



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES
DE OLIVA VIRGEN EXTRA.
IMPLICACIÓN EN LA SALUD.**

Memoria que presenta
Cristina Samaniego Sánchez
Para optar al grado de
Doctor en Farmacia por la
Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cristina Samaniego Sánchez
D.L.: Gr. 727 - 2005
ISBN: 84-338-3804-0

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**La Directora del Departamento, María Fátima Olea Serrano
CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de Investigación ha sido desarrollado en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la Licenciada Cristina Samaniego Sánchez. Parte del estudio ha sido realizado en el Área de Nutrición y Bromatología, Departamento de Bioquímica Bromatología, Toxicología y Medicina legal. Facultad Farmacia. Universidad de Sevilla.

Dra. M^a Fátima Olea Serrano

Granada, 2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. M^a Carmen López Martínez

Dra. H López García de la Serrana

Dr. J.J Quesada Granados

Memoria presentada por D^a Cristina Samaniego Sánchez
Aspirante al Grado de Doctor en Farmacia
Granada, 2006

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. Generalidades del aceite de Oliva	3
1.1. Origen del olivo y difusión del cultivo.	3
1.2. Características botánicas del olivo.	6
1.3. La aceituna como materia prima: estructura, composición y variedades.	7
1.4. Definición y clasificación de los aceites de oliva.	13
1.5. Proceso de obtención del aceite de oliva: del olivar a la almazara.	16
1.6. Criterios de calidad para el aceite de oliva.....	22
1.7. Composición química del aceite de oliva.....	25
1.7.1. Fracción insaponificable del aceite de oliva.	27
1.7.2. Hidrocarburos de la fracción insaponificable.	32
2. Oxidación y Antioxidantes	40
2.1. Radicales libres.....	40
2.1.1. Tipos de radicales libres.....	42
2.1.2. Reacciones de los radicales libres.....	43
2.2. Sistemas de defensa antioxidante.....	43
3. Antioxidantes presentes en el Aceite de Oliva	47
4. Medida de la Actividad Antioxidante	50
4.1. Método del ABTS ⁺	53
4.2. Método del DPPH [•]	57
4.3. Método β -Caroteno/ Ácido Linoleico.....	58
4.4. Método ORAC.....	59
II. OBJETIVOS	63
III. PARTE EXPERIMENTAL	67
1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.	67
1.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1.1.1. Determinación de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra.....	67
1.1.2.- Estudio del contenido en Ceras del aceite de oliva virgen extra.....	72
1.1.3.- Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra. Determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales.....	80
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
1.2.1 Determinación de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra.....	87
1.2.2. Estudio del contenido en Ceras del Aceite de Oliva Virgen Extra.....	89
1.2.3. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra. Determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales.....	96
2. ESTUDIO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA	103
2.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
2.1.1. Estudio del contenido en Escualeno del aceite de oliva virgen extra.....	103
2.1.2. Estudio del contenido en β -Caroteno del aceite de oliva virgen extra.....	111
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
2.2.1. Estudio del contenido en Escualeno del Aceite de Oliva Virgen Extra.....	123
2.2.2. Estudio del contenido en β -Caroteno del aceite de oliva virgen extra.....	135
3. ESTUDIO IN VITRO DE DIFERENTES MÉTODOS DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.	149

3.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	149
3.1.1. Método del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).....	157
3.1.2. Método DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil).....	162
3.1.3. Método Beta-Caroteno/Ácido linoleico.....	166
3.1.4. Método ORAC (Capacidad de absorbanca de radicales de oxígeno).....	171
3.1.5. Tratamiento Estadístico de los Resultados.....	177
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	179
3.2.1. Método del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).	179
3.2.2. Método DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil).....	186
3.2.3. Ensayo antioxidante Beta-Caroteno/Ácido Linoleico.....	192
3.2.4. Método ORAC (Capacidad de absorbanca de radicales de oxígeno).....	200
3.2.5. Estudio estadístico de los resultados de los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante.....	212
4. ESTUDIOS IN VIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	219
4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	219
4.1.1. Capacidad Antioxidante en el plasma tras la ingesta de AOVE.....	219
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	225
4.2.1. Capacidad Antioxidante en el plasma tras la ingesta de AOVE.....	225
<i>IV. CONCLUSIONES.....</i>	235
<i>V. BIBLIOGRAFIA.....</i>	239

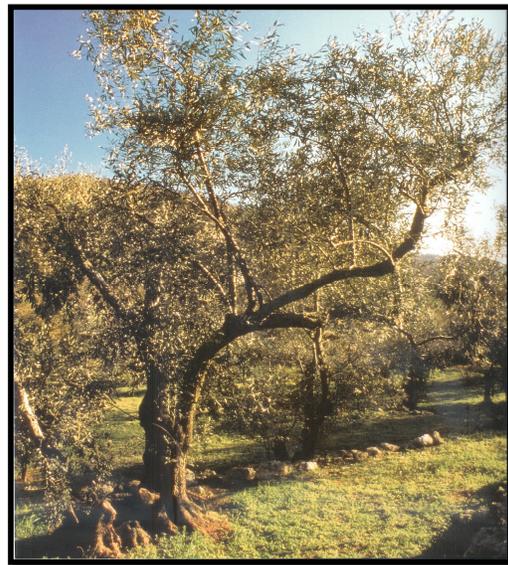
I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del aceite de Oliva.

1.1. Origen del olivo y difusión del cultivo.

El origen del cultivo se pierde en el tiempo, coincidiendo y confundándose su expansión con las civilizaciones que se han desarrollado en la cuenca del Mediterráneo. El origen del olivo cultivado se sitúa en Asia Menor hace unos seis milenios. El olivo, cuyo nombre botánico es *Olea Europea Sativa*, pertenece a la familia de las Oleáceas y al orden de los Ligustales, es una planta de hoja perenne que, según las áreas geográficas de crecimiento, presenta variedades diferentes.

El origen del cultivo del olivo es incierto. Por un lado se conoce el oleastro, matorral espinoso de frutos pequeños, poco útiles para el hombre, pero muy extendido en el ámbito mediterráneo (*Standish., 1960*). Se piensa, por otro lado, que en la edad de Cobre (4000 a.C.), en Oriente Próximo, fue seleccionada una variedad de frutos grandes y carnosos, conseguida por hibridaciones entre olivos africanos y orientales. El fruto del olivo fue, entonces, utilizado inmediatamente con fines alimenticios. El aceite, obtenido de las aceitunas con métodos aún primitivos, era utilizado con diversos objetivos: como alimento, como ungüento, como alimentación de lámparas, Sinuhé el Egipcio (1971-1178 a.C.) menciona el aceite fino en casa del hijo del rey, también conoce el uso del aceite para ungir el cuerpo contra las grietas y las quemaduras de la piel. (*Blanquez et al., 1996*)



Los olivares se citan en los libros del Antiguo Testamento, como el Deuteronomio y los de Jeremías, Oseas y Joel, ya que el aceite era muy necesario para la salud. El sentido religioso del olivo aparece en la Biblia, los reyes y sacerdotes son ungidos con aceite. Así, la Biblia cuenta que cuando Noé soltó una paloma, ésta regresó hasta su arca o navío con un ramo de oliva en el pico. Era, posiblemente, la única especie vegetal que no había sucumbido a la catástrofe del diluvio. Quizás así, el olivo se convirtió para los antiguos cristianos en representación de la paz, como hoy sucede con la figura de una paloma con un ramo de oliva en su pico.

La presencia del olivo en la mitología es de gran importancia, directamente proporcional a la utilidad de la planta. El mismo origen de Atenas es relacionado a la instalación del olivo por parte de Atenea, en lucha con Poseidón por la supremacía en la protección de la ciudad. Para calmar la contienda entre ellos, el sumo Zeus intervino, y estableció conceder el dominio de aquel territorio a quien fuera capaz de aportar el regalo más útil para la humanidad.

Poseidón llevó un caballo, animal resistente, veloz y capaz de aliviar el trabajo de los hombres; Atenea, en cambio, apareció con una pequeña ramita retorcida entre las manos, de sutiles hojuelas de color verde argénteo. Poseidón ya estaba saboreando la victoria cuando Atenea empezó a explicar las extraordinarias propiedades del olivo: una



planta fuerte, capaz de vivir largos años y de producir frutos apetitosos y sabrosos, de los que los hombres podían extraer un líquido ideal para sazonar la comida, dar fuerza al organismo, aliviar las heridas y también alumbrar la noche. La victoria de la diosa fue aplastante. Zeus decretó vencedora a Atenea, al donar a los ciudadanos la planta más útil y le fue concedida la soberanía sobre toda la región.

En muestras de tierra del Peloponeso occidental, cuyo origen se remonta al siglo XX a.C. se han identificado granos de polen fosilizados, cuya proporción va en aumento a medida que pasamos a estratos más modernos, para alcanzar su punto álgido en torno al siglo X a.C. También en los yacimientos pliocenos de Mongardino (Italia) se han encontrado hojas de olivo fósiles, lo mismo que en estratos del Paleolítico superior de Relilai (África). Entre las plantas que figuran en el inventario de las que cultivó Inena en su huerto de Tebas (unos 1500 años a.C.) se incluye el olivo, con cuyas ramas se trenzaron algunas de las coronas encontradas en los sarcófagos de ciertas momias de los faraones.

La llegada a Europa probablemente tuvo lugar de mano de los Fenicios, en tránsito por Chipre, Creta, e Islas del Mar Egeo, pasando a Grecia y más tarde a Italia. Los primeros indicios de la presencia del olivo en las costas mediterráneas españolas coinciden con el dominio romano, aunque fueron posteriormente los árabes los que impulsaron su cultivo en Andalucía, convirtiendo a España en el primer país productor de aceite de oliva a nivel mundial. Los antiguos romanos clasificaron el aceite de aceituna en cinco calidades: "oleum ex albis ulivis" procedente de la molienda de las aceitunas verdes, "oleum viride" procedente de aceitunas recogidas a el estadio más avanzado de maduración, "oleum maturum" procedente de aceitunas maduras, "oleum caducum" procedente de aceitunas caídas a tierra y "oleum cibarium" procedente de aceitunas casi podridas, que fue destinado a la alimentación de los esclavos.

El cultivo del olivo sale de la cuenca mediterránea con el descubrimiento de América, en 1492. En tiempos más modernos el olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo, cultivándose hoy en lugares tan alejados de su origen como la región sudafricana, Australia, Japón ó China (*Uceda et al., 1997*).



En los últimos años al conocerse nuevos datos nutricionales, la ciencia médica está comprobando lo que los antiguos doctores ya conocían: que el aceite de oliva es una fuente nutricional muy importante para la salud humana, así como un factor preventivo en muchas enfermedades relacionadas con la nutrición (*Kiritsakis., 1992*).

1.2. Características botánicas del olivo.

El olivo pertenece a la familia Oleaceae, que comprende 20-29 géneros principales, según el sistema de clasificación (*Morettini et al., 1972*).

El olivo es un árbol que puede tomar dimensiones y formas muy variables, es un árbol polimorfo, que requiere intensidades de luz elevadas para la diferenciación de los botones florales y el desarrollo de los brotes, por eso el fruto se localiza en su mayoría en la superficie de la copa (*Tombessi et al., 1986*).



Tiene hojas largas de una media de 5 a 8 centímetros, de forma lanceolada, verdes en la parte superior y grises plata en la parte inferior, que viven una media de unos 3 años. Las raíces tienen muchas ramificaciones superficiales que desarrollan la mayor parte de la actividad de absorción nutritiva. Se extienden horizontalmente hasta 2-3 veces la altura de la planta y penetran en el suelo, en los suelos más fértiles, hasta 1,5 ó 2 metros de profundidad. El tronco aparece gris-verde y liso hasta

aproximadamente los diez años; luego se vuelve nudoso, con surcos profundos y retorcidos y toma color oscuro, casi negro.

España cuenta con olivares repartidos por casi todo el territorio nacional lo que le lleva a la cabeza de la producción de aceitunas del mundo. La superficie de olivar de España es de 2.423.841 hectáreas repartidas por regiones, el número total de olivos es de 307.758.000.

Región	Superficie
Andalucía	1.480.162 ha
Extremadura	267.284 ha
Centro	332.463 ha
Ebro	178.803 ha
Levante	165.129 ha

Tabla 1: Datos obtenidos de la Agencia para el aceite de oliva AAO. Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación

1.3. La aceituna como materia prima: estructura, composición y variedades.

El fruto del olivo es una drupa y está formada por tres partes: la parte exterior o epicarpio o cáscara (1-2 %), la parte mediana o mesocarpio o pulpa (68-86 %) de la que se saca el 70% del aceite y la parte interna o endocarpio o avellano (20-30 %) del que se saca el restante 30%. Morfológicamente la aceituna no se diferencia de otras drupas, su composición química y sus cualidades organolépticas son muy diferentes. Es la única drupa que no es dulce (baja concentración de azúcares 2.5- 6%), sino claramente amarga, lo que impide consumirse de forma inmediata tras su recolección, es necesario someterla a procedimientos especiales.



El componente mayoritario de la aceituna es el agua (50%), que depende del contenido de aceite (22%). En su composición hay también azúcares (19%), por transformación del almidón inicial, celulosa (6%) y proteínas (1,6%). Otros compuestos como elementos minerales (1,6%), vitaminas ó compuestos fenólicos están presentes en menor proporción (*Kiritsakis et al., 1992*) Las vitaminas

liposolubles permanecen en la pulpa hasta el final de la elaboración, mientras que las hidrosolubles se pierden en mayor o menor medida, dependiendo del modo de elaboración.

Las producciones de aceitunas varían sensiblemente cada año por lo que las cifras que siguen recogen los valores correspondientes a la media de los 5 últimos años. La producción media en el mundo es de 1,3 Millones de Toneladas/año, en la UE de 469.00 Toneladas/año, y en España la producción media es de más de 300.000 Toneladas/año. Es el primer productor mundial lo que supone aproximadamente el 75% de la producción Europea y la producción media en Andalucía es de 270.000 Toneladas/año. Supone normalmente las tres cuartas partes de la producción nacional.

El aceite obtenido de su fruto, considerado como uno de los alimentos de la dieta mediterránea, es cada vez más apreciado por sus cualidades organolépticas, que lo convierten en una grasa ideal en gastronomía y que aporta unas características nutricionales muy apreciadas, tanto en la prevención de enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo como en la patología cardiovascular.

- **Procesos de maduración de la aceituna**

Alrededor de mayo o junio se da la formación de pequeñas flores blancas y verdes agrupados en forma de racimo. La polinización la facilita el viento; existen variedades auto incompatibles (que no fecundan solas) que necesitan la presencia de otra variedad que tenga una época de floración que coincida de modo bastante preciso para que pueda realizarse la polinización cruzada. También existe una variedad auto compatible cuyas flores pueden ser fecundadas por el propio polen que producen. En los primeros meses veraniegos se forman los primeros frutos verdes. De finales de septiembre en adelante, según la variedad, los frutos maduran y se transforman en las clásicas drupas de color negro morado. Los frutos de la aceituna no pueden ser consumidos tal cuál aparecen en el árbol: también las destinadas a la mesa son sometidas, después de la colección, a particulares tratos que las convierten en comestibles (salmuera). Factores como la edad del

olivo, la variedad, estado del árbol y los factores ecológicos intervienen en el desarrollo y maduración de los frutos (*Kiritsakis et al., 1992*).

- **Variedades de aceitunas.**

Existen muchos tipos y variedades de aceituna, tanto para el consumo en verde como para la producción de aceite, de entre las más conocidas destacan:

➤ **Variedad Picual:**



Constituye la variedad más extendida no solo en España, sino también en el mundo, representando el 20% del olivar mundial. Se calcula que en España alcanza el 50% siendo la zona de Andalucía en donde alcanza una mayor difusión, se cultiva fundamentalmente en las provincias de Jaén, Córdoba y Granada.

Una característica muy importante de los olivos picuales es su alta productividad. Esto ha influido en una intensificación de sus plantaciones, además el árbol se adapta perfectamente a diversas condiciones de clima y suelo siendo tolerante a las heladas. Los únicos factores perjudiciales para esta variedad son las sequías y los terrenos muy calizos.

La variedad Picual tiene un rendimiento graso elevado que puede alcanzar el 25%, un elevado índice de estabilidad (por su alto contenido en polifenoles) y un alto contenido en ácido oleico. Destacaremos también su elevada resistencia al enranciamiento gracias a la cantidad de antioxidantes de origen natural que contiene. La variedad Picual se promociona poco por el sector comercial, en parte debido al ligero sabor amargo que presenta. Pero destacar en este sentido que, precisamente, los componentes responsables del sabor amargo son también los responsables del mayor poder antioxidante y, por tanto, de su estabilidad.

Su aceite posee una gran fuerza, sabor afrutado, un amargor intenso y claros tonos picantes. Esta variedad recibe diferentes nombres según la zona de producción, pero su nombre se debe a la forma pronunciada del fruto, que termina en pico. La relación pulpa/hueso está entorno a 5.6.

Los aceites de oliva utilizados en el presente estudio, proceden de esta variedad de aceituna.

➤ **Variedad Hojiblanca:**



Es la tercera variedad olivarera en importancia en nuestro país, después de la picual y la cornicabra, con una superficie de cultivo próxima a las 220.000 ha, repartidas por las provincias de Córdoba, Málaga, Cádiz, Granada y Sevilla. También conocida con la denominación de 'lucentino', por los reflejos metalizados que tienen sus hojas al darle el sol, es una variedad apreciada por su resistencia a suelos calizos.

El nombre le viene del color del envés de la hoja que hace que el olivo presente un aspecto plateado en la lejanía. Su fruto se usa tanto para aceituna de mesa negra, como para la producción de aceite, presentan un contenido en aceite bajo, aunque de buena calidad. Es oblongo, de tamaño medio, con una relación pulpa/hueso elevada, con un rendimiento graso de esta variedad es bajo, en torno al 18%.

La composición de ácidos grasos es muy equilibrada con ácidos saturados relativamente más bajos que en los aceites de otras variedades. No tienen una gran estabilidad frente a la oxidación por lo que es recomendable mantener estos aceites protegidos de la luz y sin contacto con el aire.

Da unos aceites de color verde intenso, con aromas de frutas maduras y recuerdos de aguacate, presentado un sabor agradable con ligero amargor y picor.

➤ **Variedad Cornicabra:**



Es la segunda variedad más cultivada en lo que a número de hectáreas se refiere pero la tercera en producción. Originaria del pueblo toledano de Mora, es la gran variedad manchega (Toledo y Ciudad Real). Es larga y puntiaguda, con forma de cuerno, de ahí la procedencia de su nombre. En ciertas zonas se le conoce como Cornezuelo, Corniche y Osnal.

El árbol del que proviene es muy resistente a las sequías, heladas y fríos. El rendimiento graso se sitúa en torno al 19%. El aceite presenta una gran estabilidad debido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados.

Sus aceites son de color amarillo verdoso a oro. Aromas frescos y sabor entre dulce, amargo y algo picante.

➤ **Variedad Picuda:**

La picudo o picuda, también es conocida como carrasqueña de Córdoba ya que es muy característica de esta provincia. Se cultiva fundamentalmente en la zona norte de Granada, Málaga, Jaén y en la zona Penibética Cordobesa.

El fruto maduro es de color negro y de gran tamaño. Recibe esta denominación por el ápice apuntado y curvado de sus frutos, el rendimiento graso es del 20%. Las aceitunas picudas también se destinan para consumo de mesa.

Son aceites muy equilibrados con una gran dulzura. Por su composición en ácidos grasos, la picudo se coloca en la gama de aceites delicados ante la oxidación, por lo que se complementa con otras variedades como la picual.

➤ **Variedad Arbequina:**



Es la aceituna por excelencia de Cataluña, aunque también se encuentra en Aragón. Es originaria de la localidad de Arbeca, en la provincia de Lérida. De tamaño pequeño, concentrada y produce aceites con una gran intensidad aromática. Sus sabores varían mucho dependiendo del tipo de suelo y clima.

Procede del olivo arbequín, que da un fruto pequeño pero muy apreciado por su precoz entrada en producción. Su rendimiento graso es bueno (en torno al 21%). Esta variedad de olivo es de tamaño medio, frondoso y de buen aspecto cuando lleva el fruto.

Produce aceites frutados, entre verdosos y amarillos, con aromas a manzana y almendra fresca suave y dulce. Amargan y pican muy poco, presentando una gran suavidad. Por su composición son aceites bastante delicados frente a la oxidación, por lo que una vez envasados hay que resguardarlos de la luz y el calor.

➤ **Variedad Empeltre:**

Se cultiva en el Bajo Aragón. Procede de un tipo de olivo pequeño, pero muy fructífero, de aceituna negra azabache que es apta tanto para el consumo como aceituna de mesa como para ser triturada.

El rendimiento graso de esta variedad está en torno al 18%. De ella se obtienen aceites de color entre amarillo paja y oro viejo. Tiene aromas de frutas, sobre todo de manzana y un sabor suave y dulce que casi nunca presentan amargor ni picor.

1.4. Definición y clasificación de los aceites de oliva.

El aceite de oliva es el más antiguo lípido alimentario y ha sido uno de los componentes más importantes de la dieta mediterránea. Según el Código Alimentario Español (CAE), capítulo XVI, se dará el nombre de aceite de oliva ó simplemente aceite, al líquido oleoso extraído de los frutos maduros del olivo, sin que haya sido sometido a manipulaciones o tratamientos no autorizados.

Según el Reglamento (CE) nº 1989/2003 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/1991, los aceites se clasifican:

- **Aceite de oliva virgen**

Aceite obtenido a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos ó por otros medios físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. El aceite de oliva virgen debe tener como máximo, una acidez libre de 2 g por 100 g expresada en ácido oleico.

- **Aceite de oliva virgen extra**

Aceite de oliva virgen de características irreprochables, cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0.8 g por 100g.

- **Aceite de oliva lampante**

Aceite de oliva con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g por 100 g. Requiere proceso de refinado para poder consumirse.

- **Aceite de oliva refinado**

Aceite de oliva obtenido mediante la refinación de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g.

