de una hora, El inóculo inicial fue de aprox, 10^4 UFC/mL

Sin embargo, debe comentarse que la mezcla de hidroxitirosol, tirosol, Hy-EDA y Ty-EDA disminuye el número de células 2 unidades logarítmicas aproximadamente, lo que significa que el efecto bactericida del aceite de oliva virgen es debido a la acción conjunta de diferentes compuestos fenólicos, principalmente hidroxitirosol, tirosol, Hy-EDA y Ty-EDA, en particular el compuesto Ty-EDA (Medina y cols., 2006) del cual se ha encontrado recientemente que posee también actividad anti-inflamatoria (Beauchamp y cols., 2005). Estos resultados están en consonancia con los comentados en las Tablas 5 y 6, en especial para Hy-EDA y Ty-EDA, obtenidos mediante análisis de regresión lineal del efecto bactericida de los compuestos fenólicos y su concentración en los aceites de oliva virgen y extractos en tampón. Por lo tanto, ha quedado demostrado cuales son los principales compuestos con actividad bactericida del aceite de oliva.

4.1.3. Comparación del efecto bactericida del aceite de oliva y otros alimentos líquidos

Se ha demostrado, por tanto, un efecto bactericida *in vitro* por parte del aceite de oliva (Medina y cols., 2006). Sin embargo, existen otros alimentos a los cuales se les ha atribuido también dicha actividad. Por ello, se diseñaron una serie de experimentos para comparar el efecto del aceite de oliva y el de esos alimentos descritos en el apartado 3.10.4.

Todas las cepas de microorganismos patógenos ensayados sobrevivieron en los zumos de fruta después de los 5 minutos de contacto. Ninguno de estos zumos produjo una reducción de la población mayor a 1 unidad logarítmica. No se conoce ningún trabajo que trate sobre la actividad antimicrobiana de zumos de frutas, a pesar de que el pH bajo (~ 4) y un entorno ácido podrían contribuir al control microbiano. Sin embargo, hoy día la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* en zumos de naranja y manzana son de gran preocupación (Millar y cols., 1994; Ryu y cols., 1998). En nuestro estudio, los recuentos de microorganismos se determinaron a los 5 minutos de contacto para observar los efectos bactericidas, y es obvio que el bajo pH no fue suficientemente letal para los patógenos estudiados.

Las bacterias también sobrevivieron al menos durante 5 minutos en productos lácteos y Coca-Cola. Era predecible que estos microorganismos pudieran sobrevivir en

leche, a un pH 7, y verse afectado por el pH de 4,6 del yogurt líquido, sin embargo fue sorprendente que incluso sobrevivieron a pH tan bajo de 2,7 en el caso de la Coca-Cola. De hecho, estos resultados confirmaron los obtenidos por Sheth y cols. (1988), quienes observaron la supervivencia de patógenos en la leche y bebida de cola durante 48 horas. Parece por tanto, que el pH por sí solo no puede reducir el número de patógenos en estos productos alimenticios.

Ha de comentarse que las bebidas de yogurt utilizadas contienen bacterias (las bacterias del ácido láctico utilizadas en la fabricación), las cuales pudieron distinguirse fácilmente de los patógenos inoculados debido a sus diferencias en la morfología de colonias y tasas de crecimiento. No obstante, ningún otro producto líquido contiene poblaciones microbianas que puedan interferir con el recuento de los microorganismos inoculados.

Se asume que la cerveza está libre de microorganismos patógenos debido tanto a su pH bajo, elevada concentración de etanol y su tratamiento de pasterización. No obstante, ha aumentado la preocupación sobre las bacterias en cervezas sin alcohol, en particular las almacenadas en barriles (L'Anthoën y Ingledew, 1996), que no se pasterizan. En nuestro trabajo, no se encontró reducción en el número de microorganismos inoculados en cerveza sin alcohol ni en cerveza con un 5 % de alcohol, exceptuando la cerveza con alcohol inoculada con una de las dos cepas de *S. Enteritidis*, donde se observó una reducción de 1,4 unidades logarítmicas. De ahí, un pH relativamente bajo (4-4,5) y una concentración de alcohol ($\leq 5\%$) parecen no matar a los patógenos inoculados en estos alimentos líquidos.

También se ha encontrado actividad bactericida para extractos acuosos de café, aunque los datos son contradictorios, en particular sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli* (Okabe y cols., 2003; Toda y cols., 1989). En nuestro estudio, no se ha detectado reducción del número de microorganismos después de los 5 minutos de contacto en ninguno de los extractos de café inoculados, lo que significa que ni la concentración de cafeína en los extractos ni los polifenoles del café ejercen una acción inhibitoria rápida.

Por el contrario, vino, vinagre, té y extractos de aceite de oliva mostraron actividad bactericida frente a los microorganismos patógenos ensayados (Figuras 14 y

15)(Medina y colbs., 2007a). Entre ellos, el vinagre mostró el efecto bactericida mayor, seguido del extracto acuoso de aceite de oliva virgen, vinos, extractos de aceite de oliva y té. El vinagre redujo el número de microorganismos inoculados de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. sonnei* y *Yersinia* sp. a niveles por debajo del límite de detección y redujo más de tres unidades logarítmicas el número de células de *E. coli* y *S. aureus*. Es bien conocida la fuerte actividad bactericida que presenta el vinagre (Entani y colbs., 1998; Wu colbs., 2000) debido a su alto contenido en ácido acético, y ello se confirma con los resultados obtenidos en esta experiencia. Asimismo, el extracto acuoso del aceite de oliva virgen ejerció un efecto similar al del vinagre, lo que supone un nuevo e interesante hallazgo. Ni *S. aureus* ni *Yersinia* sp. se detectaron después de 5 minutos de contacto con el extracto acuoso de aceite de oliva virgen, lo que significa una reducción de más de 5 unidades logarítmicas, y una reducción de más de 4 unidades logarítmicas para los patógenos restantes.

Existen un gran número de publicaciones acerca de las propiedades antimicrobianas del té (Toda y colbs., 1989; Yam y colbs., 1997), y es sorprendente que el té negro y el té verde solo produjeron una ligera acción bactericida frente a la mayoría de los patógenos. Se han descrito los extractos de té y sus principales componentes activos (catequinas y teflavinas) como inhibidores del crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Friedman y colbs., 2006; Ikigai y colbs., 1993); sin embargo fueron inactivos cuando se ensayaron *in vivo* con carne triturada (Kim y colbs., 2004). En esta experiencia se encontraron reducciones menores de 3 unidades logarítmicas para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* y un efecto no significativo frente a *S. Enteritidis*, *S. sonnei* y *Yersinia* sp. (Figuras 14 y 15).

En cambio, los vinos tinto y blanco fueron unos potentes antibacterianos, en particular frente a *S. Enteritidis* y *Yersinia* sp., cuyos recuentos de células viables estuvieron por debajo del límite de detección. *S. aureus* y *L. monocytogenes* fueron los patógenos menos sensibles a ambos vinos. No obstante, se apreciaron diferencias en los resultados obtenidos con las distintas cepas de una misma especie, por ejemplo el efecto del vino blanco frente a *S. aureus*. Estos datos están en consonancia con investigaciones anteriores (Just y Daeschel, 2003; Sheth y colbs., 1988; Weisse y colbs., 1995) que relacionan la actividad antimicrobiana de los vinos bien con la acción sinérgica de los ácidos orgánicos, bajo pH y etanol (Møretø y colbs., 2004) o también con los

compuestos fenólicos (Papadopoulo y colbs., 2005). Esta actividad antimicrobiana de los vinos es conocida desde la antigüedad, e investigadores recomiendan su consumo como protección frente a algunos alimentos contaminados con microorganismos patógenos (Just y Daeschel, 2003), aunque la ingestión de etanol debe ser tomada en cuenta.

Figura 14. Efecto bactericida del té, vino, vinagre y extractos de aceite de oliva frente a diversos patógenos. N_0 =UFC/ml inoculado. N_1 =UFC/ml después de 5 min. de contacto. Las barras indican la desviación estándar de los resultados obtenidos con dos cepas de cada especie. Las flechas indican que los eventuales microorganismos supervivientes están por debajo del límite de detección.

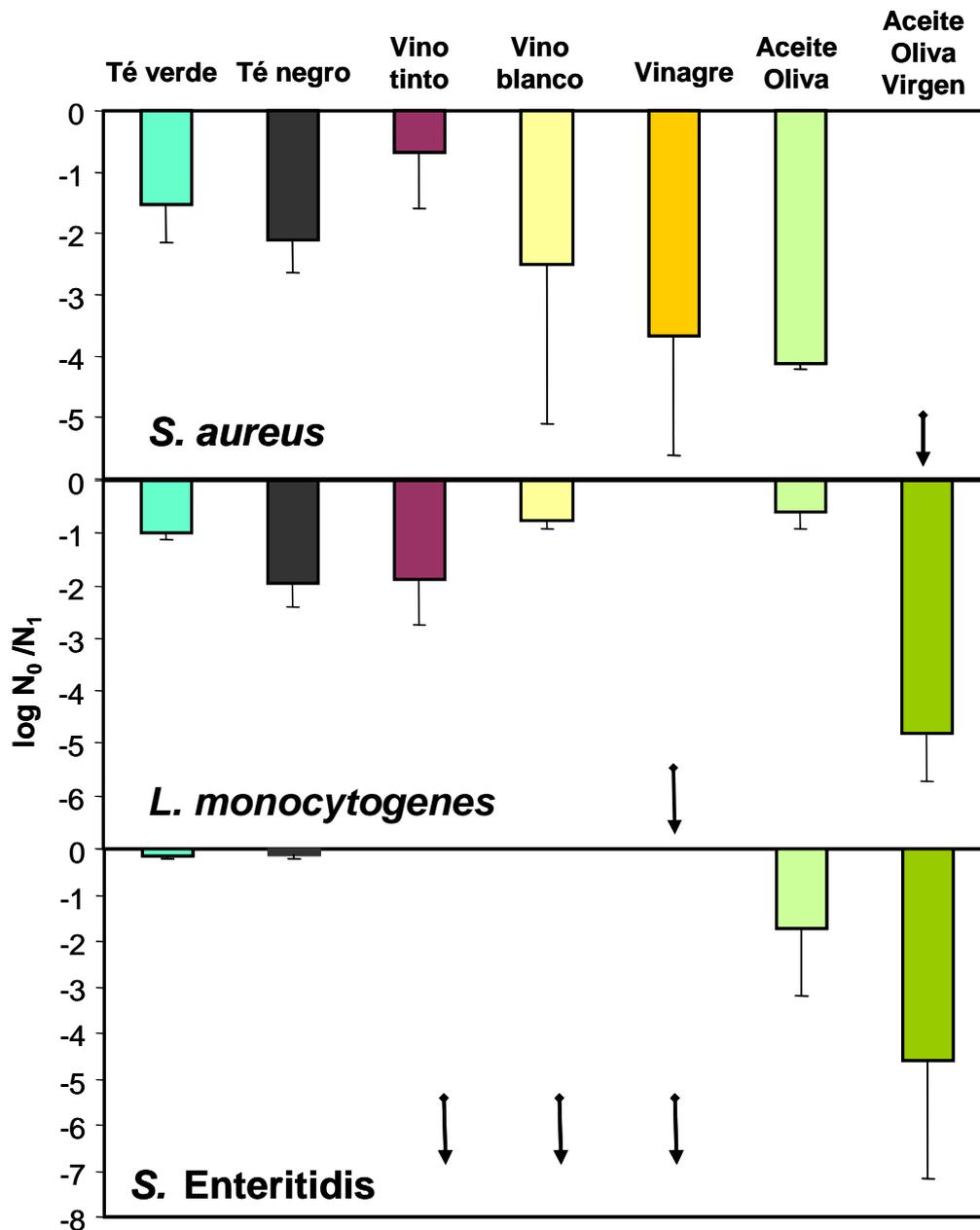
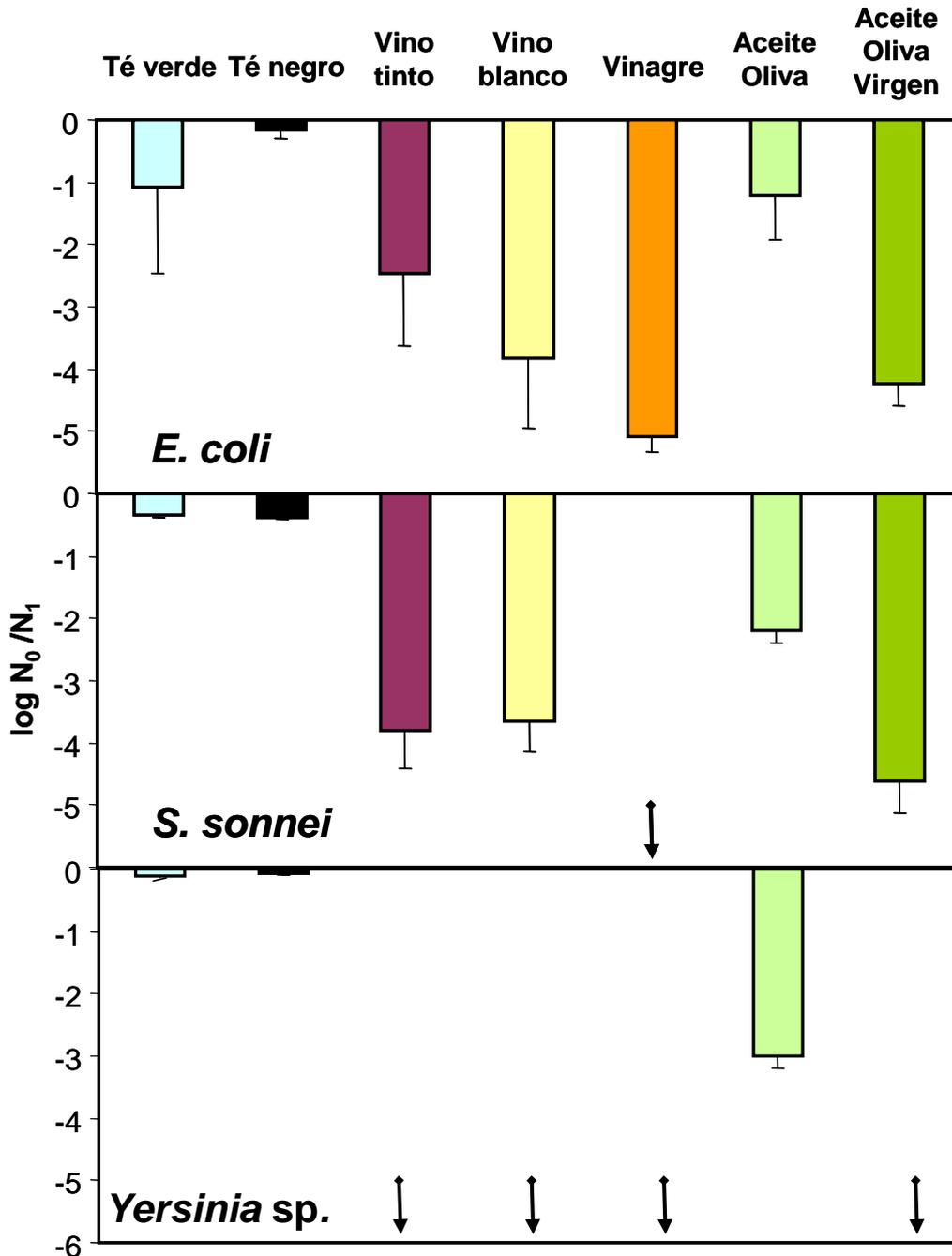


Figura 15. Efecto bactericida del té, vino, vinagre y extractos de aceite de oliva frente a diversos patógenos. N_0 =UFC/ml inoculado. N_1 =UFC/ml después de 5 min. de contacto. Las barras indican la desviación estándar de los resultados obtenidos con dos cepas de *E. coli* y duplicados de una sola cepa de *S. sonnei* y *Yersinia sp.*. Las flechas indican que los eventuales microorganismos supervivientes están por debajo del límite de detección.



El extracto de aceite de oliva muestra una acción bactericida más débil que el aceite de oliva virgen pero más fuerte que los extractos de té. Como se ha dicho en el apartado 4.1.1., la actividad antimicrobiana está relacionada con los compuestos fenólicos del extracto, en particular, la acción sinérgica entre hidroxitirosol, tirosol y la forma dialdehídica decarboximetilada del ácido elenólico unido a hidroxitirosol y a tirosol (Medina y cols., 2006). En la Tabla 9 se expone la composición fenólica de los aceites y sus extractos acuosos empleados en estas experiencias.

Tabla 9. Composición fenólica (mg /kg) del aceite de oliva y aceite de oliva virgen empleado en los experimentos con alimentos líquidos.

Compuesto	Aceite inicial		Extracto acuoso	
	A. oliva virgen	Aceite de oliva	A. oliva virgen	Aceite de oliva
Hy-G	3,9 (0,0) ^b	ND ^c	1,6 (0,2)	ND
Hidroxitirosol	52,8 (6,5)	14,1 (0,2)	36,9 (0,8)	13,5 (0,5)
Tirosol	17,0 (0,3)	7,4 (0,2)	15,2 (0,3)	8,2 (0,2)
Hy-Ac	ND	11,5 (0,1)	ND	4,0 (0,2)
Hy-EDA	179,1 (11,9)	79,4 (5,1)	118,4 (6,0)	28,1 (0,7)
Ty-EDA	78,5 (0,5)	35,5 (1,2)	26,7 (0,4)	5,8 (0,1)
1-AcPinor	16,3 (1,4)	21,0 (0,9)	1,8 (0,0)	3,7 (0,2)
Pinoresinol	56,9 (1,9)	37,7 (0,4)	5,4 (0,3)	3,5 (0,3)
Hy-EA	210,9 (12,0)	147,6 (0,7)	52,3 (3,5)	25,5 (1,3)
Ty-EA	65,6 (1,8)	62,7 (0,7)	5,0 (0,9)	1,8 (0,6)
Luteolina	3,2 (1,5)	2,1 (0,0)	ND	ND
Apigenina	0,4 (0,3)	0,6 (0,0)	ND	ND
Total	684,6 (48,1)	419,6 (9,5)	263,3 (12,4)	94,1 (4,1)

^cND, no detectado.

Como era de esperar, el aceite de oliva virgen tiene una mayor concentración en polifenoles totales e individuales que el aceite de oliva, y la misma relación se puede observar en los extractos acuosos. El extracto de aceite de oliva virgen contiene casi el doble de estos compuestos que el extracto de aceite de oliva, lo que explica el alto efecto bactericida del primero (Medina y cols., 2007a). Hay que tener en cuenta que el aceite de oliva virgen es obtenido directamente del fruto de la aceituna y que el aceite de

oliva es una mezcla de aceite de oliva refinado con aceite de oliva virgen, siendo este último el que aporta el contenido de polifenoles.

El aceite de oliva puede ser consumido directamente con pan y con ensaladas frescas, pero también puede ser empleado en la preparación de platos caseros (mayonesas, pasteles) y alimentos procesados (atún en lata, tomate frito, alimentos cárnicos). Por consiguiente, los polifenoles del aceite de oliva pueden ejercer su actividad antimicrobiana directamente en estos alimentos, pero también pueden actuar durante la ingestión como una barrera en ciertas comidas contaminadas. El consumo del vino se ha relacionado con la reducción de casos en brotes causados por emparedados de atún contaminados y ostras crudas (Bellido-Blasco, 2002; Desenclos y cols., 1992) y se ha propuesto como una ayuda digestiva para proporcionar un efecto protector contra patógenos cuando se ingieren alimentos contaminados. Por consiguiente, el aceite de oliva virgen, cuya acción bactericida es mayor que la de los vinos, también podría proporcionar este efecto protector.

4.1.4. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de mayonesas

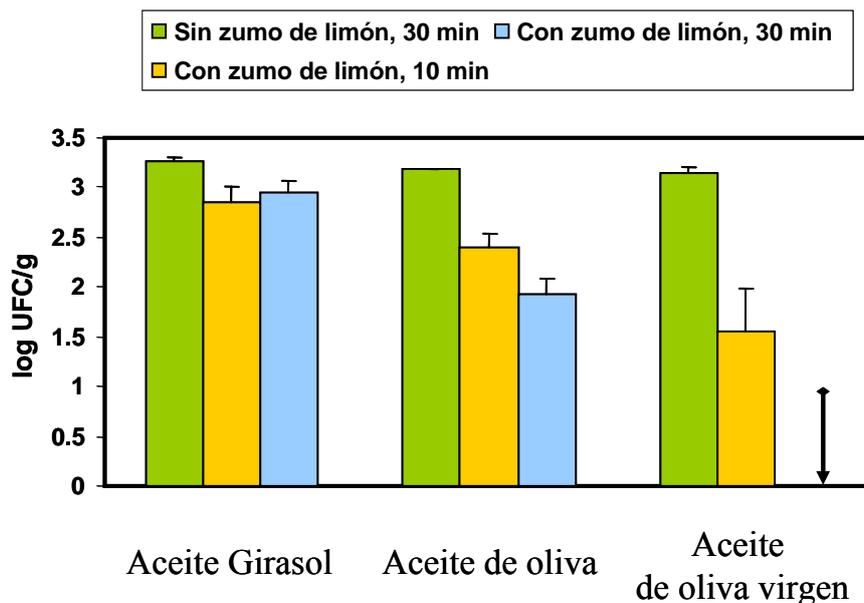
Para confirmar los resultados obtenidos *in vitro* sobre el efecto bactericida del aceite de oliva y del aceite de oliva virgen, se utilizaron como modelos de alimento mayonesas hechas con huevo o leche descritos en el apartado 3.10.5. En un caso se estudió la supervivencia de *S. Enteritidis* inoculada durante la preparación de las mayonesas con huevo y el efecto de la adición de zumo de limón, siendo evaluada a los 10 y 30 minutos. Los resultados mostrados en la Figura 16 confirman la acción bactericida del aceite de oliva virgen y, en un grado menor, del aceite de oliva en este modelo de alimento (Medina y cols., 2007a).

Este efecto es también dependiente del tiempo y sólo se observa cuando se añade el jugo de limón. De modo interesante, los recuentos de células viables de *S. Enteritidis* estaban por debajo del límite de detección en la mayonesa hecha con el aceite de oliva virgen después de 30 minutos, que quiere decir una reducción de 3 unidades logarítmicas de UFC/mL. La mayonesa de huevo hecha con aceite de oliva virgen

(Radford y cols., 1991) e inoculada después de su preparación necesitó más de 48 h para reducir el número de microorganismos a un nivel imperceptible.

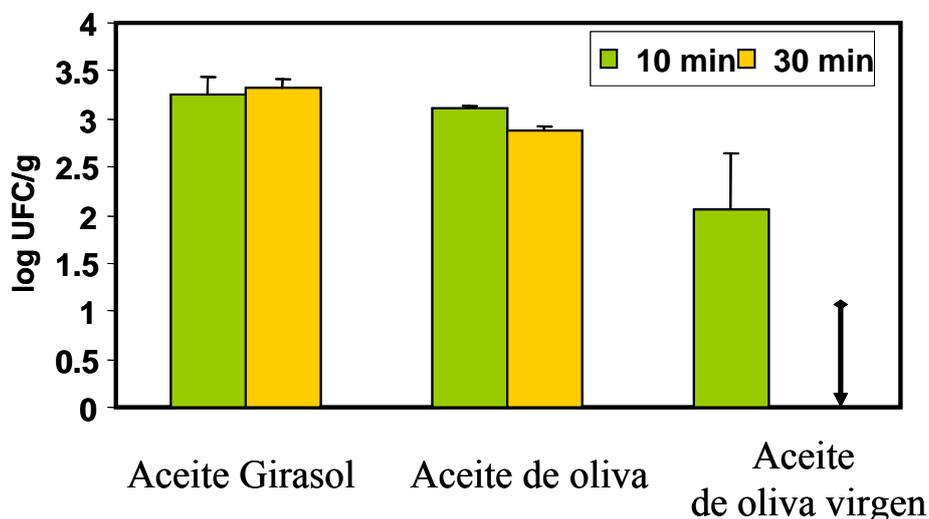
Los investigadores atribuyeron la acción bactericida en este ensayo a la acidez del aceite y a los fenoles simples. Basado en nuestros resultados anteriores (Medina y cols., 2006), es razonable asumir que las diferencias de la actividad bactericida entre los aceites es debida a las diferencias en la composición de compuestos fenólicos, en particular los cuatro mencionados anteriormente.

Figura 16. Supervivencia de *S. Enteritidis* en mayonesas de huevo elaboradas con diferentes aceites, y con un inóculo inicial de 2×10^3 UFC/g. Las barras indican la desviación estándar de duplicados y las flechas indican que la población se encuentra por debajo del límite de detección.



Por otra parte, las mayonesas realizadas con leche fueron inoculadas con *L. monocytogenes* durante la preparación de este modelo de alimento. De nuevo, puede observarse en la Figura 17, que el uso del aceite de oliva virgen reduce la población bacteriana por debajo de los límites de detección después de 30 minutos. Los efectos bactericidas para el aceite de oliva son más débiles debido a la menor concentración de compuestos fenólicos (Tabla 9), confirmándose los resultados obtenidos con el anterior tipo de mayonesa.

Figura 17. Supervivencia de *L. monocytogenes* en mayonesas de leche elaboradas con diferentes aceites, y con un inóculo inicial de 2×10^3 UFC/g. Las barras indican la desviación estándar de duplicados y las flechas indican que la población se encuentra por debajo del límite de detección.

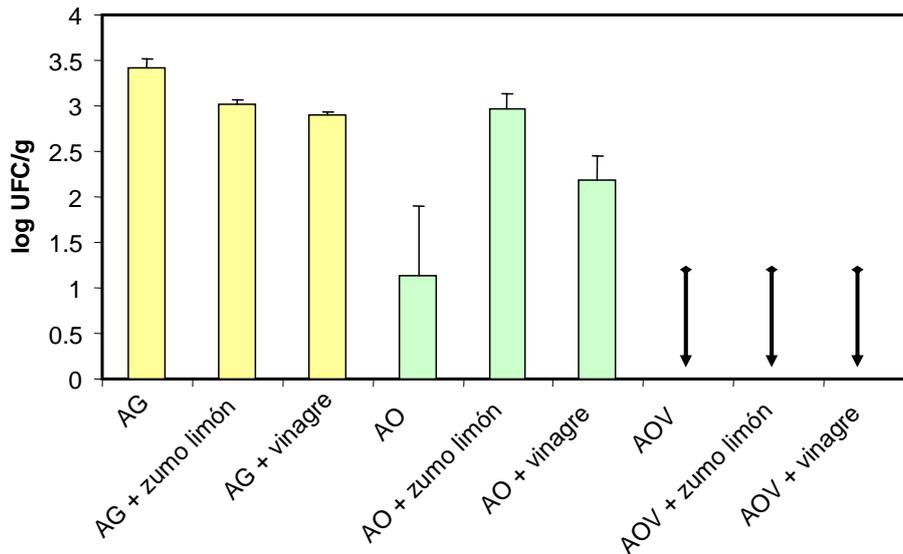


4.1.5. Evaluación de la actividad bactericida del aceite de oliva en la preparación de ensaladas

En la Figura 18 se refleja la supervivencia de *L. monocytogenes* inoculada en lechuga aliñada con diferentes tipos de aceites, zumo de limón, y vinagre después de 30 minutos. Son bien conocidas la efectividad del vinagre y del zumo de limón sobre la reducción del recuento de *Salmonella Typhimurium* inoculada en zanahorias y *Listeria innocua* en varias frutas y vegetales (Kilonzo-Nthenge y colbs., 2006; Sengun y colbs., 2004), y se encuentran reducciones de 1 a 3 log UFC/g.

En nuestra experiencia se observaron ligeras reducciones de *L. monocytogenes* en lechugas aliñadas con aceite de girasol y vinagre o zumo de limón. Por el contrario, después de 30 minutos en contacto con aceite de oliva y sin aliño, se observó un efecto mayor que para las ensaladas aliñadas con vinagre o zumo de limón (Medina y colbs., 2007a). Solo en el caso del aderezo con aceite de oliva virgen las células de *L. monocytogenes* murieron, reduciendo el número de bacterias por debajo del límite de detección, independientemente de la adición de vinagre o limón.

Figura 18. Supervivencia de *L. monocytogenes* en ensaladas de lechuga elaboradas con aceite de girasol (AG), aceite de oliva (AO) y aceite de oliva virgen (AOV). Los aliños de las ensaladas fueron con zumo de limón, vinagre o sin aliñar. El inóculo inicial fue de 2×10^3 UFC/g y el análisis a los 30 minutos después de la preparación. Las barras indican la desviación estándar de duplicados y las flechas indican que la población se encuentra por debajo del límite de detección.



De nuevo se confirma con estos resultados la fuerte actividad bactericida del aceite de oliva virgen y los compuestos difundidos a la fase acuosa de la ensalada, en particular los compuestos fenólicos.

4.1.6. Actividad antimicrobiana del aceite de oliva frente a *Helicobacter pylori*

Este microorganismo es el responsable de la mayoría de úlceras y cánceres de estómago (Cavallaro y cols., 2006), y existen estudios *in vitro* con diversos alimentos indicando que el consumo de éstos podría reducir, controlar o erradicar dicho microorganismo.

Las diferentes cepas de *H. pylori* se sometieron a un ensayo de susceptibilidad a antibióticos como se describe en el apartado 3.9. Entre las 8 cepas de *H. pylori* ensayadas, LMG 19449 y LMG 18041 fueron resistentes a metronidazol, y V7 fue resistente a metronidazol y claritromicina (CMI > 256 µg/mL). Todas las cepas fueron

susceptibles a amoxicilina y tetraciclina. Estudios previos llevados a cabo en el Hospital de Valme (Sevilla) revelaron la resistencia a metronidazol del 29 % de las cepas de *H. pylori* aisladas y a claritromicina del 10 % (García y cols., 2000).

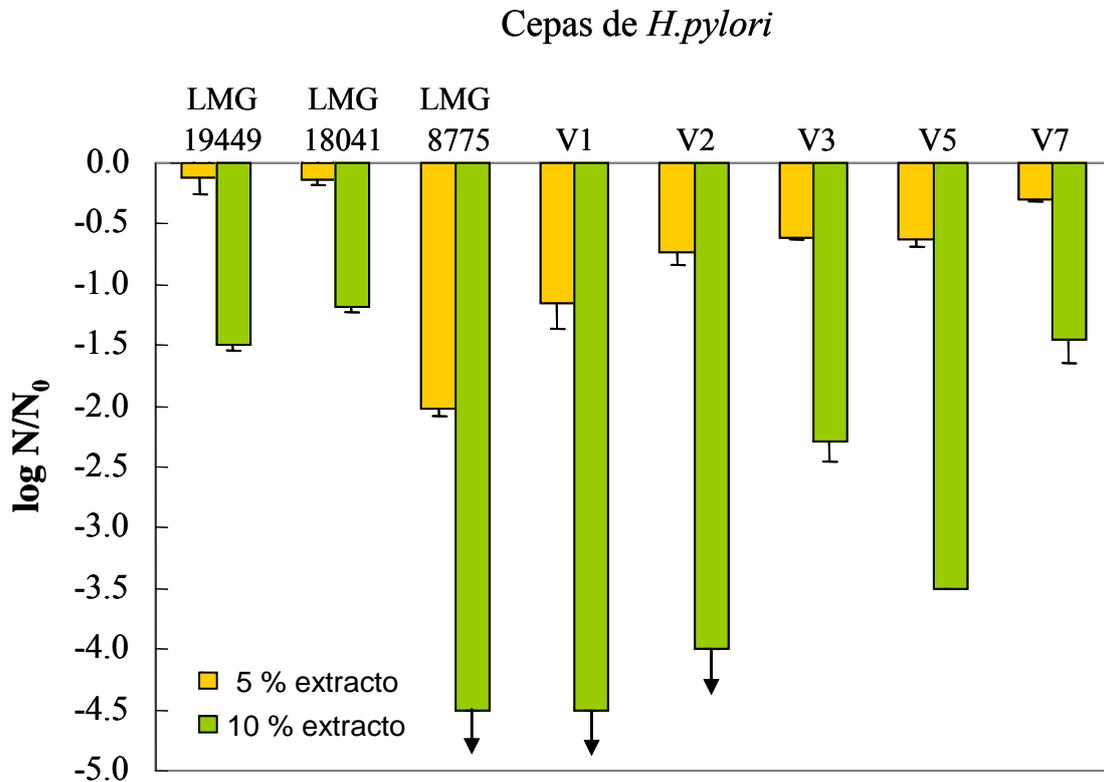
Para determinar la supervivencia de *H. pylori* frente a aceite de oliva, se utilizaron extractos acuosos de aceite de oliva virgen Manzanilla en los experimentos *in vitro*. En la Tabla 10 se muestran los contenidos fenólicos de este extracto, siendo rico en los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol y en la forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona de la oleuropeína (Hy-EDA).

Tabla 10. Contenido en polifenoles del extracto acuoso obtenido después de 30 minutos en contacto entre 10 g de aceite de oliva virgen Manzanilla y 10 mL de tampón PBS.

Polifenoles	Concentración (μM) \pm SD
Hidroxitirosol	485,7 \pm 20,8
Hy-G	10,0 \pm 0,6
Tirosol	203,6 \pm 0,1
Hy-Ac	95,4 \pm 0,5
Hy-EDA	491,6 \pm 35,0
Ty-EDA	84,8 \pm 6,3
1-AcPinor	21,4 \pm 4,0
Pinoresinol	4,7 \pm 1,4
Hy-EA	129,6 \pm 5,0
Ty-EA	18,8 \pm 0,6

Se realizaron experimentos preliminares que revelaron que los extractos de aceite de oliva sin diluir reducen el número de células por debajo del límite de detección de todas las cepas de *H. pylori* después de 5 minutos de contacto. Por lo tanto, se utilizaron extractos diluidos para comparar el efecto bactericida frente a las 8 cepas estudiadas. El extracto acuoso al 20 % de concentración en tampón PBS mató a todas las bacterias ($N_0 = 5,2 \pm 0,3 \log \text{UFC/mL}$). *H. pylori* sobrevivió a los 5 minutos de contacto sólo a concentraciones menores del 10 % del extracto (Figura 19).

Figura 19. Actividad bactericida ($\log N/N_0$) de extractos acuosos diluidos de aceite de oliva virgen Manzanilla frente a cepas de *H. pylori*. $N_0 = 5.2 \pm 0.3$ UFC/mL inoculado. $N =$ UFC/mL después de 5 minutos de contacto. Las flechas indican que el número de células viables se encuentra por debajo del límite de detección. Las barras indican la desviación de los duplicados.

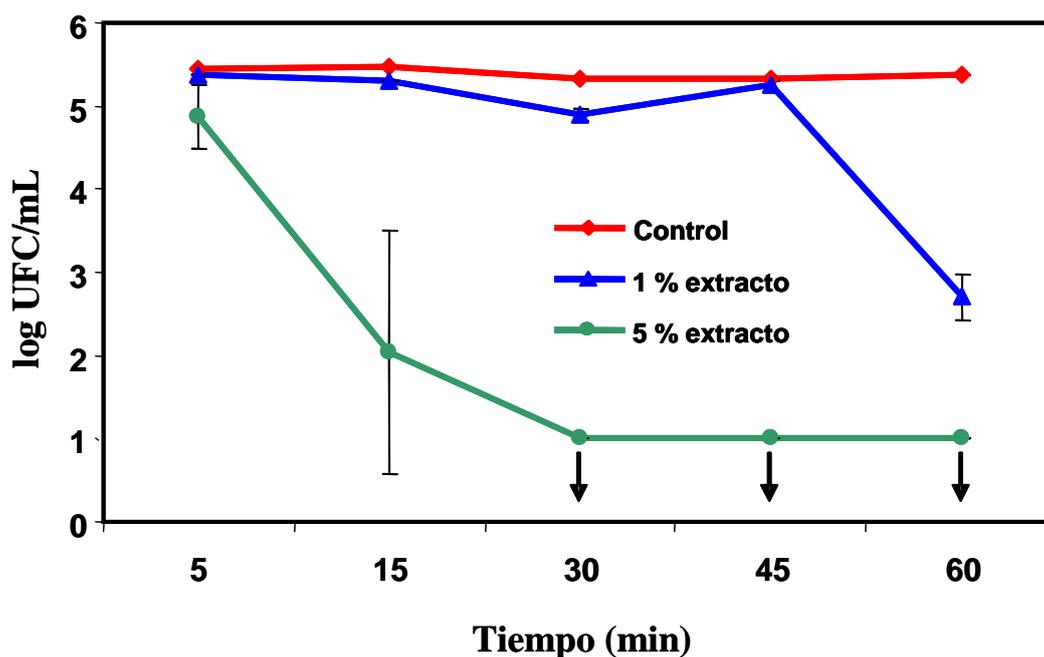


Sin embargo, tres de las ocho cepas ensayadas (LMG 8775, V1 y V2) fueron muy sensibles al extracto de aceite de oliva y no sobrevivieron después de los 5 minutos de contacto con el extracto al 10 % (Romero y cols., 2007). Las cepas más resistentes fueron LMG 19449 y LMG 18041. Como era de esperar, hay un claro efecto con la concentración para todas las cepas, el extracto al 10 % es más bactericida que el extracto al 5 %. Una concentración de extracto de aceite de oliva de Manzanilla al 5 % contiene aproximadamente 19 $\mu\text{g/mL}$ de polifenoles totales en esta solución.

También se observa que la actividad bactericida del extracto de aceite de oliva es dependiente del tiempo (Figura 20). Un extracto de aceite al 5 % no mostró un efecto significativo en el número de células de *H. pylori* LMG 19449 después de 5 minutos de contacto, sin embargo redujo el número de células más de 4 unidades logarítmicas

después de 30 minutos de contacto. De hecho, el extracto al 1 % mostró una actividad bactericida significativa después de 60 minutos de contacto.

Figura 20. Influencia del tiempo sobre la supervivencia de *H. pylori* LMG 19449 en contacto con extractos acuosos diluidos de aceite de oliva virgen Manzanilla. Las flechas indican que el número de células viables se encuentra por debajo del límite de detección. Las barras indican la desviación de los duplicados.



Al contrario que otros aceites vegetales refinados, el aceite de oliva virgen contiene una considerable cantidad de compuestos fenólicos con muchos beneficios para la salud (Funatogawa y colbs., 2004; tuck y colbs., 2002; Visioli y colbs., 2005). Además, se ha demostrado una fuerte actividad bactericida frente a ciertos patógenos de alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis y otros (Medina y colbs., 2006). En este estudio se ha observado por primera vez una potente actividad anti-*H. pylori* de los extractos de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos. Esta actividad ha sido efectiva incluso con algunas cepas resistentes a antibióticos, lo que es muy importante, siendo suficiente una concentración muy baja de extracto de aceite de oliva.

El consumo de aceite de oliva puede reducir la secreción ácida en el tracto intestinal (Serrano y cols., 1997), asociándose con la reducción en el tamaño de las úlceras pépticas (Tait, 1986), aunque nunca había sido relacionado con la acción bactericida frente a *H. pylori*. Recientemente, se ha sugerido el posible efecto bactericida de los ácidos grasos y monoglicéridos sobre *H. pylori* (Bergsson y cols., 2002), aunque ello no ha sido demostrado. Sin embargo, en nuestro estudio sí ha quedado demostrado *in vitro* que los compuestos fenólicos que difunden del aceite al jugo gástrico son las sustancias responsables de la fuerte actividad anti-*H. pylori* de este aceite (Romero y cols., 2007).

