



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN
OLIVAS**

Autor: Laura Diez de la Iglesia

Tutor: Ana Isabel Olives Barba

Convocatoria: Febrero 2018

Índice

Resumen	Página 3
1. Introducción y antecedentes	Página 3
1.1. El olivo y las olivas	Página 3
1.2. Oxidantes	Página 5
1.3. Antioxidantes y su importancia	Página 5
2. Objetivos	Página 7
3. Metodología	Página 8
4. Resultados y discusión	Página 8
4.1. Obtención de la muestra	Página 8
4.2. Determinación de antioxidantes	Página 8
4.2.1. Métodos espectrofotométricos	Página 10
4.2.1.1. Método ORAC	Página 10
4.2.1.2. Método DPPH	Página 12
4.2.1.3. Método Folin-Ciocalteu	Página 13
4.2.1.4. Método CUPRAC	Página 13
4.2.1.5. Ensayo de FRAP	Página 14
4.2.2. Métodos cromatográficos.....	Página 14
4.2.2.1. GC	Página 14
4.2.2.2. LC	Página 15
4.2.2.2.1. Determinación de compuestos fenólicos	Página 15
4.2.2.2.2. Determinación de vitamina E	Página 16
4.2.2.2.3. Determinación de Escualeno	Página 17
4.2.3. Otros métodos.....	Página 17
5. Conclusiones	Página 18
6. Bibliografía	Página 19
Abreviaturas	Página 20

Resumen

La oliva es el fruto del olivo y es reconocida como una fuente de antioxidantes y de ácidos grasos saludables altamente recomendables en una dieta equilibrada para mantener la salud y prevenir y mejorar numerosas enfermedades. Los antioxidantes serán importantes tanto en aquellos organismos que los ingieran como en la protección del propio alimento y en la de otros que van a mejorar su conservación al añadirlos.

Las olivas sufren una serie de procesos para la obtención del aceite que deben controlarse para obtener la máxima calidad y garantizar su correcta conservación.

La determinación de antioxidantes en alimentos no es una tarea fácil y son necesarios experiencia y conocimientos adecuados para producir resultados que sean exactos, precisos, selectivos y válidos, por lo que es necesario conocer los métodos analíticos disponibles y los avances en investigación.

Este Trabajo Fin de Grado revisa algunos de los ensayos que determinan la capacidad antioxidante de las olivas dividiéndolos en métodos espectrofotométricos (métodos ORAC, DPPH, Folin-Ciocalteu, CUPRAC y FRAC), y cromatográficos (HPLC, GC) y otros métodos que pueden ser útiles o con perspectiva de serlo en el futuro.

Palabras clave: Olivas, determinación analítica, antioxidantes, espectrofotometría, fluorimetría, cromatografía.

1. Introducción y Antecedentes

La dieta mediterránea ha demostrado ser una forma de alimentación saludable con múltiples beneficios. Uno de sus máximos representantes son las olivas y el aceite de oliva que de ellas se extrae, apreciados tanto por sus características organolépticas como por su calidad nutricional, que previenen enfermedades por su alta cantidad de antioxidantes y ácido oleico.

1.1. El olivo y las olivas



Fig. 1. Olivo, hojas y olivas.

En la Fig. 1 se observan un olivo y detalle de las hojas y frutos (oliva).

El olivo pertenece a la familia de las Oleaceae del género *Olea*. *Olea Europaea L.* incluye las especies cultivadas y los olivos silvestres.

Es un árbol polimorfo, de dimensión y estructura variable, de fácil cultivo que se adapta muy bien a todo tipo de suelos, aunque prefiere los arenosos, profundos con drenaje, porque es sensible al exceso de humedad prolongado. Resiste bien a suelos calizos y a la salinidad.

Necesita luz y crece mejor con precipitaciones medias, aunque aguanta bien la sequía, ya que la forma y colocación de sus hojas minimiza las pérdidas de agua. Soporta temperaturas de -10°C a 40°C si tiene suficiente humedad en el suelo.

Sobre todo afectarán a la producción de olivas, los vientos secos y temperaturas elevadas durante la floración, que se produce en primavera.^{1,2,3}

La oliva es el fruto en drupa del olivo que consta de epicardio, mesocarpio y endocarpio.

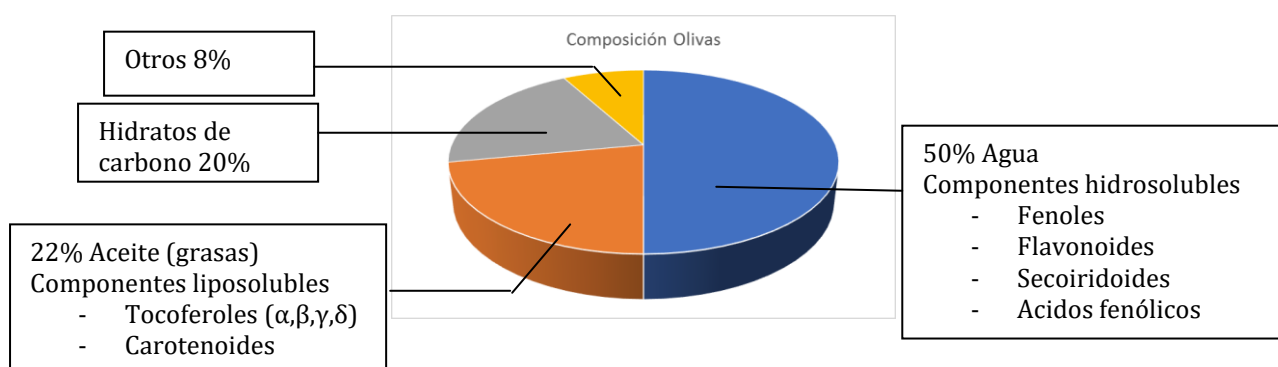


Fig. 2. Composición nutricional de la oliva.