Es el aceite procedente de la refinación por procedimientos químicos, de aceites de oliva vírgenes de alta acidez. Estos aceites han perdido sus características organolépticas (color, olor y sabor) y sus propiedades naturales. El refinado del aceite de oliva, consta de una serie de etapas:

- Desmucilaginado para separar las impurezas hidratables, se emplea agua caliente a 60-70°C
- Desacidificación clásica con álcalis (saponificación) o por medios físicos para favorecer la eliminación de las sustancias volátiles en condiciones de temperatura y de presión residual que permita también la eliminación de los ácidos grasos libres
- Blanqueado o decoloración que elimina por adsorción o partición los productos coloreados presentes en el aceite o que proceden de fenómenos de degradación, tanto del aceite como de sus colorantes naturales. Emplea como agentes decolorantes arcillas ácidas y neutras o carbón activo.
- Desodorización para eliminar del aceite toda sustancia olorosa que lo haga desagradable al paladar. Técnicamente es una destilación en corriente de vapor al vacío.
- Winterización o desceración a temperaturas inferiores a 15°C, los aceites de oliva depositan una capa sólida formada preferentemente por glicéridos.

- **Aceite de oliva**

Aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1g por 100g.

- **Aceite de orujo de oliva crudo**

Aceite obtenido mediante tratamiento por disolvente del orujo de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. Requiere ser refinado para su consumo.

- **Aceite de orujo de oliva refinado**

Es el aceite obtenido mediante refinación del aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g de ácido oleico.

- **Aceite de orujo de oliva**

Aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen, cuya acidez libre expresada en ácido oleico no podrá ser superior a 1g por 100g.

Las características que deben cumplir los aceites según el Consejo Oleícola Internacional (Reglamento (CE) nº 1989/2003, aparecen indicadas en la Tabla 2.

Categoría	Acidez (%) ⁽¹⁾	Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg ⁽²⁾	Ceras mg/kg ⁽³⁾	Ácidos saturados en posición 2 de los triglicéridos (%)	Estigmasterol mg/kg ⁽⁴⁾	Diferencia entre ECN41 HPLC y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (°)	K ₂₃₂ (°)	Del-a-K (°)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) ⁽⁵⁾	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) ⁽⁶⁾
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	> 2,0	—	≤ 300 (°)	≤ 1,5	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (°)	—
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Aceite de oliva compuesto exclusivamente por aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	> 350 (°)	≤ 2,2	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

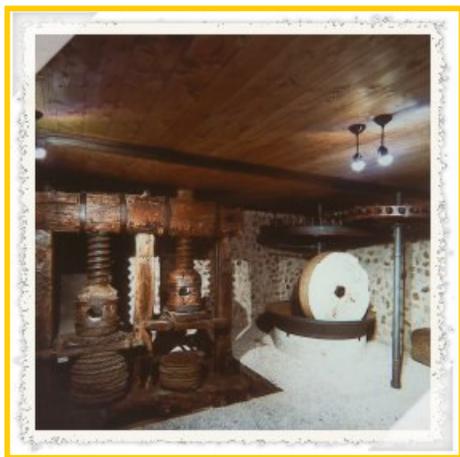
Tabla 2: Características de los aceites de oliva

1.5. Proceso de obtención del aceite de oliva: del olivar a la almazara.

El momento más apropiado para la recolección de las aceitunas destinadas a la extracción de aceite, es cuando el fruto alcanza su maduración óptima, en ese momento, el contenido en aceite y la calidad del mismo, se encuentran a su nivel más alto.

La tecnología que lleva del fruto al aceite es muy compleja y, a menudo, la buena calidad del producto depende de su correcta aplicación: recolectar la aceituna en el grado justo de maduración, transformarla en un tiempo razonable, emplear las instalaciones adecuadas y actuar en condiciones (COI., 1996).

Cuando el aceite es obtenido por sistemas de elaboración adecuados y procede de frutos frescos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones y con la adecuada madurez, posee excepcionales características de aspecto, fragancia, y sabor delicado, y es prácticamente el único de los aceites vegetales que puede consumirse crudo.



(Di Giovacchino et al., 1991).

La extracción del aceite con el método tradicional, el molino de rulos (empiedro) y el sistema de prensas, se empleó hasta los años sesenta, era poco operativo y racional, ya que las necesidades de mano de obra eran elevadas y la limpieza e higiene eran difíciles. Actualmente, la investigación e innovación tecnológica ha provocado un paso adelante, registrándose una importante transformación

- **Fases del proceso de obtención del aceite de oliva:**

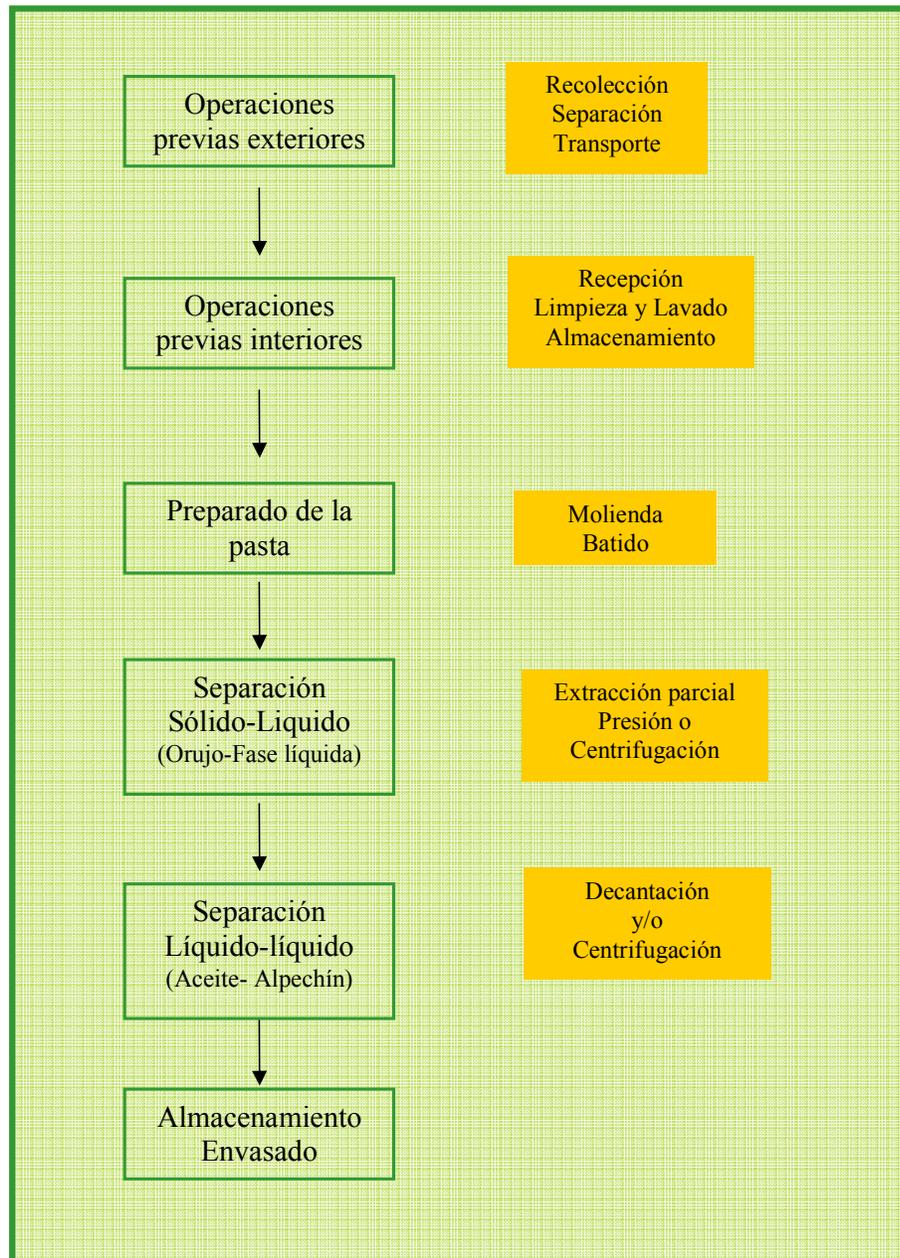


Figura 1: Diferentes fases del proceso de obtención del aceite de oliva virgen. (Lendinez., 2004)

Recolección

Para obtener un aceite de calidad, es fundamental recolectar la aceituna en el momento óptimo de maduración, cuando la mayoría está cambiando de color (envero), apenas quedan aceitunas verdes y algunas están completamente maduras. Tradicionalmente se recolectan cuando su color es verde-amarillo o negro-púrpura. Como los frutos no maduran a la misma vez, ni siquiera en el mismo árbol, la recolección se debe realizar cuando la mayoría de las aceitunas alcanzan su madurez óptima.

Los métodos de recolección han permanecido invariables durante siglos, sólo recientemente se han introducido nuevas técnicas para facilitar la recolección. El método ideal de recolección es el ordeño, a mano. Las operaciones previas que se realizan antes de llegar a la almazara son preparación del terreno, recogida de frutos caídos



de forma natural, derribo del fruto del árbol y recogida y limpieza del mismo antes de su presentación en la industria transformadora. La recogida de la aceituna puede ser manual (por vareo ó por ordeño), es el método más inocuo para el árbol y las aceitunas ó mecanizada (con vibradores).

Lo más importante es no dañar la aceituna y transportarla lo antes posible a la almazara, para que el fruto no se deteriore. Actualmente, la recolección de la aceituna se hace antes de alcanzar el punto óptimo de maduración, para elaborar aceites más verdes que presenta un mayor contenido en sustancias antioxidantes y de mejor calidad.

Molienda

La aceituna se debe molturar el mismo día de su recolección, ya que al ser un fruto con agua vegetal que fermenta y aceite que se oxida, el tiempo de almacenamiento deteriora notablemente la calidad del producto final. En las almazaras las aceitunas se limpian y se lavan, para eliminar materias extrañas, de la planta (hojas, ramitas, etc.) o de posibles tratamientos sometidos al olivo.

Se realiza con trituradores de martillo o muelas de piedra, que rompen los tejidos vegetales y liberan el aceite, formando una pasta homogénea. Se debe evitar la formación de emulsiones, que conlleva a un aumento en el tiempo de batido y en la temperatura de la pasta, provocando además un desgaste en las partes metálicas que pueden contaminar el aceite con trazas metálicas.

El producto de esta molienda se denomina pasta, la cual está compuesta por alpechín, aceite y materias sólidas procedentes del hueso y de la piel de la aceituna.

Batido

Es una etapa básica en todos los sistemas de extracción, donde se produce el fenómeno de coalescencia (formación de gotas de aceite grandes a partir de las pequeñas), lo que facilita la separación de las fases acuosa y aceitosa (*Alba., 1999*).

La temperatura de batido no debe ser muy alta ($< 30^{\circ}\text{C}$), porque se destruyen los componentes aromáticos, el color del aceite se vuelve rojizo y aumenta la acidez. Generalmente las batidoras para evitar esos defectos, están equipadas con un termostato automático.

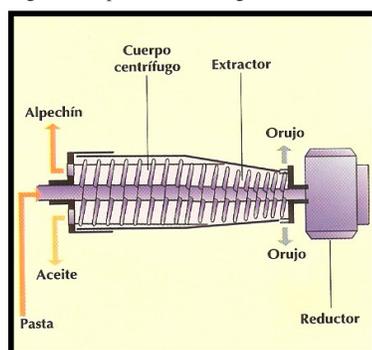
Es importante controlar durante el batido de la pasta el tiempo de duración del batido, que favorece el fenómeno de coalescencia y la temperatura del batido, que contribuye a disminuir la viscosidad de los líquidos y por tanto mejor separación en la centrífuga.

Separación del aceite de oliva

La pasta de aceituna está constituida por: aceite, trozos de hueso, agua y restos celulares de las olivas molturadas. Para favorecer la separación del aceite del resto de componentes de la pasta, se aplica presión, centrifugación o ambos sistemas.

- Extracción por presión: la pasta de aceitunas obtenida de la molturación y el batido, se coloca en capachos de esparto o fibra. Por presión, fluye el mosto oleoso constituido por una mezcla de agua de vegetación y aceite que posteriormente hay que separar (decantación o centrifugación). En la actualidad esta en desuso, ya que requiere estricta limpieza y elevada mano de obra. Los aceites obtenidos por este sistema de presión, son excelentes, por la breve duración de la fase de batido y las bajas temperaturas empleadas durante todo el ciclo.
- Extracción por centrifugación: se garantiza la automatización del proceso, disminuyendo el elevado coste de la mano de obra.

Figura 2: Separador centrífugo



Este método se basa en la diferencia de pesos entre los pesos específicos del aceite, del agua y del orujo, y se realiza en un tambor horizontal que gira a gran velocidad [Figura 2]. Este sistema de centrifugación es también denominado como continuo, dado que la inyección de la masa y la

separación de los componentes se hacen de una manera continua.

Dependiendo del número de fases que se quieran obtener encontraremos dos tipos de sistemas de obtención del aceite (Mataix, 2001).

- **Sistema continuo de tres fases**

En este sistema se introduce un poco de agua del exterior para incrementar la fase acuosa y facilitar la separación del aceite. Se consume más agua y se produce más alpechín. Tras la centrifugación obtendremos una fase oleosa (aceite con restos de agua y partículas sólidas finas), una fase acuosa o alpechín (agua, algo de aceite y alguna partícula sólida) y una fase sólida (orujo con agua y algo de aceite).

Los componentes de un sistema de tres fases son el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y las separadoras verticales de aceite y de alpechín.

Con este sistema se obtienen altas producciones de aceites de calidad. El inconveniente principal es el elevado consumo de agua (litro de agua por Kg de aceituna), que conlleva además la producción de alpechín.

- **Sistema continuo de dos fases**

Este sistema reduce drásticamente el agua de fluidificación y lavado, y consigue que el agua de vegetación quede incorporada al orujo.

Tras la centrifugación obtendremos una fase oleosa (aceite con restos de agua y partículas sólidas finas), una fase sólida con bastante humedad (orujo con más agua que el que se obtiene en el sistema continuo de tres fases y algo de aceite), que se denomina alpeorujo.

Los componentes del sistema de dos fases son el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y separadoras verticales de aceite.

Con este sistema se obtiene un aceite de oliva virgen extra de mayor calidad y se disminuye el consumo de agua potable. Sin embargo, supone un mayor gasto económico debido a que, al no adicionar agua, el rendimiento de extracción de la pasta es menor. Además, hay mayor dificultad de manipulación de los alpeorujos, debido a que tienen un alto contenido de humedad.

- Extracción parcial: es el denominado Método Sinolea, la extracción del se hace totalmente en frío y se efectúa la extracción de goteo natural “gota a gota” basándose, en su principio físico de la diversa tensión superficial entre el agua de vegetación y el aceite, posteriormente por sistema continuo se extrae el resto del aceite. Los aceites obtenidos por este sistema son de mejor calidad, al no estar en contacto con los capachos, en la extracción por presión, ni se airean en el caso de la centrifugación.

1.6. Criterios de calidad para el aceite de oliva

Se define en general la calidad de un producto, por el conjunto de características propias que permiten apreciarlo como igual, mejor o peor que los restantes de su especie.

La calidad de un aceite depende de una serie de factores ambientales (clima y suelo), genéticos (variedad), agronómicos (técnicas de cultivo) y el conjunto de operaciones desde su recolección hasta su envasado.

Los criterios básicos de calidad para la clasificación del aceite de oliva son: acidez, índice de peróxidos, absorbancia en el ultravioleta y características sensoriales (olor y sabor):

- a) *Grado de acidez:* cantidad de ácidos grasos libres, expresados en ácido oleico. La acidez es una anomalía resultante del empleo de frutos en mal estado y/o sometidos a una mala conservación.

- b) *Índice de peróxidos*: determina el estado de oxidación e indica el deterioro que pueden haber sufrido ciertos componentes de interés nutricional. Se mide en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo.
- c) *Absorbancia en el ultravioleta*: parámetro que se utiliza para detectar los componentes anormales en un aceite virgen y mide la absorbancia de un aceite a la longitud de onda de 270 nm.
- d) *Características organolépticas*: conjunto de sensaciones detectables por los sentidos: olor, sabor y color. Todas las expresiones demuestran que en el control de calidad de cualquier alimento, es imprescindible recurrir al “análisis sensorial”, en excepción del desarrollo de un método analítico-instrumental, cuyos datos son estrechamente correlacionados con los criterios de calidad. El color, el sabor y el aroma son los principales parámetros para la definición de la calidad del aceite de oliva. El análisis sensorial se realiza a través de las pruebas de panel, ensayos organolépticos llevados a cabo bajo condiciones controladas, por un grupo de catadores previamente seleccionados y entrenados, de acuerdo con técnicas sensoriales preestablecidas. Los datos de las respuestas individuales se tratan estadísticamente para conocer el error y objetivizar los resultados. La temperatura de cata del aceite de oliva es de 28°C. Es esta temperatura la que permite la volatilidad de los compuestos aromáticos en un líquido denso y graso. Según el COI se define cada uno de los términos que corresponden a los atributos sensoriales que han de ser utilizados por los catadores durante la aplicación del método:
- Atributos positivos: frutado, amargo y picante.
 - Atributos negativos: atrojado, moho-humedad, borras, avinado-avinagrado, metálico, rancio.
 - Otros atributos negativos: esparto, tierra, gusano, alpechín, pepino, cocido, basto, lubricante y helado.(COI/T.20/Doc. N° 13/Rev 1).

Algunos autores determinan el contenido en **ceras** como parámetro de calidad, para detectar la posible presencia de adulteraciones en el aceite de oliva virgen con aceites obtenidos por solventes, ya sea oliva o semilla (*Aparicio et al., 2000; Ranalli et al., 2001; Pérez-Camino et al., 2002*). Las ceras son compuestos orgánicos complejos que se encuentran en la cutícula de las aceitunas, de las hojas y demás tejidos activos del olivo.

Actúan como barrera a la pérdida de agua por evaporación y transpiración de los tejidos (*Mataix., 1999*), y el límite máximo permitido es de 250 ppm para los aceites de oliva vírgenes y de 350 ppm para el refinado. Cuando las concentraciones superan las 350 ppm se lo considera aceite de orujo de oliva y seguramente estará adulterado por el empleo de solventes en la extracción.

La interpretación de los resultados en los aceites vírgenes no es sencilla, y de forma aislada puede llevar a serios errores. Lo más correcto es que el análisis de ceras se acompañe con otras determinaciones (*COI, Junio 2002*):

- Adulteración con aceite de orujo de oliva: uvaol y eritrodiol
- Adulteración con aceite de oliva refinado: estigmastadienos e isómeros trans, K270 y Δ K.
- Adulteración grosera con aceite de semilla (girasol alto oleico, soja, etc.): perfil de esteroides, esteroides totales, ECN 42 y descartar el contenido alto de eritrodiol-uvaol (> 4.5).

El contenido en ceras también puede ser inducido por fenómenos térmicos durante el proceso de extracción del aceite o por una mala separación de los orujos, y se puede deber al empleo de altas temperaturas en el amasado o a una mala separación de los orujos en el decanter.

1.7. Composición química del aceite de oliva

Las grasas son, junto con las proteínas e hidratos de carbono, los principales componentes de los alimentos. La función principal es de fuente de energía, también desempeñan funciones como la de ser fuentes de ácidos grasos esenciales, favorecen el transporte de vitaminas liposolubles y confieren a los alimentos fritos la textura que los hace más apetecibles y les aporta buen sabor. Las grasas empleadas en la alimentación son de origen animal o vegetal; a estas últimas se les llama “aceites vegetales comestibles” y se dividen en dos grupos:

- Aceite de oliva, que se obtiene de la aceituna.
- Aceite de semillas, añadiendo el nombre de la semilla o fruto de donde procede.

Los compuestos químicos del aceite de oliva pueden integrarse en dos grupos (*Mataix et al., 1988*):

a) Fracción saponificable: representa casi la totalidad del peso del aceite (98-99 % en el total de su peso), constituida por los triglicéridos y los ácidos grasos libres. La composición en ácidos grasos del aceite de oliva varía mucho dependiendo del tipo de cultivo, condiciones climáticas y de otra serie de factores (*Vitagliano et al., 1960; Amelloti et al., 1973; Kiritsakis et al., 1992; Fedeli et al., 1993*). Los glicéridos se encuentran en mayor proporción en esta fracción y son los que determinan las principales características físicas del aceite.

Entre los ácidos grasos más abundantes se encuentra el ácido monoinsaturado (AGMI) oleico (70-75 %) (*Rossell et al., 2001*) y en menor proporción los ácidos poliinsaturados (AGPI) linoleico (12 %) (*Tiscomia et al., 1998; Visioli et al., 1998*) y linolénico. El ácido oleico presenta dos efectos importantes: desde el punto de vista de su estabilidad, los aceites con mayor contenido en ácido oleico son más estables, y desde el punto de vista

nutricional, está demostrado que el aceite de oliva rico en ácido oleico presenta efecto beneficioso frente a diversas enfermedades (*Fito et al., 2000; Owen 2000a; Covas et al., 2001; Galli et al., 2001; Visioli et al., 1998; 2000; 2000 a; 2001; 2002; 2002a; 2004; 2005; 2005a; Rastrelli et al., 2002; Carluccio et al; 2003; Lambert et al., 2005; Perona et al., 2005*). Un número creciente de estudios apuntan al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la dieta mediterránea, de manera que, sus efectos beneficiosos sobre la salud pueden atribuirse tanto a su alto contenido en ácido oleico como a la presencia de antioxidantes (*Fito, 2003*). Estudios recientes sobre prevención de algunas enfermedades parecen confirmar que existen sustancias efectivamente “cardioprotectoras” en la alimentación mediterránea, de las cuales las más relevantes son las antioxidantes, con una substancial presencia en el Aceite de Oliva Virgen Extra.

Una dieta rica en AGMI reducen significativamente los niveles de LDL, incluso en algunos estudios se ha incrementado levemente el colesterol HDL (*Gimeno et al., 2002a*), de modo similar al efecto de una dieta enriquecida en AGPI.