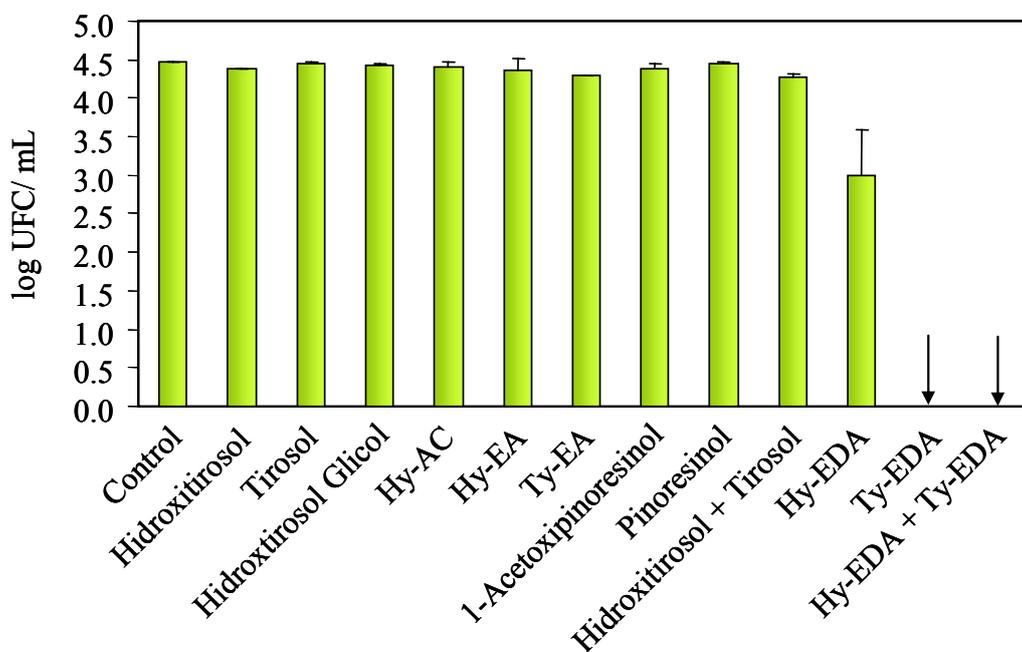
4.1.7. Efecto antimicrobiano de compuestos polifenólicos individuales del aceite de oliva frente a *Helicobacter pylori*

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado 4.1.6., se aislaron por CLAE cada compuesto fenólico simple detectado en la fase acuosa y se ensayaron a una concentración del 5 % de su concentración en el extracto (Tabla 10). *H. pylori* LMG 19449 fue incubada con los compuestos aislados durante 60 minutos. Los resultados se presentan en la Figura 21.

Ninguno de los compuestos fenólicos estudiados excepto la forma dialdehídica decarboximetilada del ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA) y, en particular, la unida a tirosol (Ty-EDA) mostraron efectos bactericidas significativos (Romero y cols., 2007). Además, también se probaron otros tres compuestos oleosídicos derivados del ácido elenólico y ninguno de ellos ejerció efecto bactericida. En consecuencia, Ty-EDA fue el compuesto responsable del mayor efecto bactericida del extracto del aceite de oliva, seguido de Hy-EDA. La incubación con Ty-EDA, a una concentración de tan solo 26 μM , redujo el número de células viables más de 4 unidades logarítmicas.

Es decir, a pesar de que otros compuestos fenólicos estuvieran presentes en el extracto acuoso a mayores concentraciones que el Ty-EDA, esta sustancia por sí sola ejerce una notable actividad bactericida frente a *H. pylori* a concentraciones tan bajas como 26 μM .

Figure 21. Supervivencia de *H. pylori* LMG 19449 después de 60 minutos de contacto con compuestos fenólicos aislados. Cada compuesto fue ensayado al 5% del contenido en el extracto acuoso reflejado en la Tabla 10. Las flechas indican que el número de células viables se encuentra por debajo del límite de detección. Las barras indican la desviación de los duplicados.



Estos resultados son muy prometedores puesto que las concentraciones necesarias para matar *in vitro* a *H. pylori* fue superior con otras sustancias y alimentos. Por ejemplo, la bacteria fue sensible a más de 100 $\mu\text{g/mL}$ de catequinas del té (Yanagawa y colbs., 2003), 12-25 $\mu\text{g/mL}$ de resveratrol (Mahady y colbs., 2003), 12 $\mu\text{g/mL}$ de flavonoides procedentes de plantas medicinales (Fukai y colbs., 2002), y 20-100 $\mu\text{g/mL}$ de aceites esenciales (Bergonzelli y colbs., 2003).

El Ty-EDA es un compuesto fenólico complejo, presente en la mayoría de los aceites de oliva vírgenes en concentraciones hasta de 240 $\mu\text{g/mL}$ (García y colbs., 2003) y al que recientemente se le ha atribuido *in vitro* actividad medicinal similar al ibuprofeno (Beauchamp y colbs., 2005). Este compuesto se hidroliza durante el almacenamiento del aceite de oliva y es relativamente lipofílico (Brenes y colbs., 2001). A raíz de esto, se ha formulado la siguiente pregunta: ¿Puede este compuesto, así como las demás agluconas secoiridoides, difundir del aceite al jugo gástrico y permanecer estables durante la digestión? Vissers y colbs., (2002) incubaron hidroxitirosol, tirosol y

oleuropeína durante 2 horas en jugo gástrico y no detectaron ningún cambio ni reacciones de hidrólisis de los compuestos. También es estable la oleuropeína durante horas en condiciones simuladas de jugo gástrico (Gikas y cols., 2006). Por el contrario, se ha indicado (Corona y cols., 2006) que las agluconas secoiridoides del aceite de oliva sufren hidrólisis durante la incubación de 4 horas con jugo gástrico simulado, y se detectó un incremento en los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol. Ya que en nuestro estudio se ha demostrado que las agluconas secoiridoides en particular, Ty-EDA y Hy-EDA, son los compuestos con mayor actividad anti-*H. pylori* fue necesario clarificar este polémica.

4.1.8. Simulación de la digestión estomacal de aceites de oliva

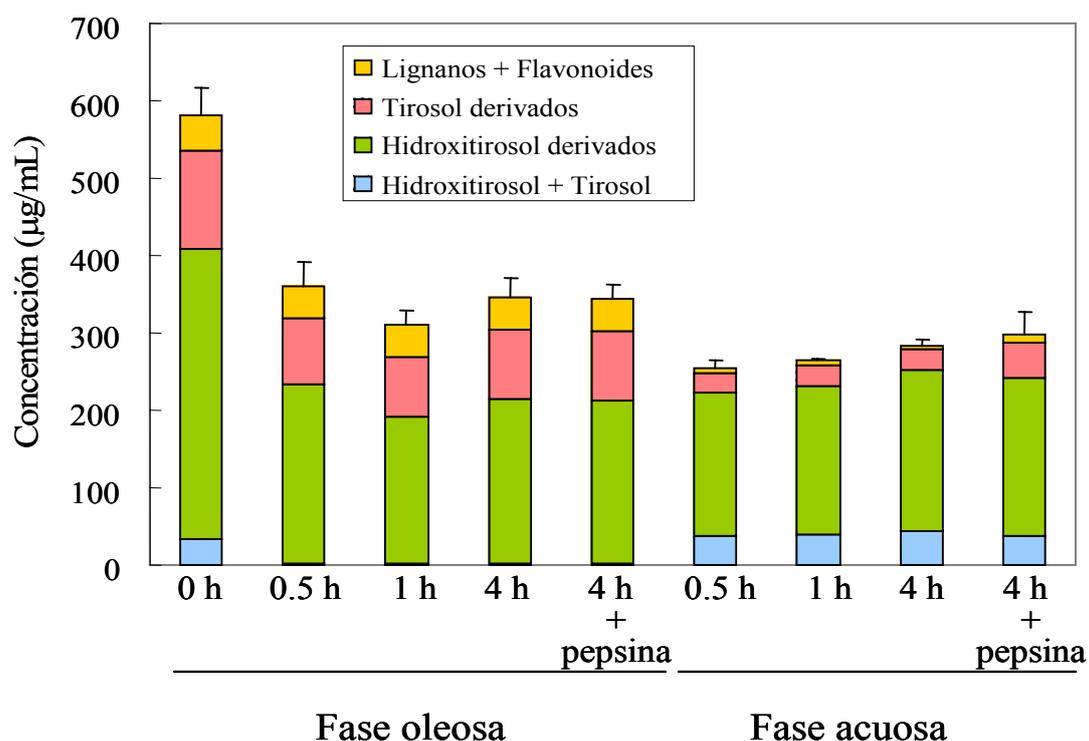
En la Tabla 11 se puede observar la composición fenólica de los diferentes aceites de oliva utilizados en este experimento. Como era de esperar, hay grandes diferencias entre las diversas variedades (García y cols., 2003). Las agluconas de la oleuropeína y del ligustrósido son los principales fenoles en los aceites, seguido de los fenoles simples hidroxitirosol, tirosol, hidroxitirosol acetato, y lignanos.

Tabla 11. Compuestos fenólicos ($\mu\text{mol/kg}$) en los aceites de oliva empleados para simulaciones estomacales.

Polifenol	Variedad de aceite de oliva				
	Manzanilla	Picual	Arbequina	Hojiblanca	Cornicabra
Hidroxitirosol	479,6	176,8	179,6	159,2	164,1
Hy-G	8,8	26,9	14,3	16,4	10,8
Tirosol	159,4	52,3	59,9	121,6	54,1
Hy-Ac	130,8	500,4	202,6	51,9	1,5
Hy-EDA	740,5	923,4	559,4	296,2	1332,7
Ty-EDA	283,5	202,6	179,8	160,2	427,1
1-AcPinor	72,2	18,7	133,9	54,4	9,2
Pinoresinol	52,7	154,2	107,6	86,0	104,4
Hy-EA	535,8	622,7	85,0	454,2	778,6
Hy-EA	249,6	253,6	17,5	240,8	497,2

La incubación del aceite de oliva virgen Picual llevada a cabo a 37 °C en agua acidificada con HCl (hasta pH 2) dio lugar a la difusión de aproximadamente la mitad de los componentes fenólicos del aceite a la fase acuosa (Figura 22). Este fenómeno no es dependiente del tiempo, ya que las diferencias en compuestos fenólicos entre los extractos acuosos obtenidos a 0,5 y 4 horas en la simulación gástrica fueron mínimas. De hecho se observó que la mayoría de los polifenoles difunden del aceite a la fase acuosa durante los primeros 5 minutos de contacto. También puede observarse en la Figura 22 que la adición de pepsina al agua acidificada no influye en el proceso de difusión de los compuestos fenólicos, no contribuyendo significativamente en el cambio de la composición fenólica en la fase acuosa.

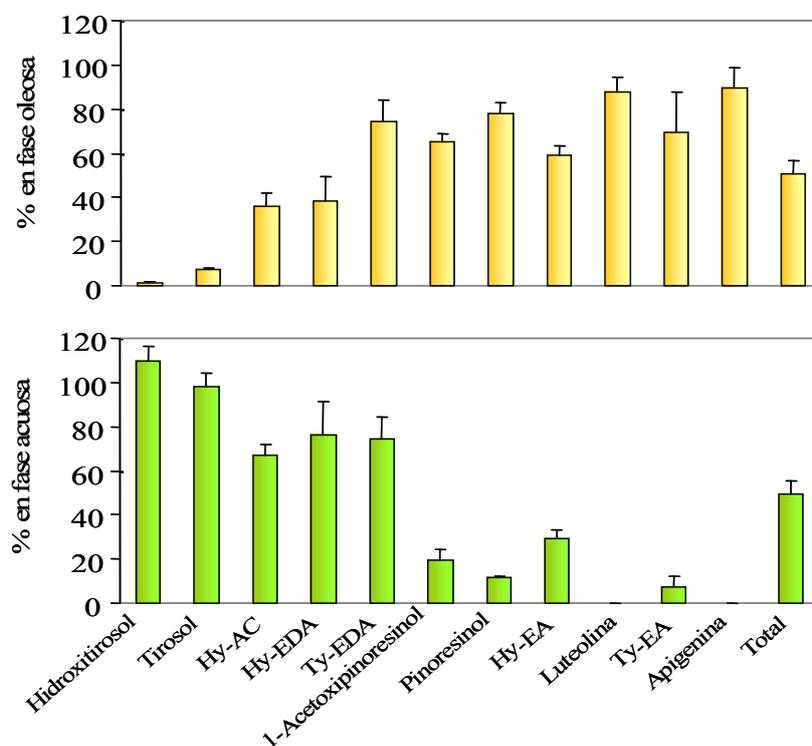
Figura 22. Distribución de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen Picual entre la fase oleosa y acuosa después de la digestión en condiciones simuladas. Las barras indican la desviación estándar de duplicados. Lignanós: 1-acetoxipinoresinol y pinoresinol; Flavonoides: apigenina y rutina; Tirosol derivados: Forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a tirosol (Ty-EDA) y aglucona del ligustrósido; Hidroxitirosol derivados: hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol acetato, forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA).



Otro punto a destacar en la Figura 22 es el hecho de que las agluconas secoiridoides (la forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona de la oleuropeína, la forma dialdehídica decarboximetilada de la aglucona del ligustrósido, la aglucona de la oleuropeína y la aglucona del ligustrósido) no sufren cambios significativos en el agua acidificada a las 4 horas. De la misma manera, la concentración de hidroxitirosol y tirosol incrementan ligeramente durante las 4 horas de la simulación gástrica. La concentración de los lignanos (1-acetoxipinoresinol y pinoresinol) y flavones (apigenina y rutina) no presentan cambios durante las 4 horas en ambiente acidificado.

En la Figura 23 se representa la concentración de cada compuesto fenólico en ambas fases de la simulación gástrica. Como cabría esperar de trabajos anteriores (Visioli y cols., 2005), cuanto más polar sea el compuesto, mayor es la difusión alcanzada desde el aceite a la fase acuosa.

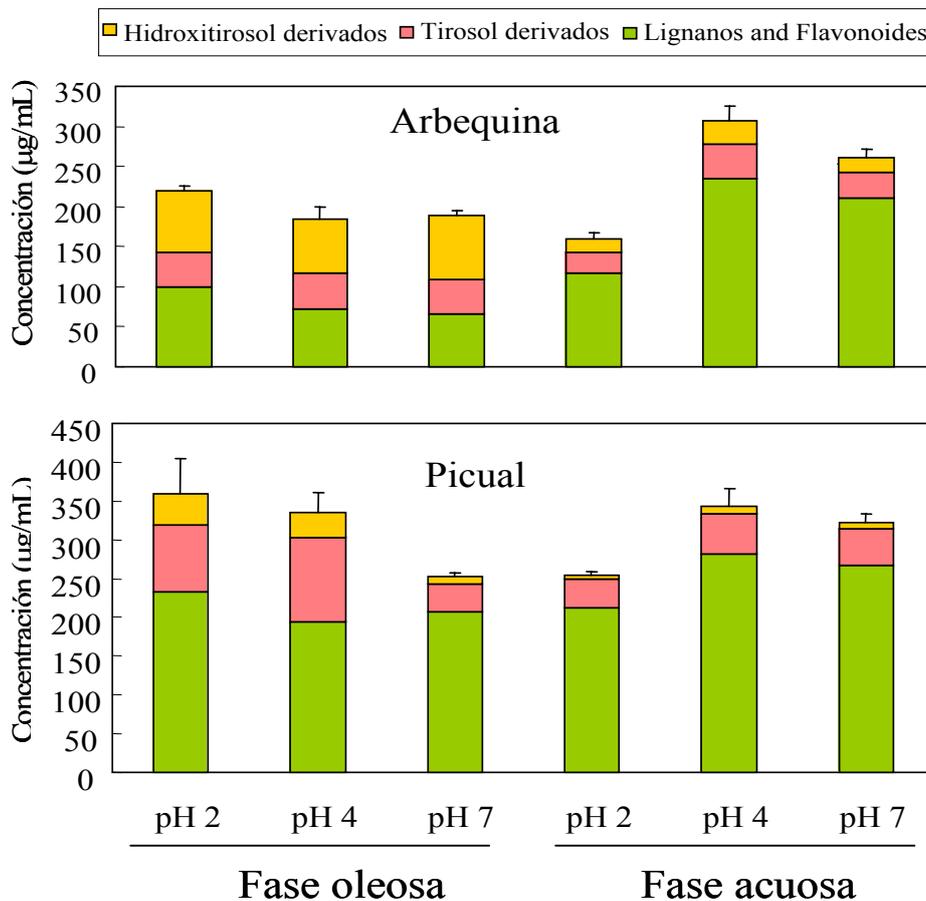
Figura 23. Distribución de compuestos fenólicos del aceite de oliva entre las fases oleosa y acuosa después de la digestión en condiciones simuladas durante 30 minutos. Los datos indican la desviación estándar de cinco aceites de oliva virgen monovarietales. (Manzanilla, Picual, Hojiblanca, Arbequina y Cornicabra).



El hidroxitirosol y tirosol difunden totalmente al agua acidificada mientras que la difusión de los lignanos, flavonas y agluconas de la oleuropeína y del ligustrósido fueron muy bajas. En general, la mitad de los fenoles totales iniciales presentes en el aceite difunden a la solución acuosa.

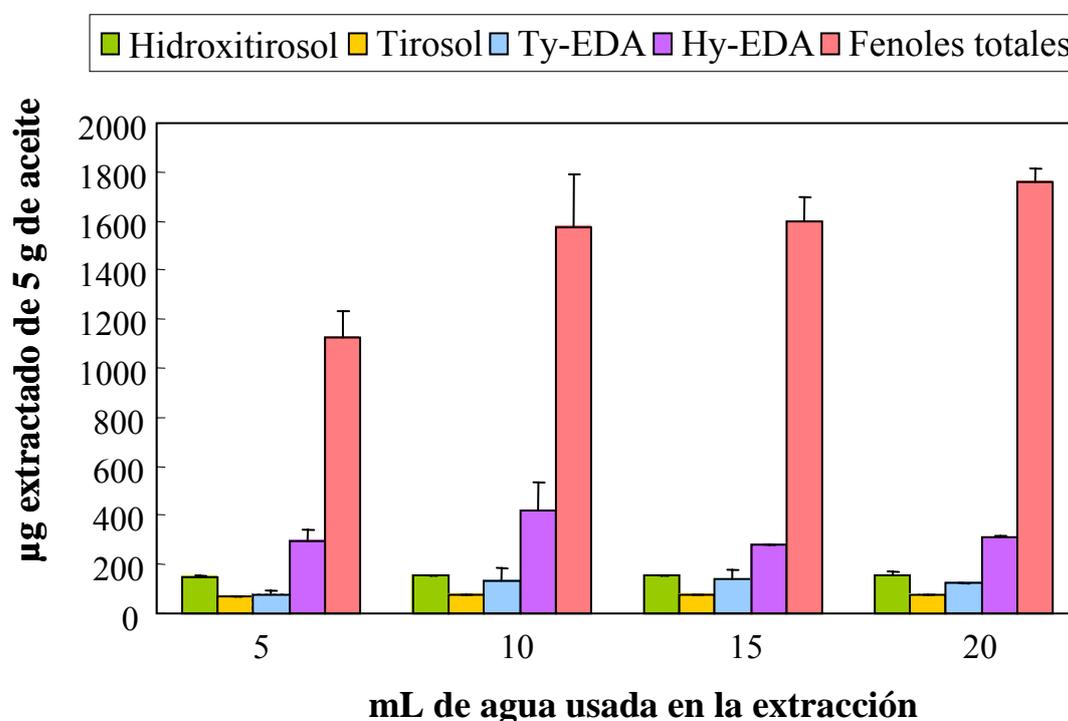
Debido al incremento del pH en el jugo gástrico durante la digestión de alimentos, también se ha estudiado la difusión de compuestos fenólicos a unos valores de pH superiores a 2 unidades (Figura 24). La difusión fue mayor a pH 4 y 7 que a pH 2 para los dos aceites de oliva virgen de Arbequina y de Picual estudiados.

Figure 24. Efecto del pH en la distribución de polifenoles del aceite de oliva entre las fases oleosa y acuosa después de la digestión en condiciones simuladas durante 30 min. Las barras indican la desviación estándar de los duplicados. Hidroxitirosol derivados: hidroxitirosol, Hy-G, Hy-Ac y Hy-EDA; Tirosol derivados: tirosol, Ty-EDA y Ty-EA; Lignanos: 1-acetoxipinoresinol y pinoresinol; Flavonoides: apigenina y rutina.



Durante la digestión, la proporción 1:1 entre fase acuosa y fase oleosa no es siempre la misma. Normalmente, la fase acuosa incrementa con el tiempo de digestión respecto a la fase oleosa. Por lo tanto, para conseguir resultados lo más reales posibles, la cantidad de compuestos fenólicos difundidos del aceite al agua acidificada se evaluó también incrementando el volumen del agua acidificada con el tiempo (Figura 25).

Figure 25. Efecto de la proporción aceite:agua acidificada en el rendimiento de extracción de polifenoles de un aceite de oliva virgen Picual después de 30 minutos de digestión en condiciones simuladas. Las barras indican la desviación estándar de los duplicados.



La extracción total de polifenoles se incrementó cuando la proporción agua:aceite fue elevada de 1 a 2, aunque se quedó inalterada cuando se volvió a subir la proporción de 2 a 4. Este comportamiento fue similar también para el complejo de las agluconas secoiridoides.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan que la mitad de la cantidad total de polifenoles difunde del aceite al jugo gástrico simulado, y las agluconas secoiridoides permanecen estables hasta con 4 horas de incubación a 37° C. En nuestra

opinión, la controversia radica en las diferencias de los métodos de almacenamiento de la fase acuosa antes del análisis. Se ha detectado que las agluconas secoiridoides se hidrolizan durante el almacenaje de extractos de aceite de oliva a pH 2 bajo refrigeración y, como consecuencia, se han tamponado los extractos acuosos a pH 4 inmediatamente después de tomar las muestras. Hecho esto, no se encontró ninguna hidrólisis significativa de las agluconas secoiridoides a las 4 horas de la digestión simulada.

Por lo tanto, Ty-EDA y Hy-EDA deben difundir sin dificultad al jugo gástrico *in vivo*, y deben permanecer estables durante horas en el ambiente ácido y estar disponibles para ejercer su actividad anti-*H. pylori* (Romero y colbs., 2007). El tratamiento frente a *H. pylori* es difícil debido al hábitat ocupado por el microorganismo bajo una capa de mucus adherido a la mucosa gástrica (Liu y colbs., 2006), y esto puede ser una razón para explicar el fallo de todos los experimentos *in vivo* llevados a cabo con diferentes alimentos (McNulty y colbs., 2001; Nir y colbs., 2000; Olthof y colbs., 2001). Sin embargo, en vista a la baja concentración requerida por el Ty-EDA para ejercer actividad bactericida frente a *H. pylori*, podría ser prometedor realizar estudios *in vivo* con el aceite de oliva virgen para prevenir y controlar úlceras pépticas y el cáncer gástrico causado por esta bacteria. Otra posibilidad es que estos compuestos ejerzan su actividad de forma sistémica; sin embargo, existen muy pocos estudios que indiquen la presencia de Ty-EDA y Hy-EDA en plasma (Vissers y colbs., 2002; Tuck y colbs., 2002; D'Angelo y colbs., 2001) y sus cantidades son muy pequeñas (Romero y colbs., 2008)

4.2. Compuestos antimicrobianos en aceitunas de mesa

4.2.1. Identificación de compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con NaOH preparadas en condiciones asépticas

4.2.1.1. Análisis de azúcares, sal y acético en salmueras asépticas

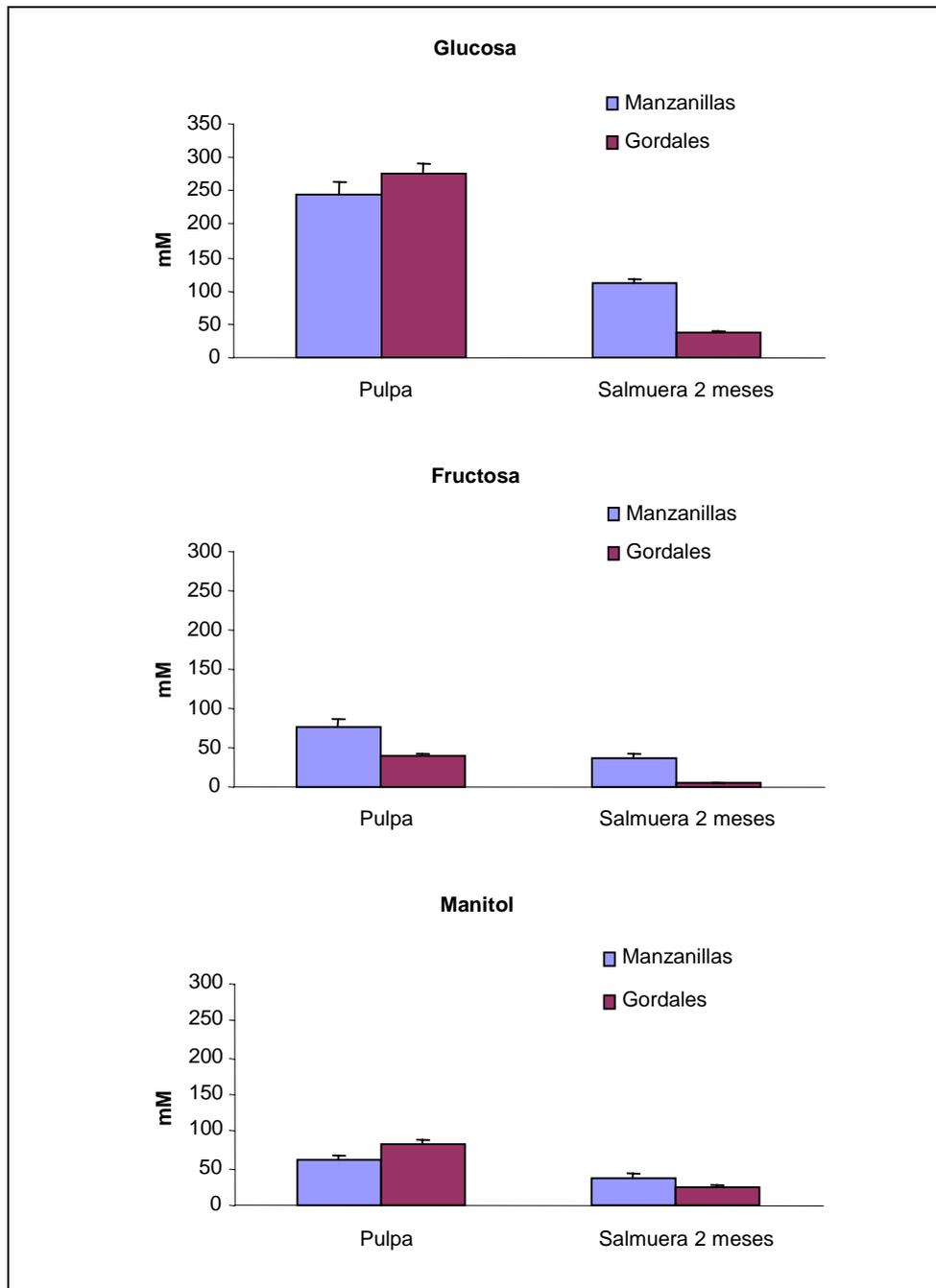
Se conoce tanto científica como industrialmente que las aceitunas de la variedad Gordal fermentan más fácilmente por la acción de bacterias lácticas que las Manzanillas. Sin embargo, no se sabe la causa. Podría deberse a la presencia de inhibidores o favorecedores de la fermentación, esto es, nutrientes y entre ellos los azúcares. Con objeto de reducir el número de variables, se prepararon asépticamente diferentes partidas de aceitunas de las variedades Gordal y Manzanilla en una salmuera acidificada, tal como se explica en el apartado 3.11.1.1.

En la Figura 26 se recogen los valores medios de los azúcares en pulpas frescas y en las salmueras a los 2 meses de almacenamiento. Se observa que las concentraciones de azúcares en pulpa fresca de aceituna para ambas variedades son muy similares. Estos resultados coinciden con datos previos de la bibliografía (García y cols., 1995) y desmienten las suposiciones de que las aceitunas de la variedad Gordal contienen mayor cantidad de azúcares que las de la variedad Manzanilla.

Por el contrario, en las salmueras preparadas en condiciones asépticas, después de dos meses de almacenamiento, sí se aprecian notables diferencias entre ambas variedades. Los valores medios de azúcares en salmueras de Manzanilla son: glucosa 110 mM, fructosa 36 mM y manitol 37 mM; mientras que las salmueras de Gordal presentan cantidades menores: glucosa 37 mM, fructosa 4 mM y manitol 25 mM. Teniendo en cuenta la relación aceitunas/líquido en los frascos asépticos y el porcentaje de jugo en las aceitunas (alrededor del 60%) puede estimarse que después de 2 meses se estableció el equilibrio entre el contenido de azúcares de la pulpa y el medio líquido para las aceitunas de la variedad Manzanilla y, sin embargo, ello no fue así para la variedad Gordal. No existen datos en la literatura sobre la difusión de sustancias fermentables en diferentes variedades de aceitunas de mesa no tratadas con hidróxido

sódico, sobre todo porque hasta ahora no se habían diseñado los experimentos en condiciones asépticas.

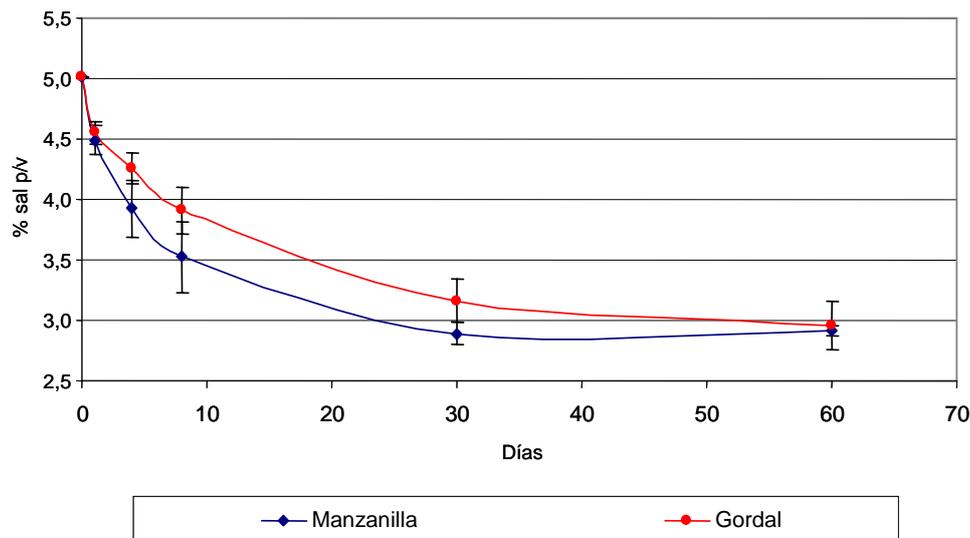
Figura 26. Valores medios en la concentración de azúcares (Glucosa, Fructosa y Manitol) en pulpa fresca y en salmueras después de 2 meses de almacenamiento, de las muestras de aceitunas Manzanillas y Gordales. Las barras de error representan el error estándar.



Asimismo, se puede extraer otra conclusión de los resultados: si la concentración de azúcares en las salmueras de Gordal es suficientemente elevada para que se de una fermentación láctica con facilidad, la salmuera de Manzanilla debería ser un medio mucho más adecuado debido a su mayor contenido en materia fermentable. Por lo tanto, la concentración de azúcares fermentables en la salmuera de Manzanilla no es el factor limitante para el desarrollo de la fermentación láctica de estas aceitunas.

Las diferencias encontradas en difusión de azúcares para ambas variedades podrían estar justificadas por la mayor superficie que presentan los frutos de Manzanilla frente a los de Gordal para similar peso de aceitunas, lo que se denomina área superficial específica. No se dispone de datos sobre velocidad de difusión de azúcares en aceitunas de mesa no tratadas, aunque sí de cloruro sódico (Drusas y colbs. 1988). Estos investigadores demostraron que la piel de las aceitunas es la principal barrera para la difusión de sustancias en estos frutos y el tratamiento con hidróxido sódico elimina, en gran medida, este problema. De los resultados hallados para la difusión del cloruro sódico (Figura 27) podemos observar que la sal penetra en el fruto de manera más rápida en la Manzanilla que en la Gordal, alcanzándose el equilibrio a los 30 días en las primeras y posteriormente en la segunda variedad.

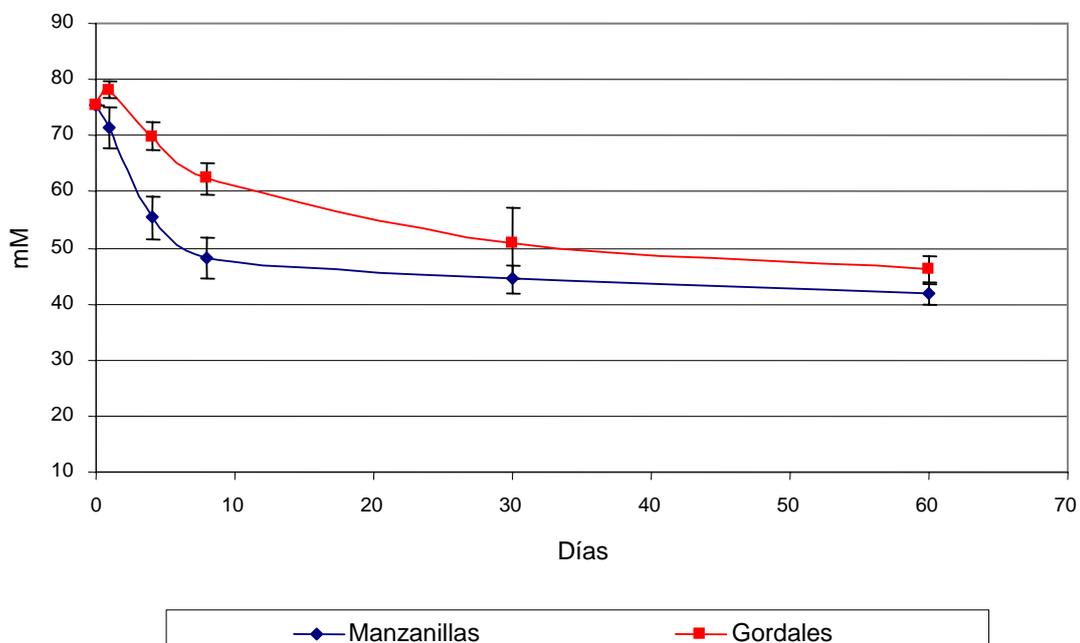
Figura 27. Evolución del % (p/v) de NaCl en salmueras de aceitunas Manzanillas y Gordales a lo largo de 60 días.



En la Figura 28 se recogen los resultados para la difusión del ácido acético, pudiéndose ver, nuevamente, que el equilibrio se alcanza prácticamente a los 10 días para la Manzanilla, mientras que se necesita más tiempo para la Gordal.

En conclusión, se puede decir que la velocidad de difusión de sustancias es mayor para las aceitunas de la variedad Manzanilla que para la Gordal siendo proporcional, entre otras cosas, al área superficial específica, aunque no hay que descartar una mayor permeabilidad de la piel de la Manzanilla frente a la Gordal. La concentración tanto de sal como de ácido acético a los dos meses de conservación fue muy similar en las salmueras de ambas variedades; por consiguiente, la inhibición del crecimiento de bacterias lácticas en salmueras de Manzanilla no tratadas con hidróxido sódico, no parece que pueda ser debida a que los nutrientes presentes en los frutos no pasen al medio.

Figura 28. Evolución de la concentración de ácido acético (mM) en salmueras de aceitunas Manzanillas y Gordales a lo largo de 60 días.



Descartando los factores de materia prima o acidez, se llevaron a cabo inoculaciones de las diferentes salmueras de aceitunas Manzanillas (M1-M4) y Gordales (G1-G4) después del almacenamiento durante 2 meses de los frutos preparados en condiciones asépticas como se describe en el apartado 3.11.1.2. Las cepas utilizadas fueron *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 y *Lactobacillus brevis* BP.

Los recuentos en placa de las salmueras inoculadas, a las 24 y 48 horas de incubación a 32 °C, indicaron crecimiento de ambas cepas de lactobacilos en las salmueras de Gordal, con poblaciones que pasaron de los valores iniciales próximos a 10^6 UFC/mL a más de 10^8 UFC/mL a las 24 h. Por el contrario, con ninguna de las Manzanillas se detectaron los microorganismos ni a las 24 ni a las 48 h de su inoculación, lo que parece indicar no sólo una clara inhibición por parte de todas las salmueras de Manzanilla, sino también un marcado efecto bactericida de las mismas.

Además, se observó consumo de azúcares en las salmueras de Gordal, especialmente de glucosa, con la consiguiente formación de ácido láctico debido al metabolismo fermentativo de estas bacterias. En las salmueras de Manzanillas, por el contrario, no se detectó ningún cambio en las concentraciones de azúcares ni en la formación de ácido láctico, ya que su crecimiento se inhibió por algún factor. En ningún caso se ha observado formación de ácido acético.

Una vez confirmado que los azúcares no constituían el factor limitante para el crecimiento de las bacterias lácticas en las salmueras de Manzanilla, cobraba más importancia la existencia de sustancias inhibidoras (Juven y colbs., 1968b; Fleming y colbs., 1969), las cuales podrían ser compuestos fenólicos u oleosídicos que estuvieran presentes en mayor concentración en Manzanillas que en Gordales.

4.2.1.2. Compuestos fenólicos y oleosídicos en salmueras asépticas

Desde hace tiempo se considera que las aceitunas de la variedad Manzanilla poseen compuestos inhibidores que impiden la fermentación de frutos no tratados con hidróxido sódico. Numerosas investigaciones se han dirigido hacia los compuestos fenólicos como los responsables de esta inhibición, por lo que en este trabajo se investigaron, en primer lugar, las diferencias existentes entre los compuestos fenólicos

presentes en aceitunas de las variedades Manzanilla y Gordal, dos claros ejemplos de aceitunas de fermentación láctica difícil y fácil, respectivamente.

En la Figura 29 se recogen los cromatogramas obtenidos por cromatografía líquida de alta eficacia a una longitud de onda de 280 nm de los compuestos fenólicos identificados en salmuera de aceitunas Manzanillas (cromatograma A) y Gordales (cromatograma B).

La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo teniendo en cuenta su tiempo de retención en el cromatograma, su espectro de absorción al ultravioleta (Figura 30) y su espectro de masas (Figura 31).

Se sabe que el compuesto fenólico más abundante en aceitunas frescas es la oleuropeína (Amiot y colbs., 1986), y su concentración va disminuyendo conforme aumenta la maduración. Sin embargo, sólo se encontró en las salmueras de Manzanilla, y a pesar de que las aceitunas de Gordal también poseen oleuropeína en su pulpa, aunque en menor cantidad (Romero y colbs., 2002b), ésta al pasar a la salmuera sufre una rápida hidrólisis y no se detectó en estas soluciones a los dos meses de almacenamiento. Por ello, el pico mayoritario en estas salmueras corresponde al hidroxitirosol, tal como se ha descrito en trabajos anteriores (Brenes y colbs., 1993). Las salmueras se van enriqueciendo en este compuesto conforme avanza el tiempo de conservación de los frutos.

Recientemente, en los laboratorios del Instituto de la Grasa, se ha descrito la presencia de hidroxitirosol 4-glucósido en pulpa y salmueras de aceitunas (Romero y colbs., 2004a). Sin embargo, en el presente trabajo se han detectado dos picos con espectros de absorción similares al de hidroxitirosol (Figura 30) y masa molecular de 316 uma (Medina y colbs., 2007b). Sin embargo, el pico que eluye inmediatamente después de hidroxitirosol tiene un máximo de absorbancia a 280,2 nm similar al del hidroxitirosol mientras el otro compuesto, tiene su máximo a 276,6 nm. Por ello, se asignó el primer pico al compuesto hidroxitirosol 1-glucósido (la estructura ortodifenólica es similar a la del hidroxitirosol) y el siguiente pico como hidroxitirosol 4-glucósido (se ha perdido la estructura ortodifenólica y ha habido un cierto desplazamiento del máximo de absorbancia). Hay que indicar que los tres posibles

glucósidos del hidroxitirosol ya habían sido descritos previamente en pulpa de aceitunas, aunque no identificados en un cromatograma de CLAE (Bianco y cols., 1998).