En la Fig. 2 se representa la composición nutricional de la oliva destacando que la mitad del contenido es agua, cerca de la cuarta parte es contenido liposoluble y en la porción restante hidratos de carbono, celulosa, proteínas y minerales.

Las olivas presentan una fracción saponificable que supone casi el total del aceite (98,5%) constituida por ácidos grasos libres y triglicéridos. La composición de los ácidos grasos variará según la especie, el tipo de cultivo y el clima, siendo los más abundantes los monoinsaturados (ácido oleico 75%) que le dará una alta estabilidad al aceite y nos aportará efectos beneficiosos frente a diversas enfermedades.

La fracción insaponificable corresponde a una concentración inferior al 1,5%.^{2,3,4,5,6,7,8}

1.2. Oxidantes

Los radicales libres son especies altamente inestables con electrones desapareados en sus orbitales que toman electrones de otros radicales libres o de especies no radicalarias para estabilizarse generando a su vez nuevos radicales libres en cadena.

Se produce estrés oxidativo cuando los radicales libres superan a los antioxidantes, pudiendo producir enfermedades debido a daños en el DNA, en proteínas y lípidos.^{2, 5, 6, 8}

Hay diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS):

- Oxígeno singulete (O_2). Formado por exposición a la luz ultravioleta (UV).
- Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Producido cuando la reducción de oxígeno molecular es incompleta en la cadena respiratoria mitocondrial y éste capta un electrón. Se elimina por las superóxido dismutasas.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Formado cuando el radical superóxido capta 2 protones. Es transformado en agua por las catalasas.
- Radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Muy reactivo, ataca a las estructuras celulares en el lugar en el que se produce.
- Óxido nítrico (NO). Destruye células. También es un neurotransmisor.

1.3. Antioxidantes y su importancia

Los antioxidantes presentes en los alimentos estimulan directamente las defensas o pueden actuar sobre las especies reactivas de oxígeno. Las olivas tienen antioxidantes como: tocoferoles, escualeno, carotenoides y compuestos fenólicos (Simples: hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílicos; Flavonoides: apigenina y luteolina; Complejos: aldehídos secoiridoides, verbascósidos. En algunas se han descrito la presencia de lignanos).

En la fracción insaponificable encontraremos antioxidantes naturales como:

- Polifenoles. Los polifenoles tienen grupos fenol que pueden aceptar un electrón para formar un radical fenoxil relativamente estable, alterando así la cadena de reacciones oxidativas.

Pueden reaccionar con el radical iniciador y prevenir la reacción en cadena de oxidación, descomponer los peróxidos, secuestrar radicales libres, actuar como quelantes de iones de metales de transición (indirecto) inducir, inhibir, proteger o activar enzimas.

- Vitamina E es una vitamina liposoluble que supone el 95% de los antioxidantes presentes en la oliva y en el aceite. Está formada por tocotrienoles y tocoferoles en forma de α , β , γ y δ -tocoferol. El α -tocoferol y sus ésteres con acetato y succinato, son los utilizados en terapéutica y el más activo como vitamina. El RRR- α -tocoferol, DDD- α -tocoferol o D- α -tocoferol es el natural y que más se encuentra en los alimentos, el todo-rac-tocoferol o DL- α -tocoferol es el sintético y sólo tiene la mitad de actividad.

La vitamina E previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las proteínas ricas en radicales con azufre al comportarse como una molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres $O_2\cdot$, $O_2^{2\cdot-}$ y $OH\cdot$ debido a su grupo fenólico, inhibe la peroxidación lipídica porque evita la acumulación de hidroperóxidos al oxidarse, formando radicales hidroquinona estables y que son regenerados a vitamina E por donación de electrones de otros reductores como la vitamina C.

- Carotenoides. El β -caroteno es un hidrocarburo tetraterpénico poliinsaturado precursor de la vitamina A. Potente antioxidante que bloquea el oxígeno singlete inhibiendo la oxidación de lípidos. Los carotenoides reducen el riesgo de cáncer, previenen la degeneración macular y las cataratas. En la maduración de las olivas se pierde casi totalmente la vitamina A.
- El escualeno es el hidrocarburo triterpénico saturado mayoritario en el aceite de oliva. Potente inhibidor del oxígeno singlete, previniendo la peroxidación lipídica y, por tanto, refuerza el sistema antioxidante endógeno frente al daño oxidativo, y ha demostrado su importancia en la prevención de cáncer, efectos hipocolesteromiantes, salud ocular, etc. Junto a otros componentes previene la autooxidación.

La oliva es amarga y no se consume como aceituna de mesa sin un proceso de maduración en salmuera y para transformar la oliva en aceite de oliva se pasa por un proceso de extracción. En ambos procesos de maduración los compuestos liposolubles permanecen en la pulpa, pero los hidrosolubles pueden perderse en mayor o menor medida según el proceso utilizado. Aunque suponen una importante fuente de antioxidantes para las olivas, si buscamos obtener un mejor rendimiento de algunos antioxidantes, como hidroxitirosol u oleuropeína, es preferible extraerlos de las hojas.