El consumo de aceite de oliva aumenta la ingestión de AGMI, sin elevación significativa de las AGS y asegura un consumo apropiado de AGPI esenciales, mejorando el perfil lipídico asociado a patologías relacionadas con el daño oxidativo (*Galli et al., 1999*), como la enfermedad cardiovascular y la diabetes. Además, existen evidencias científicas de un efecto hipotensivo tras seguir una dieta enriquecida con AGMI, aunque se precisan más estudios para conocer si estos resultados son fruto de un nutriente en particular ó sería más exacto hablar del bajo aporte de AGS junto con el alto nivel de polifenoles del aceite de oliva virgen ó simplemente de un efecto global de la dieta mediterránea (*Fito, 2003*).

Los ácidos grasos saturados se encuentran en cantidades semejantes o menores a las de otros aceites vegetales.

b) Fracción insaponificable: en el aceite de oliva, los componentes insaponificables representan el 0.5- 1.5 % del total, en otros aceites como el de orujo, esta fracción es de alrededor del 2.5 %.

1.7.1. Fracción insaponificable del aceite de oliva.

Se denomina insaponificable al conjunto de constituyentes de los aceites que no reaccionan con la sosa o potasa para dar jabones, y que tras la saponificación continúan siendo solubles en los disolventes clásicos de la grasas (hexano, éter, etc.).

Esta fracción esta constituida por un conjunto de componentes menores, de naturaleza glicerídica y no glicerídica, estos últimos aparecen a veces, en función de su estructura, esterificados con los ácidos grasos que forman el aceite (*Mariani et al., 1993*). En total, representa un porcentaje inferior al 1.5 %, aunque posee una gran importancia desde el punto de vista de su valor biológico.

Martínez de Vitoria y col., señalan que el contenido de los distintos componentes de esta fracción puede modificarse por pérdidas tras los tratamientos a los que puede someterse el aceite antes de su comercialización, como ocurre en los procesos de refinado (*Martínez et al., 1999*) y almacenamiento (*Manzi et al., 1998*). Esta fracción se usa en el estudio de las características y genuidad de un aceite o grasa, debido a su variada composición (*Boskou., 1998; Aparicio et al., 2003*).

Los principales grupos de sustancias que componen la fracción insaponificable son los siguientes:



- a) Hidrocarburos: el insaponificable de los aceites de oliva comprende una fracción importante de hidrocarburos. El más abundante en el aceite de oliva es el escualeno, hidrocarburo triterpénico saturado con seis dobles enlaces conjugados. Intermediario de la biosíntesis de esteroides, constituye hasta el 90 % de los hidrocarburos en el aceite de oliva virgen, mientras que en los refinados su concentración se reduce drásticamente. Otro compuesto presente es el β -caroteno, precursor bioquímico de la vitamina A, dotado de acción antioxidante. En esta fracción se han identificado también, algunos hidrocarburos aromáticos como fenantreno, antraceno y pireno a niveles traza (*Tiscornia et al., 1982; Jiménez et al 2001*).
- b) Esteroides: estos adquieren una importancia analítica especial, dada la peculiaridad específica de su presencia en el aceite de oliva. La diferencia entre los diversos esteroides radica en el número y posición de los dobles enlaces y en la naturaleza de la cadena lateral. El aceite de oliva posee pequeñas cantidades de diversos esteroides, el más abundante es el β -sitosterol (70-90 %), con un mecanismo competitivo en la absorción intestinal del colesterol (*Viola, 1997*), su contenido es indicativo del grado de maduración de la aceituna. El contenido total en esteroles del aceite de oliva es del orden de 180-265 mg/100g, y puede descender por oxidación durante la elaboración y el almacenamiento (*Leone et al., 1976*), y de 100-300 mg/100g de aceite (*Ryan et al., 1998*). La composición de esteroides de los aceites de oliva ha sido ampliamente estudiada (*Boskou et al., 1975; 2003; Fideli, 1977; Itoh et al., 1981; Kiritsakis, 1992*), se emplean en la actualidad para su determinación analítica, métodos combinados de cromatografía líquida, gaseosa y de espectrometría de masas. En el caso de aceites de oliva la composición de esteroides se utiliza para detectar mezclas fraudulentas con otros aceites y grasas (*Boskou., 2003*).
- c) Pigmentos: el aceite de oliva tiene un color verde-amarillo, que depende de la variedad y del estado de madurez del fruto. Contiene, carotenoides, clorofila a y b (verdes) y feofitinas a y b (marrones), responsables del especial color del aceite de oliva. El aceite de oliva recién molido, tiene clorofilas a y b con

una concentración de 1 a 10 ppm, y feofitinas a y b de 0.2 a 24 ppm (*Kiritsakis, 1992*). Las clorofilas se degradan con facilidad a feofitinas, y el contenido clorofilico del aceite disminuye según progresa el proceso de maduración de los frutos. La composición en pigmentos del aceite de oliva ha sido ampliamente estudiada por Mínguez- Mosquera y col (*Mínguez- Mosquera et al., 1985; 1986 a; 1986b; 1987; 1988; 1989a; 1989b; 1990a; 1990b*). Vázquez y col. observaron que el aceite de oliva es muy sensible a una radiación de 320- 700 nm. Esta sensibilidad es debida a la presencia de clorofilas que absorben la luz en ese espectro (*Vázquez., 1980*). Kiritsakis informó que los aceites de oliva que contienen pigmentos verdes, deben ser protegidos de la luz durante su almacenamiento, para minimizar los efectos de la oxidación (*Kiritsakis., 1992*). Los aceites refinados presentan una disminución en el contenido pigmentario, debido a fenómenos de adsorción en la etapa de decoloración y probablemente a degradación de los pigmentos a lo largo del proceso.

- d) Alcoholes triterpénicos: se encuentran en mayor cantidad en la cutícula de los vegetales, en una concentración de 100-300 mg/g. Su determinación constituye una prueba para el reconocimiento de aceite de orujo en aceite de oliva.
- e) Tocoferoles: son unos constituyentes importantes, contribuyen a dar estabilidad al aceite de oliva y tienen un papel biológico beneficioso como antioxidante. Representados en más de un 90 % por la forma alfa, que es la más activa biológicamente. Importante fuente vitamínica alimentaria y elemento estabilizador frente a la oxidación. Presentan elevada inestabilidad frente a tratamientos térmicos y en el proceso de refinado desaparecen completamente, de ahí la baja protección del aceite refinado comparado con el aceite de oliva virgen (*Boskou, 1998; Jiménez et al., 2001*). Su concentración en los aceites es mayor en aceitunas recolectadas al principio de la campaña y su contenido queda marcadamente disminuido en aceites de oliva que han sido refinados.
- f) Sustancias volátiles: el aceite tiene un aroma peculiar que se deriva de la presencia de un alto número de sustancias que en conjunto representan 250-500

ppm (*Mataix., 2001*), y son las responsables de su fragancia y sabor característico. Son compuestos volátiles de distinta naturaleza (hidrocarburos, alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos de cadena corta, etc.)(*COI., 1996*) que se determinan fácilmente (*Vichi et al 2005*)

La Tabla 2 (*Mataix., 2001*) recoge los componentes minoritarios de a fracción insaponificable del aceite de oliva virgen:

Componentes	Conc. (mg/Kg)
Alcoholes triterpénicos	3500
Esteroles	2500
Hidrocarburos	2000
Escualeno	1500
Comp.Fenólicos	350
β-caroteno	300
Alcoholes alifáticos	200
Tocoferoles	150
Ésteres	100
Aldehídos y cetonas	40

Tabla 2: Fracción insaponificable del aceite de oliva virgen.

Aunque la determinación de la materia insaponificable parece sencilla es uno de los métodos empleados en el análisis de grasas y aceites que más problemas puede presentar, debido fundamentalmente a la carencia de exactitud y precisión de los resultados. Esto ha llevado a desarrollar nuevas propuestas y a modificaciones de la técnica establecida (*Karleskind et al., 1996*). Las dificultades específicas encontradas son generalmente:

- Imposibilidad de extraer toda la materia insaponificable.
- Formación de emulsiones que son difíciles de romper.
- Hidrólisis de jabones.
- Pérdida de algo de insaponificable durante la evaporación y secado del disolvente.
- Saponificación incompleta.

En primer lugar se lleva a cabo la saponificación del aceite y la separación de la materia insaponificable mediante la extracción con un disolvente apropiado, como el éter etílico o de petróleo. Los métodos más satisfactorios se basan en la extracción por vía húmeda, es decir, extracción de la materia insaponificable de una disolución acuosa o alcohólica del jabón.

En el método de petróleo empleado por nosotros, la imposibilidad de extraer todo el insaponificable se produce con más facilidad, ya que la velocidad de extracción es más lenta que con el éter etílico, aunque este presenta el inconveniente de la formación de emulsiones, que no son fácilmente separable.

La mayor parte de los métodos para determinar la materia insaponificable especifican que deben realizarse de tres a siete extracciones, aunque estas también pueden resultar insuficientes. Este problema puede descubrirse evaporando el disolvente de la extracción final y determinando el residuo gravimétricamente, la cantidad de materia insaponificable obtenida en la extracción final debería no debería exceder de un miligramo (*Aparicio et al., 2003*). Es necesario secar correctamente el residuo insaponificable para asegurar la eliminación de las últimas trazas de disolvente y agua que puedan estar presentes. Dada la posible presencia de sustancias volátiles en el insaponificable, deben tomarse precauciones que eviten unas condiciones extremas de secado. En algunos casos, se trata el extracto con sulfato sódico anhidro para favorecer la eliminación de agua y se filtra posteriormente, y por último, las trazas de humedad que puedan quedar se eliminan secando a vacío con acetona o benceno.

Una saponificación incompleta puede conducir a resultados erróneos, ya que la parte saponificable de triacilgliceroles es soluble en éter y hexano. Cuando se sospecha una saponificación incompleta, se resaponifica el residuo insaponificable que contiene la parte no saponificada y se realiza la extracción de nuevo.

1.7.2. Hidrocarburos de la fracción insaponificable.

Los hidrocarburos están constituidos por los componentes menos polares de la fracción insaponificable de los aceites vegetales. La presencia de estos compuestos se remonta a la década de los cuarenta, cuando Jasperson y col. descubrieron en varios aceites vegetales gran cantidad de hidrocarburos terpénicos y n-alcanos en menor proporción (*Jasperson et al., 1947*). En el mismo periodo se demuestra que la fracción de hidrocarburos está constituida principalmente por escualeno y trazas de n-alcanos (*Ryohei et al., 1951*).

Estudios posteriores demuestran, que en aceites vegetales crudos la fracción hidrocarbonada está constituida por alcanos, carotenos, hidrocarburos aromáticos, terpenos, escualeno e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos aceites presentan diferencias cuantitativas y cualitativas en la fracción hidrocarbonada, lo que permite diferenciarlos unos de otros.

Los hidrocarburos son intermediarios de las estructuras lipídicas en aceites vegetales. En el aceite de oliva existen pequeñas cantidades de hidrocarburos saturados lineales (C-15 a C-35), ramificados, terpénicos e incluso aromáticos. Constituyen aproximadamente el 32-50 % del material insaponificable, lo que se traduce en concentraciones de 150-800 mg/100g.

El más abundante e importante en el aceite de oliva es el escualeno, presente en todos los aceites y grasas vegetales, seguido del β -caroteno que se encuentra en menor proporción. Otros hidrocarburos presentes en el aceite de oliva son las parafinas con un número impar de átomos de carbono (C11 a C30), hidrocarburos de cadena ramificada, iso- o anteiso, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno, pireno, fluorantreno, etc.). Un trabajo publicado en 1978, demostró que la fracción hidrocarbonada del aceite de oliva está compuesta de n-parafinas, poliolefinas, escualeno e hidrocarburos diterpenos y tripterpeno (*Bastic et al., 1978*).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentran en concentraciones muy bajas, que pueden variar desde cantidades sub-ppb hasta 700 ppb (*Aparicio et al., 2003*), en general estos compuestos están considerados como constituyentes de la fracción hidrocarbonada, pero en general son más productos de la contaminación. Se han determinado hasta 14 hidratos de carbono aromáticos policíclicos en el aceite de oliva (*Kiritsakis., 2002*).

Existen compuestos del grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos que están presentes de forma natural en los aceites, no obstante, existen determinados compuestos del grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), de toxicidad bien documentada, que no deben estar presentes como consecuencia de una contaminación externa, resultante de aplicar determinadas tecnologías en la extracción de los aceites (*Barranco et al., 2004; Moreda et al., 2004*). Por tanto, esos hidrocarburos aromáticos policíclicos, no atribuibles de forma natural a los aceites, no deben encontrarse presentes en los mismos, por lo que deberán establecerse las prácticas adecuadas que reduzcan su contenido lo máximo posible. Moreda y col. desarrollaron un método analítico simple para cuantificar estos (HAPs) en aceites, fácilmente aplicable en la industrias y organismo oficiales para controlar los niveles de estos hidrocarburos en los aceites vegetales (*Moreda et al., 2004*).

Algunos hidrocarburos nos e encuentran de forma natural en el aceite de oliva aunque aparecen en los procesos de refinación por deshidratación de los esteroides. Estos hidrocarburos se analizan por técnicas similares a las descritas posteriormente para el escualeno, que permiten determinar la autenticidad del aceite de oliva virgen.

En general, la fracción de hidrocarburos en los aceites de oliva vírgenes se modifica durante el proceso de refinado, generando nuevos productos o favoreciendo la pérdida de otros componentes existentes de forma natural. La presencia de los productos de degradación generados en el refinado, es la base en la que se fundamenta los métodos oficiales de análisis para diferenciar entre aceites refinados y crudos (*Moreda et al., 2001*)

De todos los compuestos que constituyen esta fracción, el escualeno es el que se encuentra en mayor proporción tanto en aceites de oliva vírgenes como aceites refinados (*Lanzón et al., 1994*)

➤ ESCUALENO

Denominado así por estar presente en el aceite de hígado de tiburón (*Squalus* spp.) y ser la fuente más rica de escualeno (*Gershbein et al., 1969*). Sin embargo, está ampliamente distribuido en la naturaleza, con alta proporción en el aceite de oliva comparado con otros aceites vegetales

Hidrocarburo mayoritario en el aceite de oliva, (2,6,10,15,19,23-hexametil 2,6,10,14,18,20-tetracosahexaeno) hidrocarburo triterpénico saturado con seis dobles enlaces [Figura 3], que puede constituir hasta el 90 % de esta fracción en el aceite de oliva, lo que equivale a concentraciones de 125-750 mg/ 100g de aceite (*Mataix et al., 2002; Aguilera 2005*).

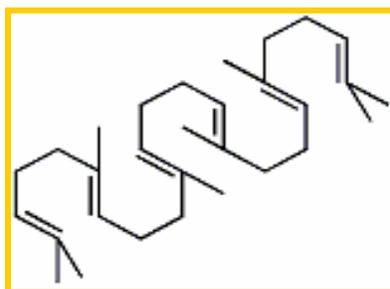


Figura 3. Estructura química del escualeno

Debido al grado de insaturación que presenta, las primeras determinaciones estaban basadas en la medida del índice de yodo del insaponificable (*Mehlenbacher, 1960*). Se pensaba que el único compuesto insaturado del insaponificable era el escualeno, cosa que no es cierta ya que compuestos como los esteroides absorben igualmente yodo. En 1943, se describió un procedimiento cromatográfico para la separación de la fracción de hidrocarburos del insaponificable, con determinación posterior del índice de yodo de esta

fracción (*Fitelson, 1943*), la actividad equivalente de escualeno se obtenía por cálculos estequiométricos. Este método ha sido ampliamente usado como método oficial de análisis para la determinación del escualeno en aceites vegetales. El insaponificable separado, se extrae con hexano y se pasa por columna de alúmina, empleando benceno o hexano como solvente de elución, la fracción que se obtiene en primer lugar corresponde a la fracción de hidrocarburos. Tras eliminar el disolvente, se determina el índice de yodo de esta fracción.

Esta técnica se ha sustituido por la cromatografía gaseosa de la fracción de hidrocarburos aislada del insaponificable, y cuantificación mediante el uso de patrones internos (*Lanzón et al., 1995; Giacometti et al., 2001; Rastrelli et al 2002*). Una técnica se basa en la metilación alcalina en frío y posterior extracción de los ésteres metílicos con hexano, junto con la mayor parte del insaponificable. Este procedimiento presenta el inconveniente del posible solapamiento de otros hidrocarburos saturados C28 con el pico del escualeno, que se puede evitar usando columnas capilares con mayor poder de resolución, pero poco adecuadas para la cuantificación por presentar baja capacidad de carga. El método oficial de la UE para la determinación de ceras, permite simultáneamente la determinación de escualeno y ceras, empleando una columna capilar corta con baja polaridad si se emplea patrón interno (*EEC/183/93*).

Otro procedimiento adecuado para la cuantificación del escualeno, consiste en el aislamiento de la fracción de hidrocarburos mediante cromatografía en capa fina, y posterior estudio con cromatografía en fase gaseosa (*Lanzón, 1990; Bondioli et al., 1993*).

En aceites con alto contenido en escualeno, como el aceite de oliva, aceites de pescado o hígado de escualo, se pueden emplear técnicas rápidas y precisas. Se puede preparar una disolución de aceite en hexano, adicionar el patrón y eluir en una columna de gel de sílice con mezclas de hexano: éter etílico. El eluido se concentra y se analiza por cromatografía gaseosa. El tiempo de análisis cromatográfico no supera los 10 minutos (*León-Camacho et al., 1996*). Se puede determinar también, adicionando previamente un patrón en el extracto eluido, y se emplean iguales condiciones en la cromatografía gaseosa.

Recientemente para la determinación de escualeno en aceites vegetales se han descrito técnicas más modernas y mejoradas que sustituyen a las descritas anteriormente. La mayoría emplean la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa o fase normal (*Manzi et al., 1998; Nenadis et al., 2002; Psomiadou et al., 2002; Lu et al., 2004*).

En general, una mayor o menor concentración de escualeno en aceites de oliva, depende del tipo de cultivo (*De Leonardis et al., 1998; Manzi et al., 1998*), de la tecnología empleada en el proceso de extracción del aceite (*Nergiz et al., 1990; Psomiadou et al., 1999*) y de si es sometido al proceso de refinado, que produce un descenso importante en su concentración (*Lanzón et al., 1994*).

Efecto del escualeno en la salud humana

El escualeno es un componente mayoritario de los lípidos de la piel en los humanos (*Liu et al., 1976*) y en los tejidos adiposos (*Aguilera et al 2005*).

El escualeno es un metabolito de la síntesis del colesterol, en el hombre una cantidad elevada de este componente minoritario se absorbe y se convierte en colesterol. Así pues, teóricamente, el escualeno de la dieta puede transformarse en colesterol en el organismo e incrementar los niveles séricos de colesterol, sin embargo este incremento en la síntesis, no está asociado a un aumento en los niveles séricos, posiblemente debido a su vez a una mayor eliminación fecal (*Strandberg et al., 1990; Assmann et al., 2002; Ostlund et al., 2002*). La ingesta exógena de escualeno estimula la actividad de la enzima ACAT (acil CoA colesterol aciltransferasa) pero su efecto hipocolesterolemizante se debe por inhibición de la enzima HMG- CoA reductasa (*Strandberg et al., 1989; Moreno. 2003*).

Para que sucediera tal efecto, la absorción debería ser en cantidades considerables, y la mayoría de los trabajos publicados, apuntan que se absorbe del 60 al 80 % del escualeno alimentario a partir de una dosis oral (*Nelly et al., 1999; Smith et al., 2000*).

Diversos estudios epidemiológicos revelan que el aceite de oliva ingerido en la dieta ejerce un efecto protector contra el cáncer (*Kelly, 1999; Assmann et al., 2002; Owen et al., 2000; 2000b; 2004; Hashim et al., 2005*), Newmark sugirió que dicho efecto podría atribuirse a la elevada cantidad de escualeno que contienen el aceite de oliva virgen extra, presunción avalada por una intensa investigación experimental realizada en animales (*Newmark, 1999*). Muchos estudios han investigado el efecto del escualeno aplicado por vía tópica o administrado por vía sistémica, en las neoplasias malignas, inducidas químicamente, tanto de piel como de colon y pulmón de ratones. En conclusión, el escualeno ingerido en la dieta posee unos efectos anticarcinogénicos manifiestos (*Rao et al., 1998; Smith et al. 1998; Moreno, 2003; Hashim et al., 2005*).

El escualeno es también un potente inhibidor del oxígeno singlete, previniendo la correspondiente peroxidación lipídica en la superficie cutánea humana (*Kohno et al., 1995; Rastrelli et al., 2002*), en estudios in vitro parece ser que el escualeno, desempeña un papel importante en la salud ocular, especialmente en las células fotorreceptoras del bastón retiniano (*Fliesler et al., 1997; Aguilera et al., 2005*) y existe una mayor excreción de toxinas cuando han ingerido dosis muy altas de escualeno.

Es un antioxidante natural en la fracción insaponificable de los aceites de oliva vírgenes, y administrado de forma exógena en el organismo refuerza el sistema antioxidante endógeno frente al daño oxidativo (*Manzi et al., 1998; Mateos et al., 2003*) y junto a otros componentes de la fracción insaponificable, previene la autooxidación del aceite, contribuyendo a su estabilidad y características de aroma y sabor.

➤ β - CAROTENO

En el aceite de oliva virgen se han identificado clorofilas y carotenoides. La fracción clorofílica está formada por clorofila a y b y sus derivados que no contienen magnesio, feofitinas a y b, y la fracción de carotenoides la constituyen la luteína, xantofilas y el β -caroteno.

El contenido de carotenos en aceites de oliva depende fundamentalmente del tipo de cultivo, estado de maduración de la aceituna y proceso de extracción empleado (*Mínguez-Mosquera et al., 1990; Moreda et al., 2001; Kiritsakis. 2002; Luaces et al., 2005*), su contenido también disminuye notablemente, si los aceites han sido sometidos a refinación, debido a fenómenos de adsorción en la etapa de decoloración y por degradación de los pigmentos a lo largo de todo el proceso. Los efectos beneficiosos del aceite de oliva no se deben solo a la elevada concentración en ácidos grasos, sino también a la presencia de sustancias antioxidantes como la vitamina E, compuestos fenólicos y carotenoides (*Visioli et al., 1998; Caruso et al., 1999; Gimeno et al., 2002*).