Figura 29. Cromatograma obtenido por CLAE con detección por ultravioleta ($\lambda = 280$ nm) de los compuestos fenólicos presentes en salmuera de aceitunas (A) Manzanillas y (B) Gordales. Los picos se corresponden con los siguientes compuestos: (1) hidroxitirosol, (2) hidroxitirosol 1-glucósido, (3) hidroxitirosol 4-glucósido, (4) tirosol, (5) patrón interno: ácido siríngico, (6) ácido *p*-cumárico, (7) verbascósido, (8) forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA), (9) oleuropeína, (10) éster del ácido cafeico unido a secologanósido, (11) comselogósido.

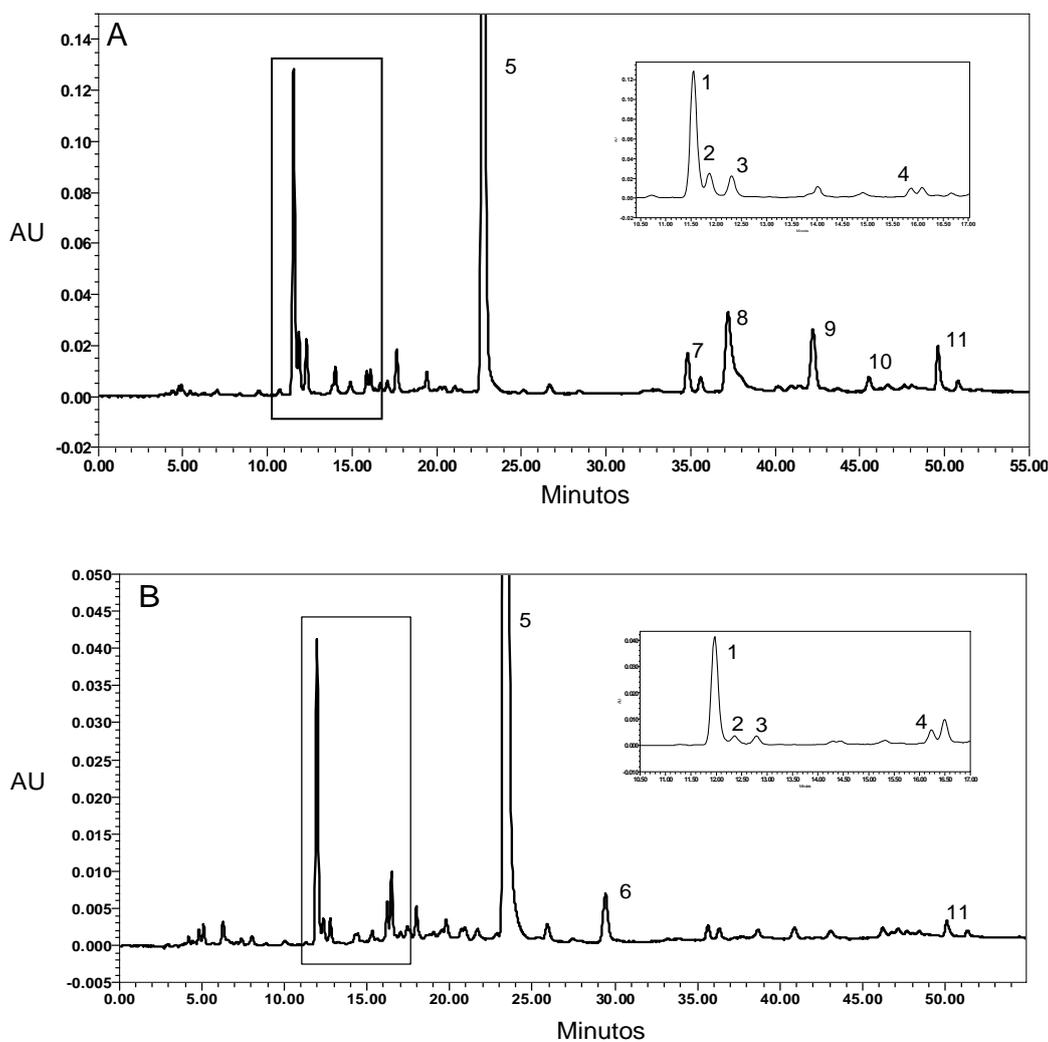


Figura 30. Espectros de absorción en la región de ultravioleta de compuestos fenólicos presentes en las salmueras de aceitunas.

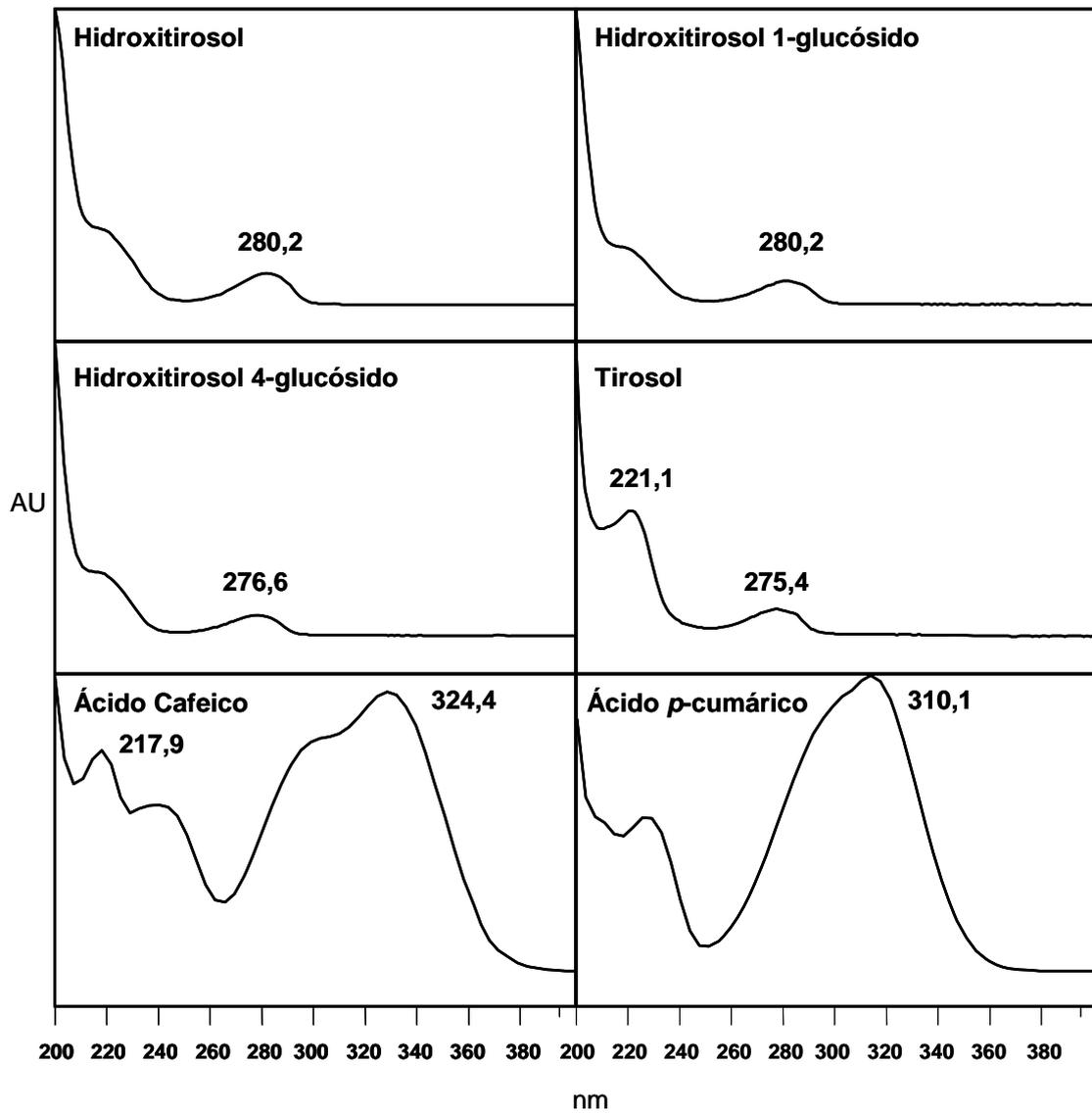


Figura 30 cont.

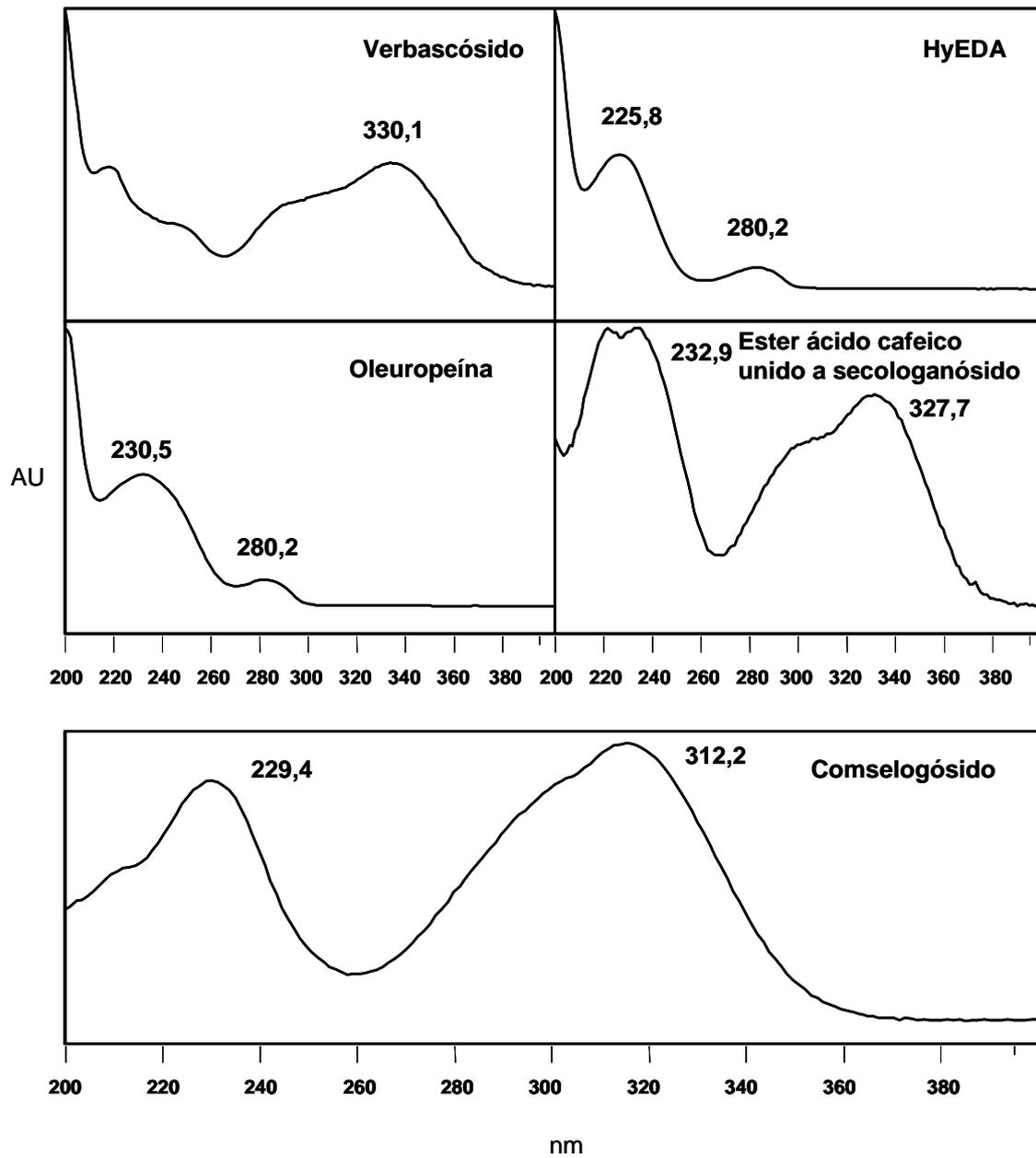


Figura 31. Espectros de masas y estructuras químicas de los compuestos fenólicos presentes en salmueras de aceitunas.

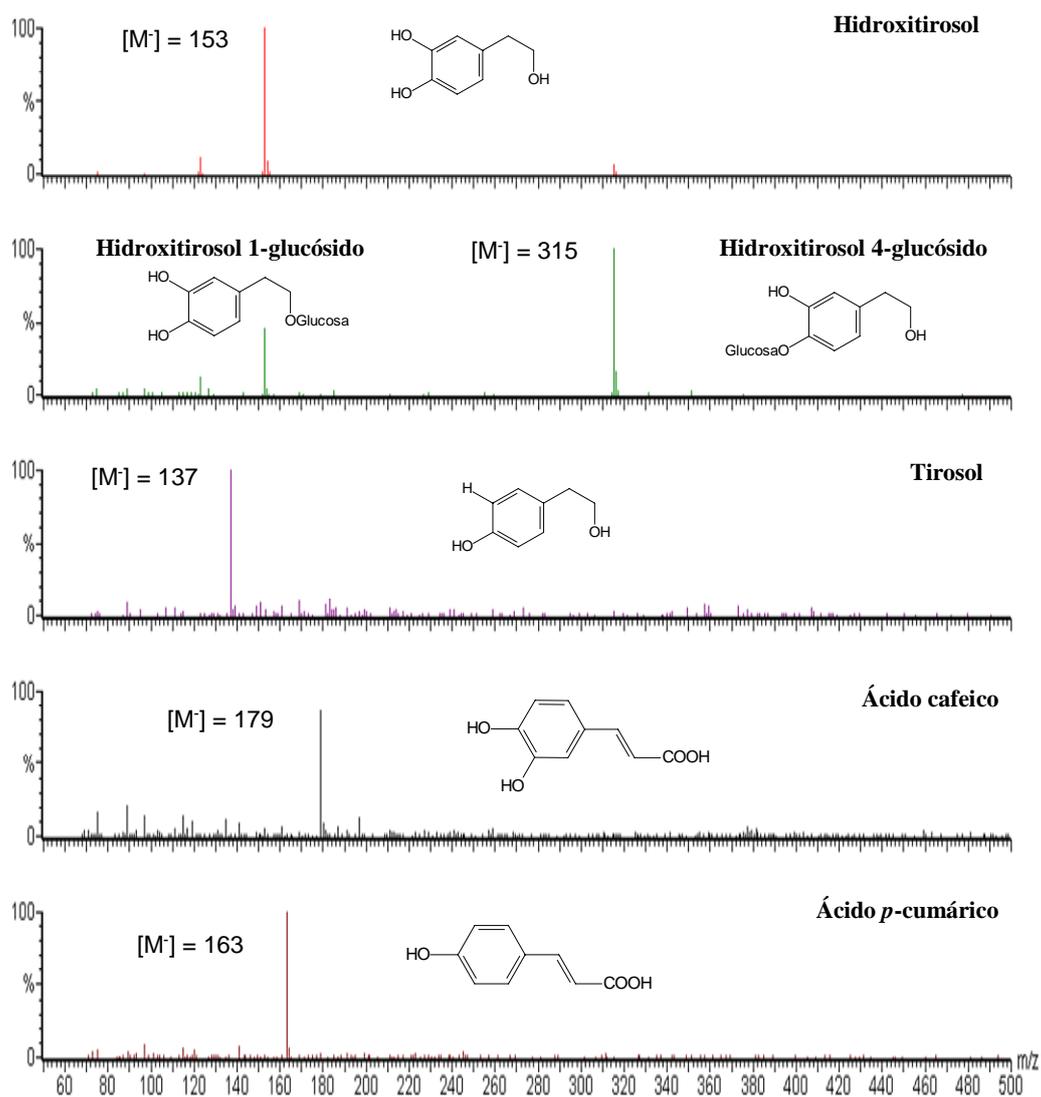
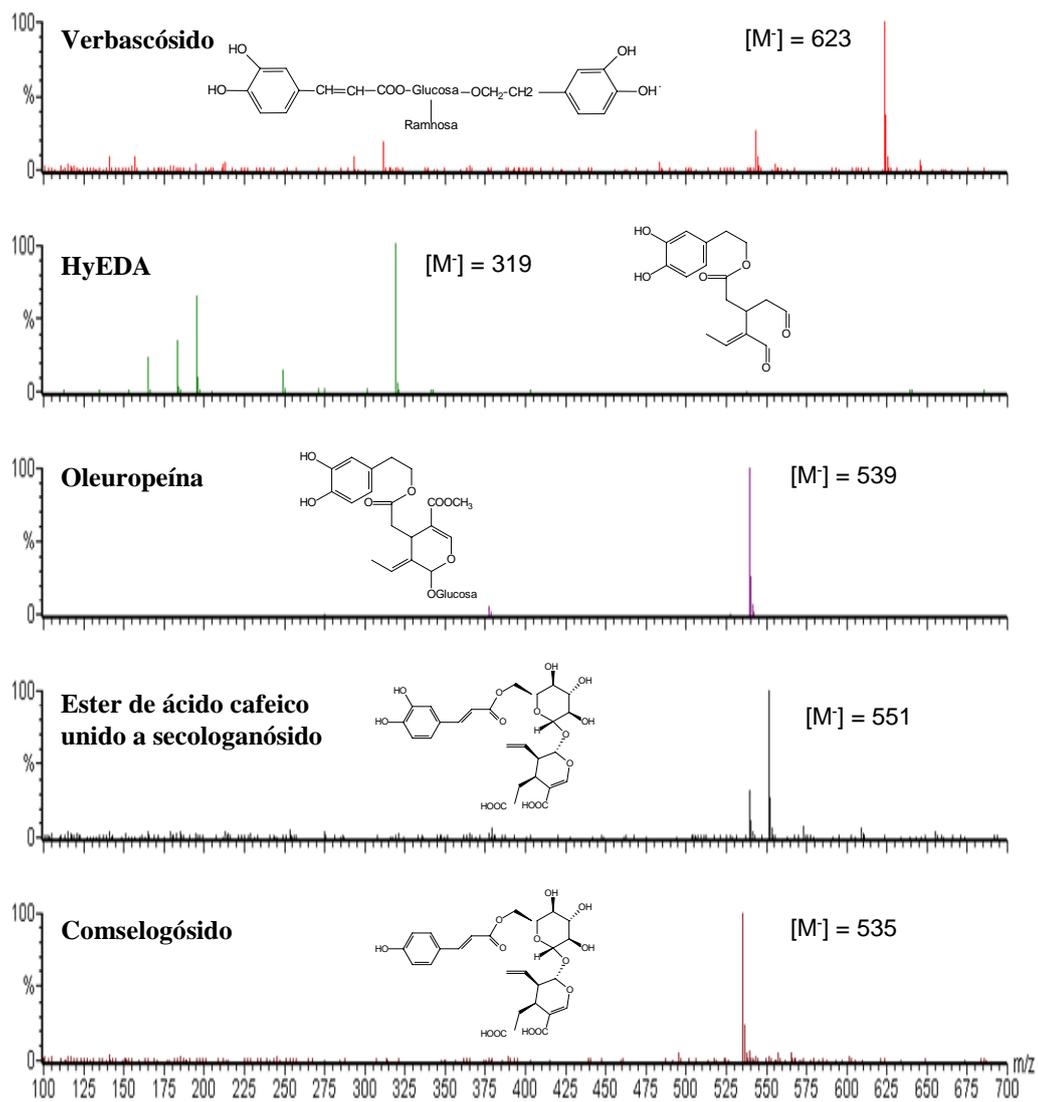


Figura 31 cont.



Tirosol, ácido cafeico y ácido *p*-cumárico son tres fenoles simples con espectros de absorción al ultravioleta muy característicos y además se dispone de patrones comerciales con lo cual su identificación fue rápida. Además, son polifenoles ampliamente descritos en aceitunas de mesa (Brenes y colbs., 1992, Marsilio y colbs., 2006). También se dispone de patrón comercial de oleuropeína, por lo que su identificación fue rápida en los cromatogramas en base a su tiempo de retención, su espectro característico al ultravioleta y su espectro de masas.

Verbascósido es un compuesto típico de las Oleáceas con dos polifenoles en su molécula, ácido cafeico e hidroxitirosol, y cuya identificación fue posible gracias a su espectro característico al ultravioleta (Amiot y colbs., 1986) con un máximo definido a 330 nm, muy cercano al del ácido cafeico, y con masa atómica 624 uma.

Un compuesto polifenólico con estructura oleosídica, ampliamente descrito en el aceite de oliva (Montedoro y colbs., 1993; Brenes y colbs., 1999), es la forma dialdehídica decarboximetilada del ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA). Esta sustancia se encuentra presente en la mayoría de los aceites de oliva virgen (Montedoro y colbs., 1993), hojas de olivo (Ryan y colbs., 2002) y también ha sido descrito recientemente en salmueras de aceitunas de mesa (Servili y colbs., 2006). En nuestros cromatogramas de CLAE fue identificado mediante sus espectros al ultravioleta y de masas, además de su rutinario análisis en los aceites de oliva por parte del grupo investigador del Instituto de la Grasa.

Muy recientemente han sido descubiertos dos nuevos compuestos polifenólicos en alpechines y orujos de aceitunas. Se trata de un éster de secologanósido unido a ácido cafeico (Innocenti y colbs., 2006) y otro éster de secologanósido unido a ácido *p*-cumárico (comselogósido) (Obied y colbs., 2007). Ambos compuestos fueron identificados en las salmueras de aceitunas Gordal y Manzanilla mediante su espectro al ultravioleta y de masas. Sus máximos de absorbancia están muy cercanos al del fenol simple que forma parte de la molécula, ácido cafeico o *p*-cumárico.

Algunos investigadores han descrito en salmueras de aceitunas otros compuestos polifenólicos tales como la aglucona de oleuropeína (Marsilio y colbs., 2006) o ácido

clorogénico entre otros (Pereira y colbs. 2006); sin embargo, su búsqueda en las salmueras de Gordal y Manzanilla mediante espectrometría de masas (CLAE-EM) no fue fructífera.

Nunca se han analizado los compuestos oleosídicos sin estructura polifenólica en salmueras de aceitunas no tratadas con hidróxido sódico. Sólo en aceitunas verdes estilo español se ha descrito la presencia de oleósido 11-metil éster (Brenes y colbs., 1995). En la Figura 32 se muestra el cromatograma a 240 nm de salmueras asépticas de Gordal y Manzanilla, ya que es a esta longitud de onda a la que suelen presentar su máximo de absorbancia estas sustancias (Figura 33). Los espectros de masas se recogen en la Figura 34.

En principio nos encontramos con dos compuestos de masa molecular 404 uma y máximo de absorbancia en el ultravioleta de 238,8 nm, y otros dos compuestos con masa molecular 390 uma y máximo de absorbancia en el ultravioleta de 232,9 nm.

La hidrólisis alcalina del patrón de oleuropeína a baja concentración nos indicó la formación de un compuesto con masa molecular de 404 uma y máximo de absorbancia de 238,8 nm, con lo cual dicho compuesto se identificó como oleósido 11-metil éster. Por el contrario, la hidrólisis alcalina del patrón de oleuropeína a más elevada concentración de hidróxido sódico originó un compuesto con masa molecular de 390 uma y máximo al ultravioleta de 238,8 nm, identificándose este compuesto como la forma demetilada del oleósido 11-metil éster, esto es el conocido como oleósido.

De otra parte, un isómero de la oleuropeína descrito en las Oleáceas es el oleorósido (Kuwajima y colbs., 1988). Sólo difieren ambas sustancias en la posición de la insaturación de la cadena olefínica de la molécula. Por tanto, teniendo en cuenta la similitud en máximos de absorbancia y de masa molecular, se identificaron los picos 5 y 6 como secoxyloganin y secologanósido.

Figura 32. Cromatograma obtenido por CLAE con detección por ultravioleta ($\lambda = 240$ nm) de los compuestos oleosídicos presentes en salmuera de aceitunas (A) Manzanillas y (B) Gordales. Los picos se corresponden con los siguientes compuestos, (1) desconocido 1, (2) desconocido 2, (3) oleósido, (4) forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA) (5) secoxyloganin, (6) secologanósido, (7) oleósido 11-metil éster, (8) patrón interno: ácido siríngico.

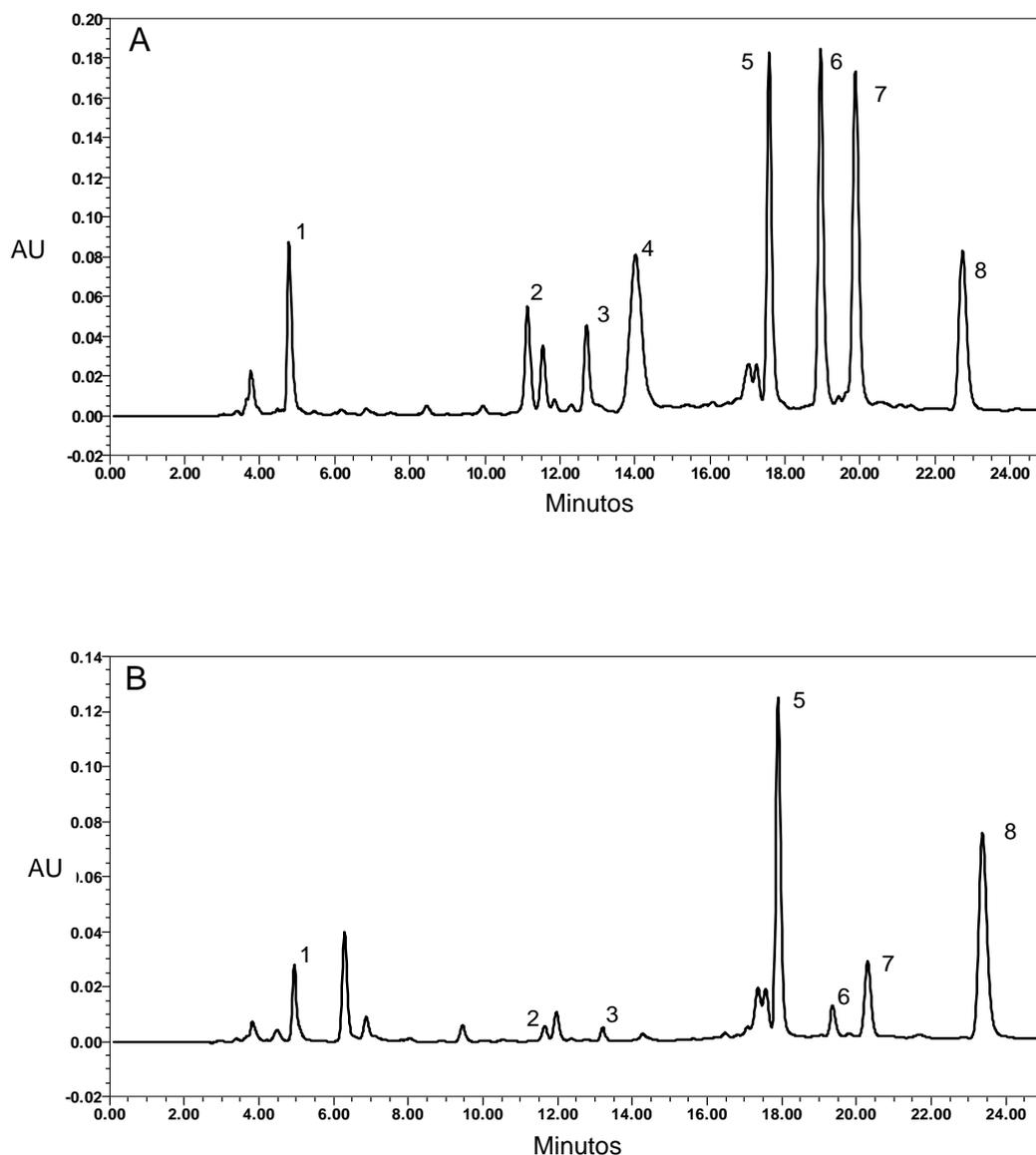


Figura 33. Espectros de absorción en la región de ultravioleta de compuestos oleosídicos presentes en las salmueras de aceitunas.

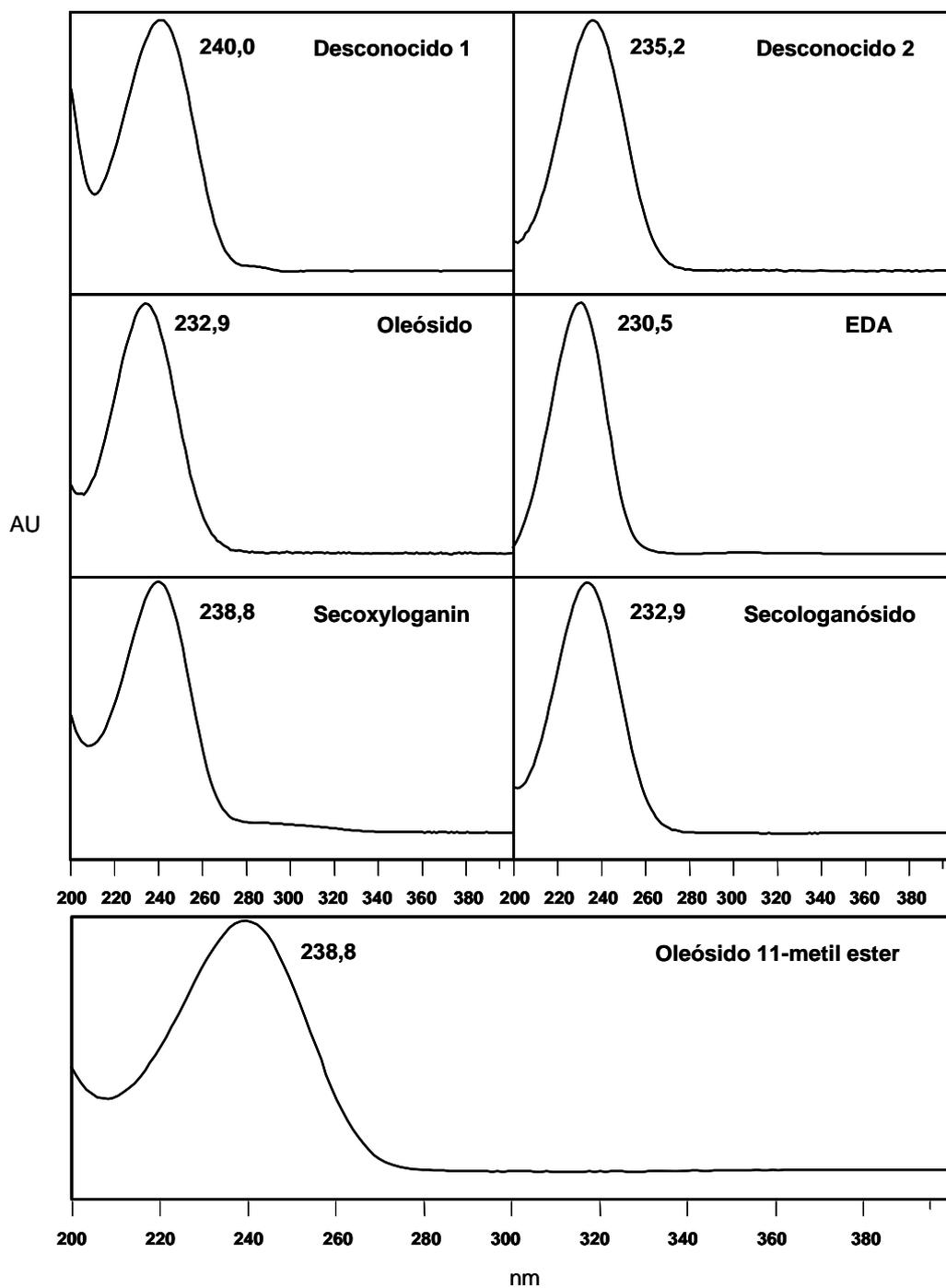
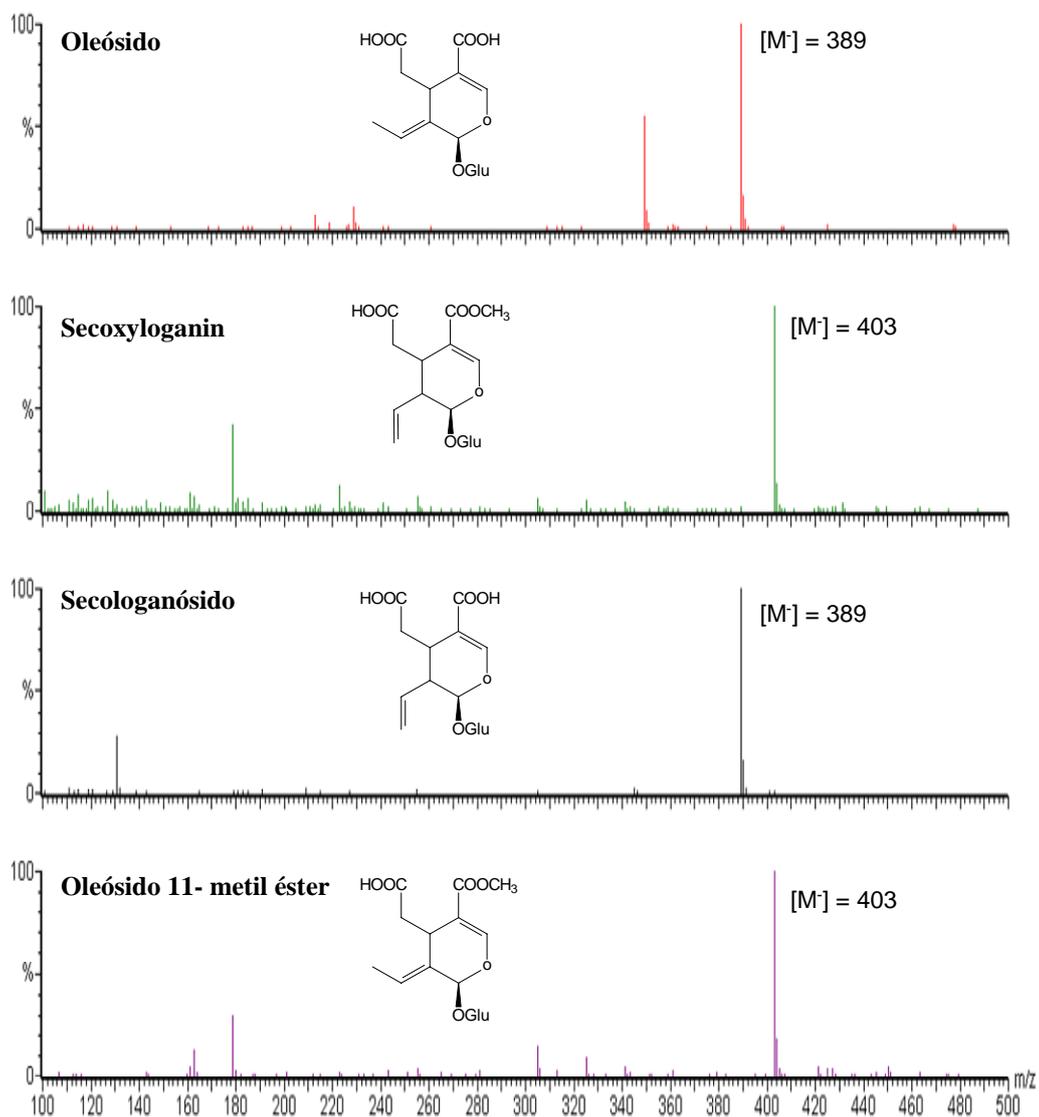


Figura 34. Espectros de masas y estructura química de los compuestos oleosídicos presentes en salmueras de aceitunas.



Otros tres compuestos con espectro en el ultravioleta similar al de los oleósidos fueron los correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2 y 4. La estructura química de los compuestos referidos a los picos 1 y 2 no fue posible determinarla puesto que estos compuestos eluían al mismo tiempo con otros e incluso con el CLAE-EM no fue posible determinar su masa molecular.

Por el contrario, el pico 4 era muy significativo en salmueras de Manzanilla y su espectro de masas indicó una masa 184 uma (Figura 35). Además, sus datos de ^{13}C RMN (Tabla 12) eran similares a los de Hy-EDA (Montedoro y cols., 1993), excepto en los carbonos 4, 5 y 6 que difieren ligeramente. Todo ello hizo pensar que se tratara de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico, lo cual se confirmó mediante la hidrólisis ácida de Hy-EDA, aislado por CLAE analítica, que originó la formación de hidroxitirosol y dicho pico 4 (Figura 36). Por tanto, definitivamente este compuesto se identificó como la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico, nunca descrita antes en aceitunas de mesa, alpechines o alperujos.

Figura 35. Espectro de masa y estructura química de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA).

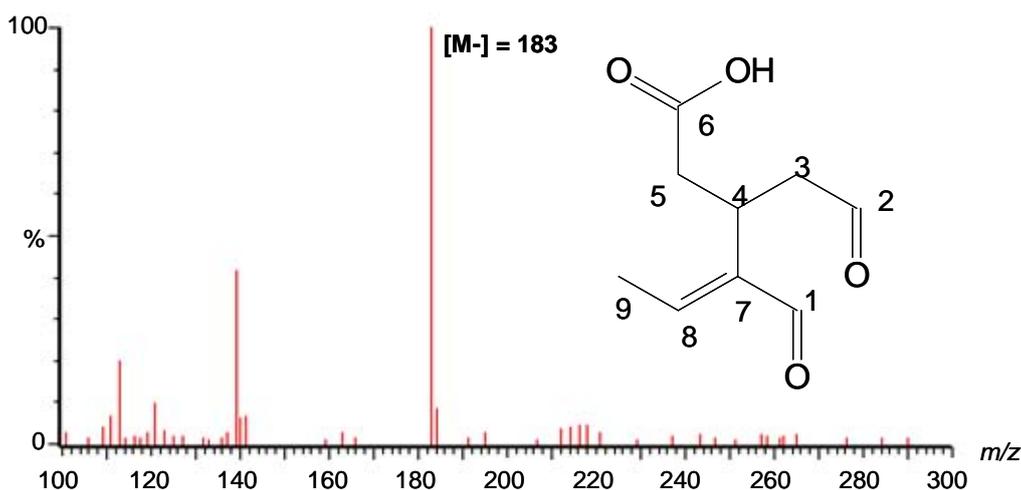
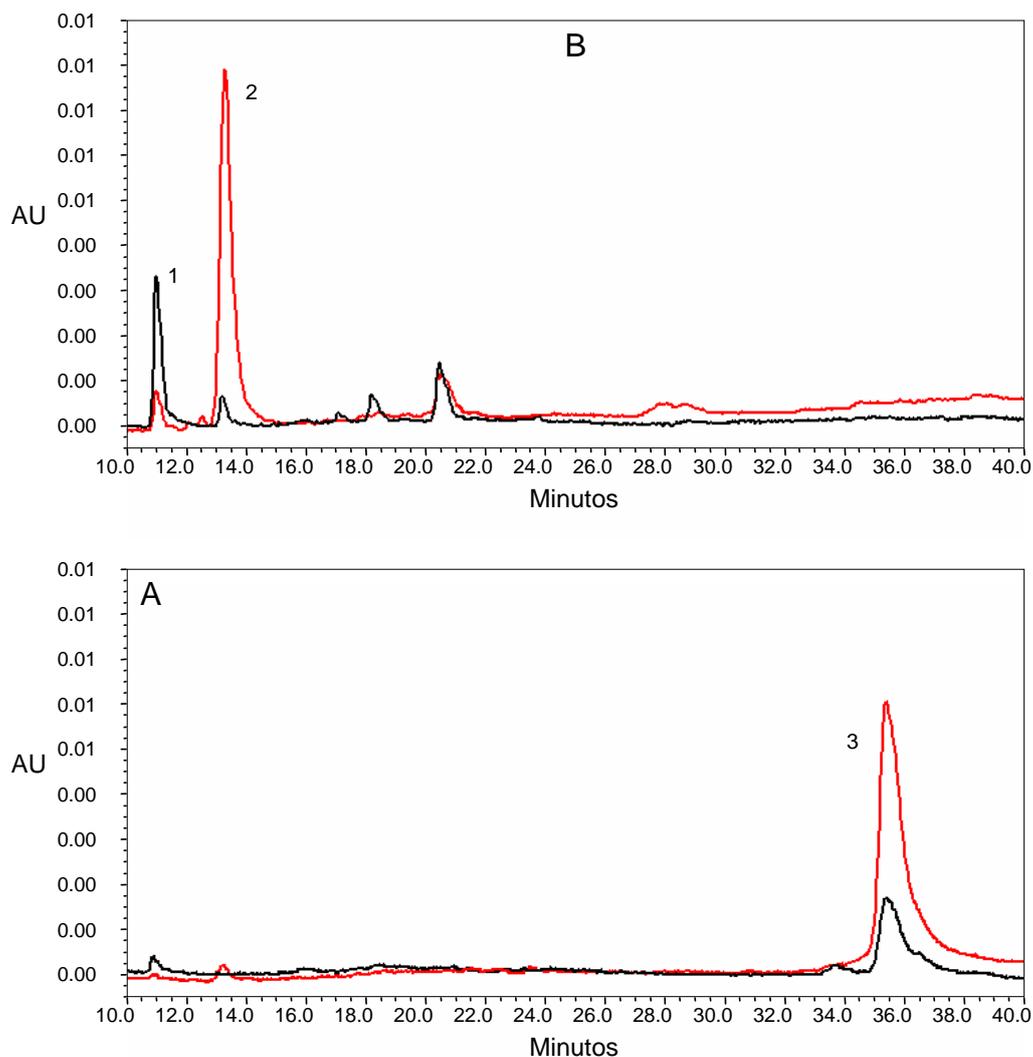


Tabla 12. Datos de ^{13}C RMN de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA).