Las vitaminas presentes en la oliva y algunos de sus fenoles, como el hidroxitirosol, son reconocidos como antioxidantes con actividad biológica “in vivo”, porque se encuentran presentes de forma natural en el cuerpo humano, presentan una estructura molecular y una actividad estructural que hace que se reconozcan y circulen sin presentar problemas de adaptación o acumulación. “In vitro” se ha demostrado la gran capacidad antioxidante del hidroxitirosol, muy superior a los valores de vitamina C y E y que combinado con vitamina C presenta una acción sinérgica.^{2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10}

Dependiendo de la especie de oliva y la época de recolección, la composición es variable y afectará a su sabor, color, estabilidad y oxidación y a si se consume como aceite u oliva de mesa y a su calidad alimentaria. Las olivas son una excelente fuente de vitamina E, según datos publicados en 2006 por el Instituto de la Grasa de Sevilla, está presente en 33% CDR en aceitunas verdes y un 31,75% CDR en aceitunas negras, ambos por 100g de porción comestible.⁵

Tipo de Oliva	Ácido oleico (%)	Composición antioxidantes	Estabilidad aceite (horas a 98,8°C)	Oxidación
Arbequina	40,5	Alta	40,5	No estable
Corniblanca	77,1	Alta	106,8	Muy estable
Empeltre	69,6	Alta	58,3	Estable
Hojiblanca	76,1	Baja	53,2	No estable
Picual	78,4	Muy alta	119,4	Muy estable
Picudo	63,4	Baja	37,6	No estable

Tabla 1. Composición de antioxidantes en diferentes variedades de olivas.^{2, 4, 6}

En la Tabla 1 queda reflejada la relación entre la alta concentración de ácido oleico y antioxidantes y los valores altos de estabilidad en horas a alta temperatura y estabilidad frente a la oxidación. Por ejemplo, la variedad de oliva Picual tiene una gran cantidad de antioxidantes y ácidos grasos monoinsaturados que le darán ese sabor amargo característico y que supondrá que presente una gran estabilidad, por lo que se utilizará en algunas ocasiones en combinación con otras especies de olivas sensibles a la oxidación como conservante y para variar sus características organolépticas (como arbequina, hojiblanca o picuda).

2. Objetivos

1. Revisión bibliográfica de la determinación de antioxidantes en olivas y su aceite.
2. Conocer nuevos avances en la tecnología y enfoques analíticos para superar los retos que supone la determinación de antioxidantes en alimentos.

3. Metodología

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los métodos analíticos utilizados para la determinación de antioxidantes en olivas, con especial atención tanto a los métodos más utilizados y reconocidos como a otros que están en investigación, existiendo numerosas modificaciones para cada uno.

Se han consultado artículos recogidos en bases de datos como PubMed, Google Académico, ScienceDirect, SciELO, Google Patents, Tesis Doctorales en Red y en distintas webs como FAO, Brunswick Labs.; el Instituto de la Grasa y el Consejo Oleícola Internacional; y libros en internet de la biblioteca de Farmacia UCM que se recogen en la bibliografía.

Para realizar la búsqueda se utilizaron términos relacionados con los olivos, procesos de maduración y obtención de aceite de oliva y determinación analítica de antioxidantes en alimentos.

Palabras clave utilizadas: olivo, olivas, aceitunas, obtención, composición, métodos analíticos, análisis, antioxidantes, vitaminas, olive tree, olives, chemical composition, analytical methods, antioxidants, vitamins, HPLC, GC.

Como sistema de apoyo a esta investigación se utilizó la aplicación EndNote.

4. Resultados y Discusión

4.1. Obtención de la muestra



Fig. 3. Procesos sufridos por las olivas para la obtención del aceite.

La recolección se hará a partir de septiembre cuando las olivas estén en envedo, es decir, cambiando de color, que es el momento de maduración óptima (la calidad y contenido en aceite son superiores), aunque se pueden recoger antes, más verdes, en busca de que

las olivas contengan una concentración más alta de antioxidantes. En la recolección es importante no dañar las olivas para conseguir un zumo del fruto de mejor calidad, por lo que se hace de forma manual por vareo (más respetuoso para el olivo) o por mecanizado con vibradores, que hace que las olivas recogidas estén en mejores condiciones.

Se transportan rápidamente a la almazara, donde se limpian, se lavan y se procede a la moltura lo antes posible. La forma ideal sería en el mismo día de su recolección para conservar las cualidades del producto pero a veces no es posible y se almacenan, intentando evitar fermentaciones, alteraciones enzimáticas o microbianas y oxidación.

Se retiran todos los objetos extraños (hojas, tierra, madera...) que puedan afectar a las características organolépticas y a la calidad del aceite.

En la molienda se molturan las olivas con trituradores de martillo o muelas de piedra y se obtiene una pasta de aceite y tejidos vegetales (aceite, alpechín y sólidos de los huesos y la piel).

A continuación, se procede al batido lento a una temperatura baja, menor de 30°C para conservar los aromas y que no aumente la acidez, y controlando el tiempo para facilitar la coalescencia, la disminución de la viscosidad y así una mejor separación. El único coadyuvante tecnológico admitido por la UE (Reglamento CE 1513/2001) es el silicato de magnesio hidratado o talco.

La extracción de la pasta molturada y batida se puede hacer por diferentes métodos: filtración selectiva (método Sinolea, en frío y gota a gota), extracción por presión en capachos de espato o fibra, y extracción por centrifugación de pasta en 2 ó 3 fases (esta última añadiendo agua para facilitar la separación). En España casi siempre se utiliza el sistema de 2 fases (87%).

La separación debe ser cuanto más perfecta mejor de las 3 fases: agua, aceite y materias sólidas para la obtención de aceites de calidad. Los líquidos se separan por decantación natural según densidad, centrifugación o sistemas mixtos (ambos procesos).