En el aceite de oliva hay presentes dos hidrocarburos en cantidades considerables: escualeno (ya descrito anteriormente) y el β -caroteno, hidrocarburo tetraterpénico poliinsaturado [Figura 4], precursor de la vitamina A. Al ser ingerido el β -caroteno es transformado en Vitamina A en la mucosa del intestino delgado, y ésta es almacenada principalmente en el hígado en forma de ésteres de retinol (*Hosotani et al., 2003*).

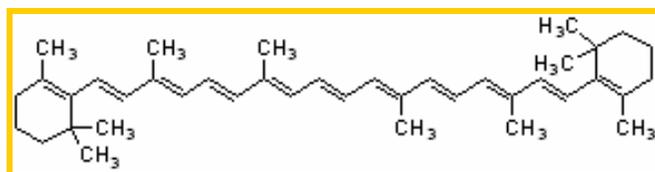


Figura 4: Estructura química del β - caroteno

Su estructura fue determinada en 1930 por Paúl Karrer. Ésta fue la primera vez en la historia en la que la estructura de una vitamina o pro-vitamina era dilucidada.

En el aceite de oliva se encuentra presente en muy pequeñas cantidades, pero se caracteriza por presentar una importante función biológica. Actúa como un potente antioxidante capaz de bloquear al oxígeno simple, inhibiendo así la oxidación de los lípidos por la acción de dicho oxígeno. Su efecto antioxidante ha sido descrito en el aceite de oliva virgen (*Mataix. 2002; Beltrán et al., 2005; Hrnčirik et al., 2005*)

La fotooxidación se puede prevenir mediante atenuadores del oxígeno simple, que producen el efecto opuesto a los sensibilizadores. Los productos atenuadores hacen que disminuya el grado de oxidación por reacción física o química con el oxígeno simple. Este último se desactiva hasta su estado base. El β -caroteno atenúa la acción del oxígeno simple, inhibiendo así la oxidación (*Kiritsakis. 2002*).

Los carotenoides presentan efectos beneficiosos en la salud humana debido fundamentalmente, a su acción antioxidante capaz de inhibir la acción de los radicales libres formados en el organismo. Algunos autores definen, que los carotenoides pueden reducir el riesgo de cáncer (*Hong et al., 1994; Chen et al., 1998; Krinsky et al., 2005*), ya que durante el desarrollo de ciertos tipos de cánceres existe un descenso en los niveles vitamínicos, y una ingesta elevada de carotenoides podría presentar efectos beneficiosos (*Beltrán et al., 2005*). También están asociados en la prevención de la degeneración macular y en la formación de cataratas (*Basu et al., 2001; Krinsky et al., 2005*).

2. Oxidación y Antioxidantes

2.1. Radicales libres

Un radical libre se define como cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados en sus orbitales, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Una vez generados, los radicales libres aparean rápidamente el electrón desapareado uniéndose a otro radical libre, o cediendo ó tomando un electrón de una estructura molecular adyacente no radicalaria, con el fin de estabilizarse. Los radicales libres son moléculas inestables que perdieron un electrón y son muy reactivas. Su misión es la de remover el electrón que les hace falta de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada, que perdió un electrón, se convierte entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.

La principal fuente de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, son las mitocondrias, que consumen más del 90 % del oxígeno disponible del organismo. Otra fuente endógena de radicales libres son las células fagocíticas, que destruyen células infectadas por bacterias o virus liberando oxidantes como NO, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OCl \cdot . En este caso los radicales libres tienen un papel positivo en el organismo, formando parte de la defensa inmunitaria (*Diplock et al., 1998*), pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas.

El desequilibrio en el organismo (estrés oxidativo) se produce cuando la presencia de radicales libres supera las defensas antioxidantes, y provoca un daño mayor o menor en función a la extensión, duración y el tiempo del oxidante implicado (*Gutteridge, 1995*). Esta situación puede deberse a un aporte insuficiente en la dieta de antioxidantes, a una producción excesiva de radicales libres durante el metabolismo de fármacos, o por una activación excesiva del sistema celular (*Halliwell, 1996*).

Los radicales libres producen daño al tomar electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que entonces no podrá cumplir sus funciones como el intercambio de nutrientes y descartar los materiales de deshecho celular, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. En el interior de la célula, los radicales libres atacan el DNA impidiendo a la célula su reproducción, pueden dañar a nivel de funciones de membrana, del metabolismo ó de expresión génica (*Cooper et al., 1995; Droge, 2002; Violi et al., 2002*).

Son muy diversas las fuentes exógenas de radicales libres, como la exposición ambiental a la luz UV, contaminantes, radiación gamma y el metabolismo de fármacos. Una importante fuente exógena de radicales libres es el tabaco. Los factores endógenos que favorecen la generación de radicales libres puede ser el ejercicio físico de alta intensidad, procesos oxidantes metabólicos, respiración celular, acción de enzimas oxidativas y reacciones inflamatorias.

Los radicales libres se han asociado, a multitud de procesos clínicos como lesiones inflamatorias, lesiones por tóxicos y radiaciones, sobrecarga de hierro, enfermedades auto inmunes, deficiencias nutricionales, diabetes, aterosclerosis, enfisema pulmonar, artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson, demencia senil, envejecimiento y neoplasias (*Cross et al., 1987; Mercuri et al., 2000; Ceriello et al., 2001*).

2.1.1. Tipos de radicales libres

Existen distintos tipos de radicales libres, que se incluyen en los términos “Especies reactivas de Oxígeno” (ROS) y “Especies reactivas de Nitrógeno” (RNS), según contengan oxígeno o nitrógeno en su estructura. Las principales especies reactivas que se encuentran en nuestro organismo son:

- Oxígeno molecular singlete (O_2): especie no radicalaria excitada que se forma por exposición a la luz UV. Presenta toxicidad baja.
- Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$): se produce en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando la reducción del oxígeno molecular no es completa. Se forma a partir de la captación de un electrón (e^-) por una molécula de oxígeno. Otras especies reactivas se forman a partir de él y presenta menos reactividad que el radical hidroxilo. Su eliminación es controlada por las enzimas superóxido dismutasas (*Chaudière et al., 1999*).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): se forma cuando el radical superóxido capta dos protones. Tiene pocas estructuras diana oxidables y es fácilmente transformado en agua por las enzimas catalasas.
- Radical Hidroxilo (OH^{\cdot}): altamente reactivo que ataca a la mayoría de las estructuras celulares, y actúa inmediatamente en el lugar en el que se produce (*Diplock et al., 1998*).
- Óxido nítrico (NO): tiene una doble función, con efectos beneficiosos en el organismo y perjudiciales. Importante función como neurotransmisor, mediador de la respuesta inmune y regulador en la agregación plaquetaria y relajación de la musculatura vascular lisa. Actúa también, destruyendo células

y tejidos jugando un papel significativo en la patología de muchas enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis, la artritis y la diabetes.

2.1.2. Reacciones de los radicales libres

En condiciones patológicas, estas especies reactivas si están a concentraciones elevadas pueden actuar sobre muchos componentes celulares, en especial con los lípidos. En general, en la peroxidación lipídica, y en las reacciones radicalarias se produce una reacción en cadena que consta de varias etapas:

- Fase de iniciación: se forman los radicales libres por la presencia de un agente iniciador. La peroxidación se inicia por la abstracción de un átomo de hidrógeno de los AGPI, en el carbono adyacente a un doble enlace.
- Fase de propagación: los radicales libres reaccionan con otras moléculas y con el oxígeno, generando nuevas moléculas oxidadas.
- Fase de terminación: se detiene la reacción por interacción entre dos radicales o por la inactivación de estos, con sustancias antioxidantes (vitamina E, C, carotenoides, glutatión, polifenoles, etc.).

2.2. Sistemas de defensa antioxidante

Se define como *antioxidante* a aquellas sustancias que presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, *retarda o previene* su oxidación (Halliwell, 1995). El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre, débil no tóxico, estable e incapaz de propagar la reacción.

Las características de un buen antioxidante son:

- Presencia de sustituyentes donantes de electrones o de hidrógeno al radical, en función de su potencial de reducción.
- Capacidad de deslocalización del radical formado en su estructura.
- Capacidad de quelación de metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- Accesibilidad al lugar de acción, dependiendo de su lipofilia/hidrofilia y coeficiente de partición.

Estas sustancias antioxidantes pueden ser mecanismos enzimáticos, llamados *antioxidantes endógenos* -que incluyen a las enzimas superóxidodismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q, o los *antioxidantes exógenos*, que ingresan al organismo por la vía de los alimentos. Tal es el caso de las vitaminas E y C, el caroteno, escualeno, etc. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, estos otros reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura, es decir, los capturan o neutralizan, y se oxidan en el proceso. Finalmente, algunos metales, como selenio, cobre, zinc y magnesio, que en ocasiones forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en este mecanismo de protección celular.

Según sus mecanismos de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios ó terciarios:

1. Antioxidantes Primarios:

Previenen la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas del oxígeno (ROS) o a través de la quelación de los iones metálicos implicados en el proceso de oxidación.

2. Antioxidantes Secundarios:

Eliminan radicales libres formados antes de que participen en reacciones en cadena que aumenten el daño celular y conduzcan a la nueva formación de radicales libres. Inhiben la generación de ROS, impidiendo la activación metabólica de carcinógenos (*Mukhtar et al., 1999; Visioli et al., 1999*). Se dividen en dos tipos:

2.1 Enzimas intracelulares

- superóxido dismutasa: transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno.
- catalasa: cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno
- glutatión peroxidasa: reduce los hidroperóxidos, generalmente con glutatión (*Ursini et al., 1995*).
- Glutatión reductasa: reduce el glutatión oxidado a su forma original.

2.2 Compuestos de bajo peso molecular

- glutatión: actúa como cofactor de enzimas detoxificantes. Es un antioxidante exógeno y endógeno.
- ácido úrico: antioxidante hidrosoluble, producto final del metabolismo de las purinas. Se une a iones metálicos o bien captura especies reactivas (*Halliwell et al., 1990*)
- bilirrubina: actúa protegiendo de la peroxidación a los ácidos grasos unidos a la albúmina.
- ubiquinona: su forma reducida, es un antioxidante efectivo en membranas extramitocondriales.

- albúmina: captador de iones metálicos previniendo del daño oxidativo.

3. Antioxidantes Terciarios:

Reparan o eliminan las estructuras celulares dañadas por los radicales libres, se incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

Es necesario aportar de forma exógena, antioxidantes a través de la dieta, debido a la incompleta eficacia de nuestras defensas antioxidantes endógenas y a la existencia de situaciones en las que los radicales libres son producidos en exceso (tabaco, contaminantes, radiación UV, inflamación, etc.). Los más representativos son el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), los carotenoides y los compuestos polifenólicos.

Numerosos estudios realizados en voluntarios han destacado las propiedades que ciertos alimentos de la dieta tienen de modular la capacidad antioxidante total del plasma tras el consumo, como son el té (*Serafini et al., 1994*), vino tinto (*Serafini et al 1998; Fernández-Pachón et al 2005*), aceite de oliva (*Fitó et al., 2000; 2002*), lechuga (*Serafini et al., 2002*) y chocolate (*Serafini et al., 2003*). Esto es debido a la presencia, en cantidades importantes, de estas sustancias antioxidantes.

3. Antioxidantes presentes en el Aceite de Oliva

Un número creciente de indicios apuntan al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la Dieta Mediterránea, en sus efectos beneficiosos sobre la salud. Dichos efectos pueden atribuirse tanto a su elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados como a la presencia de compuestos antioxidantes en el aceite (*Fitó, 2003*).

El efecto bioactivo, se atribuye a su contenido en AGMI y a su elevada carga antioxidante, tanto de vitamina E, escualeno, carotenoides y compuestos polifenólicos.

Las vitaminas actúan directamente como captadores de ROS y regulando la actividad de las enzimas antioxidantes. Entre ellas, la vitamina E ha sido reconocida como una de las más importantes como antioxidante (*Quiles et al., 1999; Kutlu et al., 2005*).

La **vitamina E**, al igual que otros antioxidantes lipídicos, actúa como captador de radicales libres, de manera que rompe la reacción en cadena, generalmente por donación de un hidrógeno al radical peroxilo, dando hidroperóxidos. Puede transferir su hidrógeno fenólico al radical libre, rompiendo por tanto la reacción en cadena y previniendo la peroxidación de los AGPI en las membranas celulares y subcelulares.

Algunos estudios han demostrado la asociación entre el consumo de alimentos ricos en Vitamina E y una reducción en la enfermedad cardiovascular (*Rimm et al., 1993*). También se ha descrito una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina E y una menor mortalidad de enfermedad cardiovascular (*Gey et al., 1991*).

La cantidades de vitamina E y carotenoides aportadas por un consumo razonable de aceite de oliva son inferiores a las ensayadas en estudios *in vitro* e *in vivo* como antioxidantes (*Fitó, 2003*). Por esto, la presencia de otros constituyentes antioxidantes en el aceite de oliva, como los compuestos polifenólicos, son de particular importancia en la investigación de los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva, tanto por su

participación directa como antioxidantes como por un posible sinergismo *in vivo* con otras sustancias antioxidantes.

Los **compuestos fenólicos** presentes en el aceite de oliva constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy elevado de compuestos, algunos todavía por identificar. Varios trabajos recientes han señalado cómo el aceite de oliva y sus compuestos menores polares (CMP) parece que actúan, en la nutrición humana, como agentes preventivos contra varias enfermedades (*Owen et al., 2000a, 2000b; Visioli et al., 2000; Lambert et al., 2005*) y particularmente, los CMP contribuyen de manera importante a la calidad sensorial (*Andrews et al., 2003; Gutiérrez-Rosales et al., 2003; Lesschaeve et al., 2005*) y estabilidad del aceite (*Velasco et al., 2002; Van der Sluis et al., 2005; Mateos et al., 2005*).

El aceite de oliva contiene fenoles simples (hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, etc.), flavonoides como apigenina y luteolina, así como otros fenoles más complejos (aldehídos secoiridoides, verbascósidos, etc.). Recientemente se ha descrito la presencia de lignanos en la fracción fenólica de algunos aceites (*Owen et al., 2000a, 2000b*).

Los aceites de oliva ricos en compuestos fenólicos presentan un mayor grado de estabilidad, y les confiere unas propiedades organolépticas con un gusto fuerte y afrutado que es indicador de alta calidad.

El contenido fenólico en los aceites, está influenciado por varios factores, tales como las condiciones climáticas, características de la tierra de cultivo, variedad de la oliva, el grado de maduración del fruto, tipo de almacenamiento y la tecnología utilizada en su transporte y procesamiento (*Gimeno et al., 2002b; Van der Sluis et al., 2005*).

Es importante conocer los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, teniendo especial interés aquellos que poseen grupos orto-difenólicos (oleuropeina e hidroxitirosol), por ser grandes inhibidores de la oxidación de la LDL *in vitro*. La actividad antioxidante del hidroxitirosol se debe tanto a un efecto quelante de iones metálicos como a un efecto captador de radicales libres (*Visioli et al., 1998*). La

oleuropeína y el hidroxitirosol han demostrado tener una actividad antioxidante superior a la de otros antioxidantes conocidos como las vitaminas E y C. (*Mateos et al., 2003; Bouaziz et al., 2005*).

En estudios *in vitro*, el hidroxitirosol y la oleuropeína, han mostrado una capacidad de inhibir la agregación plaquetaria (*Miles et al., 2005*) y pueden además inhibir la producción de la molécula proinflamatoria leucotrieno B₄. Visioli y col. demostraron que la oleuropeína incrementa la producción de óxido nítrico (*Visioli et al., 1999*). También hay numerosos trabajos sobre el efecto protector de estos compuestos sobre líneas celulares con daño oxidativo, destacando el hidroxitirosol (*Lapidot et al., 2002*).

Los lignanos han mostrado ser potentes antioxidantes *in vitro* y presentan la más alta correlación con la capacidad antioxidante (*Fitó, 2003*).

Por todo esto, es de enorme importancia no sólo conocer el contenido cuantitativo de compuestos polifenólicos del aceite de oliva virgen, sino también su perfil cualitativo, a la hora de estudiar y definir sus posibles propiedades biológicas (*Fitó, 2003*).

4. Medida de la Actividad Antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante de los alimentos es importante para determinar la protección a la oxidación y deterioro del alimento que disminuye su calidad y valor nutricional, y por otra parte sirve para predecir el potencial antioxidante del alimento antes de ser ingerido.

La actividad antioxidante no se puede medir directamente, pero sí el efecto antioxidante. La mayoría de los métodos para medir la actividad antioxidante se basan en el uso de una gran variedad de sistemas generadores de radicales, son métodos de inhibición donde se emplea una especie generadora de radicales libres y una sustancia que detecta estas especies, la muestra a analizar por su capacidad antioxidante es capaz de inhibir la generación de dichos radicales.

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación es obvio que no existe un único método de prueba, que refleje de forma completa el perfil antioxidante de la muestra estudiada (*Pérez et al., 2003*), por eso los datos obtenidos por diferentes investigadores son difíciles de comparar e interpretar (*Frankel et al., 2000*).

Lo mejor sería, medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra a analizar, sin embargo es difícil determinar el número y concentración de los antioxidantes presentes en la muestra, los métodos descritos miden la actividad global de todos los antioxidantes (conocidos o no) presentes en la muestra (*Ivekovic et al., 2005*).

Lo ideal sería establecer un único método estándar para determinar la capacidad antioxidante en diferentes tipos de muestras, Prior y col. definieron una serie de características “ideales”: que sea fácil, con un mecanismo químico y punto final fijo, instrumentación disponible, buena reproducibilidad, adaptable a ensayos con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos y con diferentes fuentes generadoras de radicales, y un elevado rendimiento de análisis. Otras características a establecer para fijar un método “ideal” de

medida de la capacidad antioxidantes incluye: a) rango analítico, b) recuperación, c) repetibilidad, d) reproducibilidad, y e) reconocimiento de sustancias que puedan interferir en el análisis (*Prior et al., 2005*).

Todos tienen en común la presencia de un agente oxidante, un sustrato adecuado y una estrategia de medida del punto final (*Frankel et al., 2000*).

Existen estrategias de medida de la actividad antirradicalaria, y es importante elegir la más adecuada en función a la información que se desea obtener:

- Determinación indirecta: se emplea una diana como punto de detección. La presencia de los radicales produce una pérdida/aparición de este reactivo. En este caso la presencia de antioxidantes produce un aumento/pérdida de la señal. Métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter).
- Determinación directa: el radical se emplea como un factor de cuantificación, así la adición del antioxidante provoca una disminución de la señal debida al radical. El empleo del antioxidante puede ser antes o después a la generación del radical (*Arnao et al., 1998*). En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra, hasta obtener una señal estable. Cuando se añade la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de señal producido. En el ensayo de inhibición, la muestra se une a los sustratos de oxidación antes de la generación del radical. La reacción comienza con la adición del oxidante.

En conclusión, los métodos de determinación de actividad antioxidante basados en la captura de radicales libres son muy variados y pueden ser clasificados de acuerdo a la estrategia de detección y cuantificación empleada [Tabla 3] (*Villaño, 2005*).

Tabla 3. Principales métodos de determinación de captura de radicales libres

	Método	Fundamento	Determinación de la actividad antioxidante
Captura de Radicales Superóxido	Ensayo de Hipoxantina/ Xantina Oxidasa ¹	El superóxido generado enzimáticamente reacciona con el azul de tetrazolio, se absorbe a 560 nm	Inhibición de la formación de azul de formazán y de A ₅₆₀
Captura de Radicales Peroxilo	TRAP ²	Producción de peroxilos por descomposición térmica de AAPH, con consumo de oxígeno	Medida de la fase de retardo en el consumo de oxígeno
	Modificaciones del TRAP ³	Los radicales peroxilo oxidan a una proteína produciendo fluorescencia. Los radicales peroxilo oxidan a la ficoeritrina o fluoresceína y disminuye su fluorescencia	Medida de la fase de retardo en la aparición de la fluorescencia Mantenimiento de la fluorescencia (AUC)
Captura de Radicales Hidroxilo	Ensayo de la Desoxirribosa ⁵	Generación de OH por la reacción de Fenton, que ataca a la desoxirribosa. Determinación de los productos por el ensayo TBARS	Inhibición de la oxidación de la desoxirribosa
Captura de radicales Peroxinitrito	Método de la Dihidrorrodamina ⁶	Los peroxinitritos oxidan la dihidrorrodamina 123 y pierde su fluorescencia	Mantenimiento de la fluorescencia
Poder Reductor	FRAP ⁷	Formación de un complejo Fe ³⁺ - TPTZ	Reducción del complejo Fe ³⁺ a Fe ²⁺ , y aumento de la absorbancia a 593 nm
Captura de radicales sintéticos	Método ABTS ⁸ Método DPPH ⁹ Método DMPD ¹⁰	Radicales coloreados con máximo de absorbancia a 414, 515, 505 nm	Disminución de la absorbancia

Refs: ¹ De Gaulejac et al., 1999; ² Wayner et al., 1985; ³ Ghiselli et al., 1995; ⁴ Cao et al., 1999; ⁵ Sánchez- Moreno, 2002; ⁶ Kooy et al., 1994; ⁷ Benzie et al., 1996; ⁸ Cano et al., 1998a; ⁹ Sánchez- Moreno et al., 1998; ¹⁰ Fogliano et al., 1999.

4.1. Método del ABTS^{•+}

➤ Fundamento

El fundamento de este método consiste en generar el radical ABTS^{•+} a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) [Figura 5]. El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el intervalo de ultravioleta-visible. En concreto tiene un máximo de absorción a 340 nm.