Carbono	ppm
1	195,3
2	200,4
3	46,1
4	26,8
5	36,4
6	172,2
7	143,0
8	154,8
9	15,4

Figura 36. Cromatograma obtenido por CLAE con detección por ultravioleta ($\lambda = 240$ nm, línea roja; $\lambda = 280$ nm, línea negra) de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA) (A), y de su hidrólisis, (B). Los picos corresponden a los siguientes compuestos: (1) hidroxitirosol, (2) forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA), (3) Hy-EDA.



En las Tablas 13 y 14 se recogen los resultados obtenidos en relación con las concentraciones de polifenoles presentes en las salmueras asépticas de aceitunas Gordales y Manzanillas después de dos meses de almacenamiento. Se muestran los datos individuales de cada partida de aceitunas (1-4) y también la media correspondiente a la variedad.

Tabla 13. Concentración de polifenoles (mM) en salmueras de aceitunas Gordales preparadas en condiciones asépticas y almacenadas durante 2 meses. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de las muestras.

Polifenoles	Gordal 1	Gordal 2	Gordal 3	Gordal 4	Valor Medio
Hidroxitirosol	1,59	1,51	1,70	1,92	1,68 (0,17)
Hidroxitirosol 1-glucósido	0,33	0,14	0,45	0,33	0,31 (0,12)
Hidroxitirosol 4-glucósido	0,17	0,21	0,30	0,22	0,22 (0,05)
Tirosol	0,36	0,25	0,24	0,24	0,27 (0,06)
Ácido cafeico	0,02	ND	ND	ND	0,01 (0,00)
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,09	0,06	0,07	0,10	0,08 (0,02)
Verbascósido	ND	ND	ND	ND	ND
Hy-EDA	ND	ND	ND	ND	ND
Oleuropeína	ND	ND	ND	ND	ND
Éster de ácido cafeico	0,02	ND	ND	ND	0,01 (0,00)
Comselogósido	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 (0,00)

ND: No detectado

Todos los compuestos fenólicos presentaron mayor concentración en salmueras de Manzanillas que de Gordales. Esta diferencia de concentraciones se aprecia para el hidroxitirosol y tirosol, casi tres veces más concentrado en las Manzanillas, y se ve acentuado para los glucósidos de hidroxitirosol: más de 10 veces más concentrados en las salmueras de Manzanillas que en las de Gordal. Verbascósido, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, comselogósido y el éster del ácido cafeico unido a secologanósido, se encontraron a unas concentraciones muy bajas en ambas salmueras, siendo la de Manzanilla más rica en estos compuestos.

Tabla 14. Concentración de polifenoles (mM) en salmueras de aceitunas Manzanillas preparadas en condiciones asépticas y almacenadas durante 2 meses. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de las muestras.

Polifenoles	Manzanilla 1	Manzanilla 2	Manzanilla 3	Manzanilla 4	Valor Medio
Hidroxitirosol	7,24	4,28	6,71	4,88	5,78 (1,41)
Hidroxitirosol 1-glucósido	4,58	1,46	6,28	2,04	3,59 (2,24)
Hidroxitirosol 4-glucósido	2,35	1,25	4,30	1,72	2,41 (1,34)
Tirosol	0,80	0,55	0,68	0,42	0,61 (0,16)
Ácido cafeico	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	ND	ND	ND
Verbascósido	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01 (0,00)
Hy-EDA	1,05	0,45	1,14	2,67	1,33 (0,94)
Oleuropeína	1,33	0,45	2,87	1,51	1,54 (1,00)
Éster de ácido cafeico	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02 (0,00)
Comselogósido	0,04	0,03	0,07	0,04	0,05 (0,02)

ND: No detectado

Resulta especialmente destacable que en las salmueras de aceitunas Gordal no se detectó la forma dialdehídica del ácido elenólico unida a hidroxitirosol ni oleuropeína, mientras que en las salmueras de Manzanillas sí se encontraron a unas concentraciones medias de 1,33 y 1,54 mM, respectivamente.

El efecto inhibitor de las salmueras de Manzanillas se ha atribuido a los compuestos fenólicos por muchos investigadores, en particular a la oleuropeína (Juven y colbs., 1968b; Fleming y colbs., 1973). Los resultados obtenidos indican que esta sustancia fue detectada en salmueras de Manzanilla pero no en las de Gordal, lo cual podía confirmar la hipótesis de los investigadores citados. Las aceitunas Gordales también tienen oleuropeína en su pulpa, aunque en menor concentración que las Manzanillas (Romero y colbs., 2002b). Su difusión lenta a las salmueras acidificadas puede originar su rápida hidrólisis (Brenes y colbs., 1993) y, por tanto, ausencia en dichas salmueras. Tanto en las salmueras de Manzanilla como de Gordal se encontró una significativa concentración de un producto de su hidrólisis, hidroxitirosol, aunque en mayor cantidad en las salmueras de Manzanilla. Este compuesto, junto con tirosol,

también ha sido propuesto para explicar el efecto inhibitor del crecimiento de bacterias lácticas en salmueras de aceitunas de mesa (Ruiz-Barba y cols., 1990; 1993).

Por el contrario, la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol sólo se encontró en salmueras de Manzanilla y este compuesto podría ser, por tanto, otro posible responsable del efecto inhibitor de la fermentación láctica en estas salmueras.

Las Tablas 15 y 16 recogen los datos de las concentraciones de compuestos oleosídicos presentes en las salmueras asépticas de aceitunas Gordales y Manzanillas después de dos meses de almacenamiento. Se muestran los datos individuales de cada partida de aceitunas (1-4) y también la media correspondiente a la variedad.

Tabla 15. Concentración de compuestos oleosídicos (mM) en salmueras de aceitunas Gordales preparadas en condiciones asépticas y almacenadas durante 2 meses. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de las muestras.

COMPUESTO	Gordal 1	Gordal 2	Gordal 3	Gordal 4	Valor Medio
Desconocido 1	0,19	0,19	0,20	0,27	0,22 (0,04)
Desconocido 2	0,03	0,04	0,04	0,01	0,03 (0,01)
Oleósido	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02 (0,00)
EDA	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03 (0,00)
Secoxyloganin	0,50	0,93	0,31	0,30	0,51 (0,29)
Secologanósido	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07 (0,00)
Oleósido 11-metil éster	0,25	0,25	0,11	0,10	0,18 (0,08)

Tabla 16. Concentración de compuestos oleosídicos (mM) en salmueras de aceitunas Manzanillas preparadas en condiciones asépticas y almacenadas durante 2 meses. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de las muestras.

COMPUESTO	Manzanilla 1	Manzanilla 2	Manzanilla 3	Manzanilla 4	Valor Medio
Desconocido 1	0,45	0,28	0,47	0,51	0,43 (0,10)
Desconocido 2	0,71	0,01	0,70	0,44	0,47 (0,32)
Oleósido	0,27	0,13	0,39	0,28	0,27 (0,10)
EDA	0,85	0,53	0,79	2,01	1,06 (0,66)
Secoxyloganin	1,88	0,31	1,11	1,28	1,15 (0,65)
Secologanósido	1,28	0,56	1,47	1,42	1,18 (0,42)
Oleósido 11-metil éster	1,05	0,91	1,90	1,48	1,34 (0,45)

En líneas generales, las salmueras de aceitunas Manzanillas tienen mayor concentración de compuestos oleosídicos que las salmueras de Gordales. Asimismo, los valores medios para los compuestos desconocido 1, desconocido 2 y secoxyloganin son mayores para la Manzanilla. Pero si observamos la salmuera de Manzanilla M2, ésta tiene valores iguales o por debajo de los valores medios de las Gordales. Lo que indica que *a priori*, estos compuestos no deberían ser los causantes de la actividad antimicrobiana, ya que se encuentran también en las salmueras de Gordal, fermentando éstas con gran facilidad.

Los compuestos oleósido, oleósido 11-metil éster y secologanósido también se encuentran en concentraciones mayores en las salmueras de Manzanillas. El compuesto que presenta mayor diferencia en concentración es la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico, siendo el valor medio más de 35 veces superior en las salmueras de aceitunas Manzanillas que en las de Gordales.

Dadas estas diferencias tan significativas de concentraciones de compuestos fenólicos y oleosídicos entre las salmueras de aceitunas Manzanillas y Gordales, cabe pensar que alguno de los compuestos citados, o combinación de varios, sean los

responsables del efecto inhibitor sobre la fermentación láctica de aceitunas Manzanilla sin tratamiento alcalino.

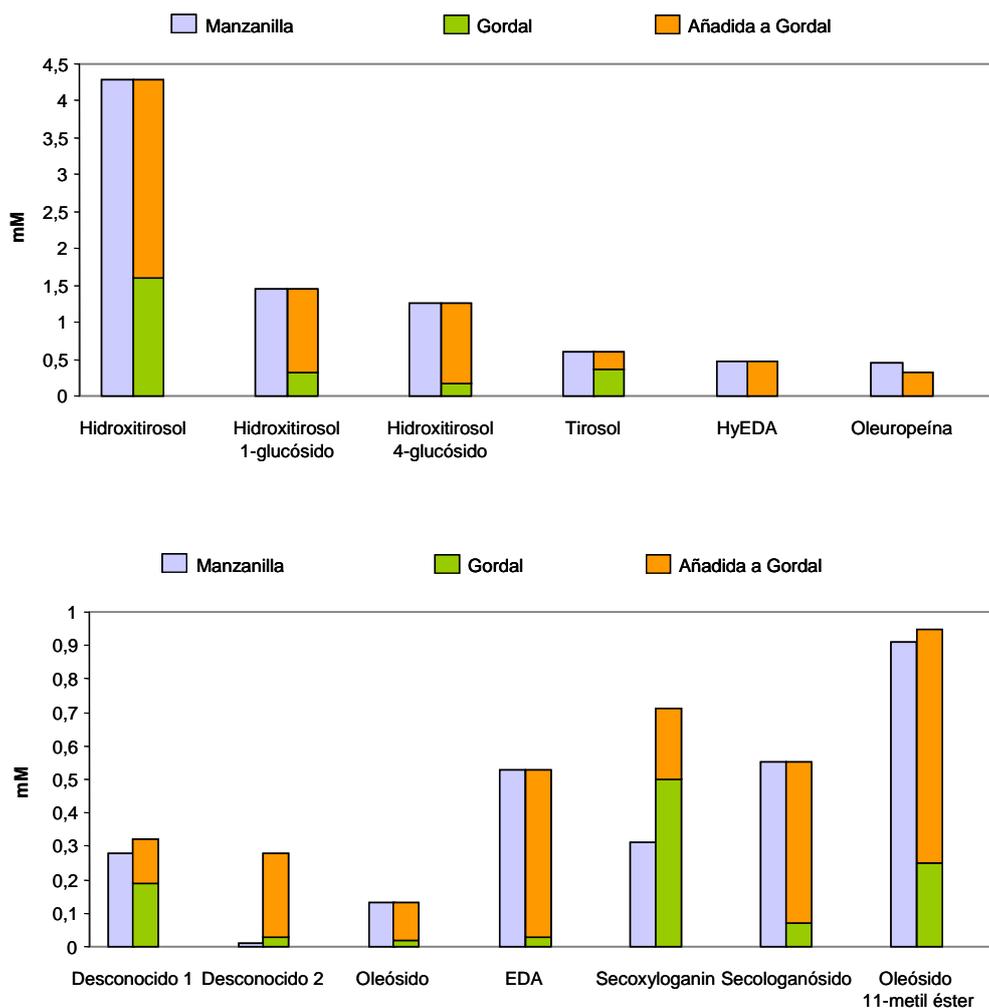
4.2.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros frente a *Lactobacillus pentosus* en salmuera

Se seleccionaron y aislaron por CLAE analítica los compuestos fenólicos y oleosídicos mayoritarios presentes tanto en salmueras de aceitunas Gordales como de Manzanillas.

El aislamiento de los compuestos se hizo a partir de la salmuera de aceitunas Manzanillas M4. Esta salmuera fue seleccionada porque era la que presentaba mayores concentraciones de los compuestos de interés. Se aislaron los siguientes compuestos: hidroxitirosol, hidroxitirosol 1-glucósido, hidroxitirosol 4-glucósido, tirosol, la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol (Hy-EDA), oleuropeína, desconocido 1, desconocido 2, oleósido, forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico(EDA), secoxyloganin, secologanósido y oleósido 11-metil éster, de los cuales solamente la oleuropeína y Hy-EDA aparecen exclusivamente en las salmueras de aceitunas Manzanillas. Cada uno de estos compuestos se añadió a la salmuera de Gordal G1 hasta alcanzar la concentración presente en la salmuera de Manzanilla M2 (Figura 37) que es la que presenta las cantidades menores de todas las partidas de la variedad. Debido a que las salmueras de Gordales también poseen, aunque en pequeñas concentraciones, algunos compuestos fenólicos y oleosídicos, se realizan los cálculos pertinentes para que, una vez adicionado el compuesto, en la solución final ensayada se alcance al menos la concentración encontrada en la Manzanilla M2.

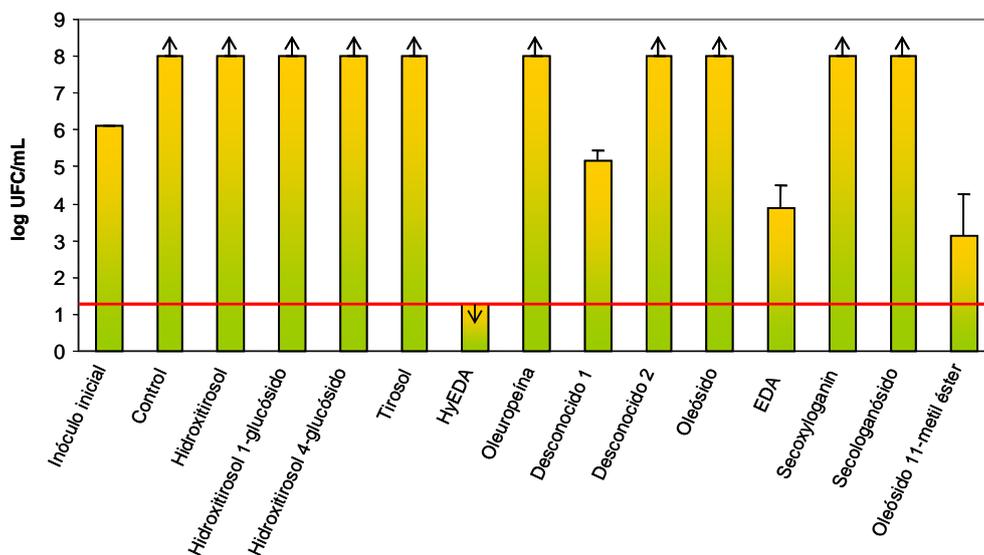
Todos estos compuestos aislados se ensayaron frente a *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, inoculando las salmueras y determinando la población presente tras 48 horas de incubación a 32 °C.

Figura 37. Concentración (mM) de compuestos fenólicos y oleosídicos presentes en la salmuera de Manzanilla M2, salmuera de Gordal G1, y concentración añadida a esta última. La concentración ensayada de los compuestos fenólicos y oleosídicos aislados por CLAE fue la suma presente en la salmuera de Gordal y la añadida.



En la Figura 38 se recogen los resultados (log UFC/mL) obtenidos de los recuentos en placa de las salmueras de aceitunas Gordales a las que se le han añadido los compuestos individualmente.

Figura 38. Evaluación de la actividad antimicrobiana de polifenoles y compuestos oleosídicos frente a *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041. La concentración de los compuestos ensayada aparece en la Figura 37. Las barras de error indican la desviación estándar. La línea roja indica el límite de detección del método (1,3 log UFC/mL).



En las salmueras con hidroxitirosol, hidroxitirosol 1-glucósido, hidroxitirosol 4-glucósido, tirosol, oleuropeína, desconocido 2, oleosido, secoxyloganin y secologanósido, tuvo lugar crecimiento del microorganismo. El recuento obtenido fue superior a 8 log UFC/mL, más de dos unidades logarítmicas que el inóculo inicial. Al igual sucedió con el control positivo de la salmuera de Gordales, que experimento el mismo crecimiento que con el resto de los compuestos anteriores.

A pesar de todas las referencias que apuntaban que la oleuropeína y el hidroxitirosol son los compuestos más inhibidores en las aceitunas, para la cepa de *Lactobacillus* estudiada y las concentraciones ensayadas, no han presentado actividad alguna.

El compuesto desconocido 1 se trata de una mezcla de diferentes compuestos, por lo que no se ha podido identificar al encontrarse muchas impurezas en la fracción colectada. Los resultados obtenidos para la fracción denominada como desconocido 1 en el recuento después de 48 horas fue de 5,15 log UFC/mL. Este valor esta muy próximo al del inóculo inicial (aproximadamente 6 log UFC/mL), por lo que podemos

decir que, después de la incubación, los microorganismos no han experimentado cambio significativo respecto a su número; no ha habido crecimiento pero la supervivencia ha sido elevada.

Por el contrario, la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico y el oleósido 11-metil éster, han presentado cierta actividad antimicrobiana. El número de microorganismos después de la incubación se ha reducido aproximadamente dos unidades logarítmicas. Ambos compuestos han ejercido un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Lactobacillus pentosus*.

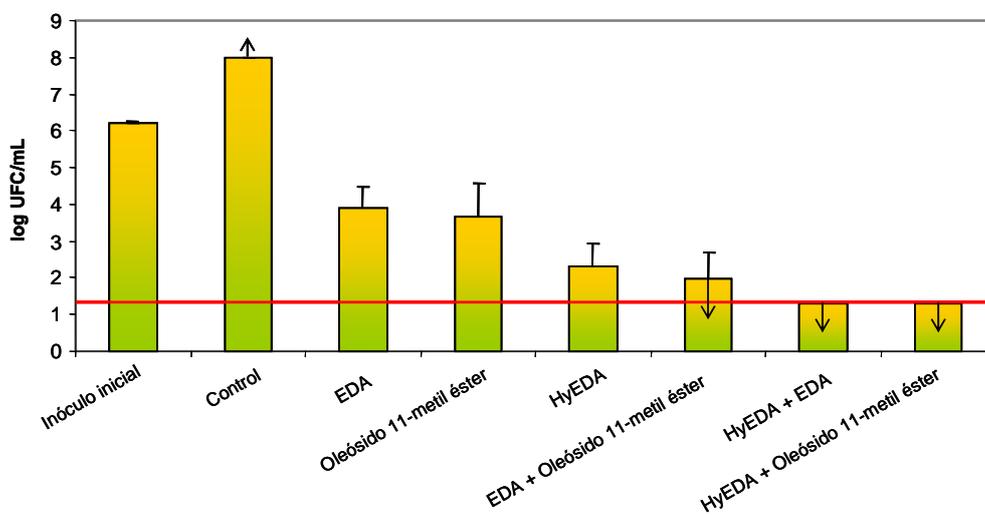
Finalmente, el compuesto que ha presentado mayor efecto antimicrobiano ha sido la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol. Después de la incubación, se realizó la siembra de la salmuera y no se obtuvo ninguna unidad formadora de colonia (UFC), situándose por debajo del límite de detección, 1,3 log UFC/mL. Este compuesto, junto con la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a tirosol, son precisamente las dos sustancias con mayor actividad bactericida presentes en los aceites de oliva virgen (Medina y cols., 2006). Sin embargo, nunca hasta ahora se había atribuido el efecto inhibitor de las salmueras de aceitunas Manzanillas frente a las bacterias lácticas a la presencia de Hy-EDA en las mismas, o de EDA o de oleósido 11-metil éster (Medina y cols., 2007b).

Teniendo en cuenta que las concentraciones de referencia a las que se han ensayado los compuestos corresponden a las encontradas en la salmuera de Manzanilla M2, y que ésta era la menos concentrada de todas las Manzanillas, podemos intuir que son compuestos con elevada actividad antimicrobiana, puesto que incluso a bajas concentraciones presentan efectos inhibidores. En otras salmueras de Manzanillas, el Hy-EDA puede llegar a alcanzar concentraciones hasta 6 veces mayores que en la M2, hasta 4 veces para el EDA y hasta el doble para el oleósido 11-metil éster. Estos compuestos, en especial el Hy-EDA, con mayor actividad bactericida, parecen ser los responsables de la inhibición de la fermentación en las salmueras de aceitunas Manzanillas sin tratamiento con hidróxido sódico.

En la Figura 39 se presentan los resultados de otro ensayo en el que se vuelve a evaluar la actividad bactericida de los compuestos Hy-EDA, EDA y oleósido 11-metil

éster, tanto individualmente como sus mezclas dos a dos. Las concentraciones fueron las mostradas en la Figura 37, excepto para el Hy-EDA que se testó a la mitad de su concentración (0,24 mM).

Figura 39. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos EDA, oleósido 11-metil éster y Hy-EDA (0,52; 1 y 0,24 mM respectivamente) y sus mezclas frente a *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041. Las barras de error indican la desviación estándar. La línea roja indica el límite de detección del método (1,3 log UFC/mL).



Lo más destacable de los resultados es que aún diluido a la mitad, el Hy-EDA sigue siendo el más inhibitorio de estos tres compuestos, aunque en este caso no fue tan eficaz como al doble de concentración. Los resultados medios del recuento para el Hy-EDA fueron 2,33 log UFC/mL, produciéndose una disminución de casi 4 unidades logarítmicas respecto al valor inicial. Las moléculas de EDA y oleósido 11-metil éster provocaron reducciones de 2 unidades logarítmicas, aproximadamente.

El efecto bactericida de las mezclas de los compuestos es superior a la de los compuestos individuales, se ha producido un efecto sinérgico, siendo más potente el efecto inhibitorio en conjunto que por separado.

De todas las mezclas realizadas, las más efectivas han sido donde participaba el Hy-EDA, ya que se ha reconocido como el inhibidor más efectivo de los tres. En estos

casos, no se detectó crecimiento de microorganismos en la salmuera después de su incubación, produciendo una disminución muy importante de más de 4 unidades logarítmicas. La mezcla ensayada de EDA y oleósido 11-metil éster, también fue más efectiva que ambos por separado. El inóculo inicial quedó reducido a un valor medio de 1,95 log UFC/mL.

Por lo tanto, gracias a este trabajo, se han podido identificar los responsables del efecto inhibitor que se produce en las salmueras de aceitunas Manzanillas cuando no reciben tratamiento alcalino. Se puede considerar al Hy-EDA como mayor agente antimicrobiano frente a *L. pentosus*, seguido del EDA y del oleósido 11-metil éster, y descartar a la oleuropeína, hidroxitirosol, verbascósido, aglucona de oleuropeína y tirosol, entre otros (Medina y cols., 2007b).

4.2.1.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos puros frente a diversos microorganismos

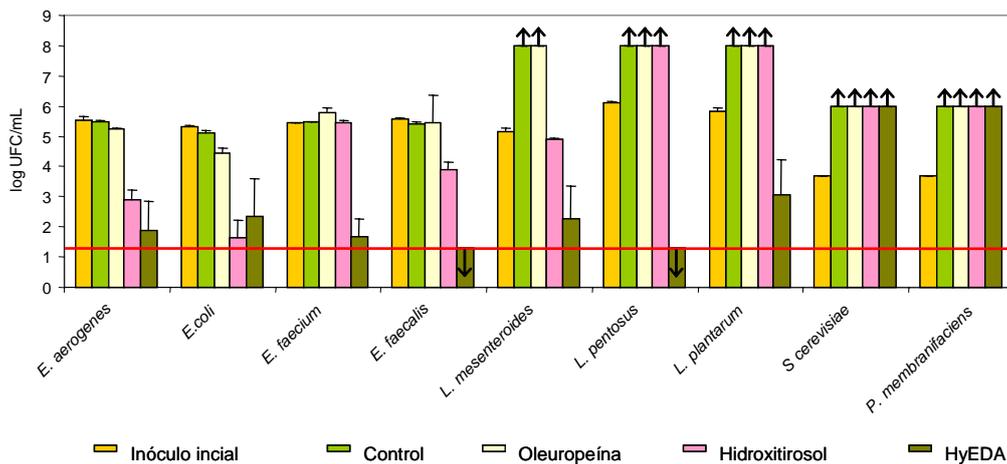
Los resultados obtenidos para la oleuropeína, hidroxitirosol y tirosol son contrarios a lo que muchos investigadores citan en sus trabajos. Muchos autores atribuían el efecto bactericida a estos compuestos, y en este trabajo se ha demostrado que frente a la cepa de *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, y para estas condiciones de ensayo, estos compuestos son inocuos para el crecimiento del microorganismo.

Confirmada la actividad bactericida de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol frente a *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, también se ha querido estudiar en el presente trabajo los efectos producidos por el Hy-EDA, hidroxitirosol y oleuropeína frente a otros microorganismos descritos en aceitunas de mesa, a unas concentraciones de 0,48; 5,2 y 5,8 mM, respectivamente y en la salmuera de Gordal G1.

En la Figura 40 se recogen los resultados obtenidos de la evaluación antimicrobiana de dichos compuestos frente a *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, *Enterococcus faecium* CECT 410, *Enterococcus faecalis* CECT 481, *Leuconostoc mesenteroides* LM51, *Enterobacter aerogenes* CECT

684, *Escherichia coli* CECT 434, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 y *Pichia membranifaciens* CECT 10482.

Figura 40. Comparación de la actividad antimicrobiana de los compuestos: forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA), hidroxitirosol y oleuropeína, a concentraciones de 0,48; 5,2 y 5,8 mM respectivamente, frente a *Enterobacter aerogenes* CECT 684, *Escherichia coli* CECT 434, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, *Pichia membranifaciens* CECT 10482, *Leuconostoc mesenteroides* LM51, *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Enterococcus faecium* CECT 410 y *Enterococcus faecalis* CECT 481. Las barras de error indican la desviación estándar.



Las levaduras *Saccharomyces* y *Pichia* no sufrieron ningún efecto inhibitor por parte de estos tres compuestos después de 48 horas en incubación en contacto con ellos, más bien al contrario, experimentaron un aumento de células superior a dos unidades logarítmicas con respecto al inóculo inicial. Este es un resultado previsible puesto que las levaduras son precisamente los microorganismos que predominan en salmueras de aceitunas no tratadas con hidróxido sódico (Brenes y colbs., 1986; de Castro y colbs., 2007). También *Candida albicans* fue el único microorganismo que no se afectó por el tratamiento con compuestos polifenólicos del aceite de oliva virgen (Medina y colbs., 2006).

La oleuropeína ejerció poca o ninguna actividad antimicrobiana frente a todas las bacterias ensayadas. Las cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* crecieron sin dificultad en presencia de este compuesto, mientras que para las demás no se observaron diferencias notables respecto al número de microorganismos inoculados inicialmente.

Los resultados obtenidos para el hidroxitirosol son más diversos. En el caso de *Lactobacillus plantarum* y *L. pentosus*, hubo crecimiento en presencia de hidroxitirosol, alcanzando unos niveles mayores a 8 log UFC/mL. Las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y *Enterococcus faecium* no sufrieron ninguna alteración significativa con respecto al número de microorganismos inoculado inicialmente. Para *Enterococcus faecalis* hubo una disminución aproximada de una unidad logarítmica, y los efectos más acusados se mostraron para *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*, alcanzándose reducciones de 2 y 3 unidades logarítmicas, respectivamente. Es posible que el efecto del hidroxitirosol sea más importante frente a bacterias Gram-negativas, pero no se ha estudiado un número suficiente de microorganismos para confirmarlo.

El compuesto que presenta mayor actividad bactericida de los tres probados vuelve a ser el Hy-EDA, que presenta efectos claros frente a todas las bacterias ensayadas, en mayor o menor medida dependiendo del microorganismo (Medina y cols., 2007b). El mayor efecto antimicrobiano se observó frente a *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus pentosus*, ya que tras la incubación en contacto con el compuesto no se obtuvo ninguna unidad formadora de colonia en placa y, por lo tanto, el número de viables fue menor que 1,3 log UFC/mL. Para el resto de bacterias, el efecto antimicrobiano producido por el Hy-EDA redujo entre 2,5 y 3,5 unidades logarítmicas el número de microorganismos en las salmueras después de 48 horas de incubación con dicho compuesto.

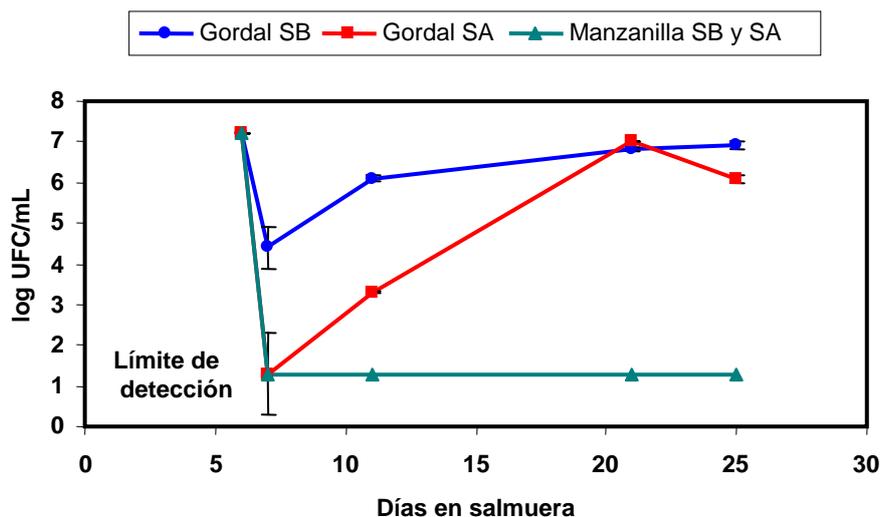
4.2.2. Influencia de las sustancias antimicrobianas sobre la fermentación a escala piloto de aceitunas de mesa Gordal y Manzanilla

Tal como se describe en el apartado 3.11.2.1, se procesaron aceitunas de las variedades Gordal y Manzanilla como verdes al estilo español (tratadas con NaOH) y negras (no tratadas con NaOH); esto es, recogidas estas últimas con color amarillento y conservadas en una salmuera acidificada. Por supuesto, estas experiencias no se

llevaron a cabo bajo condiciones asépticas. Las aceitunas no tratadas se prepararon con sal alta (SA) y sal baja (SB), y se inocularon a los 7 días con una mezcla de bacterias lácticas.

Como se observa en la Figura 41, las bacterias lácticas no crecieron en las salmueras de aceitunas Manzanilla no tratadas con NaOH, independientemente de la concentración inicial de sal. Por el contrario, dichos microorganismos redujeron su número de inóculo inicial, en mayor medida con la sal inicial alta, pero terminaron creciendo en las salmueras de aceitunas Gordales.

Figura 41: Evolución de bacterias del ácido láctico inoculadas en salmueras no tratadas con NaOH. Las barras indican la desviación estándar.



Asimismo, se produjo un abundante desarrollo de bacterias lácticas tanto en las salmuera de Gordal como en las de Manzanilla tratadas con NaOH (Figura 42). Estos datos se correlacionan con la formación de ácido láctico recogidos en la Figura 43. En todas las salmueras tratadas con NaOH se detectó un incremento paulatino en la formación de ácido láctico, así como en las de Gordal no tratadas con NaOH. Estos datos confirmaron los resultados encontrados previamente sobre las dificultades de fermentación láctica por parte de las aceitunas Manzanilla (Fleming y Etchells, 1967) y la influencia de la concentración de sal sobre el desarrollo de dicha población microbiana (Rodríguez-Borbolla y cols., 1971).

Figura 42: Crecimiento de bacterias del ácido láctico en salmuera de aceitunas tratadas con NaOH sin inocular. Las barras indican la desviación estándar.

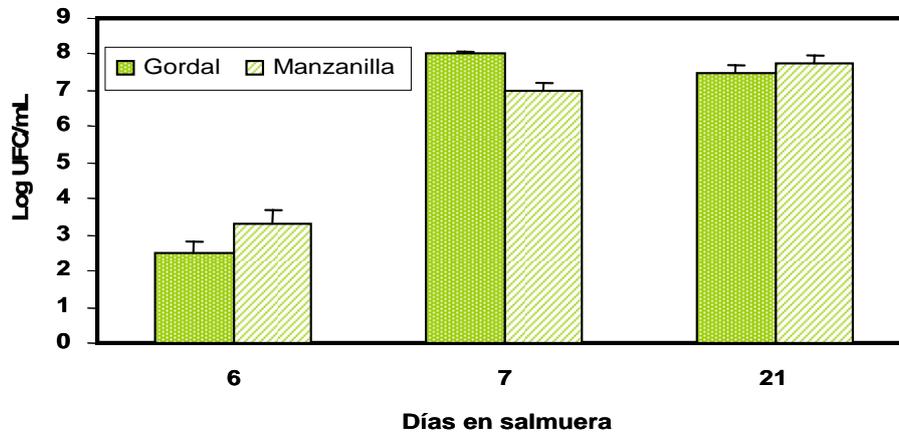
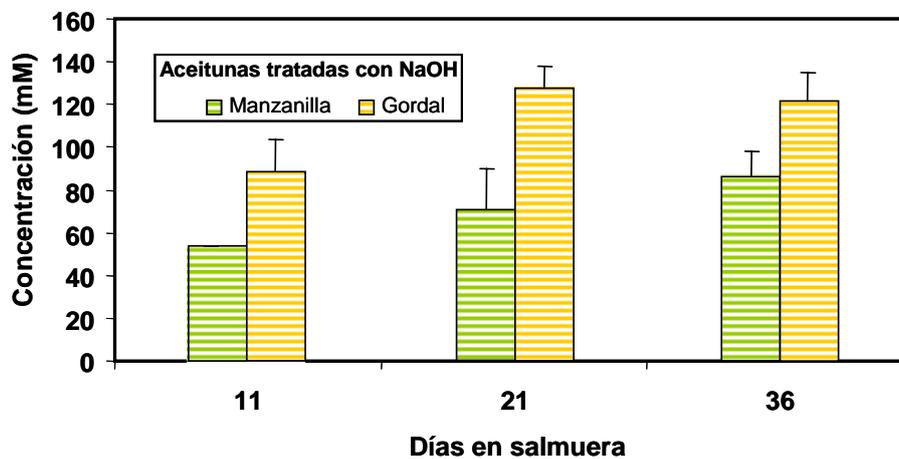
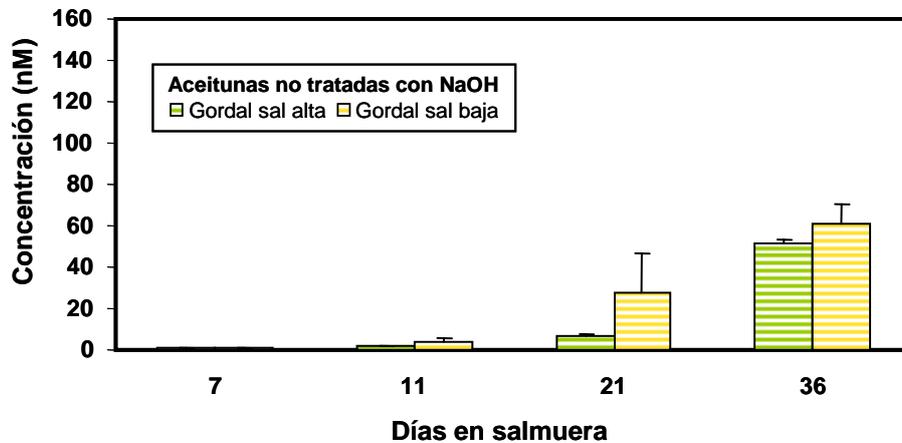
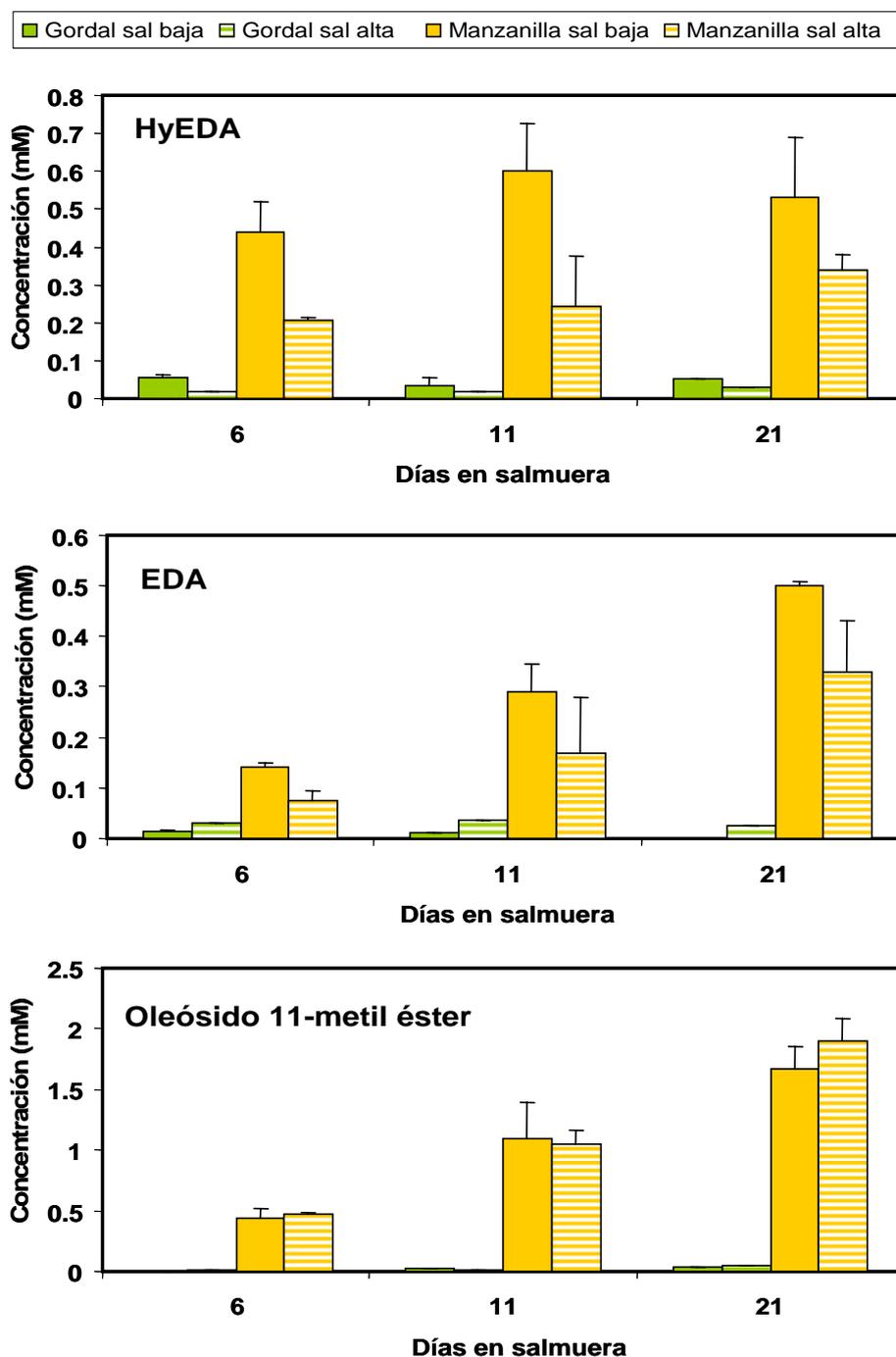


Figura 43: Concentración de ácido láctico en salmueras de aceitunas no tratadas con NaOH y en salmueras de aceitunas tratadas con NaOH. Las barras indican la desviación estándar. Nota: no se detectó ácido láctico en las salmueras de aceitunas Manzanilla no tratadas con NaOH.