Los aceites han de consumirse de una campaña para otra y solo se prevén fechas de caducidad más larga en almazaras industriales con envasado y comercialización. Deben almacenarse en materiales totalmente impermeables, a temperatura casi constante (15-18°C), con mínima luminosidad y situados donde se puedan limpiar con facilidad. Los que mejor cumplen estas condiciones son los "trujales" (depósitos tradicionales subterráneos).^{2, 3, 6, 8, 9}

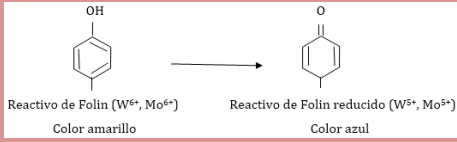
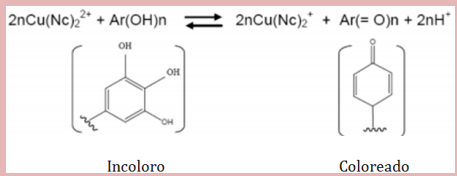
4.2. Determinación de antioxidantes

Al ser tan complejos los mecanismos de oxidación, no existe un único método que nos permita conocer el poder antioxidante. Lo más adecuado es utilizar varios métodos e interpretar los resultados para conocer el perfil antioxidante del alimento.

Para conocer mejor estos métodos vamos a diferenciarlos en: métodos espectrofotométricos y cromatográficos.

4.2.1. Métodos espectrofotométricos

Tabla 2. Métodos espectrofotométricos para la determinación de la capacidad antioxidante de olivas y aceite de oliva.

Determinación	Método	Medición	Fundamento	Ref
Capacidad antioxidante por captación de radicales libres	ORAC ORAC5 y ORAC6 (Capacidad antioxidante total)	Total ORAC Total ORAC HORAC, NORAC SORAC, SOAC y CORAC	Fluorimetría Pérdida de fluorescencia $X\bullet + AH \rightarrow XH + A\bullet$	8, 11, 12, 18
	DPPH	Radicales	Espectrofotometría abs UV-visible Pérdida de fluorescencia $DPPH\bullet + (AH)_n \rightarrow DPPH-H + (A)\bullet n$	8, 14, 18
Capacidad antioxidante reductora	Folin-Ciocalteu (Fenoles totales)	Oxidación polifenoles $-OH \rightarrow =\phi$	Espectrofotometría abs UV-visible $Mo^{6+} \rightarrow Mo^{5+}$ 	7, 8, 15, 18
	CUPRAC	Oxidación polifenoles $-OH \rightarrow \phi$	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción Cu^{2+} a Cu^+ $2nCu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightleftharpoons 2nCu(Nc)_2^+ + Ar(=O)_n + 2nH^+$ 	16, 18
	FRAP	Transferencia electrones	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ Incoloro \rightarrow coloreado	17, 18

4.2.1.1. Método ORAC. Capacidad antioxidante total^{8, 11, 12, 18}

Howard Cao desarrolló el test de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) con el que se puede conocer el valor antioxidante que presentan un alimento y el valor para cada uno de los antioxidantes por separado, expresado en μ moles equivalente Trolox por gramo.

Está basado en la habilidad del antioxidante para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. El radical peroxilo que se genera oxida a la fluoresceína produciendo productos no fluorescentes, por lo que se puede cuantificar la presencia de antioxidantes a partir de la disminución de la pérdida de fluorescencia.