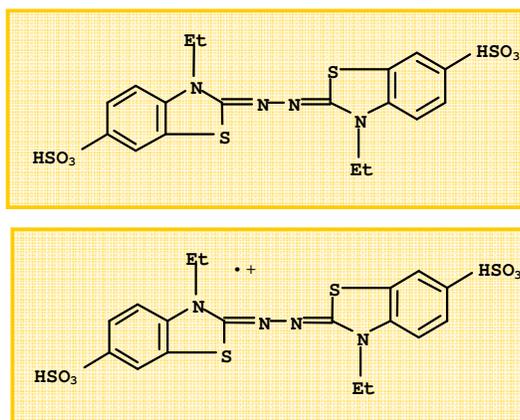


Figura 5: Estructura química del ABTS y del radical ABTS^{•+}

Una ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso.

Presenta una serie de inconvenientes: es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el ABTS (0.68V), así muchos compuestos fenólicos tienen menor potencial redox y pueden reaccionar con el ABTS^{•+}, el punto final de la reacción varía en función a la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos ó muy elevados que pueden interferir en los resultados finales.

➤ **Métodos de generación del radical ABTS⁺**

Existen diversas formas de generación del radical ABTS⁺:

- Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).
- Químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

El sistema peroxidasa mioglobina/H₂O₂ es un método ampliamente usado, es el primer método empleado por el ABTS como sustrato de oxidación (*Frankel et al., 2000*). Se desarrolló en un principio para estudiar la actividad antioxidante total de plasma y fluidos biológicos (*Rice-Evans et al., 1994*), posteriormente este método ha sido ampliamente usado a vinos, té, zumo (*Gil et al., 2000*), tomate (*Martínez-Valverde et al., 2002*) y en aceites de oliva (*Gorinstein et al., 2003*). Presenta varios inconvenientes: un estricto control de la temperatura de reacción (37°C) entre el radical y antioxidante, interferencia con sustancias con actividad peroxidasa y sobreestimación de los resultados.

El método de oxidación con dióxido de manganeso, el radical se forma haciendo pasar el ABTS a través de un filtro con dióxido de manganeso, el radical se forma instantáneamente, y es muy inestable a temperatura ambiente. Es muy empleado en el análisis de compuestos fenólicos extraídos de hojas de olivo y de semillas de uva (*Benavente-García et al., 2000*).

En la oxidación con radicales peroxilo el sustrato se incuba con un compuesto con estructura azo, sensible a la temperatura. Es un método muy inestable y que requiere elevadas temperaturas de generación del radical. Se emplea con sustancias puras como el β-caroteno, α-tocoferol, también en zumos de naranja, uva (*Kim et al., 2002*).

La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante un tiempo de 12-16 horas. El ABTS y el persulfato reaccionan estequiométricamente en una relación 1: 0.5, por lo que el ABTS no es oxidado completamente. Una vez generado el radical la medida se realiza como un ensayo de post-adición. Se aplica en la determinación de la capacidad antioxidante en té (*Van-Nederkassel et al., 2005*), frutas y verduras (*Proteggente et al., 2002*).

En el análisis electroquímico el radical se genera tras oxidación del ABTS con una corriente eléctrica, presenta muchas ventajas; es fácil y rápido de realizar, no requiere otros reactivos ni control de la temperatura, se aplica a vinos tintos y blancos, té (*Alonso et al., 2002; Ivekovic et al., 2005*). Existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por este método y los obtenidos con el clásico ensayo de decoloración TEAC.

El radical catiónico se puede generar enzimáticamente empleando el sistema ABTS/ H_2O_2 /peroxidasa de rábano, es un método fácil y rápido, presenta como ventajas; la no aparición de reacciones no deseadas, no requiere elevadas temperaturas para generar el radical, un amplio rango de pH para el estudio de la actividad antioxidante y la no interferencia con sustancia con actividad peroxidasa. Se ha empleado este método en la determinación de la actividad antioxidante en frutas, cerveza, vino. (*Arnao et al., 2001^a; Cano et al., 2002; Villaño et al., 2004*).

➤ **Variables que influyen en la actividad antioxidante.**

a. Concentración del antioxidante:

Hay estudios de la influencia de la concentración del antioxidante, patrones puros generalmente, en la actividad frente al $ABTS^{*+}$ (*Castillo et al., 2000*). Se busca la concentración tanto del patrón empleado, como de las muestras que presente una respuesta lineal. En general la relación entre el porcentaje de inhibición (o descenso de la absorbancia) y la concentración es lineal en un intervalo muy concreto.

b. Tiempo de medida:

La actividad antioxidante se mide a un tiempo fijo de reacción con el radical, aunque no existe un consenso en cuanto al tiempo óptimo de medida. Sin embargo, la actividad antioxidante obtenida guarda relación directa con el tiempo al que se midió la absorbancia (Arnao *et al.*, 2000; 2001). Se concluye que en la medida de la actividad antioxidante de una sustancia debe valorarse, no solo su estructura química sino también la posibilidad de formación de productos de reacción que tengan actividad frente al ABTS^{•+}, (Arts *et al.*, 2003). La cinética que se produce, consiste en una primera fase de reacción rápida y posteriormente una fase más larga y lenta, en la primera fase reaccionarían los compuestos más afines al radical formándose productos de reacción que, junto con los compuestos de reactividad más lenta darían lugar a la segunda fase. El aumento del tiempo de reacción con el radical posibilita la actuación de todas las sustancias antioxidantes presentes.

c. Disolvente empleado:

Existen muchas variantes en los disolventes empleados, lo que dificulta la comparación de resultados. La mayoría de los trabajos se basan en la medida de la actividad antioxidantes en sistemas acuosos, siendo muy insuficiente el estudio en antioxidantes liposolubles (Arnao *et al.*, 2001a). En la bibliografía consultada para medir la actividad antioxidante de los compuestos puros, se disuelven directamente en etanol (Re *et al.*, 1999; Pellegrini *et al.* 2001; Arts *et al.*, 2003; 2004). Van den Berg y col. estudió el efecto de diferentes solventes para solubilizar los compuestos lipofílicos, trabajaron sobre compuestos puros; tocoferol y β -Caroteno, disueltos en tetrahidrofurano, acetona y Triton X-100 y etanol (Van den Berg *et al.*, 1999), y existe una relación directa entre la actividad antioxidante de un compuesto y el solvente empleado. No existe reacción entre el ABTS^{•+} y el etanol (Long *et al.*, 2000).

d. Linealidad de la respuesta:

La concentración de antioxidantes en la muestra diluida debe ser tal que se encuentre dentro de un intervalo de respuesta lineal y que presente respuesta, y la dilución debe ser tal que se minimice el efecto de la absorbancia debido a los compuestos presentes en la muestra objeto de estudio a la longitud de onda de medida.

4.2. Método del DPPH[•]

Consiste en determinar la capacidad de captura del radical libre DPPH[•] por parte de los compuestos antioxidantes [Figura 6]. Este radical presenta un pico máximo de absorción a 515 nm y tras la adición del antioxidante se produce una disminución de absorbancia proporcional a la concentración y actividad de dicho antioxidante (*Brand-williams et al., 1995*).

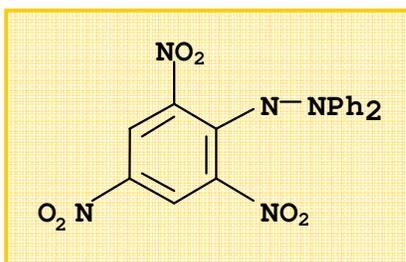


Figura 6: Estructura química DPPH[•]

El radical libre es estable y está disponible comercialmente, lo que reduce el tiempo de análisis y evita su generación por distintas vías, como ocurre con el método ABTS, que podrían conllevar una variabilidad en los resultados obtenidos.

Brand y col., aplicaron este método en compuestos fenólicos, como el ácido ascórbico y el isoascórbico y posteriormente otros autores lo aplicaron a diferentes alimentos y bebidas: vinos (*Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2005; 2006*), aceites (*Keceli*

et al., 2001; Lavelli et al., 2002; Gorinstein et al., 2003), zumo de naranja (*Sánchez-Moreno et al., 2003*). La evolución de la reacción cinética depende de la naturaleza del antioxidante estudiado (*Brand-Williams et al., 1995*), variando las condiciones del ensayo en cuanto al disolvente, concentraciones empleadas y el tiempo de análisis, aunque existe mucha homogeneidad en la bibliografía consultada en cuanto al empleo de disolventes orgánicos o el tiempo de reacción final.

Este método es fácilmente comparable con otros métodos de medida basados en la captura de radicales libres.

4.3. Método β -Caroteno/ Ácido Linoleico

Este método de medida de la actividad antioxidante, se basa en la determinación de la oxidación de moléculas diana. Se mide el descenso en la coloración del β -caroteno, debido a su destrucción por los productos de degradación del ácido linoleico, por espectrofotometría a 450-470 nm.

Para la determinación de la actividad antioxidante de un alimento se prepara una emulsión acuosa de ácido linoleico, caroteno y antioxidante y se determina la inhibición de la oxidación del β -caroteno.

Se emplean diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos basados en la oxidación de sustratos lipídicos o lipoproteínas, evaluando la actividad antioxidante, en función a la capacidad del método empleado en inhibir la oxidación (*Ben-Aziz et al., 1971; Kanner et al., 1977; 1994; Suja et al., 2005*).

En la mayoría de la bibliografía consultada, se emplea este método de medida de la actividad antioxidante en aceites esenciales (*Sacchetti et al., 2004; Bruni et al., 2004*), hierbas y plantas autóctonas (*Dapkevicius et al., 1998; Chanwitheesuk et al., 2005; Suja et*

al., 2005; *Sun et al.*, 2005) vinos (*Kanner et al.*, 1994; *Katalinic et al.*, 2004), vegetales (*Cheung et al.*, 2003; *Tian et al.*, 2004; *Motalleb et al.*, 2005) y compuestos puros (*Von Gadow et al.*, 1997).

4.4. Método ORAC

Muchos ensayos se han desarrollado para detectar de forma general o específica la acción antioxidante de una sustancia, el fundamento del método ORAC se basa en la habilidad del antioxidante para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno ($X^{\bullet} + AH \longrightarrow XH + A^{\bullet}$). El radical peroxilo reacciona con una sustancia fluorescente (fluoresceína) generando productos no fluorescentes [Figura 8], lo que permite cuantificar la capacidad antioxidante por el descenso en la fluorescencia y por la cantidad de productos generados.

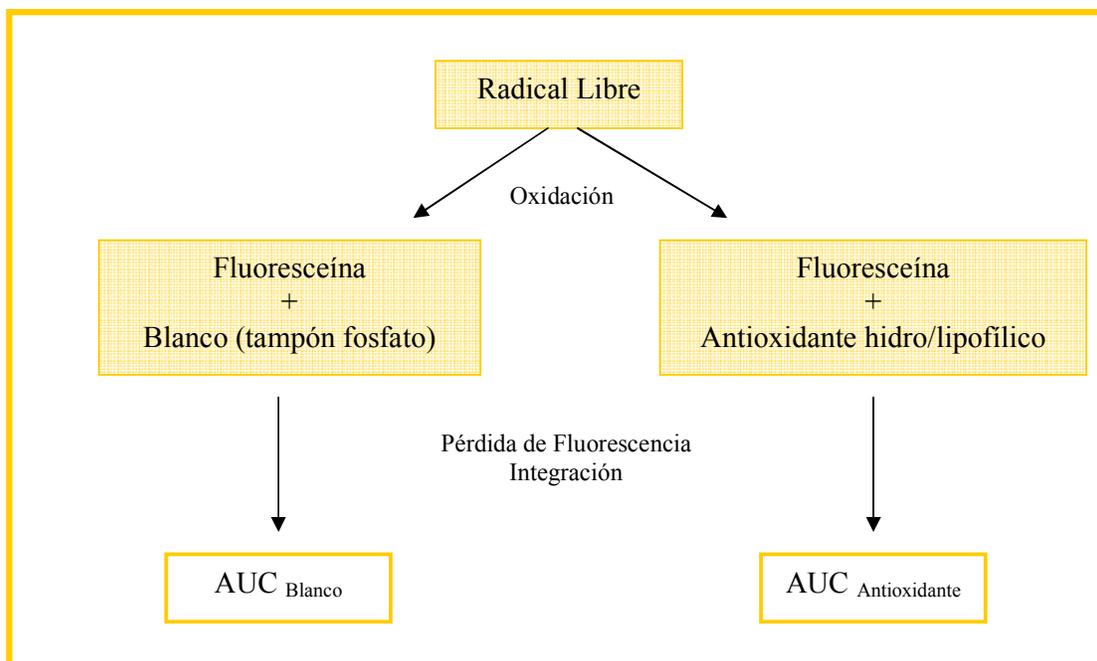


Figura 7: Esquema analítico del fundamento del ensayo ORAC

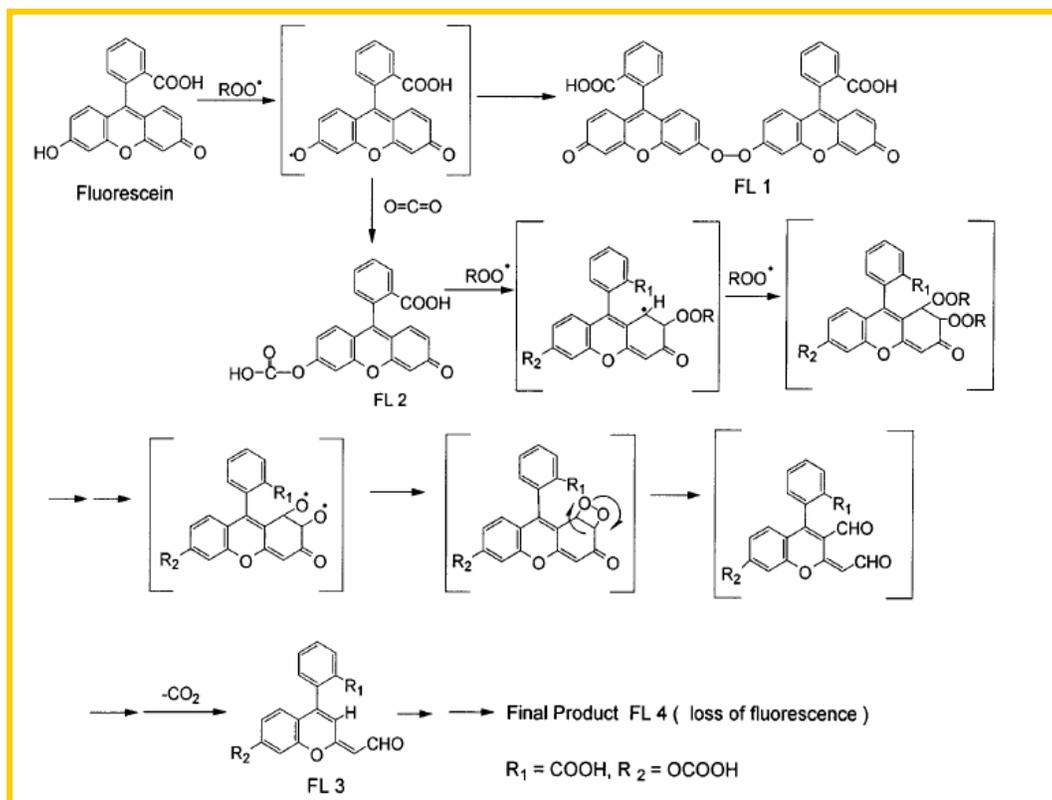


Figura 8: Esquema del mecanismo de reacción de la FL en presencia de AAPH. Productos de oxidación generados, que presentan una menor fluorescencia. *Ou et al., 2001*.

En ensayo ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno) se basa en la protección que sustancias antioxidantes ejercen sobre la pérdida de fluorescencia de la proteína fluoresceína (*Ou et al., 2001*), a causa de un daño químico que afecta a su conformación e integridad química.

Material y Métodos

II. OBJETIVOS

Los hábitos dietéticos tienen una importante influencia en el mantenimiento de la salud, se está potenciando el consumo de ciertos alimentos por las acciones biológicas positivas que ejercen algunos componentes. Los alimentos pueden ejercer efectos positivos y negativos en el equilibrio entre el daño oxidativo y las defensas frente a éste, al aportar de forma exógena sustancias antioxidantes de diversa naturaleza, con capacidad para atrapar los radicales libre que se generan en condiciones fisiológicas o por la influencia de determinadas situaciones externas. Son muchos los componentes que en el aceite de oliva virgen extra tienen actividad antioxidante, polifenoles, tocoferoles, carotenoides y clorofila, siendo los polifenoles los que confieren mayor estabilidad y actividad antioxidante. Es interesante estudiar los componentes que presentan actividad antioxidante en el aceite de oliva, como el escualeno y β -caroteno. Por ello en este trabajo hemos pretendido abordar el estudio de estos compuestos, realizar un estudio comparativo de los métodos *in vitro* más comúnmente empleados en el análisis de la actividad antioxidante de los alimentos y por último, determinar la capacidad protectora del aceite en humanos, frente al estrés oxidativo.

Nos hemos planteado por tanto, los siguientes objetivos:

1. Caracterización del aceite de oliva virgen extra con Denominación de Origen, evaluando el contenido en ceras y material insaponificable.
2. Determinar la composición de **escualeno** y **β -Caroteno** en las muestras de aceite de oliva virgen extra.
3. Puesta a punto de los métodos **ABTS**, **DPPH**, **β -Caroteno/ácido linoleico** y **ORAC** al caso concreto del aceite, para medir la actividad antioxidante.
4. Evaluar *in vivo* el efecto del aceite sobre la capacidad antioxidante en el plasma.

Material y Métodos

Material y Métodos

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1.1. Determinación de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra.

MATERIAL

- **Muestras**

Se analizaron un total de 39 muestras de Aceite de Oliva Virgen Extra pertenecientes a las campañas olivareras 2001- 2002, 2002-2003 y 2003-2004 (n = 13, por campaña), de la variedad Picual con Denominación de Origen. Obtenidas por un sistema bifásico de extracción, a excepción de algunas muestras de aceite de la última campaña analizada, la 2003-2004 que se obtuvieron por un sistema patentado de molturación en frío, basado en un efecto de laceración ejercido por un sistema de rodillos. La determinación de la fracción insaponificable se hizo en todas las muestras por triplicado.

- **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados son de calidad analítica. Los reactivos utilizados para la determinación de la fracción del insaponificable son descritos a continuación:

Tabla 1. Reactivos utilizados en la obtención de la muestra

Nombre	Proveedor
Alcohol Etilico 96 % v/v	Panreac (Barcelona, España)
Potasio Hidróxido 85%	Panreac
Agua bidestilada desionizada	Sistema Milli-Q de Millipore. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia)
Éter de petróleo 40-60°C	Panreac

- **Material y aparatos**

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Matraz de fondo plano de 200 mL, adaptable a un refrigerante de reflujo.
- Refrigerante de reflujo.
- Embudos de separación de 500 mL.
- Rotavapor 144 Büchi (Suiza).
- Pipetas Pasteur 2mL, 150 mm, Pobel (Madrid, España).
- Estufa desecación P-Selecta[®]

MÉTODO

- **Fundamento**

Se denomina insaponificable al conjunto de constituyentes de los aceites que no reaccionan con la sosa o potasa para dar jabones, y que tras la saponificación continúan siendo solubles en los disolventes clásicos de la grasas (hexano, éter, etc.). El insaponificable es el peso en gramos de sustancias no saponificables, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, contenidas en 100 gramos de grasa. Esta fracción

constituye un porcentaje muy bajo en el aceite de oliva, aunque posee una gran importancia desde el punto de vista de su valor biológico.

El aceite crudo contiene sustancias disueltas tales como: esteroides, pigmentos e hidrocarburos, que no se separan durante la neutralización cáustica, constituyendo la fracción insaponificable. Son compuestos termolábiles y solubles en disolventes corrientes de las grasas (*Bernardini, 1981*).

Se lleva a cabo la saponificación del aceite y la separación de la materia insaponificable mediante la extracción con un disolvente apropiado, tal como el éter etílico o de petróleo, este último empleado en el estudio

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Solución alcohólica de hidróxido potásico 2N: se pesan 13.17g de hidróxido potásico al 85% y se disuelve en 100 mL de alcohol etílico 96 % v/v.
- Éter de petróleo redistilado y exento de residuo.
- Alcohol etílico al 50 %: se emplea alcohol etílico 96 % v/v (9.815 mL) y se diluye en agua hasta los 100 mL. Se emplea la tabla de Gay-Lussac para la dilución de alcoholes.

- b. PROCEDIMIENTO

La muestra para el análisis debe estar limpia y brillante en caso contrario, se calienta en baño maría hasta 15 °C por encima de la temperatura de completa fusión, si a ésta temperatura la muestra continua turbia se adiciona sulfato sódico anhidro. Es también necesario eliminar el agua de la muestra por decantación y filtración sobre papel, a una

temperatura ligeramente superior al punto de fusión de determinados componentes sólidos que se han podido separar de la materia grasa fluida.

Se pesa en un matraz 5 g de la muestra de aceite, con una aproximación de 0.01g. A continuación, se adicionan 50 mL de la solución alcohólica de hidróxido potásico 2N. Se adapta el matraz al refrigerante de reflujo y se calienta hasta saponificación total, aproximadamente 1 hora. Transcurrido este tiempo, se suspende el calentamiento y se agrega por la parte superior del refrigerante 50 mL de agua destilada, y se deja enfriar.

Se transfiere cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de decantación, arrastrando las últimas porciones del matraz con dos lavados sucesivos de 25 mL de éter de petróleo, que se agregan al embudo de decantación. Se tapa y agita enérgicamente durante un minuto, evitando la formación de emulsiones estables y se deja decantar hasta que se formen dos fases. La fase hidroalcohólica se recoge y se pasa a un segundo embudo de decantación, efectuando dos nuevas extracciones con 50 mL de éter de petróleo cada vez. Los tres extractos etéreos reunidos se lavan con porciones sucesivas de 50 mL de alcohol etílico al 50 % v/v. La solución de éter de petróleo se trasvasa a un matraz de cuello corto, previamente tarado, y se elimina el disolvente en el rotavapor.