Todos estos datos, junto con los recogidos en la Figura 44 sobre la concentración de compuestos antimicrobianos (Hy-EDA, EDA y oleósido 11-metil éster), confirman en condiciones reales los resultados comentados anteriormente con las salmueras asépticas.

Figura 44: Concentración de compuestos antimicrobianos en las salmueras de aceitunas no tratadas con NaOH. Nota: no se detectaron en las salmueras de aceitunas tratadas con NaOH. Las barras indican la desviación estándar.



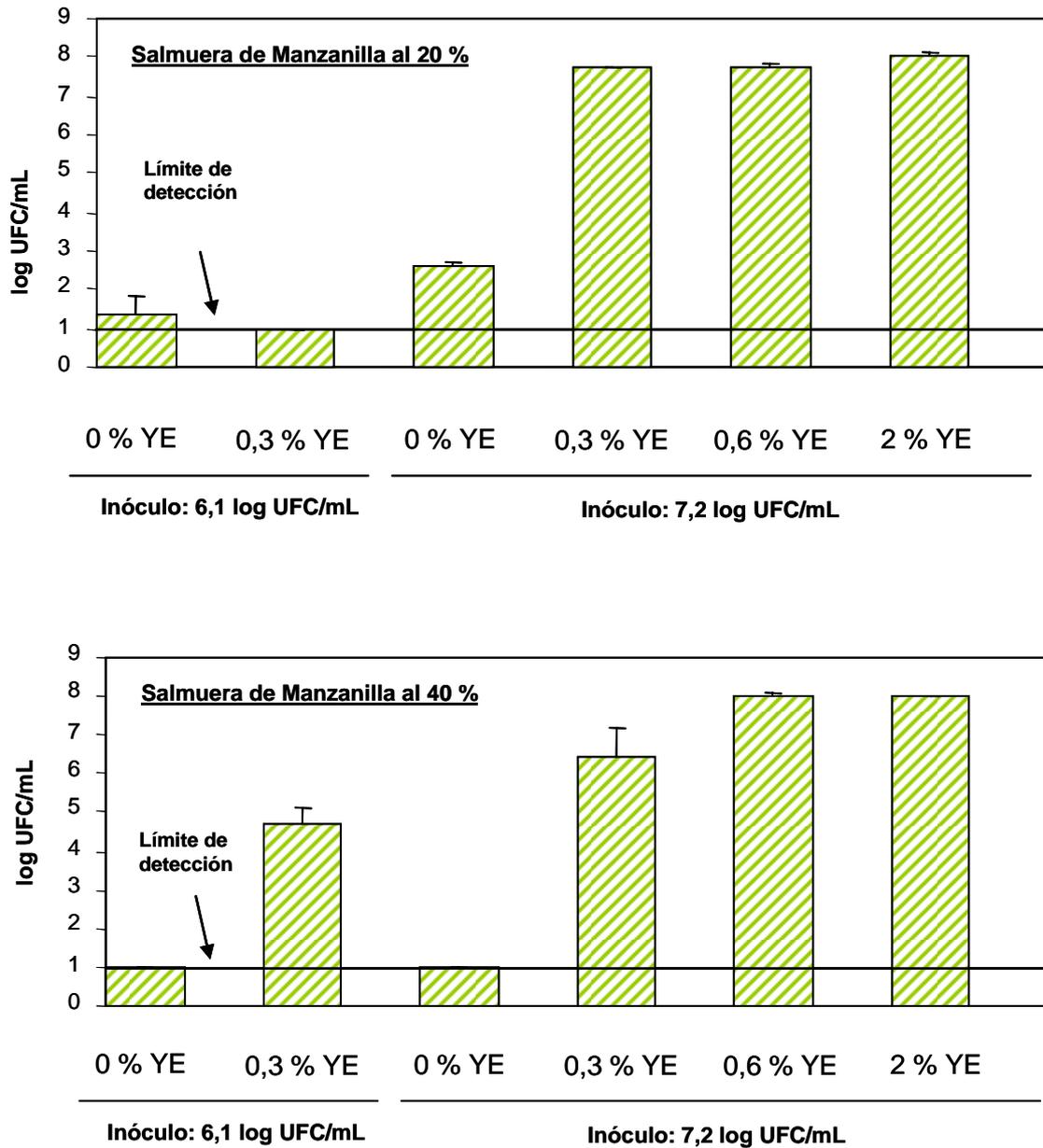
Las concentraciones de Hy-EDA, EDA y oleósido 11-metil éster fueron muy superiores a lo largo de los primeros 20 días de fermentación en salmueras aceitunas Manzanillas que de Gordales, ambas no tratadas con NaOH. Asimismo, ninguno de estos antimicrobianos se detectó en las aceitunas tratadas con NaOH, independientemente de la variedad. Tenemos, por tanto, una explicación de la facilidad de fermentación láctica de aceitunas de la variedad Gordal e inhibición para la variedad Manzanilla cuando no reciben un tratamiento alcalino.

Como ya se ha discutido, se conoce desde finales de los 60 y principios de los 70 del siglo XX las dificultades del desarrollo de bacterias lácticas en salmueras de aceitunas de la variedad Manzanilla (Juven y colbs., 1968a; Fleming y colbs., 1969), lo cual se atribuyó a la presencia de inhibidores fenólicos tales como la oleuropeína (Juven y colbs., 1968b). Ya que estas sustancias reaccionan con compuestos nitrogenados (aminoácidos y proteínas), se ha atribuido a dicho tipo de reacciones la disminución del efecto inhibitor de los antimicrobianos de la aceitunas cuando se estudiaron en medios de cultivo ricos en extractos proteicos (Juvens y colbs., 1970; Ruiz-Barba 1993). De hecho, se sabe de la adición de extracto de levadura y MRS a las salmueras de fermentación de aceitunas no tratadas con NaOH para favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas (Servili y collbs., 2006; Peres y colbs., 2008).

También, a veces los investigadores llevan a cabo sus estudios de inoculación con bacterias lácticas suspendidas en medio de cultivo (MRS), lo cual puede precisamente influir en los resultados previstos. Pues bien, en las Figuras 45 y 46 se exponen los resultados obtenidos cuando se inoculó *L. pentosus* en salmueras de Manzanilla diluidas y con cantidades crecientes, bien de extracto de levadura, o de MRS.

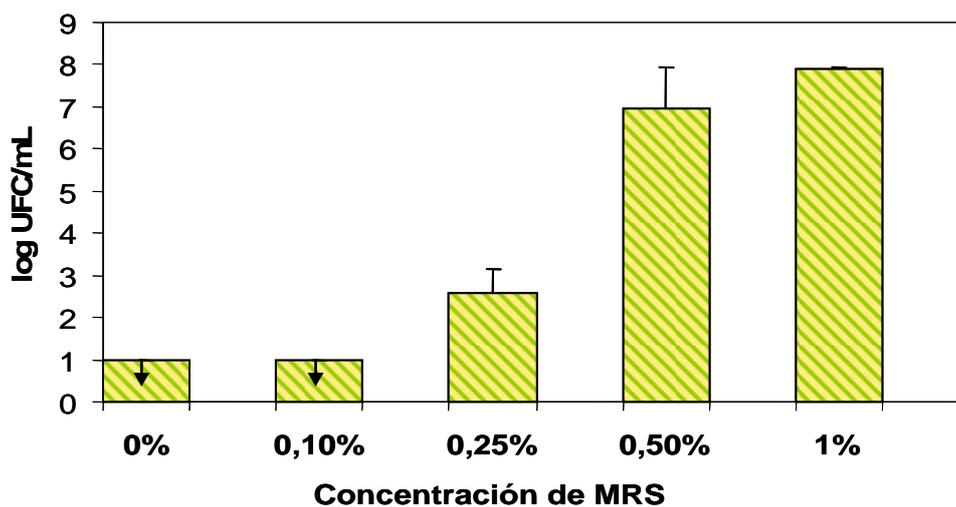
Hay que indicar que las salmueras de Manzanilla sin diluir no permitieron el desarrollo de *L. pentosus* ni cuando se adicionó un 2 % de extracto de levadura. Por el contrario, la dilución de esta salmuera al 40 %, y en particular, al 20 % evitó la muerte del microorganismo, sobre todo cuando se añadieron cantidades crecientes de extracto de levadura. También el tamaño del inóculo fue determinante para el crecimiento de los lactobacilos, a mayor inóculo aumenta el número de supervivientes.

Figura 45: Crecimiento de *L. pentosus* tras 48 horas de incubación en salmueras diluidas de aceitunas Manzanilla sin tratar con NaOH con sal baja y modificadas por adición de extracto de levadura. Las barras indican la desviación estándar de los duplicados.



Similares resultados se obtuvieron con el medio de cultivo MRS (Figura 46). La adición de un 0,5 % de MRS ya dio lugar al crecimiento de *L. pentosus* en la salmuera de Manzanilla diluida al 20 %. Ni incluso con 1-2 % de MRS creció *L. pentosus* en la salmuera de Manzanilla no diluida.

Figura 46: Crecimiento de *Lactobacillus pentosus* tras 48 horas de incubación en salmueras de aceitunas Manzanillas no tratadas con NaOH, diluidas al 20 % y modificadas por adición de MRS. El inóculo inicial fue de 6,1 log UFC/mL. Las barras indican la desviación estándar de los duplicados. Las flechas indican que el valor se encuentra por debajo del límite de detección.



Como conclusión, se puede decir que es posible contrarrestar el efecto inhibitorio de los compuestos antimicrobianos de las salmueras de Manzanilla, aunque ello dependerá de la concentración de dichas sustancias, del tamaño del inóculo y de la cantidad de sustancias nitrogenadas adicionadas al medio (MRS, extracto de levadura, etc.).

4.2.3. Relación entre la intensidad del tratamiento alcalino y la presencia de compuestos antimicrobianos durante la fermentación de aceitunas verdes estilo español

Se sabe desde hace muchos años (Rodríguez-Borbolla y cols., 1971) que aceitunas Manzanillas sometidas a un insuficiente tratamiento alcalino tienen problemas de fermentación. Teniendo en cuenta los conocimientos adquiridos sobre compuestos antimicrobianos, se desarrollaron distintas experiencias para poder explicar el fenómeno de las fermentaciones detenidas.

En primer lugar, se analizó la composición fenólica y oleosídica de las lejías y aguas de lavado. En general, estos compuestos fueron más concentrados en aquellas lejías que habían penetrado $2/3$ partes que $1/2$ la distancia de la piel al hueso de la aceituna, independientemente de la concentración de NaOH utilizada (Tabla 17). Estos compuestos difunden de las aceitunas a la lejía y al prolongarse el tratamiento con la lejía estas soluciones se enriquecieron. Por el contrario, se encontraron pequeñas diferencias entre las aguas de lavado en relación con la penetración de las lejías. El hidroxitirosol y oleósido 11-metil éster se detectaron en una concentración muy alta en ambas lejías y aguas de lavado, seguidos por el oleósido e hidroxitirosol 4-glucósido. El hidroxitirosol y el oleósido 11-metil éster se forman durante la hidrólisis alcalina de la oleuropeína (Brenes y cols., 1998), que es el principal compuesto fenólico de los frutos frescos de aceituna, y es predecible encontrarlos en una alta concentración tanto en las lejías como en las aguas de lavado. Hay que indicar que en ninguna de estas soluciones se detectaron los compuestos antimicrobianos EDA y Hy-EDA.

Las bacterias del ácido láctico pueden crecer en las aguas de lavado de aceitunas verdes estilo español (de Castro y cols., 2001), excepto cuando se forma un polímero durante la acidificación de las aguas (de Castro y cols., 2005). Sin embargo, este polímero puede ser eliminado fácilmente por centrifugación provocando un desarrollo óptimo para las bacterias lácticas. No obstante en estas aguas de lavado no se encontró ninguno de los compuestos antimicrobianos con mayor efecto frente a las bacterias lácticas, tal como se confirma en datos reflejados en la Tabla 17.

Otras dos conclusiones interesantes de este estudio son (1) el alto contenido en oleósido en las aguas de lavado del tratamiento con NaOH al 2,2 %, y (2) la ausencia de secoxyloganin en todas las soluciones. Se puede deducir que ocurrió una demetilación del oleósido 11-metil éster con las altas concentraciones de NaOH (Capozzi y cols., 2000). Asimismo, no se detectó secoxyloganin en ninguna de las lejías, aguas de lavado ni salmueras analizadas. Por lo general, este compuesto está presente en las salmueras de aceitunas que no han sido tratadas con NaOH (Medina y cols., 2007b). De ahí que el análisis de este compuesto en las salmueras de aceitunas comerciales puede ser muy útil para detectar si han sido sometidas a un tratamiento con NaOH, ya que dicho tratamiento no se permite en aceitunas orgánicas o ecológicas.

Tabla 17: Influencia de la concentración y penetración de la solución de NaOH sobre la concentración de compuestos polifenólicos y oleosídicos en las lejías alcalinas y aguas de lavado. Los datos corresponden a la experiencia B del apartado 3.11.3.1.

Compuesto (mM)	Lejía				Agua de lavado			
	A ^a	B	C	D	A	B	C	D
Hidroxitirosol	36,5 (2,2) ^b	27,8 (1,8)	36,0 (0,1)	23,1 (0,3)	28,2 (1,4)	29,2 (2,4)	28,3 (5,0)	32,8 (0,7)
Hidroxitirosol 1-glucósido	7,1 (0,5)	5,4 (0,8)	7,4 (0,6)	4,8 (0,6)	5,2 (0,1)	6,2 (0,4)	6,5 (0,3)	5,4 (1,0)
Hidroxitirosol 4-glucósido	10,0 (0,5)	7,4 (0,6)	9,0 (0,1)	4,8 (0,4)	6,0 (0,6)	6,0 (1,0)	6,0 (1,0)	8,3 (2,4)
Tirosol	2,1 (0,1)	1,5 (0,1)	2,2 (0,1)	1,2 (0,1)	2,2 (0,1)	2,0 (0,1)	2,7 (0,5)	2,8 (0,5)
Oleosido	15,7 (0,3)	12,5 (0,7)	17,9 (1,1)	11,2 (0,3)	4,9 (0,1)	4,1 (0,4)	11,8 (2,2)	11,8 (2,1)
Oleosido 11-metil éster	22,8 (0,7)	18,1 (1,0)	21,0 (0,5)	12,5 (0,5)	23,4 (1,0)	24,8 (1,7)	25,5 (4,3)	29,0 (3,9)
Secologanósido	5,6 (0,2)	4,6 (0,2)	5,8 (0,2)	3,6 (0,1)	3,6 (0,2)	3,9 (0,2)	4,5 (0,9)	5,2 (0,7)

^aA: 2/3 penetración de la lejía (1,7% NaOH); B: 1/2 penetración de la lejía (1,7% NaOH); C: 2/3 penetración de la lejía (2,2% NaOH); D: 1/2 penetración de la lejía (2,2% NaOH).^bDesviación estándar. No se detectaron en estas soluciones secoxyloganin, Hy-EDA ni EDA.

De otra parte, los polifenoles predominantes en las salmueras de aceitunas a los 7 meses de fermentación fueron hidroxitirosol y tirosol (Tablas 18 y 19). La concentración de éstos fue mayor en las salmueras de aceitunas en las que la lejía penetró a una profundidad de 1/2 la distancia de la piel al hueso del fruto que en las que penetró 2/3, lo que corresponde con su menor difusión a lejías y aguas de lavado. Estas sustancias también se encontraron a una concentración más alta en las salmueras del experimento A (Tabla 18) que en la del B (Tabla 19). Las salmueras del experimento B, por el contrario, tuvieron una concentración más alta en hidroxitirosol 4-glucósido e hidroxitirosol 1-glucósido que en las del experimento A. En todos los casos, por tanto, los compuestos mayoritarios en las salmueras fueron hidroxitirosol y sus derivados.

Hay datos contradictorios sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias lácticas por hidroxitirosol (Ruiz-Barba y colbs., 1993; Landete y colbs., 2008) aunque se ha demostrado anteriormente que éste no es el compuesto antimicrobiano principal en las salmueras de las aceitunas (Medina y colbs., 2007b).

Tabla 18: Compuestos fenólicos en salmueras de aceitunas a los 7 meses de fermentación. Los datos pertenecen al experimento A.

Compuesto (mM)	Tratamiento	
	2/3 profundidad	1/2 profundidad
Hidroxitirosol	11,4 (0,4) ^a	15,1 (0,7)
Hidroxitirosol 1-glucósido	<0,1	<0,1
Hidroxitirosol 4-glucósido	<0,1	1,1 (0,1)
Tirosol	1,4 (0,1)	1,6 (0,1)
^a Desviación estándar		

Tabla 19: Compuestos fenólicos en salmueras de aceitunas a los 7 meses de fermentación. Los datos pertenecen al experimento B.

Compuesto (mM)	Tratamiento			
	A ^a	B	C	D
Hidroxitirozol	8,7 (0,3) ^b	9,7 (0,3)	9,9 (0,1)	10,1 (1,8)
Hidroxitirozol 1-glucósido	5,7 (0,4)	6,7 (0,3)	5,8 (0,2)	6,5 (0,2)
Hidroxitirozol 4-glucósido	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	<0,1	<0,1
Tirozol	0,9 (0,2)	0,8 (0,1)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)

^aA: 2/3 profundidad de penetración de la lejía (1,7% NaOH); B: 1/2 profundidad de penetración de la lejía (1,7% NaOH); C: 2/3 profundidad de penetración de la lejía (2,2% NaOH); D: 1/2 profundidad de penetración de la lejía (2,2% NaOH).^bDesviación estándar

Respecto al crecimiento de los lactobacilos en estas salmueras de aceitunas, se confirmó tanto para el experimento A como para el B, que las células de *L. pentosus* inoculadas mueren en las salmueras de aceitunas tratadas con NaOH cuando la lejía penetra sólo hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso (Figuras 47 y 48). Ello se relaciona con que no se detectaron ni ácido láctico ni crecimiento de lactobacilos en los primeros 15 días de la puesta de los frutos en salmuera, mientras que en las salmueras de aceitunas tratadas con NaOH con una penetración de 2/3 la distancia de la piel al hueso, se observó un crecimiento abundante de bacterias lácticas y su consecuente formación de ácido láctico (Medina y cols., 2008a). Además, la glucosa se consumió rápidamente durante los 10-15 primeros días en las salmueras de estas últimas aceitunas (Figura 47).

Asimismo, en el experimento B, las bacterias lácticas crecieron en todas las salmueras de aceitunas tratadas con una lejía del 2,2 %, independientemente de la profundidad de penetración de la lejía, y también en las tratadas con 1,7 % NaOH y penetración 2/3, pero no crecieron en las salmueras de aceitunas tratadas con lejías del 1,7 % y una penetración de 1/2 la distancia de la piel al hueso (Figura 48). Este fenómeno se observó durante los primeros 15 días de su estancia en salmuera y se correspondió con una concentración de glucosa más alta en las salmueras tratadas con lejías al 1,7 %, debido a su mínima fermentación. Además, se detectó una población

más elevada de *Enterobacteriaceae* en estas salmueras en las que la lejía penetró sólo hasta 1/2 la distancia de la piel al hueso (Figura 49).

Figura 47. Evolución de glucosa, ácido láctico y bacterias lácticas en salmueras de aceitunas durante el primer mes de fermentación. Los datos pertenecen al experimento A.

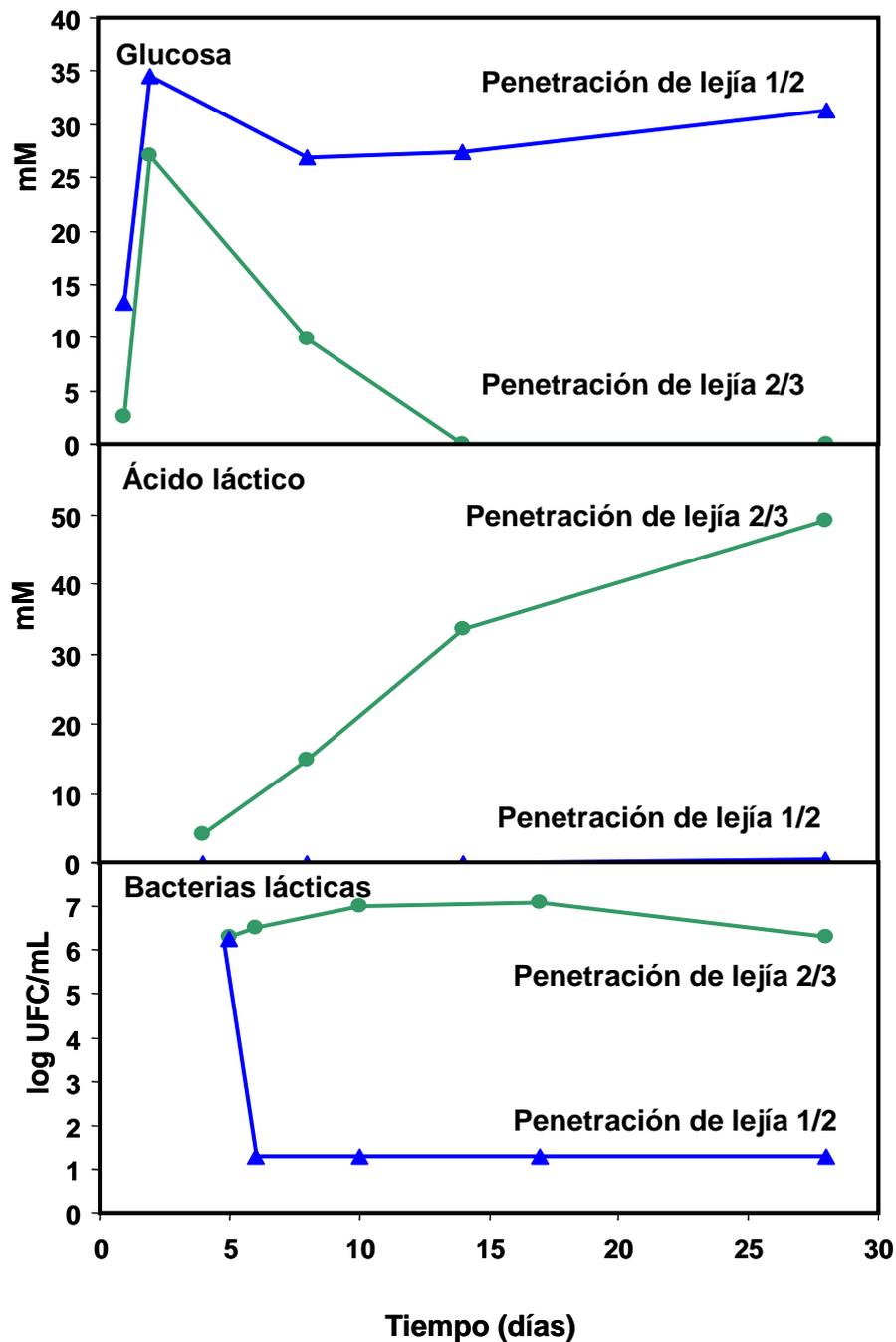
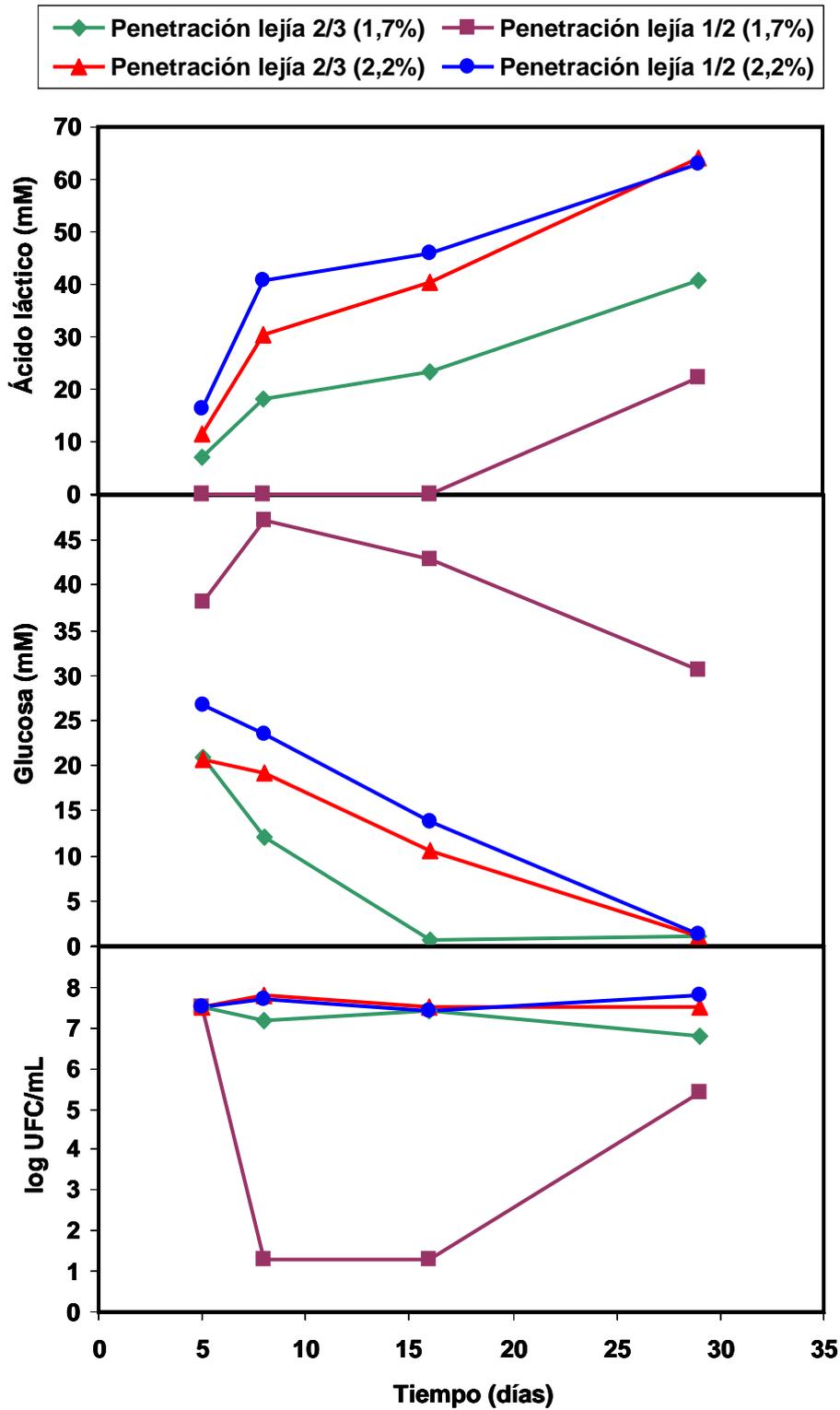


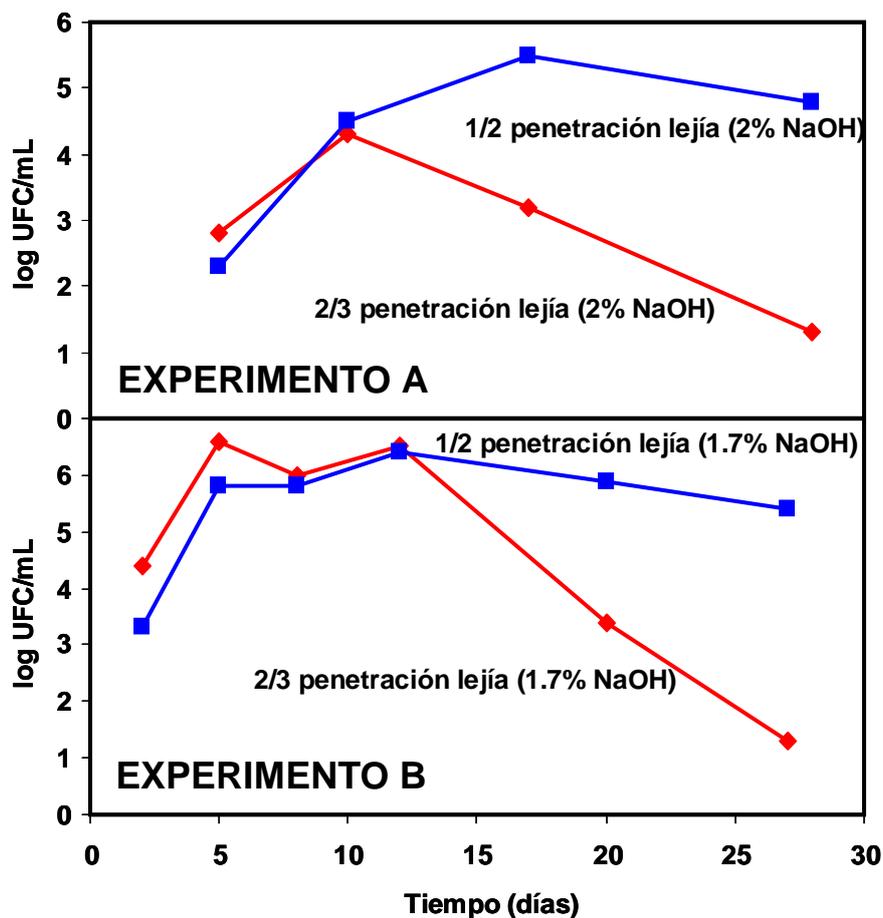
Figura 48. Evolución de glucosa, ácido láctico y bacterias lácticas en salmueras de aceitunas durante el primer mes de fermentación. Los datos pertenecen al experimento B.



Una tendencia similar se observó para las levaduras, siendo mayor su población cuando las bacterias lácticas no crecen adecuadamente.

El valor de pH de las salmueras fermentadas fue de 4,3-4,5 después de 30 días de su estancia en salmuera y de 5,0 en salmueras no fermentadas. La acidez libre fue obviamente más alta en las salmueras fermentadas que en las no fermentadas y no hubo diferencias significativas para la acidez combinada entre los distintos tratamientos, aunque cuanto más alta fue la concentración de NaOH en el tratamiento, más elevada fue también la acidez combinada de las salmueras.

Figura 49. Evolución de *Enterobacteriaceae* en salmueras de aceitunas durante el primer mes de fermentación.



Todos estos datos indican que el tratamiento alcalino en las aceitunas verdes estilo español debe realizarse hasta que la lejía penetre 2/3 partes la distancia de la piel al hueso, y la concentración de la lejía debe ser más alta del 1,7 % si se pretende que

fermenten lácticamente. Esta conclusión no es nueva, ya que Rodríguez-Borbolla y colbs., (1969) alcanzaron resultados similares. Sin embargo, la explicación de este fenómeno no se resolvió. En muchas ocasiones se detectan fermentaciones detenidas en las industrias sin conocer realmente la causa de ello. Las bajas temperaturas y bajas concentraciones en azúcares son buenas razones para dar lugar a fermentaciones detenidas, pero en nuestro estudio, las salmueras fueron inoculadas con bacterias lácticas, la temperatura fue la misma para todos los tratamientos (temperatura ambiente) y hubo suficiente cantidad de glucosa en las salmueras (Figuras 47 y 48).

Por lo tanto, se fijó la atención en la presencia de antimicrobianos en las salmueras de aceitunas, en particular Hy-EDA, EDA y oleósido 11-metil éster (Medina y colbs., 2007b). Así, se analizaron estas sustancias en las salmueras durante los primeros 30 días de fermentación (Figuras 50 y 51). Hy-EDA y EDA se detectaron solamente en las salmueras donde no crecieron las bacterias lácticas, es decir, las tratadas hasta la mitad en el experimento A y las tratadas hasta la mitad con NaOH 1,7 % en el experimento B. De ahí que haya una relación directa entre la inhibición del crecimiento de bacterias del ácido láctico y la presencia de antimicrobianos en salmueras. Debe destacarse que no se encontró Hy-EDA ni EDA en las salmueras de aceitunas tratadas con NaOH al 2,2 % con una penetración de 1/2 hasta el hueso. En este caso, se puede asumir que el pH más alto en la pulpa de la aceituna (Tabla 20) en comparación con las aceitunas tratadas con NaOH al 1,7 % impidió la formación de estas sustancias o las hidrolizó durante el tratamiento (Medina y colbs., 2008a).

Aún está sin resolver la siguiente pregunta: ¿cuál es la contribución del oleósido 11-metil éster en la inhibición de las bacterias lácticas? Este compuesto que posee actividad antimicrobiana se encontró en todas las salmueras (Figuras 50 y 51). Para clarificar este punto, los compuestos correspondientes al pico del oleósido 11-metil éster se aislaron mediante CLAE a partir de salmueras de aceitunas tratadas con NaOH al 1,7 % y con una penetración de 1/2 y 2/3 de la distancia al hueso. Posteriormente, estos dos compuestos se añadieron a una salmuera de Gordal y se inocularon con *L. pentosus*. Se observó el mismo crecimiento del microorganismo en las salmueras sin compuestos añadido que en la salmuera con el oleósido 11-metil éster aislado de la salmuera de aceitunas tratadas con NaOH hasta 2/3 de distancia al hueso. Por el contrario, la población inicial se redujo 2 log UFC/L cuando se le añadió el oleósido 11-

metil éster aislado de la salmuera de aceitunas tratadas con NaOH hasta 1/2 la distancia hasta el hueso o de salmueras no tratadas con NaOH (Figura 52). También se comprobó que el oleósido 11-metil éster aislado de las aguas de lavado permitió el crecimiento de *L. pentosus*.

Figura 50. Evolución de compuestos anti-bacterias lácticas en salmueras de aceitunas durante el primer mes de fermentación. Los datos pertenecen al experimento A.

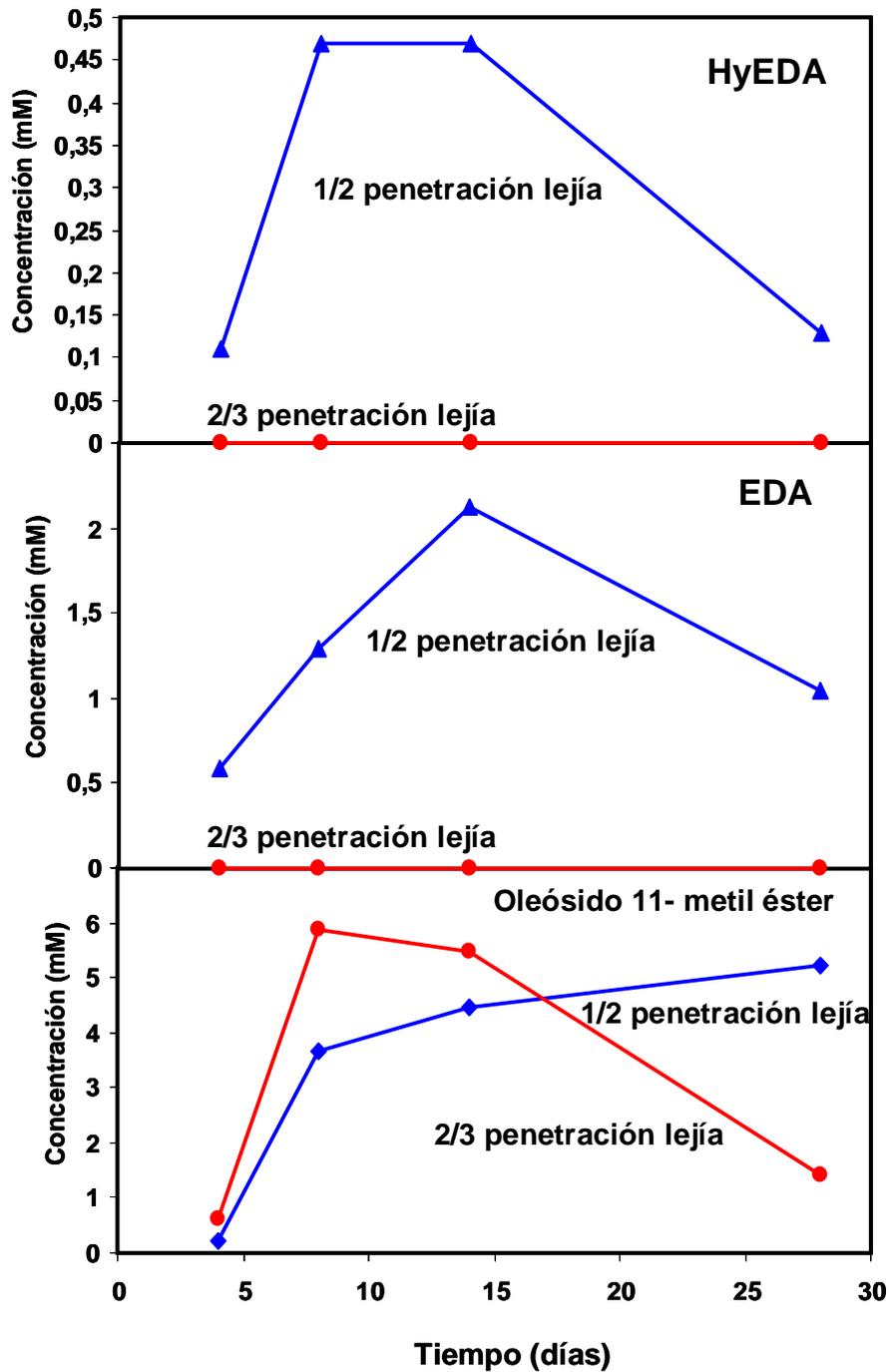


Figura 51. Evolución de compuestos anti-bacterias lácticas en salmuera de aceitunas durante el primer mes de fermentación. Los datos pertenecen al experimento B. Hy-EDA y EDA sólo se detectaron en las muestras tratadas con NaOH al 1,7 % y con penetración de la lejía 1/2.