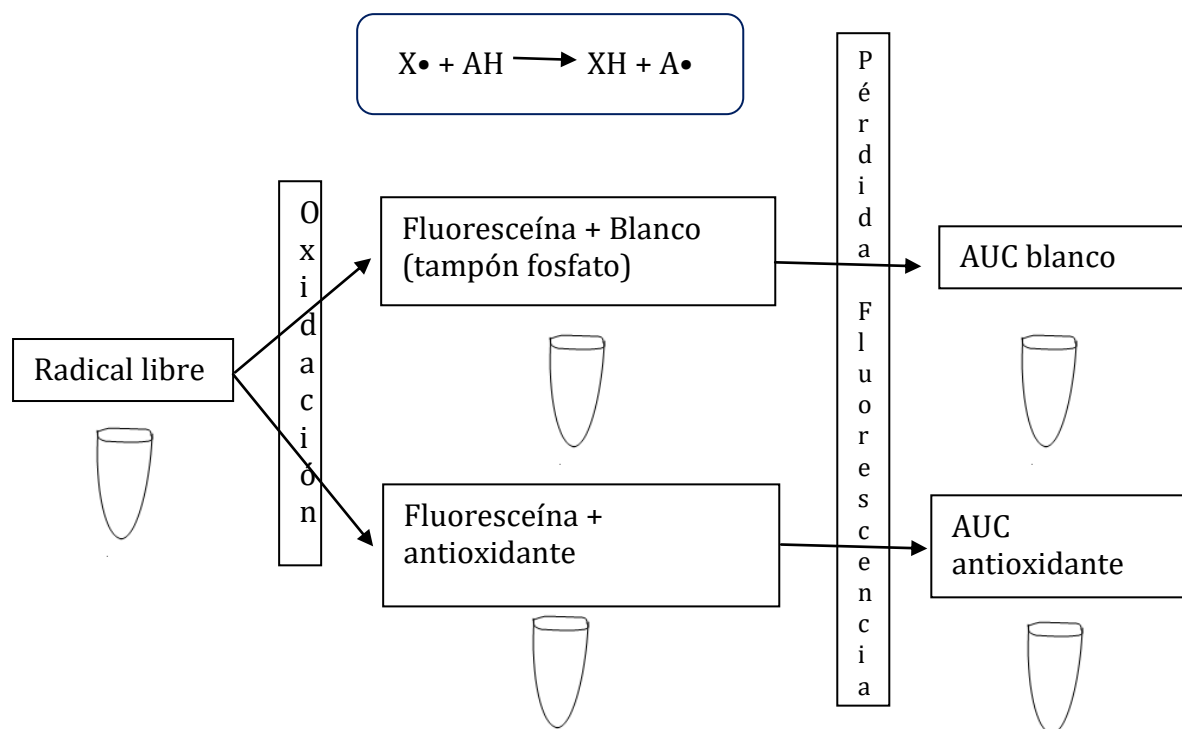


Fig. 4. Método ORAC

El valor ORAC sólo tiene en cuenta el poder antioxidante frente a los radicales peroxilo, por lo que se desarrolló el ORAC6, que mide esta capacidad frente a los 6 radicales presentes en los sistemas biológicos (Total ORAC: radicales peroxilo; HORAC: radicales hidroxilo; NORAC: radicales peroxinitrilo; SORAC: anion superóxido; SOAC: singulete de oxígeno y CORAC: hipoclorito).

El CAA (Cellular Antioxidant Assay) relaciona el valor ORAC con la biodisponibilidad y el efecto que produce en las células para aportar información de la eficacia biológica que presenta capacidad antioxidante del alimento.

No están disponibles los datos de forma pública para el ORAC6 y se ha procedido a realizar una Tabla 3 con los correspondientes al ORAC5 (Total ORAC, HORAC, NORAC, SORAC and SOAC) y CAA:

Tabla 3. Base de datos de Brunswick Labs (USA).¹² * extracto de fenoles Olivesan.

EXTRACTO	ORAC	HORAC	NORAC	SORAC	SOAC	Pureza	BDP	ORAC5 ($\mu\text{mol}/\text{TE}/\text{g}$)	Ref
Curcumina	6211	8916	906	577	66292	98%	<10%	82922	12
Resveratrol	30499	81989	1330	266	43429	98%	25%	157513	12
Exto fenoles*	20501	34354	83	20924	3917	40%	99%	79779	12, 13

La tabla 3 recoge datos del comportamiento frente a cada radical para 3 extractos: curcumina, resveratrol puro y el extracto de fenoles Olivesan*, que contiene los fenoles hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína y ácido enelólico obtenido por I+D de la empresa BIOMASLINIC S.L.¹³

- Para cada extracto hay una mayor protección frente a unos radicales que otros
- La curcumina presenta un ORAC alto pero con una baja biodisponibilidad.
- El resveratrol, con alto ORAC y mayor biodisponibilidad que la curcumina, presenta un ORAC5 muy elevado.
- En el caso del extracto de fenoles de la oliva la pureza del extracto es muy inferior a la de curcumina y resveratrol y, aunque el ORAC y la biodisponibilidad son muy altos, el valor de ORAC5 es inferior al resveratrol puro y parecido a la curcumina.

4.2.1.2. Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Determinación de la actividad antirradicalaria^{7, 8, 18}

El DPPH es un radical orgánico nitrogenado y estable de color violeta, que se pierde progresivamente en contacto con sustancias antioxidantes que pueden donar un átomo de hidrógeno u otro radical. El antioxidante dona hidrógeno u otra especie radicalaria a DPPH• y se reduce a DPPH-H, el color va haciéndose más débil y disminuye la absorbancia.

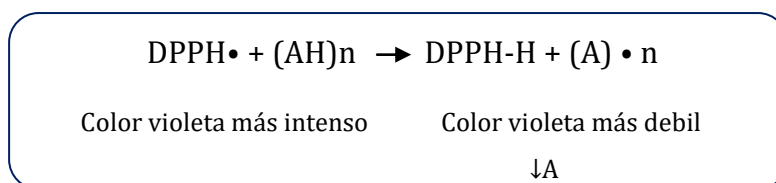


Fig. 5. Método DPPH.

4.2.1.3. Método de Folin-Ciocalteu. Determinación de fenoles totales^{7, 8, 15, 18}

Es una determinación espectrofotométrica de fenoles totales en la que el reactivo amarillo de Folin-Ciocalteu (wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico) reacciona con restos fenólicos dando color azul.

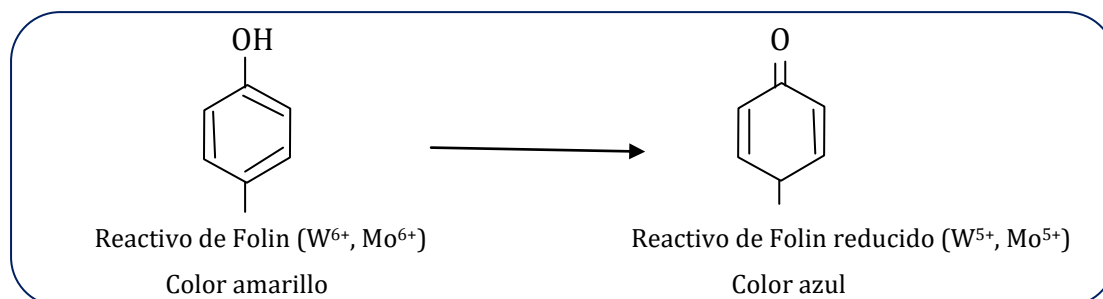


Fig. 6. Método de Folin-Ciocalteu.

Esta reacción es una medida también de la capacidad antioxidante y en muchos trabajos se ha usado como un método de determinación de capacidad antioxidante.