El matraz se seca en estufa a 103 °C durante 15 minutos, se deja enfriar en desecador y se pesa. Es necesario secar el residuo insaponificable para asegurar la eliminación de las últimas trazas de disolvente y agua que puedan estar presentes. El resultado se expresa en porcentaje:

$$\% \text{ Insaponificable} = 100 P' / P$$

P' = peso en gramos del residuo.

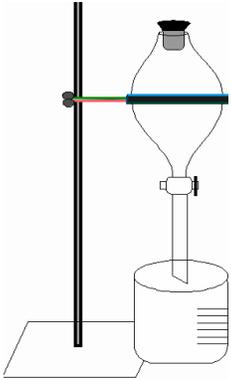
P = peso en gramos de la muestra.



Hidróxido potásico
2N



Agua Destilada



Éter de petróleo
Alcohol etílico 50 %

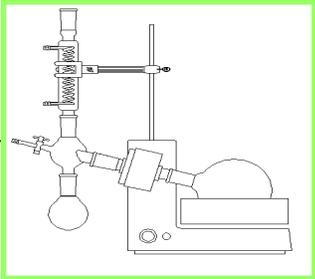


Figura 1: Esquema analítico para la determinación del insaponificable

1.1.2.- Estudio del contenido en Ceras del aceite de oliva virgen extra

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

- **Muestras**

Se analizó un total 39 muestras de aceite, 26 pertenecientes a las campañas 2001-2002 y 2002-2003, completándose el estudio posteriormente con 13 muestras de la campaña 2003-2004. Todos los aceites, de diferentes almazaras que forman parte de la misma Denominación de Origen proceden de aceitunas de la variedad Picual. Las muestras fueron obtenidas por un sistema de extracción en dos fases. En cada caso, el número de experimentos realizados, se representa como "n" con repetición analítica por duplicado, considerando el valor medio de la misma como el valor a tener en cuenta.

- **Reactivos**

Se enumeran a continuación todos los reactivos empleados en la determinación de ceras en las muestras de aceite de oliva virgen extra estudiadas:

Tabla 1. Patrón interno

Nombre	Proveedor
Laurilaraquidato C-32 PAI	Aldrich (Madrid- España)

Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de la muestra

Nombre	Proveedor
Silicagel 60 para Cromatografía en columna PA	Merck

Sudan I PA	Aldrich
n- Hexano HPLC	Panreac (Barcelona, España)
Éter Dietílico	Panreac
n-Heptano HPLC PAI	Panreac
Etanol Absoluto	Panreac
Nitrógeno comprimido	Air-liquide, Alpha Gaz (Madrid, España)
Hidrógeno comprimido	Air-liquide, Alpha Gaz

- **Instrumentación**

1. Cromatógrafo de gases: provisto de un sistema de introducción directa en la columna constituido por:

- Perkin- Elmer Autosystem (HP 5890), con sistema inyector en frío y detector de ionización de llama (FID).
- Columna capilar Zebron zb5, 15 m 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 μ de espesor
- Microjeringa 5 μ L. Hamilton.

2. Instrumentación y Material de laboratorio

- Columna de vidrio para cromatografía de 15 mm de diámetro interno y 40 cm de longitud, Pobel (Madrid, España).
- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría (vasos de precipitado, matraces..).
- Varilla de teflón.
- Embudos de vidrio de 3.5 cm y de tubo largo.
- Pipetas Pasteur 2mL, 150mm Pobel (Madrid, España)

- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo)
- Baño de agua termostatzado P-Selecta[®] (Barcelona, España).
- Rotavapor 144 Büchi (Suiza).

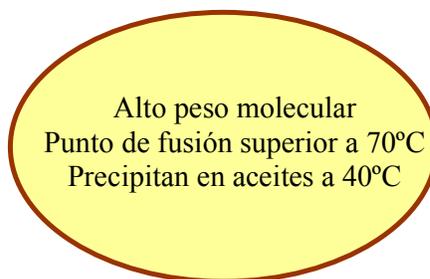
MÉTODO

- **Fundamento**

Las ceras son compuestos complejos que se encuentran en la cutícula de las aceitunas (*Bianchi et al., 1992; Ranalli et al., 1999*), hojas (*Bianchi et al., 1993*) y demás tejidos activos del olivo. Actúan como barrera a la pérdida de agua por la evaporación y transpiración de los tejidos vegetales (*Mataix et al., 2001*).

El análisis de este parámetro se utiliza para detectar la presencia de adulteración en el aceite de oliva virgen con aceites obtenidos por extracción con disolventes, ya sea de oliva o de semilla.

Químicamente las ceras son ésteres formados a partir de la unión de ácidos grasos (C₂₀-C₂₈) y alcoholes grasos de cadenas largas (C₂₇- C₃₂) (*Pérez- Camino et al., 2003*). Una cera tiene hasta 58 átomos de carbono, influyendo esto es sus propiedades físicas:



Las ceras que se encuentran con más frecuencia son las de C₄₀, C₄₂, C₄₄ y C₄₆. Las distintas ceras se separan en función del número de átomos de carbono.

Se adiciona a la grasa un patrón interno (Laurilaraquidato C32) y se fracciona mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado. La fracción eluida en las condiciones de ensayo (con menor polaridad que la de los triglicéridos) se recupera y se analiza directamente mediante cromatografía de gases con columna capilar (COI/T.20/Doc.nº18. 2003).

El disolvente portador, cuya polaridad se la da el éter etílico es poco polar. Las ceras de cadena lineal son menos polares que los triglicéridos y demás componentes del aceite, como las ceras de esteroides y las ceras triterpénicas, por lo que se retienen menos y se eluyen primero de la columna; posteriormente se eluirá el Sudan I, utilizado como marcador cromatográfico y que tiene estructura similar a las ceras. Al encontrarse el Sudan a 1 cm de la terminación de la columna, se puede asegurar que se han eluido todas las ceras incluida la C32 empleada como patrón.

El análisis realizado se llevo a cabo siguiendo el Reglamento (CEE) nº 183/93 de la Comisión, de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

- **Preparación de la muestra**

Se emplea la técnica descrita por el Consejo Oleícola Internacional (COI), empleada posteriormente por muchos autores (*Ranalli et al., 1999; Pérez- Camino et al., 2003*), para la determinación del contenido en ceras en aceites de oliva virgen extra.

a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Sudan I 1% en hexano: se pesa 1g de Sudan I y se disuelve en 100 mL de n-hexano para cromatografía.
- Gel de sílice con granulometría comprendida entre 60 y 200 μm . El gel se introduce en el horno a 500°C durante 4 horas. Se enfría y se añade el 2% de agua referido a la cantidad de gel de sílice empleada, se agita vigorosamente para homogeneizar la masa y se mantiene protegido de la luz durante 12 horas antes de usarlo.
- Solución de patrón interno Laurilaraquidato 0.1 % (m/V) en hexano: se pesan 0.1g del patrón interno y se disuelve en 100 mL de hexano (*Pérez-Camino et al., 2003*).
- Disolvente para elución n-hexano: éter dietílico (99: 1, v/v). La mezcla debe prepararse a diario.

b. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

La cromatografía en columna de gel de sílice hidratado se utiliza para separar la fracción de ceras del aceite. Los pasos para preparar la columna son los siguientes:

- Colocar un algodón en el extremo inferior de la columna.
- Se suspenden 15 g del gel de sílice en n-hexano y se introduce en la columna. Producida la sedimentación espontáneamente, se completa golpeando la columna con una varilla de teflón para que el lecho cromatográfico sea más homogéneo y se adiciona n- hexano para eliminar posibles impurezas.
- Se pesan en un matraz de 25 mL 0.5 g de la muestra de aceite a analizar, y se adiciona 0.1 mL de patrón interno.
- Añadir al matraz que contiene el aceite unas gotas de la solución Sudan I.

- Transferir la muestra preparada a la columna cromatográfica, con ayuda de dos porciones de 2 mL de disolvente de elución.
- Se deja fluir el solvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel del gel de sílice. A continuación se añade el disolvente de elución, con un flujo de unas 15-20 gotas cada 10 segundos. La temperatura ambiente será de 22°C aproximadamente. Se interrumpe la elución cuando el Sudan I se localiza a 1 cm aproximado del algodón.
- Evaporar la fracción resultante en rotavapor hasta la práctica eliminación del solvente, y llevar a completa sequedad con una corriente débil de nitrógeno
- Adicionar finalmente 3 mL de n-heptano (*Ranalli et al., 1999; Pérez-Camino et al., 2003*)

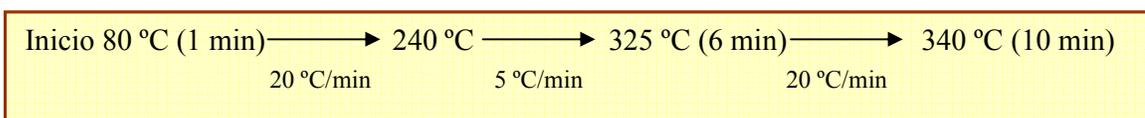
- **Método Cromatográfico**

Se analiza el contenido en ceras presente en las muestras de aceite pertenecientes a las campañas olivareras 2001- 2004, mediante cromatografía de gases, con previa extracción de la muestras siguiendo los pasos antes descritos.

a. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones operativas son las siguientes:

a.1. Temperatura de la columna:



a.2. Temperatura del detector: 350 °C.

a.3. Gas portador: Hidrógeno a presión constante de 25 Kpa

a.4. Cantidad de sustancia inyectada: 1 μ L de la solución en n- heptano.

a.5 Tiempo total de análisis: 58 minutos.

b. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CERAS

La identificación de cada uno de los picos correspondientes a las ceras se efectúa en función de los tiempo de retención y por comparación con mezclas de ceras analizadas en idénticas condiciones, de las que se conocen sus tiempos de retención. Las ceras que se encuentran con más frecuencia son las de C₄₀, C₄₂, C₄₄ y C₄₆.

Se identifican gracias al empleo del patrón interno (C₃₂), cuyo tiempo de retención es el límite de identificación de los aldehídos presentes en el aceite, y evita su interferencia con otros compuestos (*Pérez- Camino et al., 2003*).

El análisis cuantitativo se realizó con empleo del integrador de las áreas de los picos del patrón interno y de los ésteres alifáticos de C40 a C46. El contenido expresado en mg/kg de materia grasa, se calcula:

$$\text{Ceras} = A_x \cdot m_s \cdot 1000 / A_s \cdot m$$

A_x = área del pico de cada uno de los ésteres, en milímetros cuadrados.

A_s = área del pico del patrón interno, en milímetros cuadrados.

m_s = peso del patrón interno añadido, en miligramos.

m = peso de la muestra de aceite tomada, en gramos.

Los componentes a cuantificar son los correspondientes a los picos con número de carbono par comprendidos entre los ésteres C40 y C46. Los resultados se expresan en miligramo por kilogramo de materia grasa (ppm).

0.1 mL patrón interno
+
Gotas de Sudan I



Disolvente de elución:
n-hexano/éter dietílico



n- Heptano



Cromatografía de gases
1 μ L

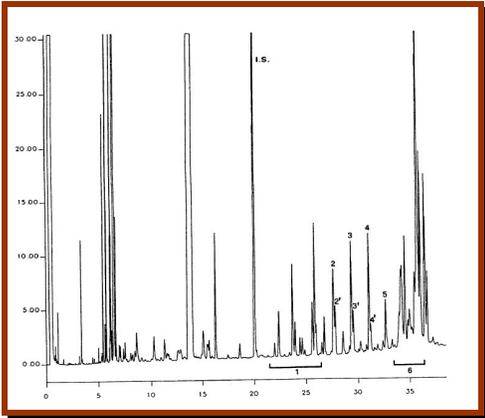


Figura 1: Esquema analítico para la determinación de Ceras

1.1.3.- Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra. Determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

- **Muestras**

Las muestras analizadas en este estudio son las mismas que las empleadas en las técnicas descritas en los apartados anteriores. Aceites de oliva virgen extra obtenidos de aceitunas de la variedad Picual, por sistema de extracción bifásico, pertenecientes a una misma Denominación de Origen de las campañas 2001- 2002, 2002- 2003 y 2003- 2004. La extracción de todas las muestras 13 por campaña, 39 en total, se realizó por duplicado.

- **Reactivos**

Se emplea los siguientes reactivos en la determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales [Tabla 1,2]:

Tabla 1. Patrón de referencia

Nombre	Proveedor
Ácido Gálico	Sigma (Madrid-España)

Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de la muestra

Nombre	Proveedor
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Merck (Darmstadt, Alemania)
Carbonato Sódico	Panreac (Barcelona, España)
n-Hexano HPLC	Panreac
Metanol	Panreac

- **Instrumentación**

1. Espectrofotómetro:

- Espectrofotómetro UV- Vis. Boeco S-22, Germany.

2. Instrumentación y Material de laboratorio

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría (vasos de precipitado, pipetas aforadas, matraces).
- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo)
- Baño de agua termostatzado P-Selecta[®] (Barcelona, España).
- Rotavapor 144 Büchi (Suiza).

MÉTODO

- **Fundamento**

El método se fundamenta en el carácter reductor de los polifenoles. Emplea como reactivo una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado es máxima en torno a los 725 nm, proporcional a la concentración total de polifenoles y se expresa como índice de Folin-Ciocalteau. Se trata la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteau en presencia de Na_2CO_3 (Vázquez *et al.*, 1973). Los resultados obtenidos con este método espectrofotométrico se pueden correlacionar perfectamente con los test enzimáticos de capacidad antioxidante realizados en el aceite.

- **Preparación de la muestra**

La determinación de los polifenoles se ha realizado por el método descrito por Vázquez y col. (Vázquez *et al.*, 1973).

a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Disolución Patrón: se disuelven 0.500g de ácido gálico, desecado previamente en estufa a 100 °C durante 2 horas y enfriado en desecador, en 100mL de agua bidestilada
- Disolución de bicarbonato sódico al 20% (p/v): se disuelven 200g de carbonato sódico en un litro de agua en ebullición, se enfría a temperatura ambiente y se filtra. Se prepara con antelación para evitar la turbidez y por tanto su interferencia en la lectura.

b. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDIDA DEL INDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)

- Curva de calibrado: se prepara a partir de la disolución madre de ácido gálico de 0.5 g/L, tomando volúmenes de 10, 20, 30 y 50 mL que se vierten en matraces aforados de 100 mL y se diluyen con agua bidestilada hasta enrase. La concentración de estas disoluciones es de 50, 100, 150 y 250 mg/L respectivamente. De cada una de estas disoluciones se toma 1 mL y se vierte en un matraz aforado de 100 mL, se adiciona a continuación a cada matraz 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de Na_2CO_3 , se agita bien y se diluye con agua hasta enrase. Se deja reposar la disolución durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro a 725 nm, empleando agua bidestilada como blanco. Se representa la absorbancia frente a la concentración [Figura 1].

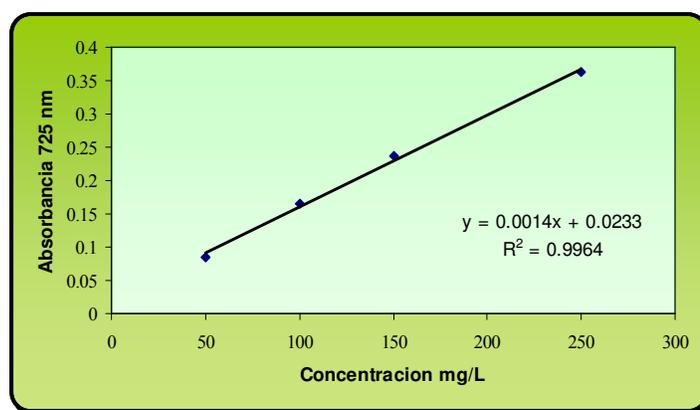


Figura 1: Curva de calibrado de polifenoles totales.

- Preparación de la muestra: se pesa con exactitud 15g de aceite. Se adicionan 20 mL de hexano para favorecer la solubilización completamente. La mezcla se transfiere a una ampolla de decantación. Para realizar la extracción de los polifenoles del aceite, se adiciona un volumen total de 50mL fraccionado en tres volúmenes con una mezcla de MeOH:H₂O

(40:60) (v/v). Se agita suavemente para evitar la formación de emulsiones. Se extraen las tres fases acuosas que contienen los compuestos fenólicos, que se transfieren a un matraz de 50 mL, se adiciona la mezcla de metanol: agua hasta enrase. Se toma 1 mL y se adiciona 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de Na_2CO_3 al 20%, se enrasa con agua bidestilada y se deja en reposo durante 30 min, a continuación se realiza la lectura a 725 nm. La medida de la absorbancia en las mismas condiciones que con la recta de calibrado permite conocer la concentración de polifenoles totales, por extrapolación en la recta. Los resultados se expresan como ácido gálico en mg /L.

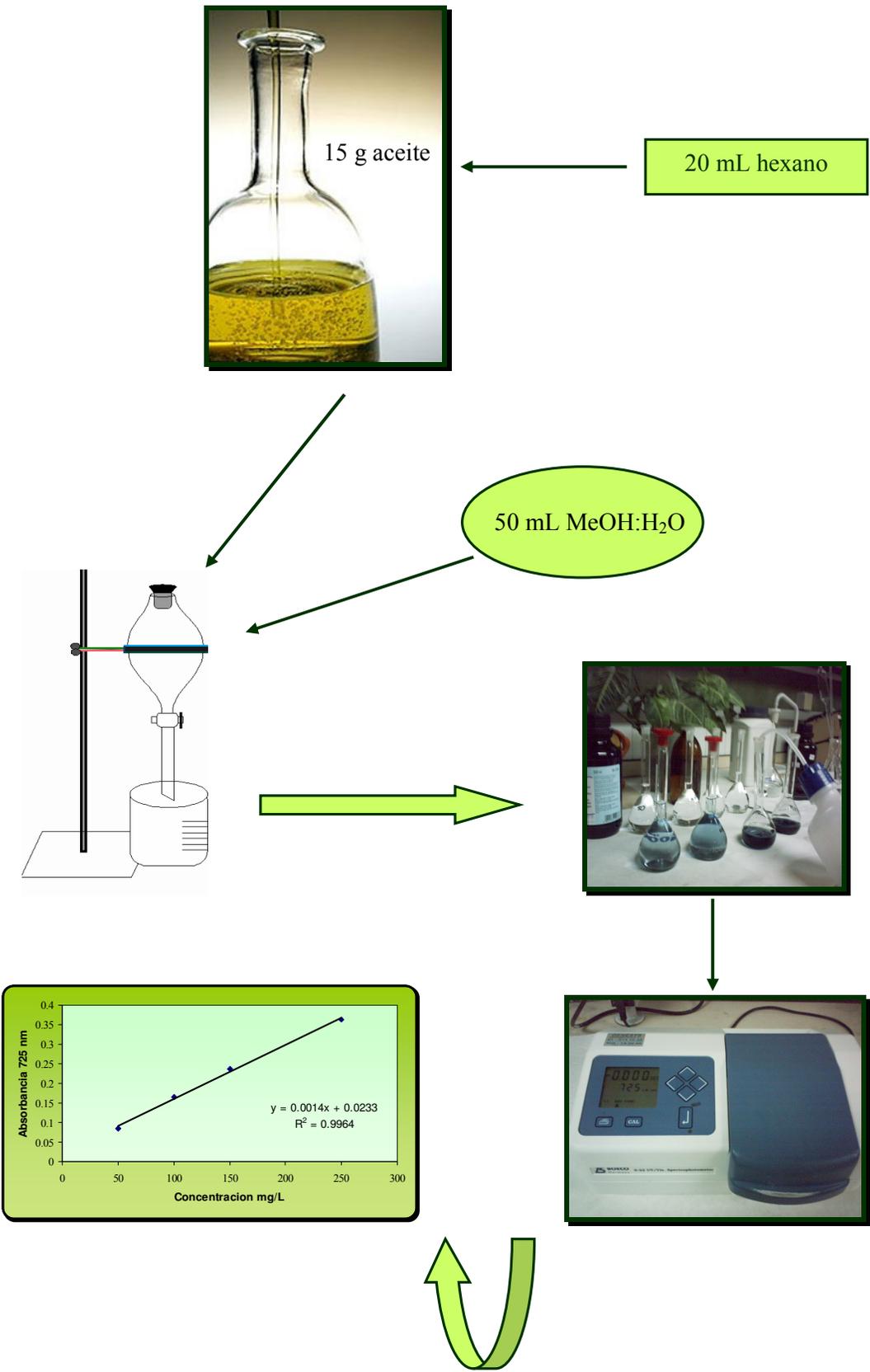


Figura 2: Esquema analítico para la determinación del IPT

1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1 Determinación de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la fracción insaponificable de las muestras estudiadas. El valor oscila entre 1.002 % y 1.291 %, en el total de las campañas analizadas. Para comparación de los resultados de la determinación de la fracción insaponificable en las muestras de aceite de oliva virgen extra, se realizó un análisis de los parámetros estadísticos: media aritmética, desviación estándar (S.D), valor máximo y mínimo por campaña y el error relativo o coeficiente de variación (CV %).

	Muestra	% Insaponificable	Muestra	% Insaponificable	Muestra	% Insaponificable		
Campana 2003-2004	1	1.291 ± 0.07	Campana 2002-2003	1	1.277 ± 0.03	Campana 2001-2002	1	1.170 ± 0.10
	2	1.154 ± 0.10		2	1.295 ± 0.05		2	1.198 ± 0.08
	3	1.183 ± 0.03		3	1.179 ± 0.04		3	1.187 ± 0.02
	4	1.030 ± 0.03		4	1.041 ± 0.06		4	1.161 ± 0.05
	5	1.330 ± 0.04		5	1.184 ± 0.06		5	1.157 ± 0.03
	6	1.211 ± 0.15		6	1.033 ± 0.04		6	1.222 ± 0.06
	7	1.099 ± 0.01		7	1.089 ± 0.09		7	1.135 ± 0.08
	8	1.110 ± 0.04		8	1.11 ± 0.05		8	1.114 ± 0.09
	9	1.189 ± 0.03		9	1.238 ± 0.04		9	1.196 ± 0.10
	10	1.098 ± 0.03		10	1.267 ± 0.12		10	1.320 ± 0.04
	11	1.125 ± 0.13		11	1.065 ± 0.04		11	1.247 ± 0.03
	12	1.232 ± 0.07		12	1.072 ± 0.13		12	1.163 ± 0.15
	13	1.002 ± 0.10		13	1.111 ± 0.07		13	1.094 ± 0.05

Tabla 1: Resultados de la fracción insaponificable total en las muestras de aceite de oliva virgen estudiadas.

