



MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN OLIVAS

TRABAJO FIN DE GRADO. CONVOCATORIA FEBRERO 2018

Laura Diez de la Iglesia

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

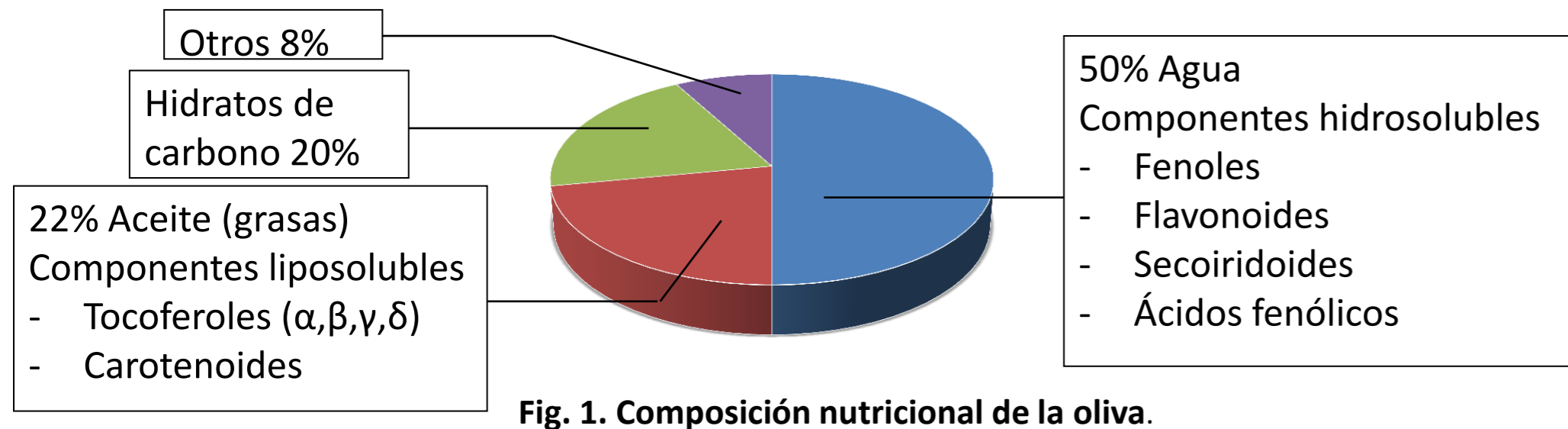


Fig. 1. Composición nutricional de la oliva.



Fig. 2. *Olea Europea L.*

Oxidantes

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Oxígeno singulete	O_2
Radical anión superóxido	$O_2^{\bullet -}$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	OH^{\bullet}
Óxido nítrico	NO

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 presentan una fracción saponificable que supone el 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. Los más abundantes son los monoinsaturados, ácido oleico en el 75%, que le dará una alta estabilidad al aceite y oliva y nos aportará efectos beneficiosos frente a diversas enfermedades. La fracción insaponificable corresponde a una concentración inferior al 1,5% donde están los antioxidantes.

Tabla 1. Composición de antioxidantes en diferentes variedades de olivas

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

Antioxidantes

Las olivas tienen antioxidantes como: **tocoferoles, escualeno, carotenoides y compuestos fenólicos** (Simples: hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico; Flavonoides: apigenina y luteolina; Complejos: aldehídos secoiridoides, verbascósidos. En algunas lignanos).

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.