Se extrae mediante disolución acuosa en metanol, concentración en rotavapor y lectura espectrofotométrica y se expresa como ppm de ácido cafeico.

4.2.1.4. Método CUPRAC (Copper Reducing Antioxidant Capacity). Capacidad antioxidante^{16, 18}

Mide la capacidad antioxidante de la muestra en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ con el reactivo oxidante cromogénico neocuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantroína).

Los polifenoles (-OH) se oxidan a sus formas quinoléicas ($=\Phi$) y el Cu^{2+} es reducido a Cu^+ coloreado.

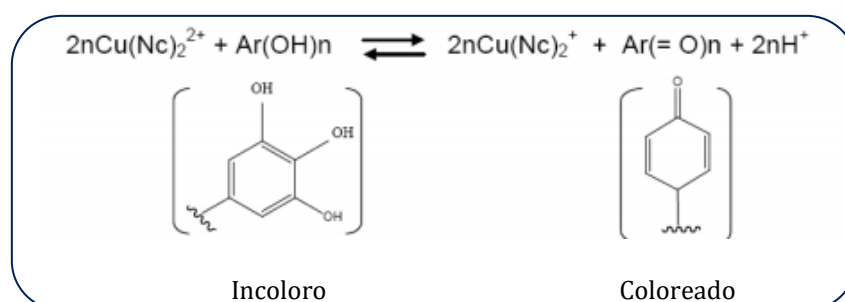


Fig 7. Reacción del método CUPRAC.¹⁸

4.2.1.5. Ensayo de FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)^{17,18}

Es un método indirecto de transferencia de electrones basado en el poder de los antioxidantes para reducir el Fe^{3+} , midiendo el Fe^{2+} resultante por espectrofotometría abs UV-visible.

Reducción $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$

Incoloro \rightarrow coloreado

> reducción \rightarrow >concentración de $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \uparrow A$

El complejo TPTZ (complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

4.2.2. Métodos cromatográficos

4.2.2.1. Cromatografía de gases (GC)

Es una técnica que permite separar los componentes por su distinta afinidad por la fase estacionaria atendiendo a sus puntos de ebullición. Se inyecta el analito que es arrastrado por la fase móvil (gaseosa) e interacciona con la fase estacionaria en la columna, eluye y entra al detector donde se produce un pico en el cromatograma cuya área se relaciona con su concentración y el t_R sirve para su identificación.

Para la determinación de la fracción insaponificable es necesario realizar previamente una saponificación y separación mediante cromatografía en columna o en TLC, en la que la fase estacionaria es una capa delgada de adsorbente finamente dividido sobre un soporte plano normalmente de aluminio, en ella se coloca una muestra con micropipeta con disolvente adecuado y va avanzando por la placa por capilaridad.

Ejemplos de determinaciones por GC en el aceite de oliva:

- Para determinar compuestos fenólicos se procede a hacerse LLE, se limpia el extracto metanólico, se destila para eliminar los disolventes, cromatografía en columna a baja presión y cuantificación mediante GC utilizando como detector FID, o bien GC-MS.
- Para el escualeno, se realiza por GC-MS.
- Los tocoferoles pueden separarse por TLC y analizarse con GC y calibración mediante patrón interno. Podría deteriorarse a alta temperatura y la HPLC es una alternativa.

Podría deteriorarse a alta temperatura y la HPLC es una alternativa.

4.2.2.2. Cromatografía líquida (LC)

En el HPLC los componentes de la muestra se distribuyen por afinidad entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria.

El desarrollo se puede realizar en fase normal o en fase inversa.

- En la NPC: Fase estacionaria polar, fase móvil no polar. Los primeros componentes en eluir serán los apolares.
- En la RP-HPLC: fase estacionaria no polar y fase móvil polar. Los compuestos apolares estarán más tiempo retenidos en la columna.

Los detectores presentan una gran sensibilidad y los más usados son los absorciométricos, aunque según las cualidades específicas de cada analito también puede utilizarse la detección fluorimétrica o bien HPLC-MS.

Ejemplos de determinaciones analíticas por HPLC en aceite de oliva:

- Compuestos fenólicos se realiza SPE y se analizan por HPLC UV-visible o HPLC-MS. También se ha utilizado LLE o SPE y HPLC UV o HPLC-MS, centrifugación y ultracentrifugación.^{7, 8, 9, 10, 19}
- Tocoferoles. Inyección del aceite disuelto en hexano y se separa con una fase móvil de n-hexano con una pequeña proporción de disolvente polar como isopropanol o dioxano.^{4, 8, 10, 19}
- Clorofilas y carotenos. Extracción de pigmentos mediante LLE o SPE, HPLC con detección UV.

En la Tabla 4 se resume los principales métodos cromatográficos utilizados.

4.2.2.2.1. Determinación de compuestos fenólicos

El método para aislar y determinar los compuestos fenólicos por el Consejo Oleícola Internacional (COI/T.20/DOC nº 29, 2009) se realiza mediante extracción LLE metanol/agua 80/20 v/v, baño de ultrasonidos, ultracentrífuga y filtrado. Se cuantifica con HPLC-UV-visible a 280nm usando como patrón interno ácido siríngico, en gradiente (FMA agua/ácido fórmico 99/1 v/v y en la FMB metanol/acetoneitrilo 1/1 v/v).¹⁰

Los flavonoides totales habitualmente se cuantifican mediante TLC, CG o HPLC-UV-visible.

Tabla 4. Métodos cromatográficos de determinación de antioxidantes en olivas y aceite de oliva.