Campana	n	Media	S.D	Máximo	Mínimo	CV %
2003-2004	13	1.158	0.09	1.33	1.00	7.77
2002-2003	13	1.150	0.09	1.30	1.09	7.82
2001-2002	13	1.181	0.05	1.09	1.32	4.23

Tabla 2: Resultados por campañas del contenido en insaponificable.

Estos aceites se encontraban dentro de la normativa europea vigente en el momento en que se realizaron los análisis (Reglamento CEE nº 2568/91), que establecía un valor para el aceite de oliva virgen de la materia insaponificable, no superior al 1.5 %. En la actualidad, el Reglamento (CE) nº 1989/2003, que modifica al anterior, no altera este valor del contenido en materia insaponificable en un aceite de oliva virgen, de manera que los aceites presentan un contenido dentro del límite legal permitido, y se consideran aceites de oliva vírgenes extra. Esta fracción es la que marca la gran diferencia de los aceites de oliva vírgenes con el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva, ya que estos están formados en su gran mayoría por aceites refinados, y al pasar por refinería la gran parte de la fracción insaponificable es destruida por los procesos que sufre en ella.

Es muy escasa la bibliografía encontrada, que cuantifique de forma global el contenido de la fracción insaponificable en el aceite de oliva virgen. Se emplean métodos analíticos específicos para cuantificar los componentes minoritarios que forman esta fracción y que son de elevado interés por las funciones biológicas que presenta (escualeno, vitamina E, β -caroteno etc.) (*Jiménez et al., 1996; Cert et al., 1997; Lecker et al., 2000; Giacometti et al., 2001; Fourati et al., 2002; Lazzez et al., 2002; Dell' Agli et al., 2002*)

Un trabajo publicado en el 2004, evaluó in vitro, la influencia que la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen tiene en la producción de eicosanoides y óxido nítrico por las células endoteliales, presentando un efecto beneficioso sobre la función endotelial por descenso en la biosíntesis de eicosanoides proinflamatorios y vasoconstrictores (*Perona et al., 2004*).

Los componentes minoritarios que forman parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva, incluye más de 250 compuestos químicos (*Servili et al., 2002, Carrasco-Pancorbo et al., 2005*), son importante no sólo por mejorar la calidad y palatabilidad del aceite (aroma, color, flavor etc.) (*Mataix et al., 1988; Mariani et al., 1993; Mataix, 1993*), sino también por los efectos beneficiosos que estos aportan a la salud humana (sustancias antioxidantes, hipocolesterolemiantes, aporte de vitaminas, etc.) (*De la Puerta et al., 2000; Mataix, 2002*).

1.2.2. Estudio del contenido en Ceras del Aceite de Oliva Virgen Extra

El análisis realizado se llevo a cabo siguiendo el Reglamento (CEE) n° 183/93 de la Comisión, de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

La mayoría de los trabajos publicados basados en la determinación en aceites de oliva virgen extra del contenido en ceras, emplean la técnica descrita por nosotros. Existen pequeñas modificaciones en cuanto al proceso de obtención de la muestra a inyectar en el cromatógrafo de gases, utilizando diferentes disolventes de elución, patrón interno, y condiciones operativas en la cromatografía que varían en función de las características de la columna y del cromatógrafo de gases a fin de obtener una adecuada separación de las ceras, satisfactoria resolución de los picos y óptima retención del patrón interno de 18 ± 3 minutos (*COI/T.20/Doc.n°18. 2003*).

Nota y col. diseñaron un nuevo procedimiento para determinar el contenido en ceras en aceites de oliva virgen extra, aceites de oliva virgen y aceites de oliva, en un intento de mejorar el método propuesto por el Reglamento (CE) 183/93, que es más laborioso y emplea un elevado tiempo en la preparación de la columna cromatográfica y en la elución de las muestras. La técnica descrita emplea una columna de gel de sílice disponible comercialmente, lo que reduce el tiempo de análisis y la cantidad de sílica gel utilizado, emplea como solvente de elución el tetracloruro de carbono, que favorece la separación completa entre la fracción de las ceras y la fracción de triglicéridos, y al ser un único solvente evita cambios en la polaridad que puede darse al emplear una mezcla, así se eliminan todos los posibles riesgos cromatográficos. El disolvente de elución descrito en el Reglamento (CE) (n-hexano/éter dietílico), se caracteriza por una cantidad crítica de éter que puede conllevar a una incompleta separación de ambas fracciones si la cantidad añadida se incrementa o reduce en proporciones insignificantes. En general el método propuesto por Nota y col. mejora el descrito en el Reglamento (CE) y empleado en la

memoria, ya que a las ventajas antes descritas se une una reducción en el tiempo de análisis, desde 3 horas a 40 minutos y una disminución en la cantidad de muestra analizada de 500 mg, empleado por nosotros, a 20 mg. En el análisis cromatográfico, las condiciones empleadas han sido similares sólo difiriendo en el uso de una columna capilar con mayor polaridad.

En conclusión, el método descrito obtiene resultados similares a los obtenidos con la técnica descrita en el Reglamento, pero este procedimiento es más fácil de usar, más rápido y más exacto (*Nota et al., 1999*). Presenta como inconveniente la elevada toxicidad en humanos del solvente empleado, muy limitado su uso hoy en día. Trabajos publicados posteriormente, emplean para la elución la mezcla propuesta en el Reglamento (*Ranalli et al., 1999*) o la mezcla de hexano- tolueno (*Pérez- Camino et al., 2003*).

En 1993, Amelio y col. emplearon para la separación de las ceras en aceites de oliva, la cromatografía líquida (LC), e intentaron reemplazarla por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando como solventes una mezcla de hexano/etanol, obteniendo buenos resultados comparándolos con el método tradicional. En 1998, se perfeccionó la técnica favoreciendo la separación conjunta de las ceras, isómeros del escualeno y estigmastadienos (*Amelio et al., 1993; 1998*).

Se emplea como patrón interno Laurilaraquidato C-32, que impide que interfiera en el análisis cromatográfico con otros componentes, este patrón es ampliamente usado en todos los trabajos consultados (*Nota et al., 1999; Ranalli et al., 1999; COI/T.20/Doc.n°18. 2003; Pérez- Camino et al., 2003*), y es posible también utilizar palmitil palmitato o miristil estearato.

Para controlar visiblemente la correcta elución de las ceras, se añade a la mezcla de elución Sudan I. El colorante tiene una retención intermedia entre las ceras y triglicéridos, por lo tanto, cuando la coloración alcanza el fondo de la columna cromatográfica hay que suspender la elución, al haberse eluido todas las ceras.

Pérez- camino y col, emplearon la mezcla de hexano- tolueno como solvente de elución en la columna de gel de sílice, para favorecer la eliminación de la fracción hidrocarbonada presente en el aceite de oliva (mayoritariamente escualeno). La primera fracción obtenida (7mL aprox.) se rechaza, y la segunda fracción es la que se analiza por contener aldehídos, ceras y una cantidad residual de escualeno que no interfiere en el análisis realizado (Pérez- Camino *et al.*, 2003).

Se emplea en el ensayo cromatográfico hidrógeno como gas portador, aunque algunos autores utilizan el helio (Nota *et al.*, 1999), y las muestras diluidas en heptano.

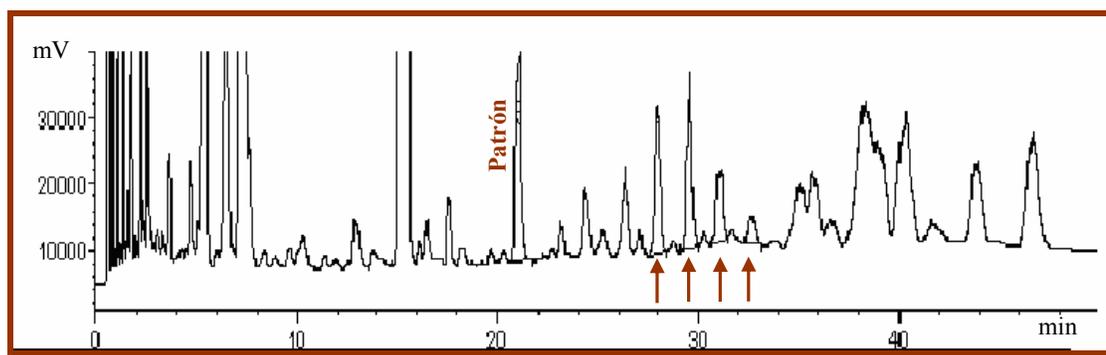


Figura 1: Cromatograma de la fracción de ceras de una muestra de aceite de oliva virgen extra por CG.

Los componentes a cuantificar son los correspondientes a los picos con número de carbono par comprendidos entre los ésteres C40 y C46, como se muestra en el cromatograma de las ceras del aceite de oliva [Figura 1].

En los aceites de oliva las ceras más frecuentemente encontradas son las de C40- C46, y su determinación se emplea como parámetro para evaluar su calidad, estando regulado su contenido en valores máximos de 25mg/ 100g para evitar adulteraciones por mezcla con aceites de orujo de aceituna y/o aceites lampantes (Mataix *et al.*, 2001).

A continuación se muestra el contenido en ceras en las muestras de aceite de oliva virgen extra, correspondiente a las tres campañas de nuestro estudio. Para comparación de

los resultados de la determinación de ceras en las muestras de aceite de oliva virgen extra, se realizó un análisis de los parámetros estadísticos: media aritmética, desviación estándar (S.D), valor máximo y mínimo por campaña y el error relativo o coeficiente de variación (CV %).

Campaña	n	Media	S.D	Máximo	Mínimo	CV %
2003-2004	13	62.80	11.52	87.30	55.50	18.3
2002-2003	13	66.40	11.64	95.50	50.60	17.5
2001-2002	13	76.29	10.20	92.30	53.20	13.3

Tabla 1: Resultados por campañas del contenido en ceras de las muestras de aceite de oliva virgen extra estudiadas.

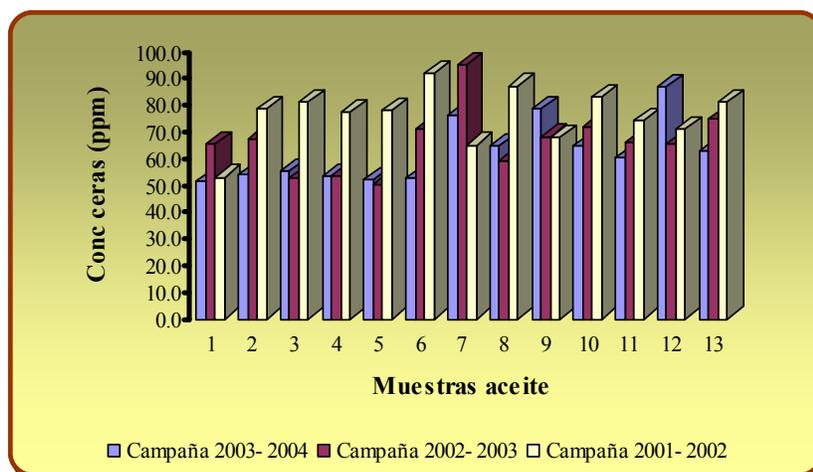


Figura 2: Concentración de ceras en aceites de oliva virgen extra de las tres campañas estudiadas.

La normativa vigente en el momento del análisis (Reglamento CEE nº 2568/91), establecía un valor de contenido en ceras para aceites de oliva vírgenes, inferior o igual a 250 mg/kg. En la actualidad el Reglamento (CE) nº 1989/2003, que modifica al anterior, mantiene dicho valor en el contenido de ceras, de manera que los aceites presentan un contenido en ceras dentro del límite legal permitido, y se consideran aceites de oliva vírgenes extra.

En las muestras estudiadas los valores de ceras encontradas en la campaña 2003-2004 oscilan entre 51.5 ppm y 87.3 ppm, entre 50.6 y 95.5 ppm en la segunda campaña y entre 53.2 y 92.3 en la primera campaña, correspondiente a 2001- 2002.

Los valores son muy similares y comparables a los encontrados en la bibliografía para aceites españoles e italianos, 94 mg/ kg (*Nota et al., 1999*), 31- 95 mg/ kg (*Ranalli et al., 1999*), 27- 185 mg/ kg (*Pérez- Camino et al., 2003*).

Algunos autores han estudiado la influencia del método de extracción en la determinación de ceras, conjuntamente a otra serie de parámetros: acidez, índice de peróxidos, k_{232} , k_{270} etc., relacionados directamente con la calidad del aceite de oliva virgen extra. El estudio se realizó en aceites italianos de la variedad Leccino, Coratina y Dritta, y los resultados mostraban un descenso en el valor de todos los parámetros descritos si el sistema de extracción era por centrifugación, en comparación al sistema de percolación. El contenido en las ceras oscilaba desde 112 a 95, 46 a 31 y 77 a 57mg/ kg, para las variedades Leccino, Coratina y Dritta respectivamente, comprobando que el aceite procedente de la 1ª extracción es más rico en las ceras C40- C46. El fenómeno es debido a la presencia de estas sustancias en la cutícula externa de la fruta verde (*Ranalli et al., 1999*).

El contenido en ceras puede ser “inducido” por fenómenos térmicos durante el proceso de extracción del aceite por una mala separación de orujos (*Boskou et al., 1998*), o debido al empleo de altas temperaturas en el amasado. Si el incremento es debido a un “mal trabajo” de la pasta de aceituna, la determinación debería ir acompañada por acidez y alcoholes.

Son muchos los estudios que relacionan el aumento de contenido de ceras en el aceite, con el aumento de la temperatura durante el almacenamiento (*García et al., 1996; Mariani et al., 1996*). Así, las ceras experimentan un gran aumento por encima de 20 °C, por lo que es recomendable, almacenar los aceites a temperaturas inferiores. Puede suceder que el aceite expuesto a temperaturas menores de 8 °C, y envasado en botellas transparentes

durante un tiempo prolongado adquiriera un aspecto “opaco” o aparezcan copos y esto puede deberse, bien a concentraciones altas de ácido palmítico que se solidifica en el centro de la botella dando un aspecto turbio al aceite, fenómeno que desaparece cuando el aceite se expone a altas temperaturas, o bien a la presencia de ceras, la deposición, en este caso es en la base en forma de precipitado y en las paredes del envase; una vez que solidifican es más difícil que vuelvan a formar parte de la masa oleosa. Es común que ambas manifestaciones se den en el aceite de oliva cuando se expone a bajas temperaturas ya que todos los aceites contienen ácido palmítico en su composición de ácidos grasos y pequeñas concentraciones de ceras.

La aparición de ceras se incrementa durante el almacenamiento prolongado dependiendo de, el tipo, material constructivo, temperatura y situación del depósito, a la intemperie o en bodegas a temperaturas controladas (*Mariani et al., 1996*)

Se observó que el empleo de nitrógeno, como gas sustitutivo del aire en los espacios inertes disminuye la concentración de ceras, lo que puede estar relacionado con la disminución de oxígeno y por tanto, de los fenómenos oxidativos.

Christopoulo y col. estudian los efectos del tiempo y condiciones de almacenamiento (luz, oscuridad y nevera) en los diferentes tipos de aceite de oliva, concluyendo que al final del periodo el contenido en ceras es proporcional al de alcoholes totales, que la acidez baja se corresponde con ceras bajas en el aceite de oliva virgen y que la temperatura es el principal factor que influye en el contenido de ceras en el aceite (*Christopoulo et al., 1997*). Un estudio realizado entre 1997 y 1999 sobre el efecto del tiempo y temperatura sobre el aceite de oliva obtenido de variedades italianas, demostró el progresivo incremento del contenido total en ceras con el paso del tiempo y a elevadas temperaturas (*Paganuzzi et al., 1997; 1999*).

El contenido en ceras varía también en función a la variedad de aceites de oliva, obtenidos por presión y centrifugación, siendo ligeramente superior en los aceites

obtenidos por presión y aumenta la formación de ceras cuando se realizan varios procesos de centrifugación consecutivos (*Ranalli et al., 1996; Alba et al., 1996*).

En general, la presencia de ceras no altera las propiedades del aceite ni le confiere características desagradables desde el punto de vista nutricional. Si se hallan dentro de los límites establecidos en la norma del código alimentario, su presencia no debe ser considerada un defecto sino el resultado de fenómenos térmicos que afectan momentáneamente al producto. Aun así, se recomienda el almacenamiento de las muestras de aceite a temperatura inferior a los 20° C, ausencia total de luz y de oxígeno.

1.2.3. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra. Determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales.

Los análisis realizados tienen como finalidad caracterizar la fracción fenólica de estos aceites, mediante identificación y cuantificación de los polifenoles presentes. El ensayo colorimétrico basado en la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, es el más usado para la determinación cuantitativa de los polifenoles totales del aceite de oliva (*Singleton et al., 1965; Gutfinger et al., 1981*). El método consiste en una calibración con un compuesto fenólico puro (ácido gálico), la extracción de los fenoles de la muestra y la medida de la absorbancia después de la reacción generadora de color. El ácido gálico es el compuesto puro, empleado mayoritariamente, al encontrarse en elevada proporción, por muchos autores. Se emplea este ensayo por su simplicidad y rapidez en el análisis (*Blekas et al., 2002*).

El principal inconveniente de estos métodos es su baja especificidad, que puede llevar incluso a la aparición del color sin que exista ninguna reacción con el grupo hidroxilo del compuesto fenólico, que induce a error en los resultados, sobreestimando la cantidad de fenoles presentes. Cualquier sustancia capaz de reducir el complejo fosfotúngstico-fosfomolibdénico podría interferir (*Matthaus., 2002; Obied et al., 2005*). Además, este método responde de manera diferente a los distintos fenoles (*Escarpa et al., 2001*), por lo que los datos de esta medida del conjunto de polifenoles no deben considerarse como resultados absolutos. Así, muestras con un contenido fenólico total muy similar, pero muy variable en cuanto a su composición fenólica, presentan diferente respuesta en el método colorimétrico.

El método original fue descrito por Folin y Denis en 1912, empleando en el proceso el reactivo Folin-Denis (*Folin et al., 1912*), aunque presentaba ciertos inconvenientes y posibles errores. Dependiendo de la temperatura de trabajo y de otros factores, el color azul generado por la reacción se mantenía o desaparecía transcurrido los 30 minutos, dando

lugar a resultados erróneos, lo que dificultaba la realización del análisis cuando se trabajaba con un amplio número de muestras. Por ello, se investigó para desarrollar un nuevo procedimiento que evitara dichos inconvenientes, empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu que producía soluciones menos turbias y reduce el tiempo de reacción (*Folin et al., 1927*). El reactivo Folin-Ciocalteu contiene un mayor contenido de molibdato, aumentando la sensibilidad a la reducción en comparación al reactivo Folin-Denis. El compuesto generado es azul y se detecta fácilmente con el espectrofotómetro en el intervalo de 500- 750 nm.

Montedoro y col. estudiaron la influencia de diferentes solventes (metanol al 60%, 80% y 100%) en la extracción de los compuestos fenólicos en el aceite de oliva y en mezclas del aceite con diferentes solventes (hexano, éter de petróleo, cloroformo). Los mejores resultados se obtuvieron al emplear metanol/agua (80: 20 v/v) (*Montedoro et al., 1992*).

Los métodos enzimáticos también son muy adecuados para medir la cantidad total de fenoles y se caracterizan porque son más sencillos y rápidos que el Folin-Ciocalteu y que las técnicas cromatográficas (*Huang et al., 2005; Prior et al., 2005*), presentando una mayor estimación en los resultados que el método colorimétrico. Se demostró la existencia de una relación lineal entre el contenido polifenólico de los aceites de oliva y su capacidad antioxidante, al emplear estos métodos (*Mosca et al., 2000*).

Escarpa y col. cuantificaron el contenido en polifenoles totales en diferentes tipos de muestras, comparando un método cromatográfico (HPLC) y el tradicional análisis por espectrofotometría, en un intento de minimizar las desventajas analíticas asociadas a la técnica de Folin-Ciocalteu, principalmente la falta de especificidad del método que lleva a una sobreestimación de los resultados finales (*Escarpa et al., 2001*).

El empleo de la técnica de HPLC para determinar los polifenoles totales se basa en la suma de los picos de manera individual, usando curvas de calibración ó factores de respuesta, estándares comerciales y distintas longitudes de onda. Las limitaciones de esta

técnica para cuantificar polifenoles totales se deben a la complejidad de los cromatogramas de HPLC y al elevado solapamiento de los picos.

Un trabajo publicado recientemente, describe un nuevo método electroquímico como alternativa a la técnica tradicional por espectrofotometría, con una elevada especificidad, para cuantificar el contenido total polifenólico. Este método genera una reacción electroquímica basada principalmente en la oxidación del grupo alcohol (-OH) de los polifenoles a cetona (-C=O). Concluyen que el método electroquímico propuesto puede ser una buena alternativa en la determinación de los polifenoles totales; es una técnica rápida, fácil, de elevada precisión y ampliamente aplicable a diferentes alimentos (*Blasco et al., 2005*). En 2003, Pignatelli empleo un análisis electroquímico, no sólo para determinar el contenido polifenólico total sino también para medir el poder antioxidante de la fracción fenólica en aceites (*Pignatelli, 2003*).