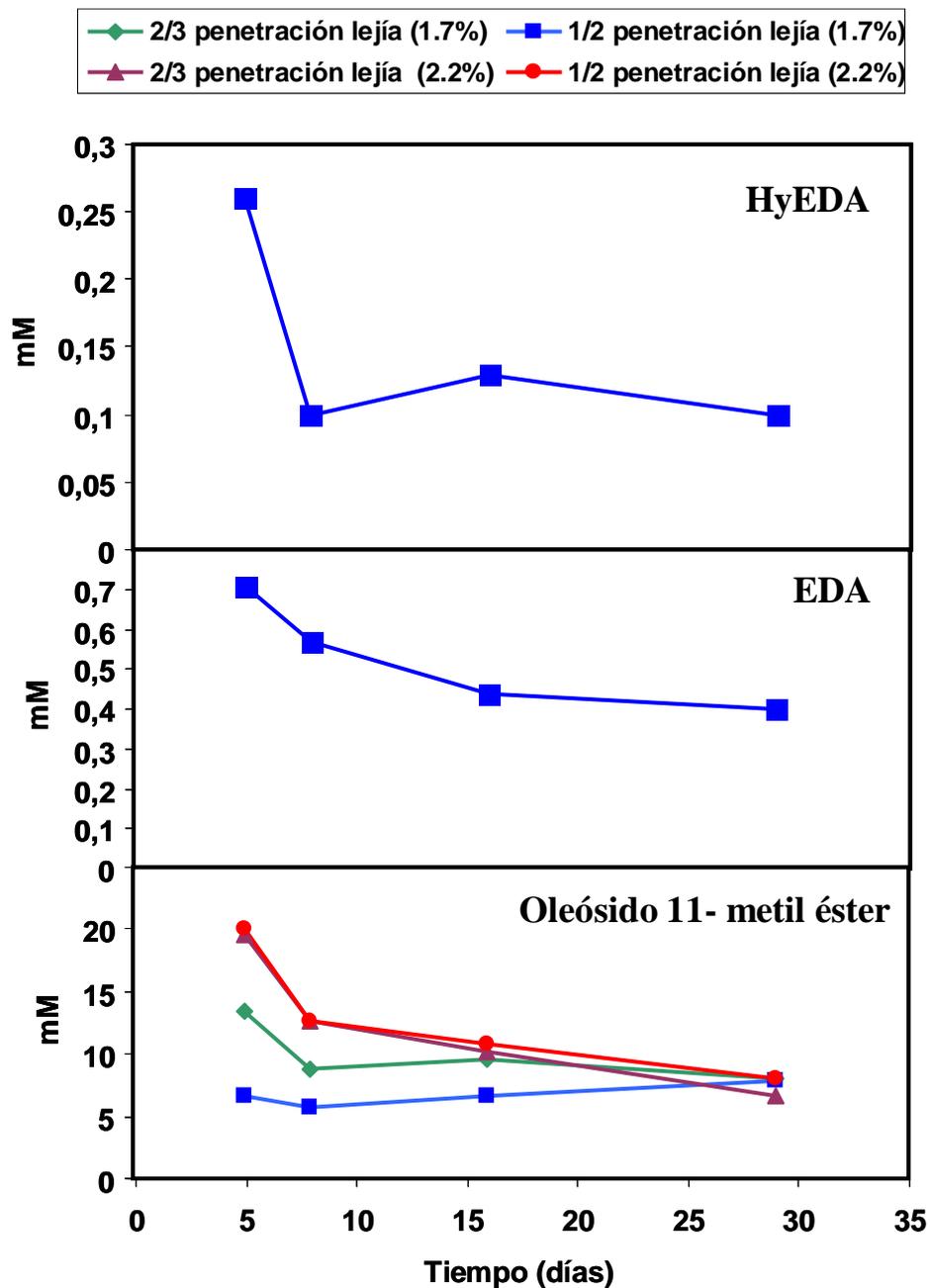
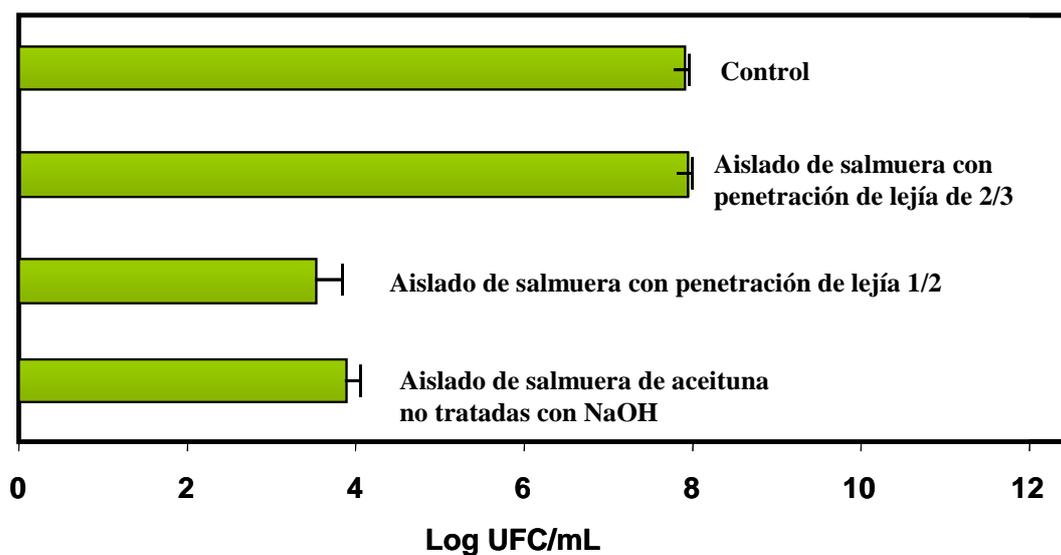


Tabla 20: Valor de pH en la pulpa de aceitunas y líquidos de gobierno al principio del tratamiento. Los datos pertenecen al Experimento B.

pH	Tratamiento			
	A ^a	B	C	D
Pulpa de aceituna antes del lavado	10,1	9,6	11,4	10,8
Pulpa de aceitunas 1 día en salmuera	9,0	8,6	10,0	9,8
Agua de lavado	9,9	9,7	10,8	10,7
Salmuera (1 día)	8,2	6,4	9,4	9,0

^aA: 2/3 penetración de la lejía (1,7% NaOH); B: 1/2 penetración de la lejía (1,7% NaOH); C: 2/3 penetración de la lejía (2,2% NaOH); D: 1/2 penetración de la lejía (2,2% NaOH).

Figura 52. Efecto del oleósido 11-metil éster aislado de diferentes orígenes sobre el crecimiento de bacterias lácticas. El recuento fue después de 48 horas de incubación de una salmuera de Gordal inoculada con 6,2 log UFC/ml. La salmuera de Gordal fue usada como medio de cultivo y los diferentes isómeros del oleósido 11-metil éster aislados por CLAE se añadieron al medio. Las barras indican la desviación estándar.



Asimismo, tanto el oleósido 11-metil éster aislado de las aguas de lavado como el de las salmueras de Manzanilla no tratadas con NaOH tenían un espectro similar por detección ultravioleta (UV) y masas (ESI). Además, ambos compuestos presentaron espectros idénticos de ^1H RMN y muy similares de ^{13}C RMN (Tabla 21), siendo compatible con la estructura propuesta por Damtoff y cols. (1993) (Figura 53). Las únicas diferencias significativas se observaron en los desplazamientos de los carbonos C5 y C6. Así, C5 apareció a δ 42,4 para el isómero “a” y a 43,2 para el isómero “b”, y C6 apareció a δ 178,6 para el isómero “a” y a 179,5 para el isómero “b”. Estas diferencias pueden ser consecuencia de una configuración diferente del C4. Como el C4 es un carbono quiral, los isómeros “a” y “b” pueden ser diastereoisómeros, aunque serán necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis, así como para determinar las configuraciones absolutas de ambos isómeros.

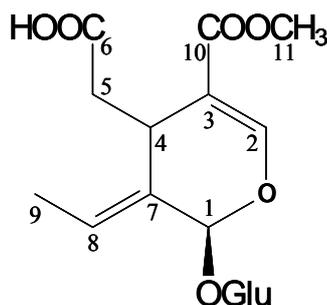
Tabla 21. Datos de ^{13}C RMN para los isómeros del oleósido 11-metil éster

Carbono	Oleósido 11-metil éster	
	Isómero “a”	Isómero “b”
1	95,8	95,9
2	155,2	155,1
3	109,7	109,9
4	31,8	32,0
5	42,4	43,2
6	178,6	179,5
7	129,4	129,5
8	125,6	125,5
9	13,8	13,8
10	170,3	170,4
11	52,8	52,8

Nota: El isómero “a” se aisló del agua de lavado en el proceso de preparación de aceitunas verdes estilo español y el isómero “b” de una salmuera de aceitunas Manzanilla no tratadas con NaOH

Por ello, el diastereoisómero “b” encontrado en las salmueras de aceitunas Manzanilla no tratadas con NaOH posee actividad antimicrobiana, mientras que el diastereoisómero “a” aislado de las aguas de lavado en la preparación de aceitunas verdes al estilo español no. No es extraño observar que la estereoespecificidad en las estructuras químicas determine la actividad antimicrobiana, como por ejemplo para las catequinas del té y el vino (Veluri y cols., 2004).

Figura 53. Estructura química del oleósido 11-metil éster.



Resumiendo, los resultados de este trabajo muestran que un tratamiento de lejía insuficiente en aceitunas con una solución de NaOH de baja concentración da lugar a fermentaciones lácticas detenidas. Este fenómeno está relacionado directamente con la presencia de los compuestos antimicrobianos en las salmueras Hy-EDA, EDA y un isómero oleósido 11-metil éster (Medina y cols., 2008a). Por lo tanto, la información obtenida en este estudio será útil para poder entender mejor el desarrollo de fermentación de las aceitunas verdes estilo español.

4.2.4. Compuestos antimicrobianos en aceitunas no tratadas con álcali. Experiencia industrial de conservación de aceitunas negras

De los resultados aportados en este trabajo se deduce que las sustancias antimicrobianas de las aceitunas de mesa se encuentran en las salmueras de Manzanilla procesadas con un insuficiente tratamiento alcalino (Medina y cols., 2008a). Sin embargo, donde se han detectado de forma clara y en cantidades significativas es en las salmueras de aceitunas no tratadas con NaOH (Medina y cols., 2007b). Actualmente, las aceitunas no tratadas con NaOH (negras naturales y verdes en salmuera para ennegrecer) representan un mayor porcentaje de producto tanto a escala mundial como nacional. En concreto, en España, las aceitunas que se recogen con coloración amarillorosea y se conservan sin tratamiento alcalino para su posterior

procesamiento como negras oxidadas representan alrededor del 42 % de la producción. Son, además, aceitunas de las variedades Hojiblanca, Cacereña y Manzanilla las que se destinan a esta forma de elaboración.

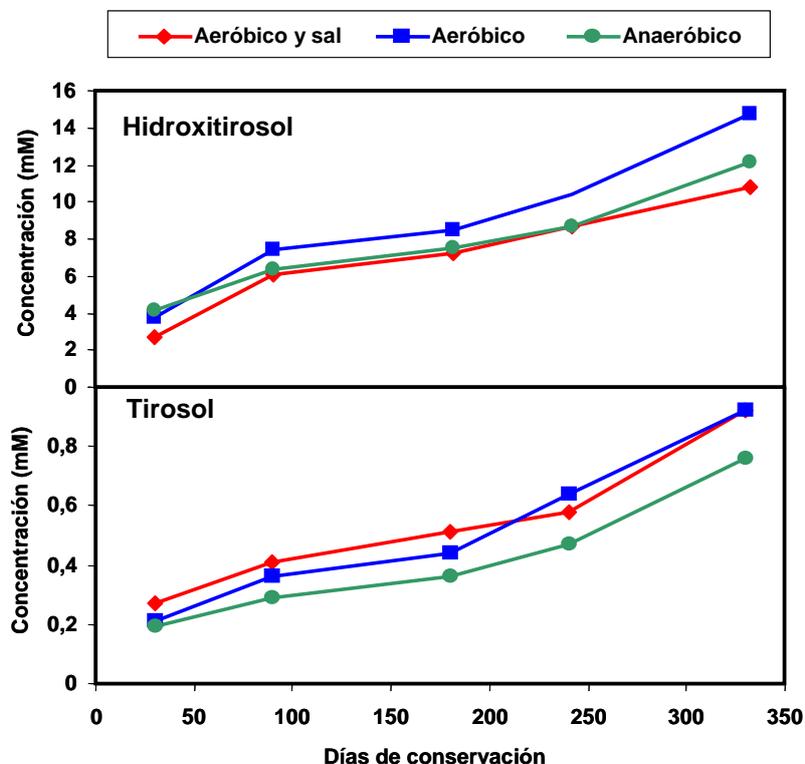
Tal como se describe en el apartado 3.11.4.1. de Materiales y Métodos, se llevó a cabo el seguimiento del proceso de conservación de aceitunas Hojiblanca a escala industrial. Los microorganismos que mayoritariamente se desarrollan en las salmueras de estas aceitunas son las levaduras (Brenes y colbs., 1996). Sin embargo, la industria está modificando el sistema de conservación y está reduciendo el nivel de sal (de Castro y colbs., 2007), lo que ha originado la aparición de bacterias lácticas, en especial después del verano (aproximadamente 300 días después de iniciar la conservación).

Los análisis llevados a cabo en las salmueras o soluciones acidificadas de aceitunas conservadas para ennegrecer tenían como objetivo explicar por qué la aparición de estas bacterias lácticas y por qué a partir de los meses abril-mayo (alrededor de 150-180 días desde su preparación).

El análisis de los compuestos fenólicos y oleosídicos indicó que el hidroxitirosol fue el compuesto en el que se enriquecían en mayor medida estas soluciones de conservación de aceitunas (Figura 54), siendo también destacable el aumento de tirosol.

Un aumento estable de ambos compuestos fenólicos se observó en todos los líquidos de conservación, aunque se detectó una cantidad ligeramente más alta de hidroxitirosol cuando se burbujeó aire en las soluciones acidificadas sin sal. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos anteriormente a nivel de planta piloto (Brenes y colbs., 1993), aunque en el último caso la cantidad de compuestos fenólicos fue menor que las encontradas en los tanques industriales, lo cual puede ser atribuido a la distinta proporción de aceitunas/líquido entre los tanques de la planta industrial y la piloto. De hecho, la concentración del antioxidante hidroxitirosol puede alcanzar hasta 14 mM (2,2 g/L), que es un nivel muy alto para su posible recuperación a partir de estas soluciones, tal como se ha propuesto para las hojas de olivo (De Leonardis y colbs., 2008), alpechín (Obied y colbs., 2005) y alpeorujo (Rodríguez y colbs., 2007).

Figura 54. Evolución de hidroxitirosol y tirosol en líquidos de conservación de aceitunas almacenadas en tanques industriales durante varios meses.

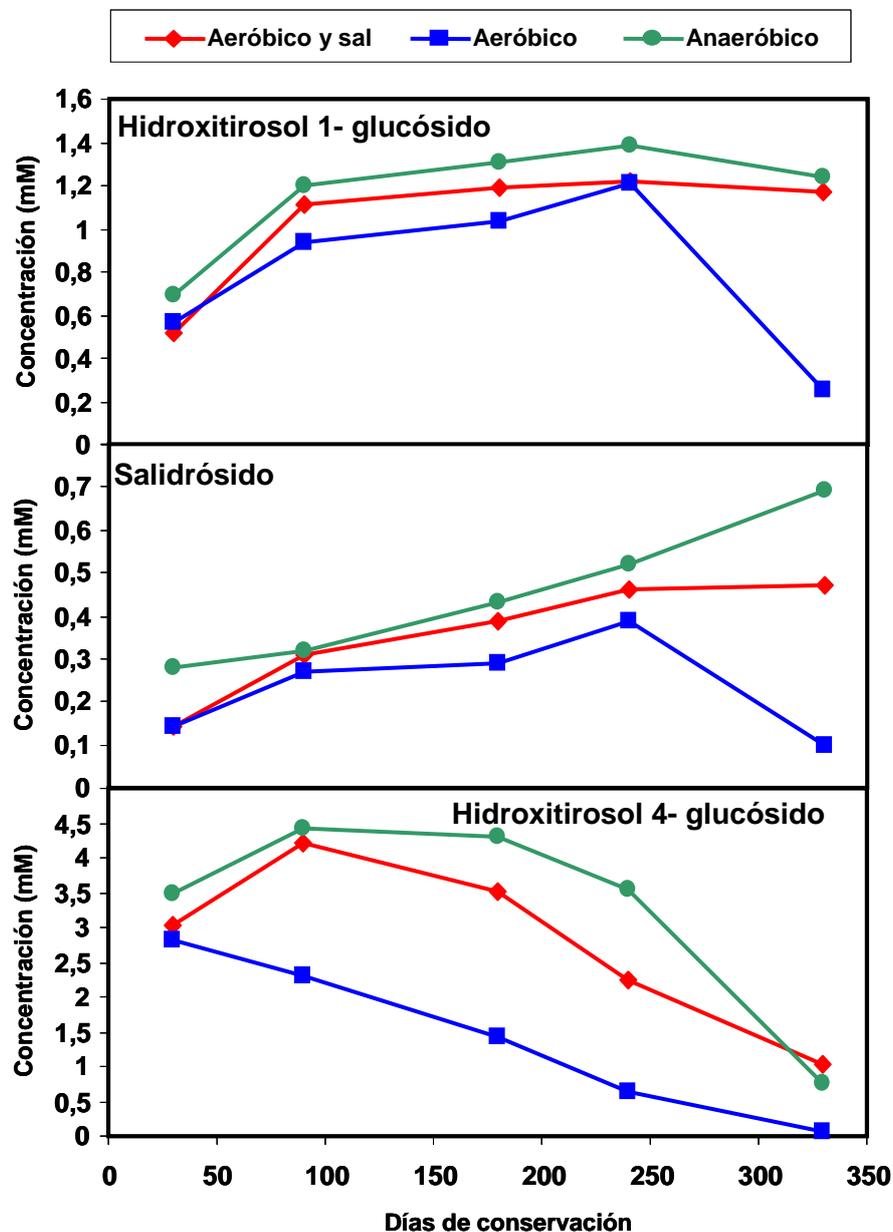


Muy probablemente el hidroxitirosol se formó a partir de la hidrólisis de la oleuropeína, principal compuesto fenólico en el fruto de las aceitunas (Amiot y colbs., 1986; Romero y colbs., 2002b). De hecho, la concentración de este glucósido se encontró en los líquidos de conservación a un nivel muy bajo ($<0,1$ mM). Varios investigadores han sugerido una posible degradación microbiana de la oleuropeína por parte de bacterias del ácido láctico durante la fermentación de la aceituna (Servilli y colbs., 2006; Marsilio y colbs., 2005). Sin embargo, en nuestro caso no se detectó ácido láctico en los líquidos de conservación hasta los 5 meses de su estancia en salmuera. Por consiguiente, la mejor explicación para el enriquecimiento en hidroxitirosol de estas soluciones es la hidrólisis ácida de este glucósido, teniendo en cuenta el alto nivel de ácido acético añadido al principio de la etapa de conservación.

Por otra parte, es la primera vez que se han estudiado los glucósidos fenólicos tales como el salidrósido, hidroxitirosol 1-glucósido e hidroxitirosol 4-glucósido en líquidos de conservación de aceitunas negras (Medina y colbs., 2008b). Éstos se

acumularon en estas soluciones desde los primeros meses de conservación (Figura 55) y su concentración comienza a disminuir al principio de la estación de verano. También, el nivel de estos glucósidos fenólicos fue menor cuando el sistema empleado fue sin sal y aeróbico. Ninguna de las sustancias anteriores mostraron actividad antimicrobiana, y puede pensarse en la hidrólisis ácida de sus enlaces glucosídicos debido al incremento de temperatura en el verano, como causa de su disminución.

Figura 55. Evolución de hidroxitirosol 1-glucósido, salidrósido e hidroxitirosol 4-glucósido en líquidos de conservación de aceitunas almacenadas en tanques industriales durante varios meses.



En lo que concierne a los compuestos oleósidos, oleósido 11-metil éster y secoxyloganin, también se encontraron a altas concentraciones en los líquidos de conservación (Figura 56). Por el contrario, el nivel de secologanósido y oleósido se mantuvo siempre debajo de 0,2 mM. Hay que destacar que las concentraciones para secoxyloganin y oleósido 11-metil éster fueron más altas en las salmueras mantenidas en condiciones aeróbicas respecto a los demás tipos de conservación estudiados. No se tiene explicación para este fenómeno, aunque podría estar relacionado con la diferente microbiota presente en los diferentes medios.

El oleósido 11-metil éster puede ser una fuente de carbono para las bacterias del ácido láctico (Brenes y colbs., 1998), aunque permanece confuso si la disminución de los compuestos oleósidos durante el verano es debido a una hidrólisis química del enlace glucosídico o al consumo microbiano de estos. Por otra parte, la concentración máxima de oleósido 11-metil éster en las soluciones es de 1 mM, que es inferior a la encontrado en las aguas de lavado y en las salmueras de aceitunas verdes estilo español (Brenes y colbs., 1995; Brenes y colbs., 2004), aunque mucho más alta que la encontrada en las salmueras de aceitunas italianas no tratadas con NaOH (Marsilio y colbs., 2005).

Se ha indicado anteriormente que tanto Hy-EDA como EDA son sustancias con un alto poder antibacteriano siendo efectivas a concentraciones tan bajas como 0,25-0,50 mM. De hecho, en los primeros meses de la conservación de aceitunas se encontraron concentraciones de estas sustancias mucho mayores (Figura 57), pudiendo explicar la ausencia de fermentación láctica durante este período (De Castro y colbs., 2007).

Sin embargo, los lactobacilos pueden crecer en estas soluciones durante el verano y no hay ninguna explicación de ello hasta ahora. La explicación la encontramos en la Figura 57. La concentración de ambos antimicrobianos, tanto Hy-EDA como EDA, disminuyó después de varios meses de conservación y probablemente permitió el crecimiento de las bacterias lácticas. Debe tenerse en cuenta que la concentración de EDA y Hy-EDA al principio de la conservación era superior a 0,5 mM. Para confirmar este punto, la presencia de ácido láctico, empleado como índice de crecimiento de

bacterias lácticas, y la concentración de antimicrobianos en todos los tanques industriales fueron analizados después de 7 meses de conservación (Figura 58).

Los tanques con ausencia de ácido láctico tenían concentraciones mayores de compuestos antimicrobianos que aquellos en donde había ácido láctico. Hay que decir que la mayoría de los tanques mostraban ácido láctico en los líquidos de conservación después del verano. Es decir, el nivel de antimicrobianos disminuyó durante el verano y esto permitió el crecimiento de bacterias lácticas (Medina y cols., 2008b).

Figura 56. Evolución de oleósido 11-metil éster y secoxyloganin en líquidos de conservación de aceitunas almacenadas en tanques industriales durante varios meses.

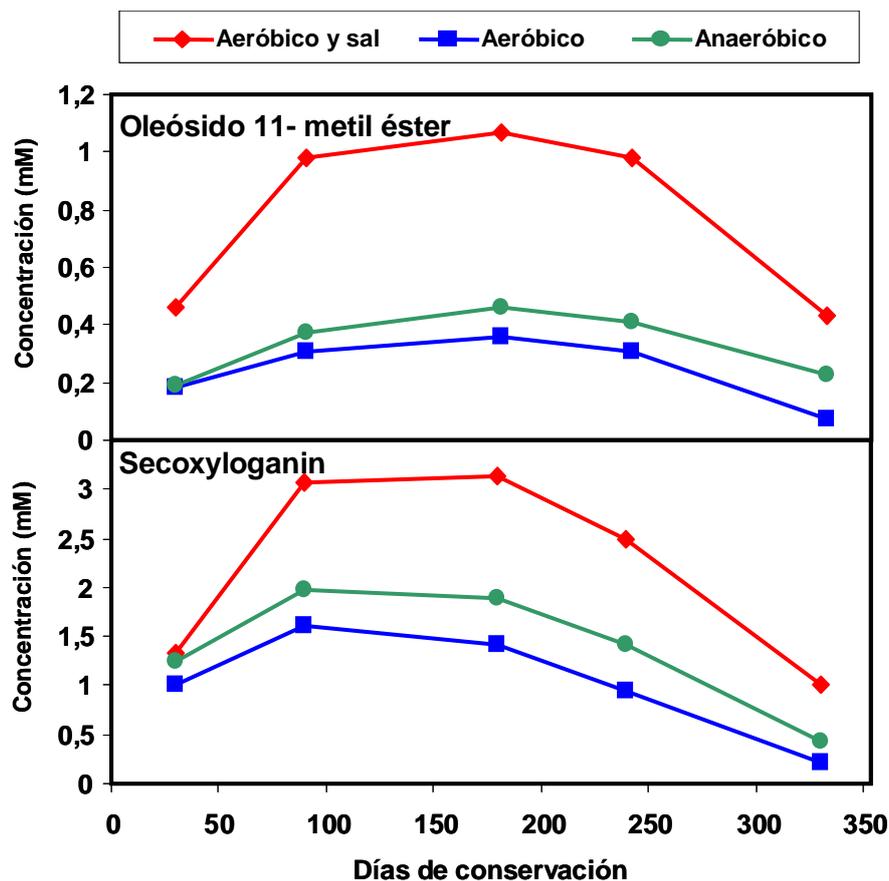
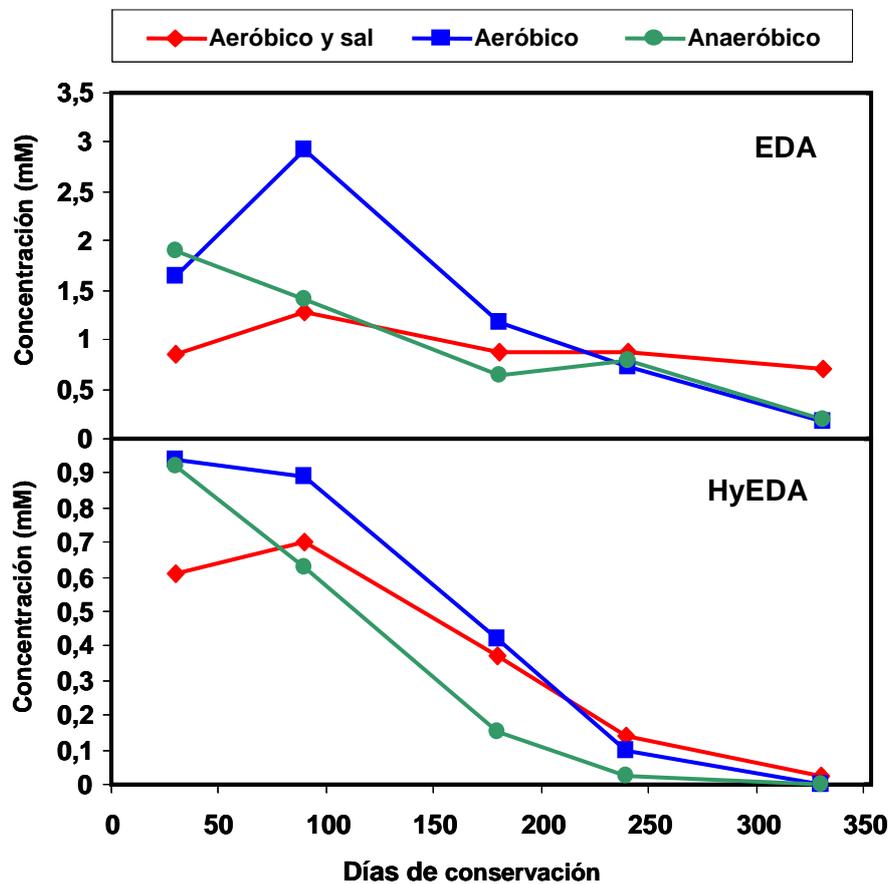
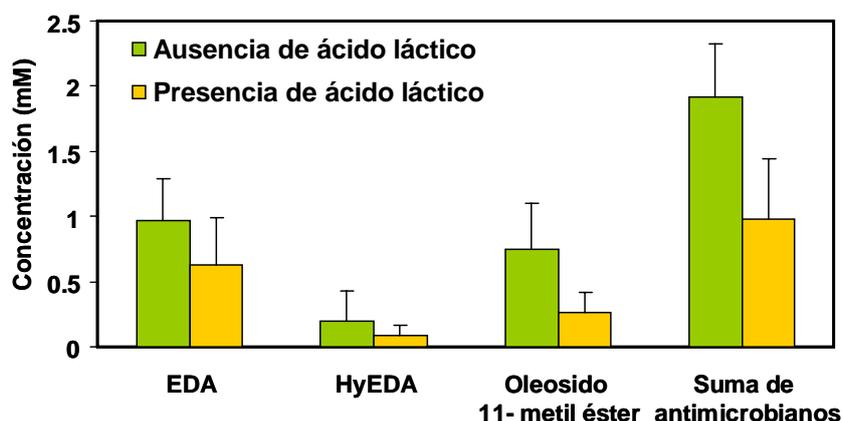


Figura 57. Evolución de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico libre (EDA) o unido a hidroxitirosol (Hy-EDA) en líquidos de conservación de aceitunas almacenadas en tanques industriales durante varios meses.



No obstante, la pregunta de por qué la concentración de antimicrobianos disminuye en los líquidos de conservación permanece sin resolver. En busca de una respuesta, tres muestras de aceitunas y sus líquidos de conservación retirados de las industrias a los 7 meses, se incubaron a 32 °C durante varios meses y periódicamente se analizó su contenido en compuestos antimicrobianos. Los compuestos oleósido 11-metil éster, EDA y en particular Hy-EDA disminuyeron sus concentraciones con el tiempo de incubación (figura 59). Esta reducción se dio también en las soluciones filtradas por 0,22 μm y 3000 daltons de tamaño de poro, lo que significa que debe excluirse una posible degradación microbiana y enzimática. De ahí que la hidrólisis ácida sea la explicación más convincente.

Figura 58. Relación entre los contenidos de compuestos antimicrobianos y de ácido láctico en líquidos de conservación de aceitunas analizados a los 7 meses de conservación. Las muestras fueron obtenidas de 24 tanques industriales. Las barras de error indican la desviación estándar de 12 muestras.



Se realizó un nuevo experimento con Hy-EDA aislado mediante CLAE que fue incubado a 32 °C en una salmuera acidificada. Como cabría esperar, el Hy-EDA se hidrolizó y los productos de su hidrólisis fueron hidroxitirosol y EDA (Figura 60). Mientras que la concentración de hidroxitirosol alcanzó casi la misma que Hy-EDA al principio de la incubación, la cantidad de EDA aumentó pero permaneció casi constante debido a su degradación.

Por tanto, los resultados de estos estudios indican que la presencia de una concentración elevada de antimicrobianos durante los primeros meses de procesamiento impide el desarrollo de bacterias lácticas. Sin embargo, la hidrólisis ácida de estas sustancias permite posteriormente su desarrollo, en particular cuando la concentración de sal es baja y se incrementa la temperatura.

Figura 59. Cambios en la concentración de compuestos antimicrobianos en líquidos de conservación de aceitunas incubadas a 32 °C durante varios meses. Las aceitunas y los líquidos de conservación fueron obtenidos de 3 tanques industriales a los 7 meses de conservación. Las barras indican la desviación estándar de triplicados.

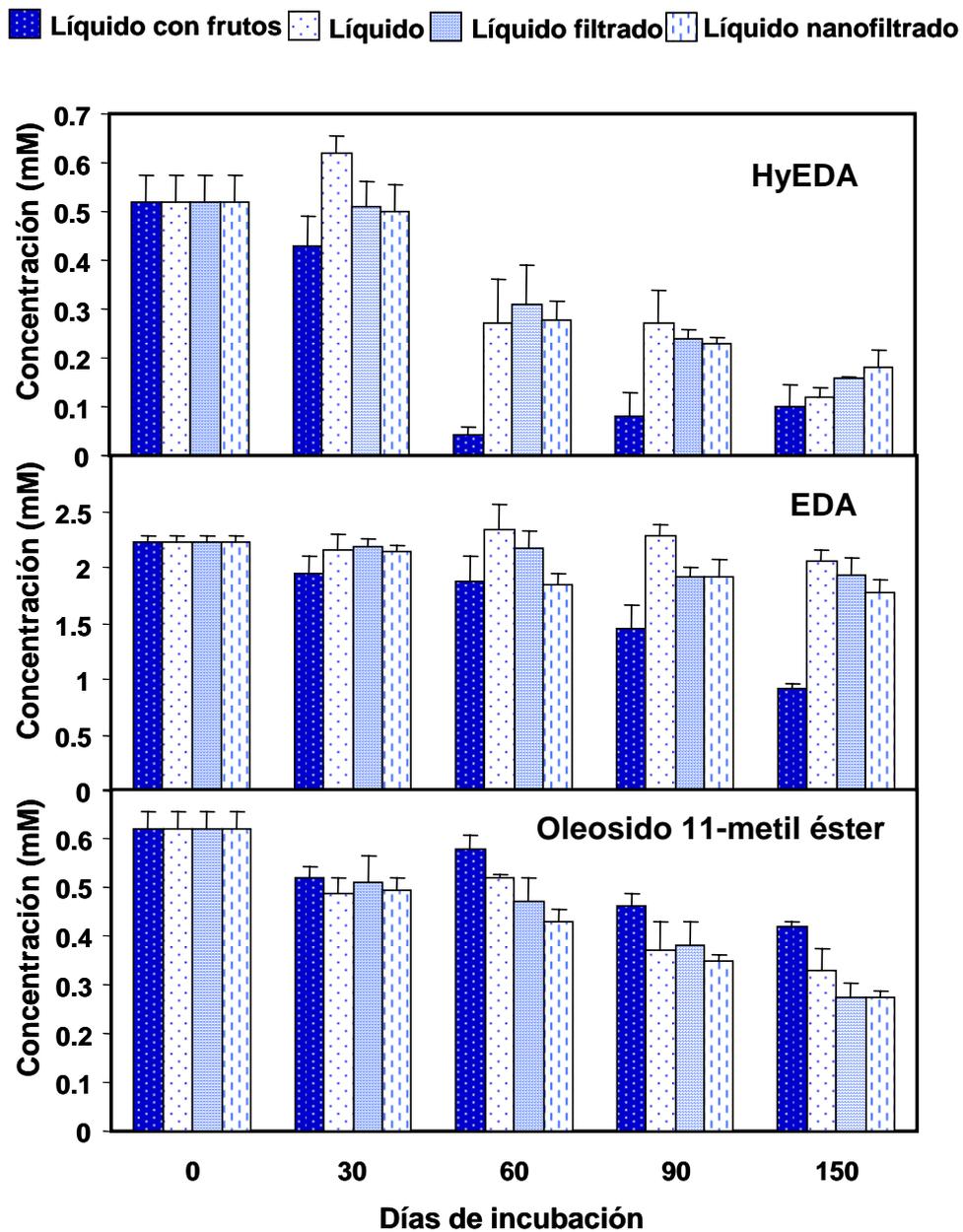
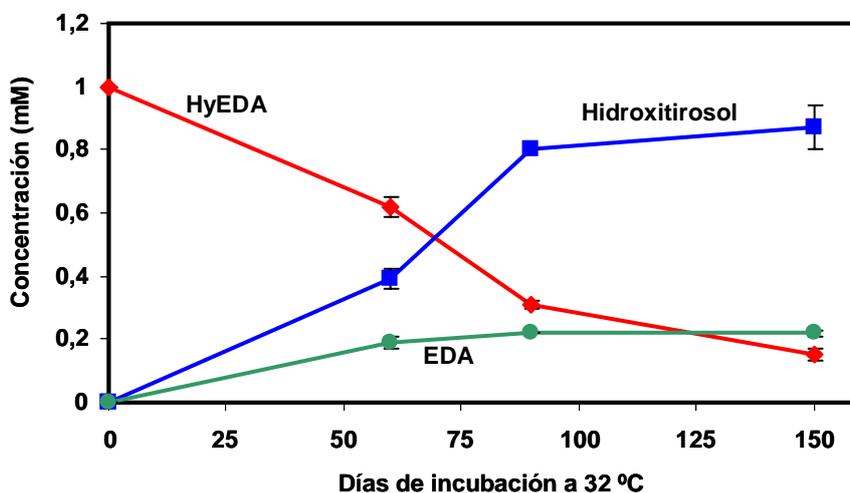


Figura 60. Cambios en la concentración de la forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico libre (EDA) o unido a hidroxitirosol (Hy-EDA), y de hidroxitirosol durante la incubación a 32 °C de Hy-EDA aislado por CLAE preparativa. Las barras indican la desviación estándar de triplicados.



Brevemente, tuvo lugar una hidrólisis ácida tanto de Hy-EDA como de EDA pudiendo explicar la pérdida de estos compuestos antimicrobianos en los líquidos de conservación durante el verano (Medina y cols., 2008b).

4.2.5. Antimicrobianos en diferentes variedades de aceitunas de mesa: análisis y formación

4.2.5.1. Antimicrobianos en salmueras asépticas de diferentes variedades

Se ha demostrado en los apartados anteriores cuáles son los principales compuestos antimicrobianos en salmueras de aceitunas Manzanilla. Sin embargo, existen muchas otras variedades de aceitunas destinadas a aceitunas de mesa, tanto en España como a escala mundial. Además, existen datos contradictorios en la literatura científica sobre el desarrollo de bacterias lácticas en salmueras de estas otras variedades. Por ello, se diseñó una serie de experiencias con salmueras asépticas preparadas con las variedades de aceitunas más utilizadas para mesa, tal como se indica en el apartado 3.11.5.1. Se inocularon con *L. pentosus* las salmueras almacenadas durante 2 meses y se analizó su composición fenólica y oleosídica. A partir de los resultados de crecimiento

de *L. pentosus*, se clasificaron las variedades en 3 grupos (Tabla 22): aquellas donde hubo crecimiento del inóculo (Grupo A), otras en las que no hubo crecimiento pero sí una supervivencia variable del inóculo (Grupo B) y, por último, las variedades en cuyas salmueras no se detectó supervivencia (Medina y cols., 2008c).

Tabla 22. Concentración de compuestos fenólicos y oleosídicos (mM) en salmueras de aceitunas de diferentes variedades preparadas en condiciones asépticas y almacenadas durante 2 meses.

Compuesto	Variedad de aceituna		
	Grupo A ^a	Grupo B	Grupo C
	Ascolana, Domat		
	Aloreña, Arbequina	Hojiblanca, Leccino	
	Morona, Conservolea	Koroneiki, Verdial	Cacereña, Kalamata
	Gordal, Picual	Picholine	Galega, Manzanilla
Hidroxitirosol	3,01y ^b	4,68z	5,11z
Hy1Glu	1,11y	2,18y	4,52z
Hy4Glu	1,01y	2,70z	1,82z
Salidrósido	0,22y	0,29y	1,21z
Tirosol	0,30y	0,41y	0,73z
Oleuropeína	0,80y	0,86y	2,43z
Oleósido	0,11y	0,12y	0,28z
Secoxyloganin	1,22y	1,47y	1,52x
Secologanósido	0,60y	0,79y	1,07x
Ole11ME	1,40y	1,78y	1,51x
EDA	0,01y	0,69z	0,90z
Hy-EDA	0,04y	0,52z	0,61z
EDA + Hy-EDA	0,05y	1,21z	1,51z

^aEl recuento de células cultivables (log UFC/mL) en salmueras después de 48 h de la inoculación con *Lactobacillus pentosus* (inóculo inicial 6,2 log UFC/mL) fue >6,5, 1-6,5 y <1 para las variedades de aceitunas del grupo A, B y C, respectivamente. ^bValores seguidos de la misma letra no fueron significativamente diferentes según el test de Duncan (p<0,05). Se analizaron por duplicado cada variedad de aceituna.

La concentración de sal y los niveles de ácido acético fueron muy similares en todas las salmueras y se han encontrado grandes diferencias entre las variedades de aceitunas en relación con el crecimiento de *L. pentosus*. De nuevo, hay que decir que la inhibición de las bacterias lácticas en salmuera de aceitunas ha sido asociado con la presencia de compuestos fenólicos, en particular oleuropeína e hidroxitirosol (Fleming y colbs., 1973; Ruiz-Barba y colbs., 1993), aunque recientemente se ha comprobado la baja actividad antimicrobiana de estos compuestos (Landete y colbs., 2008), y la fuerte actividad producida por el Hy-EDA y EDA (Medina y colbs., 2007b).