Antioxidante	Métodos	Ensayo	Ref
Compuestos fenólicos	HPLC	- Extracción SPE con metanol - HPLC con acetonitrilo y metanol	10
	Otros métodos: TLC, GC-FID, GC-MS, HPLC UV-visible, HPLC-DAD, Centrifugación y ultracentrifugación		7, 8, 9, 10, 19
Vitamina E (α -tocoferol)	HPLC-DAD	1- Saponificación 2- HPLC-DAD - Recta de calibrado - LC fase móvil metanol y agua - Estandar interno acetato de tocoferol	8, 10, 11
	Otros métodos: TLC-GC, NPC, RPC		4, 8, 10, 19
Escualeno	GC	- Extracción con hexano - Purificación LLE - Estandarización externa con escualeno	8, 10
	Otros métodos: TLC, GC-MS, RP-HPLC (acetona:acetonitrilo 1/1), NP-HPLC (n-hexano:7 dietileter)		8, 10, 19

4.2.2.2.2. Determinación de Vitamina E (α -tocoferol)

La vitamina E es sensible a la luz y a la oxidación por lo que habrá que mantener la muestra protegida durante todo el proceso en atmósfera inerte y utilizar materiales opacos y/o topacios.

Tradicionalmente se han utilizado métodos indirectos para medir la vitamina E como la reacción de cloruro férrico (reducción a ión ferroso que en contacto con la azaMipiridina o batofenantrolina forma complejos de color rojo) o la reacción de Emmerie-Engel (saponificación y cromatografía en extractos purificados) pero está en desuso porque produce complejos inestables, requería mucho tiempo y había interferencias.

Hay un gran número de métodos GC y LC disponibles para su análisis. Puede utilizarse GC pero se prefiere utilizar HPLC, ya que la temperatura puede ser un problema y que separa simultáneamente α , β , γ y δ -tocoferol, además de permitir determinar al mismo tiempo α -tocoferol y fenoles del aceite de oliva y otros componentes. Para todos estos métodos se trabajará en condiciones anaerobias o medios inertes porque los antioxidantes son muy sensibles al oxígeno en condiciones alcalinas.

Para asegurar una buena extracción completa se repetirán varias veces cada uno de los siguientes pasos. Para la saponificación pueden realizarse métodos como poner en contacto con N₂ o con disolventes por vía húmeda en múltiples extracciones, añadiendo a la muestra un disolvente orgánico apropiado como etanol o metanol, dietiléter, éter de petróleo, tercbutil metil éter o n-hexano (una extracción habitual es con dietiléter: éter de petróleo 1:1), se lava a pH neutro con agua y un antioxidante (como BHT, ácido ascórbico, hidroquinona, etc) e hidróxido de potasio. Se evapora con un rotavapor a baja temperatura redisolviendo con la fase móvil utilizada en la separación por HPLC o un disolvente compatible con una concentración apropiada de inyección.

Se analiza por HPLC-DAD con un LC con una fase móvil de metanol y 2% de agua y patrón interno de acetato de tocoferol. Se realiza una recta de calibrado.^{8, 10, 11}

También se puede determinar tocoferoles NPC (que separa todos los tocoferoles) y en RP-HPLC (que separa β de γ-tocoferol) haciendo la detección preferentemente por fluorescencia por su selectividad y límites de detección menores que por detección absorciométrica.^{4, 8, 10, 19}

4.2.2.2.3. Determinación de Escualeno.

Es un importante bioprecursor de la ruta de los esteroides.

Antes se utilizaba cromatografía para la separación de la fracción de hidrocarburos del insaponificable y determinación por índice de yodo insaponificable. Éstos métodos han sido sustituidos por GC de la fracción de hidrocarburos extrayendo del insaponificable con hexano, limpieza con etanol:agua 1:1 v/v e inyección en el cromatógrafo. Se cuantifica mediante estandarización externa de escualeno (se compara la recta de calibrado de diferentes concentraciones de escualeno en hexano con el contenido esperado para la muestra problema, y se interpola).^{8, 10}

El método oficial de la UE usa acetona/acetonitrilo 1/1 v/v en RP HPLC (o NP HPLC con n-hexano: dietileter).

El método oficial de la UE para determinar ceras, GC con columna capilar, permite determinar simultáneamente escualeno. Se emplea una columna capilar corta de sílice con baja polaridad con patrón interno de LaurilaraquidatoC32 y se analiza con GC.^{8, 10, 19}

4.2.3. Otros

La industria utiliza de modo habitual técnicas para medir los productos secundarios de la oxidación de los fenoles totales como el método Rancimat, una variante automatizada

del método OAM (Active Oxygen Method), para evaluar la estabilidad oxidativa de los alimentos grasos forzando la oxidación de una grasa presente en el alimento o añadida como antioxidante.

Otros ejemplos de métodos para medir los productos secundarios de oxidación serían el método TBARS (ácido barbitúrico), el índice de anisidida para determinar aldehídos volátiles y la determinación por GC de los productos de oxidación.

En el futuro podrían desarrollarse nuevos estudios como la técnica “in vitro” GAR (Global Antioxidant Response) desarrollada por investigadores de la Universidad de Granada que demuestran que la cantidad de antioxidantes presentes en alimentos podría ser 10 veces superior a la analizada hasta ahora y pone de manifiesto la necesidad de plantear estudios en los que se tenga en cuenta la capacidad antioxidante de la fibra, ya que ésta es fermentada por la microbiota intestinal y pueden extraerse más antioxidantes.²⁰

5. Conclusiones

Queda mucho por investigar en cuanto a la determinación de antioxidantes en alimentos debido a las dificultades inherentes a su propia naturaleza como pueden ser la sensibilidad a la luz o la temperatura, la compleja separación de la muestra y de otros compuestos que pueden interferir en su análisis y la búsqueda de extractantes que nos permitan aprovechar los beneficios de los compuestos bioactivos de las olivas.

La determinación de los antioxidantes es compleja. Existen técnicas útiles para determinar el poder antioxidante global del alimento o de un grupo, para investigar un analito concreto o varios al mismo tiempo. A pesar de esto, lo más indicado es plantear diferentes métodos que den una visión más cercana a la realidad del alimento.

Se sigue innovando y mejorando en cuanto al desarrollo de nuevos métodos y se trabaja en mejorar los disponibles actualmente gracias a las mejoras tecnológicas.

La cantidad de antioxidantes que contienen las olivas es, proporcionalmente en cuanto a composición total del alimento, muy baja pero dentro del 1,5% de la porción insaponificable supone casi la totalidad y, debido a las importantes acciones, beneficios y utilidades de éstos hacen que el aceite sea acertadamente llamado “oro líquido” y las olivas uno de los alimentos indispensables en la saludable dieta Mediterránea. Las olivas y el aceite obtenido de ellas, son una joya antioxidante de la que nos queda mucho por conocer.

6. Bibliografía

- ¹Barranco D, et al. El cultivo del olivo. 7ª ed. Madrid: Mundi-Prensa. ProQuest Ebook Central; 2017.
- ²Olives and olive oil in health and disease prevention. 1ª ed. Preedy, V. R. Watson, R. R. (Eds). Amsterdam: Elsevier; 2010.
- ³Souilem S, et al. Olive Oil Production sector: environmental effects and sustainability challenges **En:** Olive Mill Waste. Galanakis C (Ed). Academic Press, Oxford. 2016. (1-28) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128053140>
- ⁴Schüep W. Análisis de vitaminas en alimentos. **En:** Producción y manejo de datos de composición química en alimentos en nutrición. Depósito de documentos de la FAO. Morón C, Zacarías I, de Pablo S (Eds) (Santiago de Chile): Universidad de Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos; 1997. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s00.HTM>
- ⁵Instituto de la Grasa. Disponible en: www.ig.csic.es . (Consultado 25 de noviembre de 2017).
- ⁶Consejo Oleícola Internacional. Disponible en: www.internationaloliveoil.org . (Consultado 25 de noviembre de 2017).
- ⁷Oliveras MJ. Calidad del aceite de Oliva Virgen Extra. Antioxidantes y Función biológica. (tesis doctoral en internet).(Granada): Universidad de Granada; 2005. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/15573>
- ⁸Samaniego C. Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante de aceites de oliva virgen extra. Implicación en la salud. (tesis doctoral en internet). (Granada): Universidad de Granada; 2006. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisurg/16068282.pdf>
- ⁹Galanakis C, et al. Recovery of Bioactive compounds from olive mill waste **En:** Olive Mill Waste. Galanakis C (Ed). Academic Press, Oxford. 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128053140>
- ¹⁰Olives A I, et al. Assaying Vitamins. **En:** Micronutrients in Tomato and Citation Information. Tomatoes and Tomato Products. Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties. Preedy, V. R. Watson, R. R. (Eds.) Phymouth: Science Publishers. 2008. p. 537-83.
- ¹¹Xu B, Chang SK. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. Journal of Agricultural and Food Chem, 2008. 56 (18).
- ¹²Brunswick Labs. (USA) Brunswick Laboratories Database for ORAC 6.0 (replacing ORAC 5.0) and Cellular Antioxidant Assay (CAA) Preface. 2017. (Consultado 25 de noviembre de 2017). Disponible en: <http://www.brunswicklabs.com/tech-library/orac-database-preface>

¹³Olivesan. Disponible en <http://www.olivesan.com>

¹⁴Brand-Williams W, et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and technology*. 1995, 28 (1) 25-30.

¹⁵Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American journal of enology and Viticulture*. 1965, 16 (3) 144-158.

¹⁶Apak R, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with de CUPRAC assay. *Molecules*. 2007, 12 (7), 1496-1547.

¹⁷Benzie IF, et al. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996, 239 (1): 70-6.. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660627>

¹⁸Girbés T, et al. Cuaderno de prácticas de Radicales libres y antioxidantes dieta. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid; 2010.

¹⁹Quirantes R, et al. Técnicas de análisis del aceite de oliva Disponible en: www.economiaandaluza.es

²⁰Álvarez J, et al. Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chem*; 2014; 164: 396–405. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996350>

Abreviaturas

AUC = Área bajo la curva = *Area Under the Curve*

BHT = Butilhidroxitolueno

CE = Electroforesis Capilar = *Capillary Electrophoresis*

DAD= Detección por Diodo Array = *Diodo Array Detection*

FID = Detección por Ionización en Llama = *Flame Ionization Detector*

GC = Cromatografía de Gases = *Gas Chromatography*

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Resolución = *High Performance Liquid Chromatography*

LC = Cromatografía de Líquidos = *Liquid Chromatography*

LLE = Extracción Líquido-Líquido = *Liquid-Liquid Extraction*

MS = Espectrometría de Masas = *Mass Spectrometry*

NPC = Cromatografía de fase normal = *Normal Phase Chromatography*

RV-HPLC = Cromatografía de fase reversa = *Reversed Phase Chromatography*

SPE = Extracción Líquido-Sólido = *Liquid-Solid Extraction*

TLC = Cromatografía en capa fina = *Thin Layer Chromatography*