METODOLOGÍA

Búsqueda bibliográfica en bases de datos: 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Determinación	Método	Medición	Fundamento
Capacidad antioxidante por captación de radicales libres	ORAC	Total ORAC	Fluorimetría Pérdida de fluorescencia $X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$
	ORAC5 y ORAC6 (Capacidad antioxidante total)	Total ORAC HORAC, NORAC SORAC, SOAC y CORAC	Fluoresceína + Blanco (tampón fosfato) → AUC blanco Fluoresceína + antioxidante → AUC antioxidante
Capacidad antioxidante reductora	DPPH	Radicales	Espectrofotometría abs UV-visible Pérdida de fluorescencia $DPPH^{\bullet} + (AH)_n \rightarrow DPPH-H + (A)_n$
	Folin-Ciocalteu (Fenoles totales)	Oxidación polifenoles $-OH \rightarrow -\phi$	Espectrofotometría abs UV-visible $Mo^{6+} \rightarrow Mo^{5+}$ Reactivo de Folin (W^{6+} , Mo^{6+}) Color amarillo Reactivo de Folin reducido (W^{5+} , Mo^{5+}) Color azul
	CUPRAC	Oxidación polifenoles $-OH \rightarrow -\phi$	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción Cu^{2+} a Cu^+ $2nCu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightleftharpoons 2nCu(Nc)_2^+ + Ar(=O)_n + 2nH^+$ Incoloro → Coloreado
	FRAP	Transferencia electrones	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ Incoloro → coloreado



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

La saponificación de los ácidos grasos permite la separación de la materia insaponificable para eliminar la interferencia de los triglicéridos. Suele utilizarse metanol para la extracción pero se está investigando en extractantes seguros, inocuos y eficaces para intentar aprovechar el potencial terapéutico. Condiciones anaerobias o medios inertes (antioxidantes sensibles en condiciones alcalinas)

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

EXTRACTO	ORAC	HORAC	NORAC	SORAC	SOAC	Pureza (%)	BDP (%)	ORAC5 (μmol/TE/g)
Curcumina	6211	8916	906	577	66292	98	<10	82922
Resveratrol	30499	81989	1330	266	43429	98	25	157513
Exto fenoles*	20501	34354	83	20924	3917	40	99	79779

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

Antioxidante	Métodos	Ensayo
Compuestos fenólicos	HPLC	- Extracción SPE con metanol - HPLC con acetonitrilo y metanol
	Otros métodos: TLC, GC-FID, GC-MS, HPLC UV-visible, HPLC-DAD, Centrifugación y ultracentrifugación	
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
	Otros métodos: TLC-GC, NPC, RPC	
Escualeno	GC	- Extracción con hexano - Purificación LLE - Estandarización externa con escualeno
	Otros métodos: TLC, GC-MS, RP-HPLC (acetona:acetonitrilo 1/1), NP-HPLC (n-hexano:7diétiler)	

Otros: como el método Rancimat, el método TBARS o el índice de anisidida. En el futuro podrían desarrollarse nuevos estudios como la técnica "in vitro" GAR

CONCLUSIONES

- Sensibilidad a la luz/temperatura y separación compleja. Búsqueda de nuevos extractantes.
- Técnicas útiles para determinar el poder antioxidante global, de un grupo, para un analito concreto o varios al mismo tiempo. Lo más indicado es plantear diferentes métodos.
- Innovación y mejoras en nuevos métodos y en los disponibles por mejoras tecnológicas.
- La cantidad de antioxidantes de las olivas es muy baja, proporcionalmente en cuanto a composición total, 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 dieta Mediterránea.
- Las olivas y el aceite son una joya antioxidante de la que nos queda mucho por conocer.

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. 1ªed. Preedy, V. R. Watson, R. R. (Eds). Amsterdam: Elsevier; 2010
- ³Instituto de la Grasa www.ig.csic.es
- ⁴Consejo Oleícola Internacional www.internationaloliveoil.org
- ⁵Oliveras MJ. Calidad del aceite de Oliva Virgen Extra. Antioxidantes y Función biológica. Universidad de Granada; 2005
- ⁶Samaniego C. Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante de aceites de oliva virgen extra. Implicación en la salud Universidad de Granada; 2006
- ⁷Brunswick Labs. (USA) Brunswick Laboratories Database for ORAC 6.0 (replacing ORAC 5.0) and Cellular Antioxidant Assay (CAA) <http://www.brunswicklabs.com/tech-library/orac-database-preface>
- ⁸Girbés T, et al. Cuaderno de prácticas de Radicales libres y antioxidantes dieta. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid; 2010
- ⁹Quirantes R, et al. Técnicas de análisis del aceite de oliva. www.economiaandaluza.es