Como puede verse en la Tabla 22, el hidroxitirosol, sus glucósidos, tirosol, salidrósido, oleuropeína y Hy-EDA son los principales compuestos fenólicos detectados en las salmueras asépticas almacenadas durante 2 meses, y oleósido, oleósido 11-metil éster, secoxyloganin y secologanósido son los principales compuestos oleosídicos. Se conoce que la difusión de estos compuestos desde el fruto a la salmuera es lenta (Brenes y colbs., 1993; Panagou y colbs., 2003); sin embargo, después de dos meses de permanencia de los frutos en salmuera difunde una cantidad significativa de estos compuestos. Las salmueras de las aceitunas del grupo C son las que tienen mayor contenido en estas sustancias, seguidas de las aceitunas del grupo B y A, lo que significa que existe una relación directa entre el contenido total de compuestos fenólicos y el crecimiento de lactobacilos. Cuanto mayor es el contenido en estos compuestos, menor es el crecimiento observado de los microorganismos. Sin embargo, esto no es una razón suficiente para explicar el desarrollo o la inhibición de los lactobacilos, ya que la actividad anti-bacterias lácticas del hidroxitirosol, sus glucósidos, oleuropeína y oleósidos, excepto el oleósido 11-metil éster, se ha demostrado que es mucho menor que la encontrada para el Hy-EDA y EDA (Medina y colbs., 2007b). Además, la concentración de los últimos compuestos fue también mayor en las salmueras del grupo C, seguido del grupo B y A, lo que probablemente explica mejor la actividad anti-bacterias lácticas de las salmueras de aceitunas. Por otra parte, se encontró una cantidad suficiente de azúcares en las salmueras, no siendo un factor limitante para el crecimiento de los lactobacilos (Tabla 23). De hecho, las variedades del Grupo C contienen más azúcares que las demás.

Tabla 23. Concentración de azúcares (mM) en salmueras asépticas de diferentes variedades de aceitunas almacenadas durante 2 meses.

	Variedad de aceituna		
	Grupo A ^a	Grupo B	Grupo C
	Ascolana, Domat		
	Aloreña, Arbequina	Hojiblanca, Leccino	
	Morona, Conservolea	Koroneiki, Verdial	Cacereña, Kalamata
Compuesto	Gordal, Picual	Picholine	Galega, Manzanilla
Glucosa	4,4y ^b	54,4y	96,9z
Fructosa	8,7y	5,5y	19,5z
Manitol	28,2y	17,1y	42,7z

^aEl recuento de células cultivables (log UFC/mL) en salmueras después de 48 h de la inoculación con *Lactobacillus pentosus* (inóculo inicial 6,2 log UFC/mL) fue >6,5, 1-6,5 y <1 para las variedades de aceitunas del grupo A, B y C, respectivamente. ^bValores seguidos de la misma letra no fueron significativamente diferentes según el test de Duncan ($p < 0,05$). Se analizaron dos muestras de cada variedad de aceituna.

En concreto, las salmueras de las variedades de aceitunas que mostraron una potente actividad bactericida frente a la cepa de *L. pentosus* fueron Cacereña, Kalamata, Manzanilla y Galega, y esto se puede atribuir a su alto contenido en Hy-EDA y EDA. Se ha descrito precisamente la inhibición del crecimiento de lactobacilos en salmuera de aceitunas Manzanilla (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1971; Medina y colbs., 2007b), Galega (Oliveira y colbs., 2004) y Kalamata (Sabatini y colbs., 2008), lo que puede apoyar los resultados encontrados en este estudio. De la misma manera, *L. pentosus* creció bien en salmueras de las variedades de Ascolana, Domat, Aloreña, Arbequina, Morona, Conservolea, Gordal y Picual, todas ellas con un contenido muy bajo en Hy-EDA y EDA. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por varios investigadores que no encontraron inhibición del crecimiento de lactobacilos en salmueras de Conservolea (Panagou y colbs., 2003), Ascolana (Marsilio y colbs., 2006; Durán y colbs., 1991) y Aloreña (García y colbs., 1992). Sin embargo, se ha observado inhibición del crecimiento de lactobacilos en salmueras de la variedad Arbequina (de la Torre y colbs., 1993; Oliveira y colbs., 2004), aunque ello podría atribuirse al bajo

contenido en azúcares y nutrientes en estas salmueras debido al elevado número de lavados empleados durante la preparación de estas aceitunas.

Asimismo, se han encontrado variedades (grupo B) que muestran diferentes comportamientos para las dos muestras estudiadas, los cuales procedían de diferentes localizaciones. Una de las muestras de las salmueras de las variedades Hojiblanca, Picholine y Leccino permitieron el crecimiento de *L. pentosus* y las otras muestras impidieron el desarrollo, disminuyendo el número inicial de células incluso por debajo del límite de detección (Tabla 24).

Tabla 24. Concentración de compuestos antimicrobianos (mM) en salmueras asépticas de las variedades Hojiblanca, Picholine y Leccino almacenadas durante 2 meses, y recuento de células cultivables a las 48 h de la inoculación con *Lactobacillus pentosus*.

Muestra	log UFC/mL	Hy-EDA	EDA	Hidroxitirosol	
Oleuropeína					
Hojiblanca 1	>6,5	0,04	0,07	5,91	0,36
Hojiblanca 2	2,60	0,84	0,94	5,92	3,79
Picholine 1	>6,5	0,01	0,13	3,12	0,17
Picholine 2	<1,0	2,09	1,08	4,86	1,83
Leccino 1	>6,5	0,09	0,20	6,72	0,02
Leccino 2	<1,0	0,20	0,35	4,80	0,05

Los resultados mostrados en la Tabla 24 son muy esclarecedores puesto que permiten descartar al hidroxitirosol como responsable del efecto antimicrobiano y apoyan, nuevamente, la actividad bactericida de Hy-EDA y EDA. Las salmueras con actividad antimicrobiana de las variedades Hojiblanca y Picholine contenían una alta concentración en oleuropeína e hidroxitirosol, y lo contrario se observó para las muestras de la variedad Leccino. Lo más interesante es que todas las salmueras con un alto contenido en Hy-EDA y EDA mostraron actividad anti-bacterias lácticas, independientemente de la variedad (Medina y cols., 2008c). Estos resultados confirman de nuevo que Hy-EDA y EDA están implicados en el crecimiento de *L. pentosus* en las salmueras de aceitunas.

Servilli y colbs. (2006), observaron que tenía lugar crecimiento de *L. pentosus* en salmueras de aceitunas de la variedad Leccino maduras, con color negro. La maduración de los frutos es un punto importante a tener en cuenta porque los frutos disminuyen su concentración de polifenoles con la madurez (Amiot y colbs., 1986), y el contenido de los compuestos antimicrobianos en salmueras se puede ver afectado por la maduración de las aceitunas. De hecho, frutos de la variedad Manzanilla con color negro se procesaron de la misma manera que los de color verde-amarillento, y las bacterias lácticas crecieron en las salmueras asépticas inoculadas. Además, la concentración de Hy-EDA y EDA en estas salmueras fue baja.

Por tanto, son muchas las variables que pueden afectar al crecimiento de los lactobacilos en las salmueras de aceitunas, y entre ellas también es de destacar la concentración de sal. Aceitunas Hojiblanca fermentaron lácticamente a baja concentración de sal (<5 %) y no se desarrollaron bacterias lácticas con niveles por encima del 5-6 % (Rodríguez-Borbolla y colbs., 1971; Durán y colbs., 1994a). Sin embargo, la presencia de compuestos antimicrobianos (Hy-EDA y EDA) en estas salmueras es también muy determinante y está influenciado por la variedad de aceitunas y su estado de maduración.

4.2.5.2. Formación de compuestos antimicrobianos

La siguiente cuestión que se planteó fue si los compuestos Hy-EDA y EDA están presentes en los frutos frescos o se forman durante la permanencia en salmuera. El análisis de los compuestos fenólicos en la pulpa de seis variedades de aceitunas reveló la presencia de hidroxitirosol, hidroxitirosol 4-glucósido, oleuropeína, tirosol, salidrósido y otros componentes menores; sin embargo, no se detectó Hy-EDA ni EDA. (Tabla 25) Parece que estos antimicrobianos deben ser generados durante la conservación de las aceitunas en salmuera. Sin embargo, varios investigadores han encontrado Hy-EDA en la pulpa de aceitunas (Ryan y colbs., 2003; Savarese y colbs., 2007), aunque se podría explicar debido a las diferencias de variedad de aceitunas estudiadas o su formación durante las técnicas de extracción empleadas. De hecho, la pulpa fresca de estas seis variedades (Picual, Aloreña, Gordal, Cacereña, Kalamata y Manzanilla) se mezclaron con agua destilada en un agitador magnético durante 5 minutos, y posteriormente se detectó gran cantidad de Hy-EDA en el jugo de la aceituna

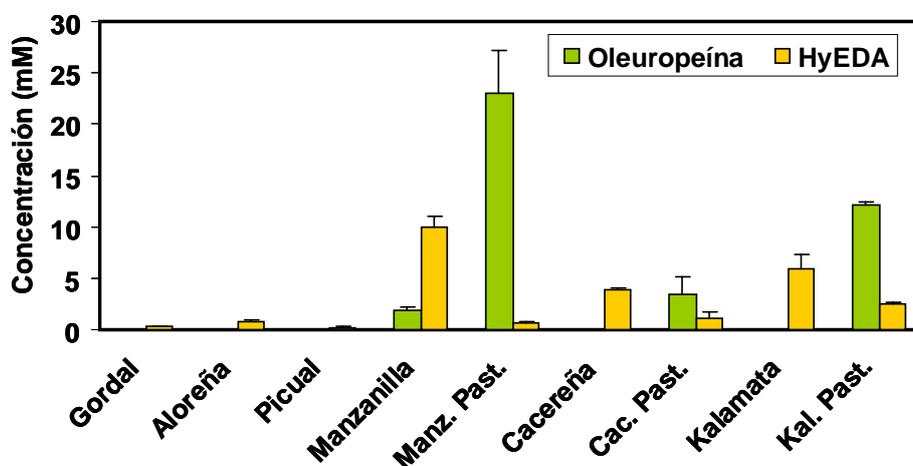
(Figura 61), en particular en las variedades Cacereña, Kalamata y Manzanilla. Por el contrario, se encontró poca cantidad de este antimicrobiano en los jugos de los frutos pasterizados, lo que apunta a una reacción enzimática, probablemente catalizada por la enzima β -glucosidasa.

Tabla 25. Compuestos fenólicos (mmol/kg) en la pulpa de distintas variedades de aceitunas.

Variedad	Hidroxitirosol				
	Hidroxitirosol	4-glucósido	Oleuropeína	Tirosol	Salidrósido
Picual	5,7 (1,0) ^a	1,6 (0,2)	2,8 (0,2)	nd ^b	nd
Aloreña	1,5 (0,2)	2,3 (0,2)	2,7 (0,1)	nd	nd
Gordal	3,7 (0,6)	2,7 (0,5)	1,2 (0,3)	nd	nd
Cacereña	8,2 (0,2)	4,6 (0,2)	5,7 (0,4)	2,4 (0,1)	0,3 (0,1)
Kalamata	3,9 (0,8)	2,7 (0,2)	27,9 (3,8)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)
Manzanilla	12,1 (1,0)	7,5 (0,1)	15,7 (0,9)	2,2 (0,2)	nd

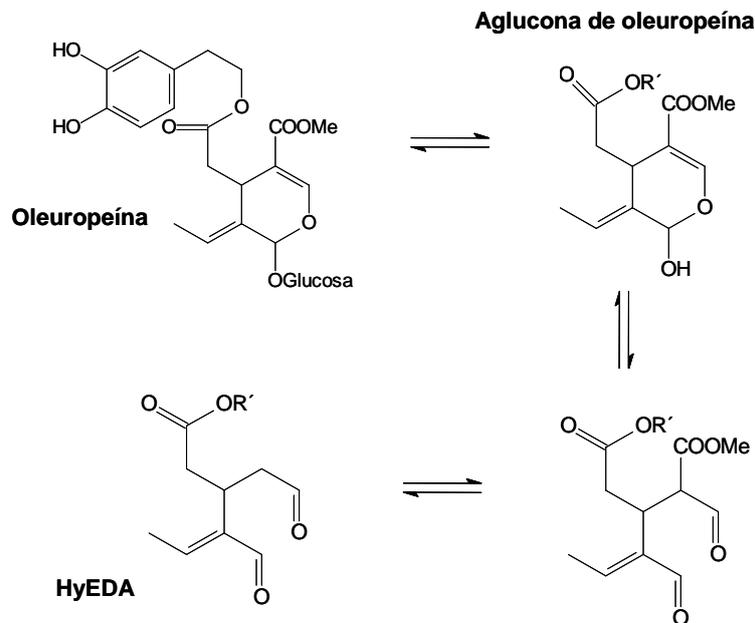
Nota: Verbascósido, luteolina 7-glucósido, rutina, comselogósido y éster de ácido cafeico unido a secologanósido se detectaron en concentraciones menores de 2 mmol/kg
^aDesviación estándar. ^bNo detectado.

Figura 61. Formación de Hy-EDA en la pasta de diferentes variedades de aceitunas mediante su agitación a temperatura ambiente por 5 minutos. Efecto de la pasterización sobre la formación de Hy-EDA y concentración de oleuropeína en el jugo de aceitunas.



La mayoría de los investigadores asumen que el Hy-EDA y las agluconas secoiridoides se forman durante la etapa de molienda en el proceso de obtención del aceite de oliva, como consecuencia de la acción de la β -glucosidasa sobre el enlace glucosídico de la oleuropeína y ligustrósido (Figura 62). Montedoro y colbs. (2002), también encontraron menor cantidad de Hy-EDA en la pasta de aceitunas escaldadas que en los frutos no calentados, lo que se atribuyó a la inactivación de la actividad β -glucosidasa. Además García y colbs. (2005), han propuesto calentar las aceitunas antes de la molienda para reducir la concentración de las agluconas secoiridoides amargas en el aceite de oliva.

Figura 62. Mecanismo de formación de Hy-EDA a partir de oleuropeína. R': hidroxitirosol.



Asimismo, la concentración de Hy-EDA fue mucho menor en la pasta de las aceitunas no calentadas de las variedades Gordal, Aloreña y Picual que en las de las variedades Cacereña, Kalamata y Manzanilla, lo cual correlaciona con los niveles de este compuesto en sus salmueras a los dos meses de almacenamiento (Tabla 22). Todos estos resultados demuestran que el Hy-EDA se forma durante la permanencia de las aceitunas en salmuera como consecuencia de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína llevado a cabo por la β -glucosidasa (Medina y colbs., 2008c). Mazzuca y colbs. (2006), han propuesto que la hidrólisis glucosídica de la oleuropeína no ocurre cuando los frutos tienen una coloración verde en el árbol, ya que no están en contacto la enzima y el

sustrato. Por el contrario, cuando los frutos van madurando en el árbol se permite la reacción por el daño causado en las estructuras celulares, y se ponen en contacto la β -glucosidasa con la oleuropeína, a pesar de que la concentración de enzima sea baja en estos frutos (Briante y cols., 2002). En el caso de la colocación en salmuera de las aceitunas, es razonable pensar que se produce una degradación de las estructuras celulares, con lo que la enzima y la oleuropeína deben entrar en contacto y, aunque el Hy-EDA no se detecta en los frutos frescos (Tabla 25), sí se encuentran cantidades significativas en las salmueras asépticas (Tabla 22).

Estos resultados obtenidos con pulpa fresca triturada se confirmaron con aceitunas enteras aderezadas bajo condiciones asépticas. Se pusieron aceitunas Manzanilla pasterizadas y no pasterizadas en salmueras acidificadas bajo condiciones asépticas durante 6 meses, y se encontró que la concentración de oleuropeína fue mucho mayor tanto en los frutos como en las salmueras de las aceitunas pasterizadas que en las no pasterizadas. Sin embargo, no se detectó ni Hy-EDA ni EDA en las aceitunas frescas, independientemente del tratamiento con calor (Tabla 26), lo que confirma la ausencia de estas sustancias en los tejidos de los frutos frescos. Por el contrario, sí se detectó Hy-EDA en la pulpa de las aceitunas no pasterizadas después de varios meses en salmuera, y tanto Hy-EDA como EDA fueron detectados en las salmueras de estas aceitunas no pasterizadas. El EDA probablemente se formó por la hidrólisis del Hy-EDA, tal como ha sido demostrado anteriormente (Medina y cols., 2008 b).

Desde los años 70 se sabe que la pasterización de las aceitunas frescas Manzanilla permite el crecimiento posterior de los lactobacilos en las salmueras, aunque nunca se ha dado ninguna explicación para este fenómeno (Rodríguez-Borbolla y cols., 1971; Fleming y cols., 1973). En la Figura 62 se puede ver que cuando se inocularon con *L. pentosus* salmueras de aceitunas frescas pasterizadas, el microorganismo creció abundantemente, lo cual no sucedió en las salmueras de las aceitunas que no se pasterizaron. A pesar de que las salmueras de las aceitunas pasterizadas tenían mucha más cantidad de oleuropeína que las no pasterizadas (Tabla 27), no se detectaron los compuestos antimicrobianos Hy-EDA ni EDA (Medina y cols., 2008c) y no hubo problemas para el crecimiento de los lactobacilos.

Tabla 26. Compuestos fenólicos y oleosídicos (mmol/kg) en pulpa de aceitunas Manzanilla. Los frutos se pusieron directamente en una salmuera acidificada o fueron pasterizados a 80°C antes de colocarlos en salmuera.

Compuesto	Fruto fresco		Aceitunas asépticas a los 6 meses en salmuera	
	No pasterizado	Pasterizado	No pasterizado	Pasterizado
Hidroxitirosol	6,2 (0,5) ^a	1,3 (0,3)	7,1 (1,7)	1,9 (0,2)
Hy4Glu	7,5 (0,8)	8,8 (0,5)	6,1 (1,5)	7,7 (0,8)
Oleuropeína	11,0 (1,3)	41,4 (0,6)	9,0 (2,3)	33,8 (1,9)
Hy-EDA	nd ^b	nd	1,4 (0,5)	nd
Secoxyloganin	1,9 (0,5)	2,7 (0,1)	1,1 (0,3)	2,2 (0,7)

^aDesviación estándar. ^bNo detectado.

Figura 62. Efecto de la pasterización sobre el crecimiento de *L. pentosus* en salmueras de aceitunas Manzanilla. El recuento de células cultivables fue a las 48 h de la inoculación.

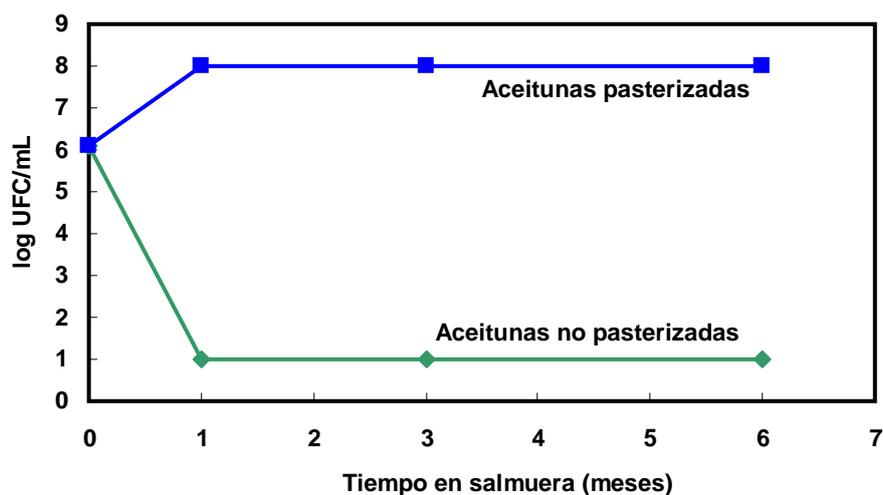


Tabla 27. Compuestos fenólicos y oleosídicos (mM) en salmueras asépticas de aceitunas Manzanilla almacenadas durante 6 meses. Los frutos se pusieron directamente en una salmuera acidificada o fueron pasterizados a 80 °C antes de ponerse en salmuera.

Compuesto	Tiempo en salmuera					
	1 mes		3 meses		6 meses	
	ANP ^a	AP	ANP	AP	ANP	AP
Hidroxitirosol	5,4 (0,1) ^b	0,6 (0,1)	7,8 (0,2)	1,0 (0,1)	9,4 (0,4)	1,5 (0,1)
Hy4Glu	5,3 (0,5)	5,4 (0,2)	6,8 (0,9)	5,9 (0,4)	6,2 (0,7)	7,0 (0,5)
Oleuropeína	4,4 (0,1)	23,0 (0,7)	6,3 (0,5)	31,9 (2,5)	7,3 (0,2)	32,1 (0,3)
Hy-EDA	2,5 (0,1)	nd ^c	2,1 (0,1)	nd	1,3 (0,1)	nd
EDA	1,0 (0,1)	nd	1,0 (0,1)	nd	1,1 (0,1)	nd
Oleósido	0,6 (0,1)	1,2 (0,1)	0,7 (0,1)	1,5 (0,1)	0,7 (0,1)	1,4 (0,1)
Secoxyloganin	2,3 (0,1)	4,7 (0,5)	2,7 (0,1)	5,7 (0,1)	2,6 (0,1)	5,7 (0,3)
Secologanósido	2,1 (0,1)	3,5 (0,5)	2,2 (0,1)	4,2 (0,1)	2,3 (0,1)	4,0 (0,1)
Ole11ME	2,2 (0,1)	4,4 (0,2)	2,5 (0,1)	5,3 (0,7)	2,3 (0,2)	5,0 (0,4)

Nota: Tirosol, verbáscosido, comselogósido, luteolina 7-glucósido, rutina, y éster de ácido cafeico unido a secologanósido se detectaron a concentraciones por debajo de 1 mM. ^aANP, aceitunas no pasterizadas; AP, aceitunas pasterizadas. ^bDesviación estándar. ^cNo detectado.

Queda, por tanto, demostrado que son estas sustancias Hy-EDA y EDA los inhibidores de la fermentación láctica de aceitunas no tratadas con NaOH y que éstos se forman durante la estancia en salmuera de las aceitunas, Hy-EDA a partir de la hidrólisis enzimática por β -glucosidasa de la oleuropeína y EDA de la hidrólisis ácido de Hy-EDA (Medina y colbs., 2008c).

4.3. Compuestos antimicrobianos de la aceituna de mesa y otros desinfectantes comerciales

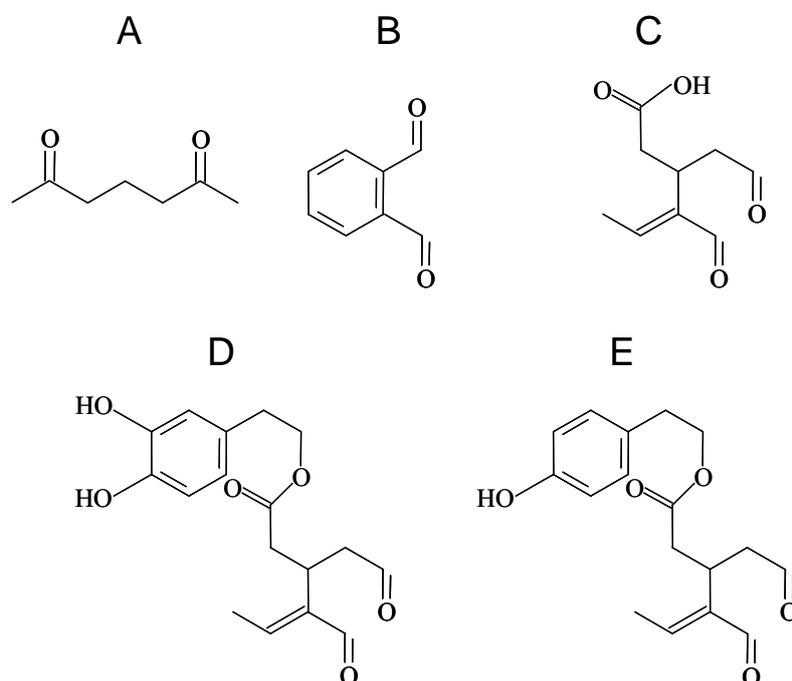
En los experimentos realizados en este apartado, los diferentes compuestos antimicrobianos fueron puestos en contacto con los microorganismos diana durante 5 minutos sin la presencia de medio de cultivo, siendo disueltos en tampón PBS. Este método experimental está basado en el recomendado para evaluar biocidas y surfactantes (European Estándar EN-1276, 1997; Simões y cols., 2006), y la actividad bactericida de aceites esenciales de plantas (Friedman y cols., 2002).

Tal como se ha comentado en varias ocasiones, la actividad antimicrobiana de aceitunas, aceite de oliva, hojas de olivo y alpechín tradicionalmente se ha asociado a compuestos polifenólicos, bien oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol, catecol y otros. Sin embargo, a lo largo de este trabajo se ha demostrado que las sustancias con mayor actividad bactericida en aceite de oliva y aceitunas de mesa son Hy-EDA, Ty-EDA y EDA. Las dos primeras tienen un componente fenólico (hidroxitirosol y tirosol) en su estructura; sin embargo, EDA no posee fenol. (Figura 63). Por otra parte, todas tienen una estructura dialdehídica, similar a la de los desinfectantes comerciales glutaraldehído y ortoftalaldehído. Por consiguiente, uno de los objetivos de las siguientes experiencias fue comparar la actividad bactericida de todas estas sustancias con semejanzas en sus estructuras. Asimismo, se ha evaluado también la actividad bactericida de otras sustancias polifenólicas a las cuales se les ha atribuido en la literatura científica de alimentos una elevada actividad antimicrobiana. Es decir, hemos descubierto una serie de compuestos con actividad bactericida en alimentos procedentes de la aceituna y queremos conocer cómo de interesante es dicha actividad con respecto a otros compuestos antimicrobianos presentes en alimentos como el vino, té café, aceites esenciales, etc.

Para ello, se estudió el efecto de distintas sustancias puras sobre diferentes bacterias. Los resultados indicaron que las cepas de *S. aureus*, *P. fluorescens*, *E. coli* y *E. faecalis* sobrevivieron después de 5 minutos de contacto con hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína (Tabla 28). Estas sustancias se probaron en un rango de concentraciones de 0,5 a 20 mM, y no fueron efectivos frente a las bacterias diana (2 Gram-positivos y 2 Gram-negativos) aún en el nivel más alto (20 mM), que son concentraciones mucho

más elevadas que las encontradas en los productos derivados de aceitunas (aceite de oliva y aceitunas de mesa) (Medina y cols., 2008d).

Figura 63. Estructura de las sustancias dialdehídicas ensayadas en este estudio. A, glutaraldehído (GTA); B, ortoftalaldehído (OPA); C, forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico (EDA); D, forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unida a hidroxitirosol (Hy-EDA); E, forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a tirosol (Ty-EDA).



Los compuestos catequina, epicatequina, timol, eugenol y carvacrol no presentaron ninguna actividad bactericida en un rango de concentraciones de 0,5-5 mM. El límite superior (5 mM) fue elegido por ser varias veces más alto que el encontrado para estas sustancias en alimentos. Ninguna de las soluciones control (PBS y PBS con etanol al 4 %) ejercieron actividad bactericida. EL compuesto nonenal, por problemas de solubilidad en PBS, fue disuelto primeramente en DMSO y posteriormente diluido 1:10 en PBS. Ni la solución control, ni las soluciones de nonenal, incluso en su concentración más alta (4 mM) mostraron actividad antimicrobiana. El límite superior es mucho más elevado que la concentración indicada para esta sustancia en el flavor del aceite de oliva y la aceituna. (Bisignano y cols., 2001).

Tabla 28. Concentración máxima a la cual varios compuestos puros no mostraron actividad bactericida frente a *S. aureus*, *P. fluorescens*, *E. coli* y *E. faecalis*.

Compuesto	Concentración (mM) ^a
Hidroxitirosol	>20
Tirosol	>20
Oleuropeína	>20
Catequina	>5
Epicatequina	>5
Timol	>5
Eugenol	>5
Carvacrol	>5
Nonenal	>4
Ácido carnósico	≥4

^aEl inóculo inicial osciló de 5×10^5 y 1×10^6 UFC/mL.

Por otra parte, el ácido carnósico no fue efectivo a la concentración máxima de 4 mM, aunque se observó una reducción en el número de células, lo que quiere decir que la CMB se encuentra cercana a este valor de concentración.

Por otra parte, en la Tabla 29 se recogen las CMBs, para los compuestos con estructura dialdehídica frente a dos bacterias Gram-positivas y dos Gram-negativas. Los resultados mostraron una mayor actividad bactericida que las sustancias recogidas en la Tabla 28. Las células de todas las cepas murieron después de 5 minutos de contacto a concentraciones mayores de 1,25 mM. Además, se observaron diferencias entre las CMBs de dichas sustancias. GTA y EDA tuvieron un valor más alto que OPA, Hy-EDA y Ty-EDA. Estos resultados revelan que la estructura química influye en la bioactividad (Figura 63), aquellos con la estructura dialdehídica y aromática (OPA, Hy-EDA y Ty-EDA) tuvieron una mayor actividad bactericida que aquellos que sólo poseen estructura dialdehídica (GTA y EDA) (Medina y cols., 2008d).

Tabla 29. CMBs de compuestos con estructura dialdehídica frente a diversas bacterias

Compuesto	CMB (mM) ^a			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
GTA	1,00	1,25	0,75	0,50
OPA	0,10	0,15	0,15	0,15
EDA	1,25	1,25	0,75	1,00
Hy-EDA	0,15	0,15	0,75	0,75
Ty-EDA	0,08	0,08	0,50	0,60

^aEl inóculo inicial osciló entre 6×10^5 y 1×10^6 UFC/mL.

Asimismo, la simulación de condiciones sucias con la adición de BSA en la suspensión bacteriana afectó a la eficacia bactericida de estos compuestos (Tabla 30). Las CMBs para el GTA, Hy-EDA, Ty-EDA y OPA se multiplicaron por 2, 3, 4 y 10 veces cuando se emplearon condiciones sucias (3 g/L BSA) en vez de condiciones limpias (0,3 g/L BSA), respectivamente.

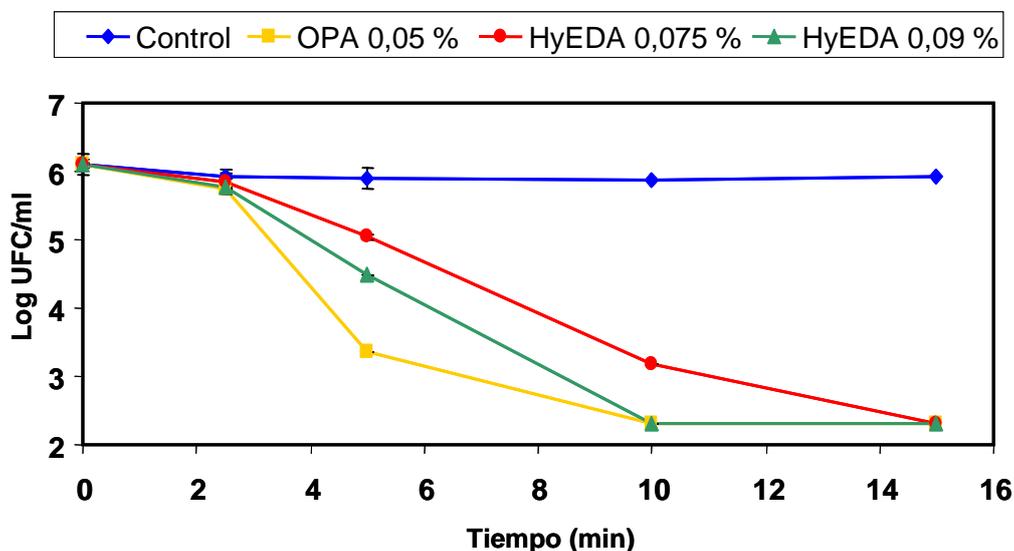
Además, se observó un efecto dependiente del tiempo para la actividad del OPA a una concentración de 0,05 mM y del Hy-EDA a una concentración de 0,075 y 0,09 mM (Figura 64). A medida que el tiempo de contacto aumentaba (de 0 a 15 minutos), la supervivencia de *S. aureus* decreció hasta no poder detectar células viables.

Tabla 30. Efecto de la concentración de albúmina (BSA) sobre la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de compuestos con estructura dialdehídica.

Compuesto	CMB (mM) ^a	
	0.3 g/L BSA	3 g/L BSA
GTA	0.8	1.5
OPA	0.2	2.0
Hy-EDA	0.3	1.0
Ty-EDA	0.2	1.0

^aEl inóculo inicial osciló entre 7×10^5 y 9×10^5 UFC/mL.

Figura 64. Efecto de OPA y Hy-EDA en el número de células viables de *S. aureus*. Las barras indican la desviación estándar.



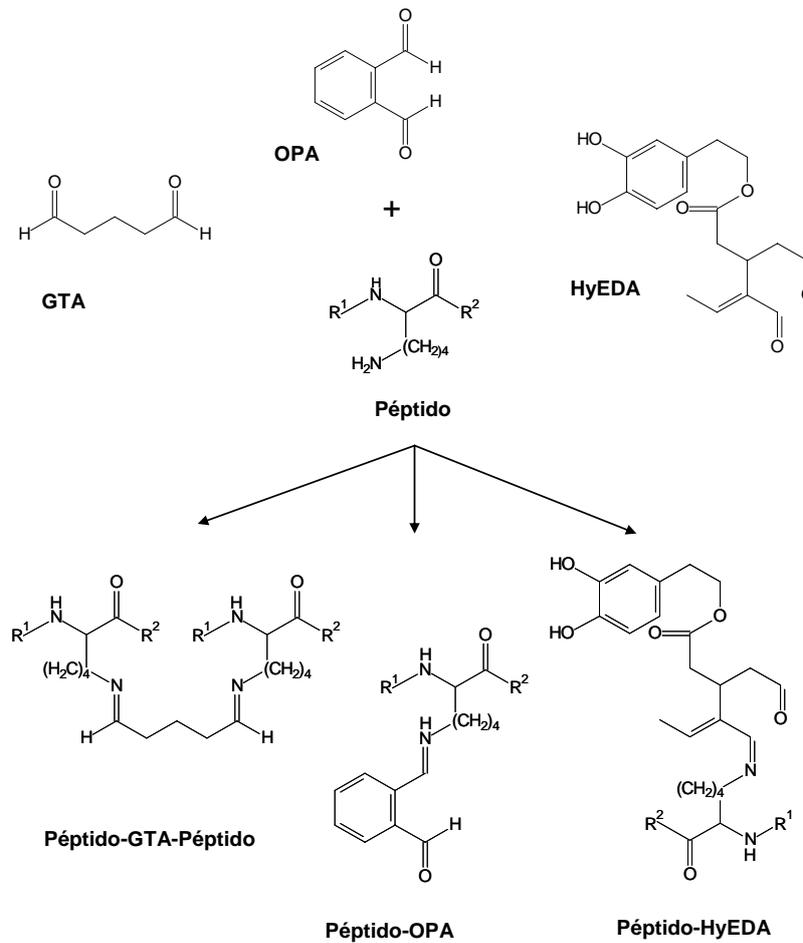
De todos estos resultados se puede sacar la siguiente conclusión: ninguno de los compuestos fenólicos de aceitunas tales como oleuropeína, hidroxitirosol y tirosol mostraron actividad bactericida incluso a concentraciones de 20 mM, lo cual confirma los resultados obtenidos con otros microorganismos en apartados anteriores de este trabajo. De hecho, Bisignano y cols. (1999) encontraron que tanto la oleuropeína como el hidroxitirosol fueron inhibidores frente a diferentes especies de patógenos del tracto intestinal y respiratorio, mientras que Fleming y cols (1973) atribuyeron la inhibición del crecimiento de bacterias lácticas al ácido elenólico y la aglucona de la oleuropeína. Kubo y cols., (1985) confirmaron que la oleuropeína inhibía el crecimiento de *Bacillus subtilis*, aunque sólo en presencia de β -glucosidasa. Es interesante destacar que Tassou y Nychas (1995) encontraron que la oleuropeína inhibía el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis en caldo y no en un sistema modelo de alimentos, y más tarde, Zanichelli y cols. (2005), explicaron que era necesaria la presencia de H_2O_2 en el caldo de cultivo para que la oleuropeína pueda ejercer su actividad antimicrobiana y que el H_2O_2 se forma como resultado de la oxidación de la triptona.

Estos resultados pusieron de nuevo de manifiesto la elevada actividad bactericida de Ty-EDA, Hy-EDA y EDA, no sólo superior a la de la oleuropeína e hidroxitirosol, sino también a la de otros compuestos de alimentos con reconocida actividad antimicrobiana. Las catequinas del té, en particular epigallocatequinas (Kajiya

y colbs., 2004; Stapleton y colbs., 2006), timol, eugenol y carvacrol de aceites esenciales (Friedman y colbs., 2002; Veldhuizen y colbs., 2006; Di Pasqua y colbs., 2007; Gill y Holley, 2006) y ácido carnósico de extractos de romero (Del Campo y colbs., 2003) son algunas de estas sustancias. Sin embargo, ninguna de ellas mostró actividad bactericida después de 5 minutos de contacto cuando se probaron a concentraciones más bajas de 4-5 mM. Por el contrario, los antimicrobianos del olivo mostraron actividad bactericida frente a las cuatro cepas estudiadas a más baja concentración. De hecho, esta actividad fue similar a la de GTA y OPA, ambos biocidas comerciales que poseen una fuerte actividad antimicrobiana (Simons y colbs., 2000; Simões y colbs., 2008). Parece, por tanto, que la estructura dialdehídica de los antimicrobianos de la aceituna (EDA, Hy-EDA y Ty-EDA), similar a la de estos desinfectantes comerciales, es determinante para su alta bioactividad. Además, se encontraron diferencias en las CMBs de estas sustancias; Hy-EDA y Ty-EDA tuvieron mayor actividad bactericida que el EDA. El componente fenólico (hidroxitirosol y tirosol) de las moléculas de Hy-EDA y Ty-EDA les confiere mayor lipofilia que la estructura dialdehídica sola del EDA y, en consecuencia, mayor eficacia bactericida, como ha sido propuesto para la diferente actividad entre OPA y GTA (Simons y colbs., 2000). De hecho, se ha sugerido que la actividad antibacteriana de las catequinas del té se incrementa notablemente con la presencia de cadenas alquílicas debido al aumento de su lipofilia (Kajiya y colbs., 2004), y la actividad antimicrobiana del carvacrol y varios compuestos estructuralmente relacionados fue influenciada, en gran medida, por su solubilidad en agua (Veldhuizen y colbs., 2006).

Aunque hay muchas teorías para explicar el mecanismo de la actividad antibacteriana de los fenoles y compuestos derivados del glutaraldehído, es evidente el posible papel de las interacciones de éstos con la membrana celular y la inhibición de procesos celulares regulados enzimáticamente (Burt, 2004). Precisamente, se ha observado que GTA y OPA interaccionan fuertemente con aminoácidos y proteínas debido a su estructura dialdehídica (Figura 65), lo cual se ha sugerido para explicar su fuerte acción bactericida (Simons y colbs., 2000; Simões y colbs., 2006; 2007). Una explicación similar puede plantearse para la actividad antimicrobiana de los compuestos antimicrobianos de la aceituna con estructura dialdehídica (EDA, Hy-EDA y Ty-EDA), y la aglucona de la aucubina (Davini y colbs., 1986; Marak y colbs., 2002), un glucósido secoiridoide similar a la oleuropeína.

Figura 65. Mecanismo de unión de compuestos con estructuras dialdehídicas con aminas primarias de una cadena péptica.



Además, se ha indicado que el Ty-EDA inhibe la actividad de las enzimas ciclooxigenasa COX-1 y COX-2 de una forma similar al ibuprofeno (Beauchamp y colbs., 2005), y Hy-EDA tiene una fuerte capacidad desnaturalizante de proteínas (Konno y colbs., 1999) e inhibitoria frente a la enzima transformadora de la angiotensina (Hansen y colbs., 1996). También, se sabe que la actividad bactericida de los extractos de aceitunas puede alterarse por la presencia de compuestos orgánicos nitrogenados en los medios de ensayo (Joven y colbs., 1970; Ruiz-Barba y colbs., 1990). Todos estos datos apoyan la teoría propuesta sobre la actividad bactericida ejercida por los antimicrobianos de la aceituna debido a su estructura dialdehídica y a su interacción con compuestos proteicos de las células bacterianas.

Teniendo en cuenta los datos anteriores, se añadió BSA a los cultivos bacterianos con el fin de aclarar si la presencia de material orgánico (condiciones sucias) interfiere con la actividad antimicrobiana (European standar test for testing disinfectants, 1997). Todos los compuestos dialdehídicos estudiados redujeron su eficacia antimicrobiana en presencia de BSA (3 g/L) aunque los antimicrobianos de las aceitunas (Ty-EDA y Hy-EDA) en una menor proporción que los desinfectantes comerciales (GTA y OPA). Debe indicarse que el efecto de BSA sobre el poder antimicrobiano de OPA y GTA depende de las condiciones experimentales, aún así se encuentran resultados contradictorios en la literatura (Wals y colbs., 1999; Fraud y colbs., 2001; Simões y colbs., 2006).

Por tanto, los alimentos derivados de la aceituna (aceite de oliva y aceitunas de mesa) contienen compuestos con estructura dialdehídica (EDA, Hy-EDA y Ty-EDA) similares al glutaraldehído que les confiere una fuerte actividad bactericida. Además, la presencia de compuestos fenólicos, hidroxitirosol y tirosol, en la estructura básica (EDA) de los antimicrobianos de aceitunas incrementa su lipofilia y su eficacia bactericida, siendo incluso mayor que las encontradas para desinfectantes sintéticos (GTA y OPA) cuando se trabajó bajo condiciones de alta carga orgánica (Medina y colbs.,2008d).

5. CONCLUSIONES

- 1- Se ha identificado a las formas dialdehídicas del ácido elenólico unido a hidroxitirosol y tirosol como los compuestos con mayor actividad bactericida del aceite de oliva.
- 2- Estos compuestos le confieren al aceite de oliva una actividad antimicrobiana superior a la de otros alimentos tales como té, café, vino y otros.
- 3- La actividad bactericida del aceite de oliva puede ser aprovechada en la preparación de alimentos (mayonesas, ensaladas, etc.), ya que reduce la población microbiana en alimentos contaminados con patógenos, y en la prevención de enfermedades gástricas producidas *Helicobacter pylori*.
- 4- Se ha identificado a la forma dialdehídica del ácido elenólico decarboximetilada libre (EDA) o unido a hidroxitirosol (Hy-EDA), junto con un isómero de oleósido 11-metil éster como los compuestos con mayor actividad bactericida de las aceitunas de mesa.
- 5- Estos son los compuestos que impiden el crecimiento de las bacterias lácticas en las salmueras de aceitunas no tratadas con hidróxido sódico o con un deficiente tratamiento alcalino.
- 6- Ni HyEDA ni EDA se encuentran en los frutos frescos. El HyEDA se forma a partir de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína durante la conservación de las aceitunas, y el EDA por hidrólisis ácida del primero. Por ello, los líquidos de conservación de aceitunas destinadas a negras oxidadas son una fuente importante de estas sustancias con actividad bactericida.
- 7- La actividad bactericida de los principales antimicrobianos del aceite de oliva y aceitunas de mesa es similar a la de los desinfectantes comerciales glutaraldehído y orto-ftalaldehído debido a que todos comparten una estructura dialdehídica en su molécula.

6. BIBLIOGRAFÍA

Al-Waili, N.S. 2005. Clinical and mycological benefits of topical application of honey, olive oil and beeswax in diaper dermatitis. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 160-163.

Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., Royo, G. 2004. Diagnóstico Microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. In *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 17. E. Cercenado y R. Cantón (Eds.). [Online] <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/indice17.htm>.

Amiot, M. J., Fleuriot, A. y Macheix, J. J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34, 823-826.

Anchisi, C., Maccioni, A. M., Sinico, C. y Valenti, D. 2001. Stability study of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. *Il Farmaco* 56, 427-431.

(ASEMESA) Asociación de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. 2007. Asemesa analiza la evolución del sector durante los últimos años. *Mercacei* 50, 176-187.

Artajo, L. S., Romero, M. P., Morelló, J. R. y Motilva M.J. 2006. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their efecto on the bitter index. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6079-6088.

Battinelli, L., Danielle, C., Cristiani, M., Bisignano, G., Saija, A. y Mazzanti, G. 2006. In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine* 13, 558-563.

Beauchamp, G. K., Keats, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C., Smith, A. B., Breslin, P. A. S. 2005. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46.

Bellido-Blasco, J. B., Arnedo-Peña, A., Cordero-Cutillas, E., Canos-Cabedo, M., Herrero-Carot, C. y L. Safont-Adsuara. 2002. The protective effect of alcoholic beverages on the occurrence of a *Salmonella* foodborne outbreak. *Epidemiology* 13, 228-230.

Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food safety issues WHO/FSF/FOS/98.2. Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva.

Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O. y H. Thomar. 2001. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3209-3212.

Bergsson, G., Steingrímsson, O., Thormar, H. 2002. Bactericidal effect of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 258-262.

Bergonzelli, G. E., Donnicola, D., Porta, N., Cotéis-Theulaz, I. E. 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3240-3246.

Bianchi, G. y Pozzi, N. 1994. 3,4-Dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochem.* 35, 1335-1337.

Bianco, A., Mazzei, R., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M. L., Soriero, A. y Uccella, N. 1998. Microcomponents of olive oil III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol. *Food Chem.* 63, 461-464.

Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crifasi, G., Uccella, N. y Saija, A. 1999. On the in-vitro activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm Pharmacol.* 51, 971-974.

Bisignano, G., Laganà, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., Mazzanti, G. y Saija, A. 2001. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. FEMS Microbiol. Letters 198, 9-13.

BOE, Boletín Oficial del Estado nº 273. 2001. Real Decreto 1230/2001 de 8 de Noviembre. Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa.

Bourquelot, E. y Vintilesco, J. 1908. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retiré de l'olivier (*Olea europaea* L.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 147, 533-535.

Brenes, M., García, P., Durán, M. C. y Garrido, A. 1986. Estudio comparativo de sistemas de conservación de aceitunas tipo negras. Grasas y Aceites, 37, 123-128.

Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 1992. Phenolic compounds related to black color formation during the processing of ripe olives. J. Agric. Food Chem. 42, 1192-1196.

Brenes, M., García, P., Durán, M. C. y Garrido, A. 1993. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. J. Food Sci. 58, 347-350.

Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, A. H. y Garrido, A. 1995. Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. J. Agric. Food Chem. 43, 2702-2706.

Brenes, M. y de Castro, A. 1998. Transformation of oleuropein y its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. J. Sci. Food Agric. 77, 353-358.

Brenes, M. García, A., García, P., Ríos, J. L. y Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. J. Agric. Food Chem. 47, 3535-3540.

Brenes, M., Hidalgo, F. J., García, A., Ríos, J.J., García, P., Zamora, R. y Garrido, A. 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 715-720.

Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A. 2001. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgen olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5609-5614.

Brenes, M., García, A., Ríos, J. J., García, P. y Garrido, A. 2002. Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 615-625.

Brenes, M., Romero, C., de Castro, A. 2004. Combined fermentation and evaporation processes for treatment of washwaters from Spanish-style green olive processing. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 253-259.

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., di Salle, A., la Cara, F., & Nucci, R. 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science* 162, 791-798.

Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E. I., Sharon, N., Neeman, I. 2000. A high molecular mass constituents of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 295-301.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.

Cavallaro, L. Egan, B., O'Morain, C., Di Mario, F., 2006. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 11, 36-39.

Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marciales, M. A. y Cristinzo, G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 393-398.

Caponio, F., Gomes, T. y Summno, C. 2003. Quality assessment of edible oils used as liquid medium in canned tuna. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 104-108.

Capozzi, F., Piperno, A., & Ucella, N. 2000. Oleuropein site selective hydrolysis by technomimetic nuclear magnetic resonante experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1623-1629.

Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Silva, A. M. S., Renard, C. M. G. C., & Coimbra, M. A. 2006. Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace. *Journal of the Science and Agriculture*, 86, 1495-1502.

Cavallaro, L., Egan, B., O' Morain, C., Di Mario, F. 2006. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11, 36-39.

Chum, S., Vattem, D. A., Lin, Y., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 40, 809-816.

Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4142-4147.

Ciafardini, G., & Zullo, B. A. 2000. β -Glucosidase activity in olive brine during the microbiological debittering process. *Advance in Food Science (CMTL)* 22, 69-76.

Columela, L. J. M. *De Re Rustica*. 42. Trad. Por Juan M^a Álvarez de Sotomayor. Editado por Sociedad Nestlé, A. E. P. A. Santander, 1979.

Consejo Oleícola Internacional (COI). 2004. Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa. Madrid. Diciembre 2004.

Consejo Oleícola Internacional (COI) 2007. Madrid, Noviembre 2007.

Corona, G., Tzounis, X., Dessi, M. A., Deiana, M., Debnam, E. S., Visioli, F., Spencer, J. P. E. 2006. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.* 40, 647-658.

Damtoff, S., Franzyk, H. y Jensen, S. R. 1993. Biosintesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytoche.* 34, 1291-1299.

Davini, E., Iavarone, C., Trogolo, C., Aureli, P y Pasolini, B. 1986. The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochem.* 25, 2420-2422.

D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Masón, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galletti, P. y Zappia, V. 2001. *Drugs metabolism and disposition.* 29, 1492-1498.

D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorretino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., Masella, L., Tufano, M. A., Zappia, M. y Galletti, P. 2005. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 908-919.

De Caro, N. y Ligori, M. G. 1959. Attività antibiotica di un estrato desunto delle acque de vegetazione delle olive. *Instituto Superiore di Sanita Roma Rendiconti* 22, 233-242.

De Castro, A., & Brenes, M. 2001. Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, 36, 797-802.

De Castro, A., Romero, C. y Brenes, M. 2005. A new polymer inhibitor of *lactobacillus* growth in table olives. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 192-196.

De Castro, A., García, P., Romero, C., Brenes, M. y Garrido, A. 2007. Industrial implementation of black ripe olive storage under acidic conditions. *J. Food Eng.* 80, 1206-1212.

De la Torre, J. E., Moya, E. R., Bota, E., & Sancho, J. 1993. Physical, chemical and microbiological studies of the fermentation of Arbequina green olives. *Grasas y Aceites*, 44, 274-278.

De la Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jáuregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Fitó, M., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D. y López-Sabater, M. C. 2007. *Analytica Chimica Acta* 583, 402-410.

De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., Ranalli, G. 2008. Isolation of hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur. Food. Res. Technol.* 226, 653-659.

De Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.

Del Campo, J., Nguyen-The, C., Sergent, M. y Amito, M. J. 2003. Determination of the most bioactive phenolic compound from rosemary against *Listeria monocytogenes*: influence of concentration, pH and NaCl. *J. Food Sci.* 68, 2066-2071.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. y Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Che.* 55, 4863-4870.

Desenclos, J. C. A., Klontz, K. C., Wilder, M. H. y Gunn, R. A. 1992. The protective effect of alcohol on the occurrence of epidemic oyster-borne Hepatitis A. *Epidemiology* 3, 371-374.

Draughon, F. A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food Technol.* 58, 20-28.

Drusas, A., Vagenas, G. K. y Saravacos, G. D. 1988. Diffusion of sodium chloride in green olives. *J. of Food Eng.* 7, 211-222.

Durán, M. C., Brenes, M., García, P., Fernández, M. J. y Garrido, A. Aceitunas tipo negras. 1991. Estudio comparativo de tres procedimientos para la conservación previa de frutos de la variedad Gordal (*O. europaea regalis*). *Grasas y Aceites* 42, 106-113.

Durán, M. C., García, P., Brenes, M. y Garrido, A. 1993. *Lactobacillus plantarum* survival during the first days of ripe olive brining. *System. Appl. Microbiol.* 16, 153-158.

Durán, M. C., García, P., Brenes, M., & Garrido, A. 1994a. Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 377-382.

Durán, M. C., García, P., Brenes, M., Garrido, A. 1994b. *Lactobacillus plantarum* survival in aerobic, directly brined olives. *J. Food Sci.* 59, 1197-1201.

Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y. y Ohta, M. 1998. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157 : H7. *J. Food Prot.* 61,953-959.

Etchells, J. L., Borg, A. F., Kittel, I. D., Bell, T. A. y Fleming, H. P. 1966. Pure culture fermentation of green olives. *Appl. Microbiol.* 14, 1027-1041.

European Standard EN 1276. 1997. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. London.

Federici, F. y Bongi, G. 1983. Improved method for the isolation of bacterial inhibitors from oleuropein hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 509-510.

Fleming, H. P. y Etchells, J. L. 1967. Occurrence of an inhibitor of lactic acid bacteria in green olives. *Appl. Microbiol.* 15, 1178-1184.

Fleming, H. P., Walter, W. M. y Etchells, J. L. 1969. Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Appl. Microbiol.* 18, 856-860.

Fleming, H. P., Walter, W. M. y Etchells, J. L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.* 20, 777-782.

Fernández, J., Garrido, A., García, P., Brenes, M., Durán, M. C. 1992. Características del proceso fermentativo durante la conservación de aceitunas hojiblancas destinadas a elaborarse como tipo negras. *Grasas y Aceites* 43,212-218.

Fogliano, V., Ritieni, A., Monti, S. M., Gallo, M., Della Medaglia, D., Ambrosiano, M. L. y Sacchi, R. 1999. Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1803-1808.

Fraud, S., Maillard, J. Y. y Russel, A. D. 2001. Comparison of the micobactericidal activity of *ortho*-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. 48, 214-221.

Friedman, M., Henika, P. R. y Mandrell, R. E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65, 1545-1560.

Friedman, M., Henika, P. R. y Mandrell, R. E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 66, 1811-1821.

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E., y Kozukue, N. 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and teaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* 69, 354-361.

Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T. 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sci.* 71, 449-1463.

Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Hirai, Y. 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannis derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microb. Immunol.* 48, 251-261.

Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. y Bisignano, G. 2002. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 293-296.

Furneri, P. M., Piperno, A., Saija, A. y Bisignano, G. 2004. Antimicoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20, 293-296.

García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C. y Garrido, A. 2003. Phenolic content of comercial olive oils. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 520-525.

García, E., Romero, M., Vargas, J., Guil, A., Bernal, S., Castro, M. 2000. Prevalence and clinical significance of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 92, 656-660.

García, J. M., Yousfi, K., Oliva, J., García-Díaz, M. T., & Pérez-Camino, M. C. 2005. Hot water dipping of olives (*Olea europaea*) for virgin olive oil debittering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8248-8252.

García, P., Durán, M. C. y Garrido, A. 1982. Modificaciones del proceso de fermentación de aceitunas negras al natural para evitar alteraciones. *Grasas y Aceites* 33, 9-17.

García, P., Durán, M. C., Brenes, M. y Garrido, A. 1992. Lactic fermentation during the storage of "Aloreña" cultivar untreated green table olives. *J. Appl. Bact.* 73, 324-330.

García, P., Brenes, M., Romero, C. y Garrido, A. 1995. Respiration and physicochemical changes in harvested olive fruits. *J. Hort. Sci.* 70, 925-933.

Garrido, A. y Vaughn, R. H. 1978. Utilization of oleuropein by microorganisms associated with olive fermentation. *Can. J. Microbiol.* 24, 680-684.

Garrido, A., García, P., Montañó, A., Brenes, M. y Durán, M. C. 1993. Biochemical changes during the preservation stage of ripe olive processing. *Die Nahrung* 37, 583-591.

Garrido-Fernández, A., Fernández-Díaz, M. J., y Adams, M. R. 1997. *Table olives: Production and Processing*. Chapman and Hall, London.

Gikas, E., Papadoulou, N., Tzarbopoulos, A. 2006. Kinetic study of the acidic hydrolysis of oleuropein, the major bioactive metabolite of olive oil. *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 29, 497-508.

Gill, A. O. y Holley, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatic. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 1-9.

Graham, D. Y., Anderson, S., Lang, T. 1999. Garlic or jalapeño peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1200-1202.

Hamdi, H. K., y Castellon, R. 2005. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 769-778.

Hansen, K., Adersen, A., Christensen, S. B., Jensen, S. R., Nyman, U., Smitt, U. W. 1996. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomed.* 2, 319-325.

Ho, C. Y., Lin, Y. T., Labbe, R. G., Shetty, K. 2006. Inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic extracts of sprouted peas (*Pisum sativum* L.). J. Food Biochem. 30, 21-34.

Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. y Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta 1147, 132-136.

Innocenti, M., la Marca, G., Malvagia, S., Giaccherini, C., Vincieri, F. F. y Mulinacci, N. 2006. Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 2013-2022.

Just, J. R., y Daeschel, M. A. 2003. Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. J. Food Sci. 68, 285-290.

Juven, B., Samish, Z., Henis, Y. y Jacoby, B. 1968a. Mechanism of enhancement of lactic acid fermentation of green olives by alkali and heat treatments. J. Appl. Bact. 31, 200-207.

Juven, B., Samish, Z. y Henis, Y. 1968b. Identification of oleuropein as a natural inhibitor of lactic acid fermentation of green olives. Israel J. Agric. Res. 18, 137-138.

Juven, B. y Henis, Y. 1970. Studies on the antimicrobial activity of olive phenolic compounds. J. Appl. Bact. 33, 721-732.

Kajiya, K., Hojo, H., Suzuki, M., Nanjo, F., Kumazaya, S., y Nakayama, T. 2004. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. J. Agric. Food Chem. 52, 1514-1519.

Karioti, A., Chatzopoulou, A., Bilia, A. R., Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. y Skaltsa, H. 2006. Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1898-1903.

Kayaardi, S., y Gok. V. 2004. Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). *Meat Sci.* 66, 249-257.

Keceli, T., Robinson, R. K., y Gordon, M. H. 1999. The role of olive oil in the preservation of yogurt cheese (labneh anbaris). *Int. J. Dairy Technol.* 52, 68-72.

Keceli, T. y Robinson, R. K. 2002. Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft* 57, 436-440.

Kilonzo-Nthenge, A., Chen, F. C., y Godwin, S. L. 2006. Efficacy of home washing methods in controlling surface microbial contamination no fresh produce. *J. Food Prot.* 69, 330-334.

Kim, K. T., Moon, S. H., Yeo, E. J., Park, Y. S., Han, Y. S., Nah, S. Y., Lee, N. G., Paik, H. D. 2006. Inhibitory effect of 7-O-butyl naringenin on growth of *Helicobacter pylori* ATCC 26695. *Food Sci. Biotechnol.* 15, 466-468.

Kim, S., Ruengwilysup, C. y Fung, D.Y.C. 2004. Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in a food model. *J. Food Prot.* 67, 2608-2612.

Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H. y Nakamura, M. 1999. Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96, 9159-9164.

Koo, M. W. L., y Cho, C. H. 2004. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 177-185.

Korukluoglu, M., Sahan, Y. y Yigit, A. 2008. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety* 28, 76-87.

Kubo, I. y Matsumoto, A. 1984. Molluscicides from olive *Olea europaea* and their efficient isolation by countercurrent chromatographies. *J. Agric. Food Chem.* 32, 687-688.

Kubo, I., Matsumoto, A. y Takase, I. 1985. A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (Oleaceae) Is oleuropein a phytoalexin precursor? *J. Chem. Ecol.* 11, 251-263.

Kubo, A., Lunde, C. S. y Kubo, I. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1629-1633.

Kuwajima, H., Uemura, T., Takaishi, K., Inoue, K. y Inoue, H. 1988. A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*. *Phytochem.* 27, 1757-1759.

L'Anthoën, N. C. L., y Ingledeu, W. M. 1996. Heat resistance of bacteria in alcohol-free beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 32-36.

Landete, J. M., Curiel, J. A., Rodriguez, H., Rivas, B., & Muñoz, R. 2008. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*, 107, 320-326.

Lee, H., Beon, M. y Kim, M. 2001. Selective growth inhibitor toward human intestinal bacteria derived from *Pulsatilla cernua* root. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4656-4661.

Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y., Zhang, J. y Huang, P. L. 2007. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 872-878.

Lin, Y. T., Kwon, Y. I., Labbe, R. G., Shetty, K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8558-8564.

- Liu, Y., Hidaka, E., Kaneko, Y., Akamatsu, T. y Ota, H. 2006. Ultrastructure of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa and *H. pylori*-infected human gastric mucosa using transmission electron microscopy and the high-pressure freezing-freeze substitution technique. *J. Gastroenterol.* 41, 569-574.
- Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M. y Spencer-Martins, I. 1997. Effect of Salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1165-1167.
- Lock, J. L. y Board, R. G. 1996. The influence of acidulants and oils on the autosterilization of home-made mayonnaise. *Food Research International* 28, 569-572.
- Ma, S., He, Z., Deng, X., But, P. P., Oooi, V. E., Xu, H., Lee, S. H. y Lee, S. 2001. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem.Pharm. Bull.* 49, 1471-1473.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I. y Takahashi, T. 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1788-1791.
- Maestro, R., León, R., Ruiz, V., Fiestas, P. y Vázquez, A. 1994. Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites* 45, 332-335.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L. y Chadwick, L. R. 2003. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 1440-1441.
- Marak, H. B., Biere, A., Damme, J. M. M. 2002. Two herbivore-deterrent iridoid glycosides reduce the in-vitro growth of a specialist but not of a generalist pathogenic fungus of *Plantago lanceolata* L. *Chemoecol.* 12, 185-192.

Marimon, J. M., Bujanda, L., Gutiérrez-Stampa, M. A., Cosme, A. y Arenas, J. I. 1998. *In vitro* bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. Am. J. Gastroenterol. 93, 1392.

Markin, D., Duek, L. y Berdicevsky, I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses 46: 132-136.

Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B. y Felicioni, M. 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. Journal of the Science and Food Agriculture 85, 1084-1090.

Marsilio, V., d'Andria, R., Lanza, B., Russi, F., Iannucci, E., Lavini, A. y Morelli, G. 2006. Effect of irrigation and lactic acid bacteria inoculants on the phenolic fraction, fermentation and sensory characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv. Ascolana tenera) fruits. J. Sci. Food Agric. 86, 1005-1013.

Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. 2003. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 715-719.

Mazzuca, S., Spadafora, A., & Innocenti, A. M. 2006. Cell and tissue localization of β -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by *in situ* activity assay. Plant Science 171, 726-733.

McNulty, C. A. M., Wilson, M. P., Havinga, W., Johnston, B., O'Gara, E. A., Maslin, D. J. 2001. A pilot study to determine the effectiveness of garlic oil capsules in the treatment of dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*. Helicobacter 6, 249-253.

Medina, E., de Castro, A., Romero, C. y Brenes, M. 2006. Comparison of the concentration of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 54, 4954-4961.

Medina, E., Romero, C., Brenes, M. y de Castro, A. 2007a. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 70, 1194-1199.

Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & de Castro, A. 2007b. Main antimicrobials in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9817-9823.

Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M., & García, A. 2008a. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*, 110, 932-937.

Medina, E., Romero, C., Brenes, M., García, P., de Castro, A., & García, A. 2008b. Profile of anti-lactic acid bacteria compounds during storage of olives which are not treated with alkali. *European Food Research and Technology*. En prensa.

Medina, E., García, A., Romero, C., de Castro, A. y Brenes, M. 2008c. Study of the anti-lactic bacteria compounds in an array of table olive varieties: analysis and formation during olive brining. En prensa.

Medina, E., Brenes, M., García, A., Romero, C. y de Castro, A. 2008d. Antibacterial activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products. Enviado.

Miller, L. G. y Kaspar, C. W. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57, 460-464.

Mínguez, M. I., Garrido, J. y Gandul, B. 1989. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *J. Agric. Food Chem.* 37, 8-11.

Montaño, A., Sánchez, A. H. y de Castro, A. 1993. Controlled fermentation of Spanish-style green olives. *J. Food Sci.* 58, 842-852.

Montaño, A., Sánchez, A. H. y de Castro, A. 2000. Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *J. Food Sci.* 65, 1022-1027.

Montedoro, G. F. y Cantarelli, C. 1969. Indagini sulle sostanze fenoliche presenti negli oli d'oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 46, 115-124.

Montedoro, G. F., Servilli, M., Baldioli, M. y Miniati, M. 1992. Simple and hydrolyzable compound in virgin olive oil. 1. Their extraction separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1571-1576

Montedoro, G. F., Servilli, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E. y Macchioni, A. 1993. Simple and hydrolyzable compound in virgin olive oil. 3. Spectroscopy characterization of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2228-2234.

Montedoro, G. F., Baldioli, M., Selvaggi, R., Begliomini, A. L., & Taticchi, A. (2002). Relationship between phenolic composition of olive fruit and olive oil: The importance of the endogenous enzymes. *Acta Horticulturae* 586, 551-556.

Møretrø, T. y Daeschel, M. A. 2004. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *J. Food Sci.* 69, 251-257.

Nir, Y., Potasman, I., Stermer, E., Tabak, M., Neeman, I. 2000. Controlled trial on the effect of cinnamon extract on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 5, 94-97.

Nohynek, L. J., Alakomi, H., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K., Puupponen-Pimiä, R. H. 2006. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanism of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer* 54, 18-32.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. 2005. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9911-9920.

Obied, H. K., Karauso, P., Prenzler, P. D. y Robards, K. 2007. Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2848-2853.

Okabe, Y., Yamamoto, Y., Yasuda, K., Hochito, K. y Ishii, N. 2003. The antibacterial effects of coffee on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 34, 85-87.

Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66-71.

Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernández, I., Gordo, F., & Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of Galega portuguese variety. *Grasas y Aceites* 55, 219-226.

Opekun, A. R., Yeh, C. W., Opekun, J. L., Graham, D. Y. 2005. *In vivo* tests of natural therapy, Tibetan yogurt or fresh broccoli, for *Helicobacter pylori* infection. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 327-329.

Paiva-Martins, F., Gordon, M. H. y Gameiro, P. 2003. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem. Phys. Lipids* 124, 23-36.

Panagou, E. Z., Tassou, C. C. y Katasboxakis, C. Z. 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83, 667-674.

Panagou, E. Z. 2006. Greek dry-salted olives: monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 °C. *LWT-Food Sci. Technol.* 39, 322-329.

Panizzi, L., Scarpati, M. L. y Oriente, E. G. 1960. Structure of the bitter glucoside oleuropein. Note II. *Gazz. Chim. Ital.* 90, 1449-1485.

Papadopoulo, C., Soulti, K. y Roussis, I. G. 2005. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 41-46.

Park, B., Kim, J., Lee, S., Kim, K. S., Takeoka, G. R., Ahn, Y. y Kim, J. 2005. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1152-1157.

Paraskevopoulou, A., Boskou, D. y Kiosseoglou, V. 2005. Stabilization of olive oil-lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chem.* 90, 627-634.

Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentano, P. Andrade, P. B., Reabra, R., Estevinho, L. y Bento, A. 2006. Table olive from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8425-8431.

Peres, C., Catulo, L., Brito, B y Pintado, C. 2008. *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 starter added to brine as freeze-dried and as culture in the nutritive media for Spanish style green olive production. *Grasas y aceites* 59, 234-238.

Pérez, J., de la Rubia, T., Moreno, J. y Martínez, J. 1992. Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 489-495.

Perri, E., Rafaelli, A. y Sindona, G. 1999. Quantification of oleuropein in virgen olive oil by ion spray mass spectrometry-selected reaction monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4156-4160.

Pretty, I. A., Gallagher, M. J., Martin, M. V., Edgar, W.M. y Higham S. M. 2003. A study to asses the effects of a new detergent-free, olive oil formulation dentifrice in vitro and in vivo. *J. Dent.* 31, 327-332.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., y Oksman-Caldentey, K M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* 90, 494-507.

Radford, S. A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E. y Board, R. G. 1991. The influence of different oils on the death rate of *Salmonella enteritidis* in homemade mayonnaise. *Letters Appl. Microbiol.* 12, 125-128.

Ragazzi, E. y Veronese, G. 1973. Indagini sui componente fenolici degli oli di oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 50, 443-452.

Reglamento CE nº 1513/2001, Reglamento sobre la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 2001.

Rejano, L., González-Cancho, F. y Rodríguez-Borbolla, J. M. 1978. La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y aceites.* 29, 203-210.

Renis, H. E. 1970. In vitro antiviral activity of calcium elenolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 167-172.

Rhodes, P. L., Mitchell, J. W., Wilson, M. W. y Melton, L. D. 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 281-286.

Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Remesy, C., Scalbert, A., Williamson, G. 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1106-1110.

Rodríguez-Borbolla, J. M., Gómez-Herrera, C., González-Cancho, F., Fernández-Díez, M. J., Gutiérrez-González, R., Izquierdo-Tamayo, A., González-Pellisó, F., Vázquez-Ladrón, R. y Guzmán-García, R. 1956. El aderezo de aceitunas verdes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

Rodríguez-Borbolla, J. M., Fernández-Díaz, M. J. y González-Cancho, F. 1969. Influence of pasteurization and lye treatment on the fermentation of Spanish-style Manzanilla olives. *Appl. Microbiol.* 17, 734-736.

Rodríguez-Borbolla, J. M., González-Pellisó, G. y González-Cancho, F. 1971. Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera. I. *Grasas y Aceites* 22, 455-460.

Rodríguez-Borbolla, J. M. y González-Pellisó, F. 1972. Estudios sobre aceitunas envasadas estilo español. XI. La inhibición del sedimento. *Grasas y Aceites*, 23, 107-117.

Rodríguez-Borbolla, J. M. y Rejano, L. 1979. Sobre la preparación de la aceituna al estilo sevillano. La fermentación I. *Grasas y Aceites*, 30, 175-185.

Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R. y Jiménez, A. 2007. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 733-741.

Romero, C., Brenes, M., García, P., & Garrido, A. 2002a. Hydroxytyrosol 4- β -D-glucoside, and important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3835-3839.

Romero, C., García, P., Brenes, M., García, A. y Garrido, A. 2002b. Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 489-496.

Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A. y Garrido, A. 2004a. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1973-1979.

Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A. y Garrido, 2004b. A. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 52, 479-484.

Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M. y de Castro, A. 2007. In vitro activity of olive oil poliphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 680-686.

Romero, M. P., Casanovas, M., Valls, R. M., Solá, R., Girona, J., Heras, M., Gonzalez, C., Soler, A. y Motilva, M. J. 2008. XXIV Internacional Conference on Polyphenols. Salamanca.

Rovellini, P. Cortesi, N. y Fedeli, E. 1997. Análisis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 74, 273-279.

Rovellini, R. y Cortesi, N. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycon in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. It. Sostanze Grasse* 79, 1-14.

Ruggiero, P., Tombola, F., Rossi, G., Pancotto, L., Lauretti, L., del Giudice, G., Zorati, M. 2006. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2550-2552.

Ruiz-Barba, J. L. y Jiménez-Díaz, R. 1989. Actividad antibacteriana de las salmueras de aceitunas verdes sobre *Lactobacillus plantarum*. *Grasas y Aceites* 40, 102-108.

Ruiz-Barba, J. L., Rios-Sanchez, R. M., Fedriani-Iriso, C., Olías, J. M., Ríos, J. L. y Jiménez-Díaz, R. 1990. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *System. Appl. Microbiol.* 13, 199-205.

Ruiz-Barba, J.L., Brenes, M., Jimenez, R., García, P. y Garrido, A. 1993. Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *J. Appl. Bact.* 74, 15-19.

Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J. y Jiménez-Díaz, R. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2059-2064.

Ruiz-Barba, J. L. y Jiménez-Díaz, R. 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1294-1297.

Russell, A. D. Glutaraldehyde: current status and uses. 1994. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15, 724-733.

Ryan, D., Antolovich, M., Herat, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., Robards, K. 2002. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6716-6724.

Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., & Robards, K. 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea*

europaea) cultivar Hardy's Mammoth. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51, 2532-2538.

Ryu, J. y Beuchat, L. R. 1998. Influence of acid tolerance on survival growth, and thermal cross-protection on *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. Int. J. Food Microbiol. 45, 185-193.

Sabatini, N., Mucciarella, M. R. y Marsilio, V. 2008. Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. Moresca and Kalamata). LWT-Food Science and Technology, 1-6.

Sánchez, A. H., García, P. y Rejano, L. 2006. Elaboration of table olive. Grasas y Aceites 57, 86-94.

Savarese, M., de Marco, E. y Sacchi, R. 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. Food Chemistry, 105, 761-770.

Scalbert, A., Monrad, C., Manach, C., y Rémésy, C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. Biomed. Pharmacother. 56, 276-282.

Seifu, E., Buys, E. M. y Donkin, E. F. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. Trends Food Sci. Technol. 16, 137-154.

Sengun, I. Y. y Karapinar, M. 2004. Effectiveness of lemon juice, vinegar and the mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). Int. J. Food Microbiol. 96, 301-305.

Serrano, P., Yago, M.D., Mañas, M., Calpeña, R., Mataix, J. y Martínez-Victoria, E. 1997. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid

secretion and release of gastrin, somastostatin, and peptide YY in man. Dig. Dis. Sci. 42, 626-633.

Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposto, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G. F. y Corsetti, A. 2006. The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. Itrana and Lecchino), a pilot-scale application. J. Agric. Food Chem. 54, 3869-3875.

Serrano, P., Yago, M. D., Mañas, M., Calpeña, R., Mataix, J. y Martinez-Victoria, E. 1997. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin, and peptide YY in man. Dig. Dis. Sci. 42, 626-633.

Sheth, N. K., Wisniewski, T. R. y Frason, T. R. 1988. Survival of enteric pathogens in common beverages: and *in vitro* study. Am. J. Gastroenterol. 83, 658-660.

Spencer, J. P. E., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srail, S. K., Debnam, E., Rice-Evans, C. 2000. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. Biochem. Biophys. Res. Commun. 272, 236-241.

Simões, M., Pereira, M. O., Machado, I., Simões, L. C. y Vieira, M. J. 2006. Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33, 741-749.

Simões, M., Simões, L. C., Cleto, S., Machado, I., Pereira, M. O. y Vieira, M. 2007. Antimicrobial mechanisms of *ortho*-phthalaldehyde action. J. Basic Microbiol. 47, 230-242.

Simões, M., Simões, L. C., Cleto, S., Pereira, M. O. y Vieira, M. J. 2008. The effects of a biocide and a surfactant on the deachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. Int. J. Food Microbiol. 121, 335-341.

Simons, C., Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D. 2000. *Ortho*-phthalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent. *Letters Appl. Microbiol.* 31, 299-302.

Simons, A. L., Renouf, M., Hendrich, S. y Murphy, P. A. 2005. Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4258-4263.

Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S. y Skaltsa, H. 2003. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* 88, 175-179.

Stapleton, P. D., Gettert, J., Taylor, P. W. 2006. Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 276-279.

Tabak, M., Armon, R., Potasman, I. y Neeman, I. 1996. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bact.* 80, 667-672.

Taits, N. S. 1986. Use of olive oil in the treatment of ulcer patients. *Urach Delo* 7, 67-70.

Tassiopoulou, S., Akkermans, A. D. L., Williams, B. y Vaughan, E. E. 2003. Studies on the potential effects of tyrosol and *p*-coumaric acid on the human gastrointestinal tract microflora. 1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, France.

Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. 1994. Inhibition of *Salmonella* by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters in Applied Microbiology* 20, 120-124.

Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. 1995. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters Appl. Microbiol.* 20, 120-124.

Tassou, C. C., Drosinos, E. H. y Nychas, G. J. E. 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *J. Food Prot.* 59, 31-34.

Tassou, C. C., Panagou, E. Z. y Katsaboxakis, K. Z. 2002. Microbial and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiol.* 19, 605-615.

Tassou, C. C., Katsaboxakis, C. Z., Georget,, D. M. R., Parker, M. L., Waldron, K. W., Smith, A. C. y Panagou, E. Z. 2007. Effect of calcium chloride on mechanical properties and microbial characteristics of cv. *Conservolea* naturally black olives fermented at different sodium chloride levels. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 87, 1123-1131.

Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R. y Shimamura, T. 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters Appl. Microbiol.* 8, 123-125.

Tranter, H., Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 253-259.

Trombetta, D., Saija, A., Bisignano, G., Arena, S., Caruso, S., Mazzanti, G., Uccella, N. y Castelli, F. 2002. Study on the mechanisms on the antibacterial action of some plant α , β -unsaturated aldehydes. *Letters Appl. Microbiol.* 35, 285-290.

Tuck, K. y Hayball, P. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* 13, 636-644.

Vaughn, R. H., Douglas, H. C. y Gililland, J. R. 1943. Production of Spanish-type green olives. *Calif. Agr. Expt. Sta. Bull.* 678.

Vázquez, A. y Maestro, R. 1970. Los colorantes antociánicos de la aceituna madura. *Grasas y Aceites* 21, 208-214.

Vázquez, A., Graciani, E. y Maestro, R. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites* 25, 269-279.

Veldhuizen, E. J. A., Theerdsma-van.Bokhoven, J. L. M., Zweijtzer, C., Burt, S., 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1874-1879.

Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R. y Vivanco, J. M. 2004. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1077-1082.

Visioli, F. y C. Galli. 2002. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 209-221.

Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C. y Galli, C. 2005. Virgin olive oil study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* 44, 121-127.

Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R. y Katan, M. B. 2002. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* 132, 409-417.

Vissers, M. N., Zock, P. L. y Katan, M. B. 2004. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 955-965.

Weisse, M. E., Eberly, B. y Person, D. A. 1995. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *Br. Med. J.* 311, 1657-1660.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. y Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected plant phenolics. *Food Microbiol.* 20, 305-311.

Wu, F. M., Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Wells, J. G., Mintz, E. D. y Swaminathan, B. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *J. Food Prot.* 63, 568-572.

Yahiro, K., Shirasaka, D., Tagashira, M., Wada, A., Morinaga, N., Kuroda, F., Choi, O., Inoue, M., Aoyama, N., Ikeda, M., Hirayama, T., Moss, J. y Noda, M. 2005. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* 10, 231-239.

Yam, T. S., Shaj, S. y Hamilton-Miller, J. M. T. 1997. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiol. Letters* 152, 169-174.

Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. y Shimamura, T. 2003. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth *in vitro*. *Current Microbiol.* 47, 244-249.

Zanichelli, D., Baker, T. A., Clifford, M. N. y Adams, M. R. 2005. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by oleuropein is mediated by hydrogen peroxide. *J. Food Prot.* 68, 1492-1496.

Zhang, L., Ma, J., Pan, K., Go, V. L., Chen, J. y You, W. 2005. Efficacy of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: A double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Helicobacter* 10, 139-145.

7. ABREVIATURAS

Hy-G	Hidroxitirosol glicol
Hy-Ac	Hidroxitirosol acetato
Hy-EDA	Forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a hidroxitirosol
Ty-EDA	Forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico unido a tirosol
1-AcPinor	1-Acetoxipinoresinol
Pinor	Pinoresinol
Hy-EA	Aglucona de oleuropeína
Ty-EA	Aglucona del ligustrósido
Hy-1Glu	Hidroxitirosol 1-glucósido
Hy-4Glu	Hidroxitirosol 4-glucósido
Hy	Hidroxitirosol
Ty	Tirosol
Ole11Me	Oleósido 11-metil éster
EDA	Forma dialdehídica decarboximetilada de ácido elenólico
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colonias
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficacia
EM	Espectrometría de masas
RMN	Resonancia magnética nuclear
ND	No detectado
OPA	Ortoftalaldehído
GTA	Glutaraldehído
BSA	Albúmina de suero bovino
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria