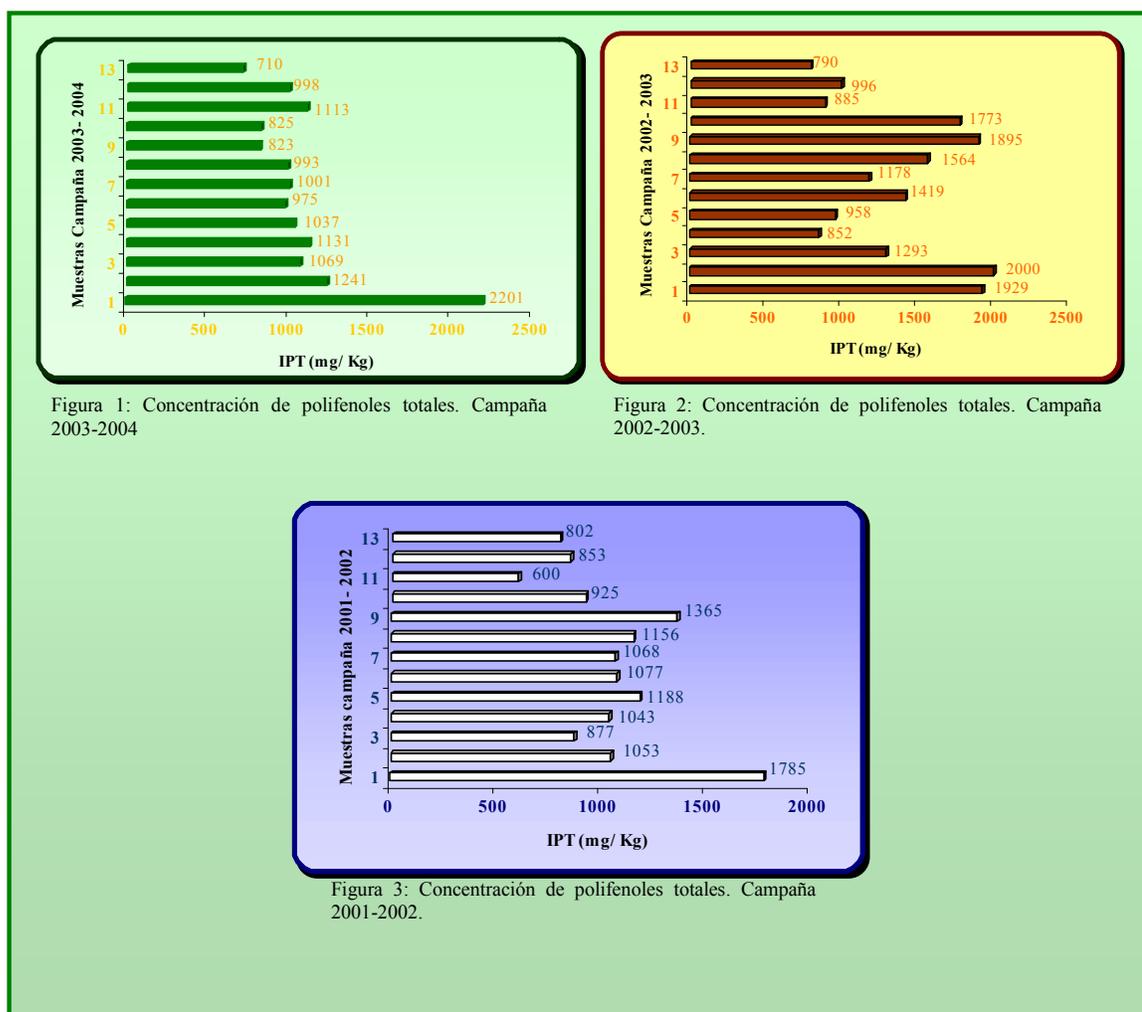
En este estudio se ha empleado el método de Folin-Ciocalteu por ser el método de cuantificación más común y más encontrado en bibliografía para polifenoles totales en el aceite (*Montedoro et al., 1992; Capannesi et al., 2000; Blekas et al., 2002; Finley et al., 2005; Georgé et al., 2005; Huang et al., 2005; Prior et al., 2005; Schoefs et al., 2005*).

Muchos trabajos correlacionaron el contenido polifenólico con los diferentes métodos de medida de la capacidad antioxidante, en aceites y en otros alimentos (*Gorinstein et al., 2003; Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2006*) conjuntamente a los resultados estadísticos, que se describirán en el capítulo 3 de la presente memoria. El contenido fenólico contribuye a la actividad antioxidante y por ello la importancia del contenido fenólico total o individual en la estabilidad de los aceites de oliva (*Tsimidou et al., 1998; Aparicio et al., 1999; Beltrán et al., 2000; Salvador et al., 2001; Del Carlo et al., 2004*). En conclusión, la actividad antioxidante es proporcional al contenido fenólico.

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (*Capannesi et al., 2000; Escarpa et al., 2001; Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2006*), ácido cafeico (*Blekas et al., 2002; Gómez-alonso et al., 2002; Gorinstein et al., 2003; Tsimidou et al.,*

2005), ácido tánico ó tirosol. El ácido gálico es el más empleado en la bibliografía, como compuesto de calibración en la determinación de polifenoles totales, y el utilizado por nosotros.

A continuación se muestra el contenido de polifenoles totales expresados en mg de ácido gálico/ Kg [Figura 1-3].



La concentración media de la campaña 2003-2004 ha sido 1085.92 ± 363.69 mg ácido gálico/Kg aceite (n=13); en la campaña 2002-2003 1348.61 ± 430.20 mg ácido gálico/Kg aceite (n=13) y en la campaña 2001-2002 1060.92 ± 291.21 mg ácido gálico/Kg aceite (n=13).

Para la comparación de los resultados de los aceites obtenidos en las diferentes campañas olivareras, se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) no encontrando diferencias significativas entre los aceites obtenidos en años consecutivos.

Los valores normales de polifenoles totales en el aceite de oliva virgen pueden variar desde 50 hasta 800 mg/Kg.

La variedad de aceituna (*Brenes et al., 1999; De Stefano et al., 1999*), el sistema de extracción empleado (*Angerosa et al., 1996; Gómez-Alonso et al., 2002*), el grado de maduración de la aceituna y las condiciones de almacenaje (*Cinquanta et al., 1997; Okogeri et al., 2002*), son factores que pueden influir en el contenido de polifenoles totales en el aceite de oliva virgen.

La elevada concentración encontrada por nosotros se debe en gran medida, a la variedad de aceituna predominante en esta Denominación de Origen, como es la Picual.

Entre las variedades de aceituna españolas, la Picual, es junto con la Picuda, la de mayor contenido en polifenoles, con unos niveles que suelen oscilar entre los 500 y 1000 mg/Kg (*Mataix, 2001*), 300 a 700 mg/Kg (*García et al., 2002*). Gómez-Alonso y col. cuantificaron el contenido polifenólico total en aceites de oliva virgen obtenidos de la variedad Cornicabra, que junto a la variedad Picual, es muy rica en compuestos polifenólicos (*Gómez-Alonso et al., 2002*). El contenido total de polifenoles en aceites de oliva griegos oscilaba entre 180 y 210 mg ácido gálico/ Kg de aceite (*Valavanidis et al., 2004*).

Se sabe que la concentración de polifenoles totales en aceites, determinada por métodos colorimétricos, disminuye con la maduración (*Uceda et al., 1997, Gutiérrez et al., 1999; Brenes et al., 2000a*), ya que durante la maduración se producen una serie de cambios que afecta al perfil polifenólico. En el 2003, Skevin y col. publicaron un trabajo basado en la disminución en la concentración total de polifenoles y *o*-difenoles, al incrementarse el grado de maduración de la aceituna (*Skevin et al., 2003*).

En nuestro estudio, se comparó el contenido polifenólico total en muestras obtenidas al principio de la campaña con las obtenidas en los últimos meses, que tienen un mayor grado de maduración. Se observó que las concentraciones de polifenoles disminuían de forma significativa (t de Student para muestras relacionadas ($p < 0.001$) al aumentar el grado de la maduración de la oliva. Se comprobó dicho descenso, al año siguiente con aceites obtenidos en diferentes etapas de la campaña. Se realizó el estudio con las muestras que tenían una mayor concentración en polifenoles totales.

Campaña 2001-2002			Campaña 2002-2003		
Muestra	Nov-Dic	Febrero	Muestra	Nov-Dic	Febrero
1	1785 ± 35.35	910 ± 40.54	1	1929 ± 114.55	965 ± 34.98
5	1188 ± 45.25	705 ± 65.13	2	2000 ± 18.38	1003 ± 76.98
9	1365 ± 94.75	694 ± 21.90	9	1895 ± 36.76	895 ± 45.89
Media ± S.D	1446 ± 306.63	769 ± 121.65	Media ± S.D	1941 ± 53.57	954 ± 54.78

Tabla 1: Polifenoles totales. Concentración de polifenoles totales (expresados como mg ácido gálico / Kg de aceite), valor medio y desviación estándar, al principio de la campaña y en los últimos meses.

Se comprueba, que en los aceites obtenidos de aceitunas con mayor grado de maduración, el contenido total se reduce casi en un 50%.

Existen muchas variables que influyen en el contenido total polifenólico del aceite de oliva: el tipo de sistema empleado en la extracción, variación de temperatura, tiempo de batido y el grado de dilución de la pasta de aceituna. Gómez-Alonso y col. demostraron que no existía diferencia significativa, en el contenido polifenólico total en aceites de la variedad Cornicabra, obtenidos por el sistema bifásico en comparación al empleo del sistema de tres fases, caracterizado por incorporar un % de agua a la pasta de aceituna, aunque si se observó que el contenido total es mayor en los aceites extraídos con el sistema bifásico (Gómez-Alonso *et al.*, 2002). En muchos trabajos publicados no se encontró diferencias significativas en cuanto al contenido en polifenoles totales, en aceites obtenidos con uno u otro sistema (Angerosa *et al.*, 1996; Salvador *et al.*, 1998). Jiménez y col.

observaron que cuanto mayor era la temperatura y cantidad de agua, el aceite obtenido era de menor estabilidad, con un contenido más bajo en polifenoles y menos amargo.

Se realizó un estudio en aceites de oliva vírgenes almacenados en ausencia y presencia de luz, observando los cambios que podían existir en diversos parámetros de calidad de los mismos, Okogeri y col. comprobaron que en presencia de luz existe un descenso del 45% en el contenido total polifenólico en aceites almacenados durante 4 meses, si el almacenaje es en ausencia de luz el descenso es de 39-45% en 6 meses y del 50-62% a los 12 meses (*Okogeri et al., 2002*). Otros autores, concluyeron que el descenso en el contenido total en aceites obtenidos de aceitunas Picual, almacenado durante 2 años en condiciones adecuadas, ha sido del 30% y esta ligera disminución se debe principalmente a la elevada concentración en ácido oleico que tienen dichos aceites (*García et al., 2002*).

2. ESTUDIO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.1. Estudio del contenido en Escualeno del aceite de oliva virgen extra.

MATERIAL

- **Muestras**

Las muestras analizadas para determinar el contenido en escualeno, son aceites de Oliva Virgen Extra pertenecientes a las campañas olivareras 2001-2002, 2002-2003 y 2003-2004, obtenidos por el sistema bifásico de extracción. Algunas muestras de aceite del periodo 2003-2004 se obtuvieron por un proceso de molturación bajo patente, basado en un efecto de laceración ejercido por un sistema de rodillos, que facilita la extracción del aceite sin formación de emulsiones y evita la pérdida de determinados componentes sensoriales y nutricionales del aceite de oliva virgen. La extracción de todas las muestras se realizó por triplicado.

- **Reactivos**

Los reactivos utilizados para la cuantificación del escualeno son descritos a continuación [Tabla 1, 2]:

Tabla 1. Standard de referencia

Nombre	Proveedor
Squalene 98% (2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosanexoeno) 100mL	Sigma (Madrid, España)

Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de la muestra

Nombre	Proveedor
n-Hexano	Panreac
Metanol	Panreac
Potasio Hidróxido 85%	Panreac
Agua bidestilada desionizada	Sistema Milli-Q de Millipore. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia)
Etanol Absoluto	Panreac
Nitrógeno comprimido	Air-liquide, Alpha Gaz (Madrid, España)
Hidrógeno comprimido	Air-liquide, Alpha Gaz

- **Instrumentación**

La instrumentación empleada en la determinación del escualeno en las muestras descritas, se detalla a continuación:

1. Cromatógrafo de gases:

- Perkin- Elmer Autosystem (HP 5890), con sistema inyector estándar y detector de ionización de llama (FID).
- Columna capilar SGL-5, 50 m de longitud, 0.32mm de diámetro interno y 0.1 μ de espesor. SUGERLABOR S.A (Madrid, España).
- Microjeringa 5 μ L. Hamilton.

2. Instrumentación y Material de laboratorio

- Tubo de ensayo T. Rosca SVL C.40, 22 x 200 M (Sigma- Madrid).
- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Vortex Reax Control. Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Micropipetas Transferpette[®], de 100, 200,500 y 1000 μ L, Brand, (Alemania)
- Pipetas Pasteur 2mL, 150 mm, Pobel (Madrid, España)
- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo)

MÉTODO

• Fundamento

Se emplea un método rápido para la determinación de escualeno en los Aceites de Oliva Virgen Extra, hidrocarburo triterpénico saturado con seis dobles enlaces [Fig.1], que es el más abundante en el aceite de oliva (más del 90 %) (*Aguilera et al., 2005*) y por tanto el de mayor proporción en la fracción insaponificable (*Mataix et al., 2001*), hasta el 40% en peso (*Kiritsakis et al., 1992*). Ampliamente distribuido en la naturaleza con una alta proporción en el aceite de oliva en comparación con otros aceites vegetales.

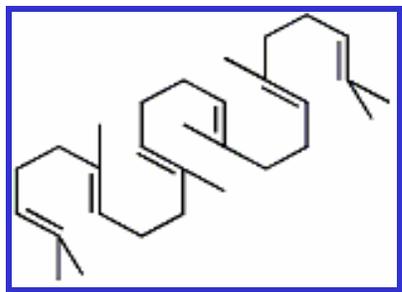


Figura 1. Estructura química del escualeno

El método analítico descrito por Lanzón y col. en 1995, ha sido puesto a punto en la presente memoria para cuantificar de forma sencilla y rápida el escualeno en las muestras de aceite descritas. Se realiza una metilación alcalina en frío de la muestra grasa disuelta en hexano y posteriormente se analiza la disolución de hexano por cromatografía gaseosa (*Lanzón et al., 1995*). Esta técnica emplea en la cuantificación de escualeno, el escualano como patrón interno.

En nuestro trabajo se emplea, en el análisis cuantitativo del pico cromatográfico del escualeno, la estandarización externa.

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS (*Lanzón et al., 1995*).

- KOH metanólica 2N: se pesan 13.17g de hidróxido potásico al 85% y se disuelve en 100 mL de metanol.
- Etanol:Agua (1:1): se mezclan volúmenes iguales de ambos reactivos en función de la cantidad necesitada en el análisis.
- Disolución estándar de escualeno en hexano: se parte de una concentración de 1000 ppm (disolución madre) a partir de la cual se preparan las disoluciones de menor concentración.

- b. PROCEDIMIENTO DE SAPONIFICACIÓN Y EXTRACCION

Durante todo el proceso de saponificación y extracción se emplea material adecuado, para evitar en lo máximo posibles alteraciones de la muestra, y se almacenaron hasta su análisis en botellas de vidrio color ámbar, en condiciones óptimas de 4°C en ausencia de luz.

Se emplea la técnica descrita por Lanzón y col. con alguna modificación, (*Lanzón et al., 1995*), para la determinación rápida y sencilla de escualeno en aceites vegetales, muy

semejante a técnicas empleadas por otros autores (*Giacometti et al., 2001*) en publicaciones posteriores, con algunas pequeñas variaciones en los reactivos empleados, pero con procedimientos muy similares.

Se pesa la muestra grasa en tubos con tapón de rosca de vidrio color topacio, con volumen adecuado (aproximadamente 15mL), para evitar pérdidas y alteraciones.

Se adiciona 5 mL de hexano para favorecer la disolución y se agita para homogeneizar la muestra. A continuación se añade 1mL de una solución metanólica de hidróxido potásico 2N, para favorecer la saponificación que permite la hidrólisis de los enlaces éster, la liberación de los ácidos grasos y una mejor separación de la fracción insaponificable que contiene los componentes minoritarios del aceite, incluyendo entre ellos el escualeno, aunque algunos trabajos indican las posibles pérdidas de escualeno durante el proceso de saponificación y extracción, que da lugar a un falseamiento de los resultados (*Lu et al., 2004*).

Se agita vigorosamente durante 1 minuto para favorecer el mezclado y se deja en reposo durante 10 minutos para favorecer la separación de las dos fases, con ayuda de una pipeta Pasteur la disolución de hexano se pasa a otro tubo de iguales características, y se lava repetidamente, con una mezcla de etanol:agua (v/v). Finalmente decantada la disolución de hexano, se inyecta directamente en el cromatógrafo de gases.

- **Método Cromatográfico**

Se emplea la cromatografía en fase gaseosa (CG), en comparación con métodos más laboriosos y antiguos descritos por algunos autores que emplean la cromatografía en capa fina, de la fracción insaponificable obtenida tras someter al aceite a una saponificación, y posterior análisis de los hidrocarburos obtenidos por cromatografía gaseosa (*Bondioli et al., 1993*)

a. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Puesta a punto de la técnica descrita por Lanzón y col. (Lanzón *et al.*, 1995) basada en el análisis de la disolución de hexano obtenida tras la extracción, por cromatografía gaseosa, empleando la técnica de patrón externo (Giacometti *et al.*, 2001). Las condiciones bajo las que se opera son las siguientes:

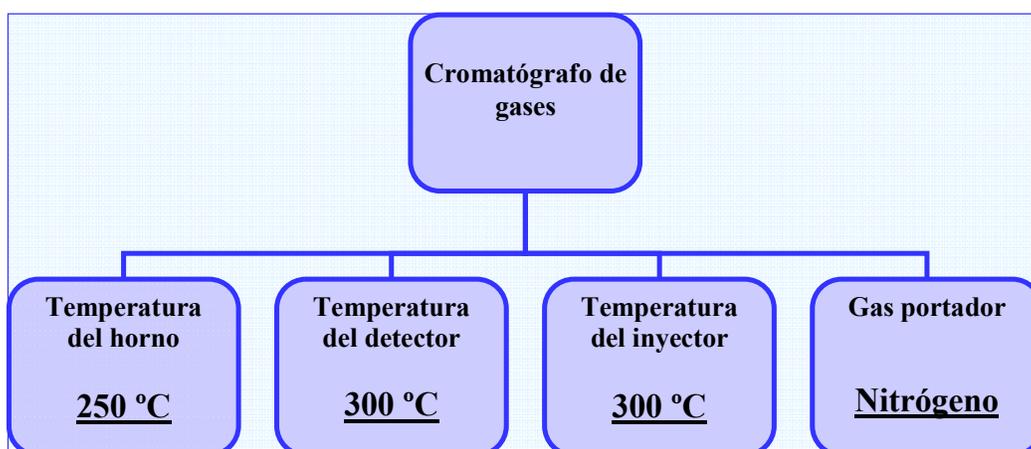
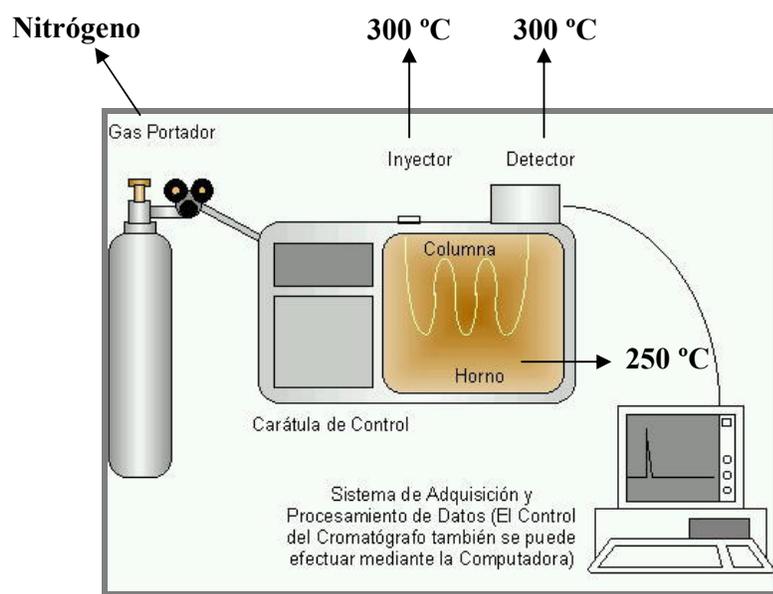


Figura 2: Esquema de las condiciones cromatográficas empleadas en la CG

Las temperaturas descritas se mantienen constantes durante todo el proceso. Se realiza una inyección siempre de 1 μ L, y la duración total de cada análisis es de 15 minutos.

Tras realizar 5 ó 6 inyecciones, se aumentó la temperatura del horno 10°C durante 15 minutos, para limpiar la columna de componentes minoritarios menos volátiles.

b. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACIÓN DEL ESCUALENO

La identificación del escualeno se realizó por igualdad de tiempo de retención entre el patrón y la muestra a analizar, empleando una técnica de identificación no cromatográfica basada en la adición de estándar a las muestras problema, y por lo tanto el incremento en el área del pico cromatográfico correspondiente.

La cuantificación del compuesto se hace en función de la señal de área que da dicho compuesto a la longitud de onda correspondiente y a su máximo de absorbancia en el cromatograma. El análisis cuantitativo del pico cromatográfico se realizó por medio de una estandarización externa, se realiza una recta de calibrado con diferentes concentraciones del patrón cromatográfico puro del escualeno en hexano, empleando concentraciones cercanas al contenido esperado en el aceite, y el área del pico identificado en la muestra se interpola en la ecuación obtenida.

Las soluciones estándar de escualeno en hexano, empleadas en la determinación de dicho componente en las muestras de aceite oscilaron entre valores de 50, 100, 125, 200, 250, 500, 750 y 1000 ppm, todas las medidas se hicieron por triplicado y la recta de calibrado se expresó en mg/ μ L.

Tabla 3: Ecuación recta de calibrado patrón Escualeno

Compuesto	Ecuación ^a	Coefficiente de correlacion (r)
Escualeno	$y = 1 \cdot 10^{-9} x - 1.3 \cdot 10^{-5}$	0.9995

^ay = ax + b, y = concentración del compuesto expresada en mg/ μ L, x = área

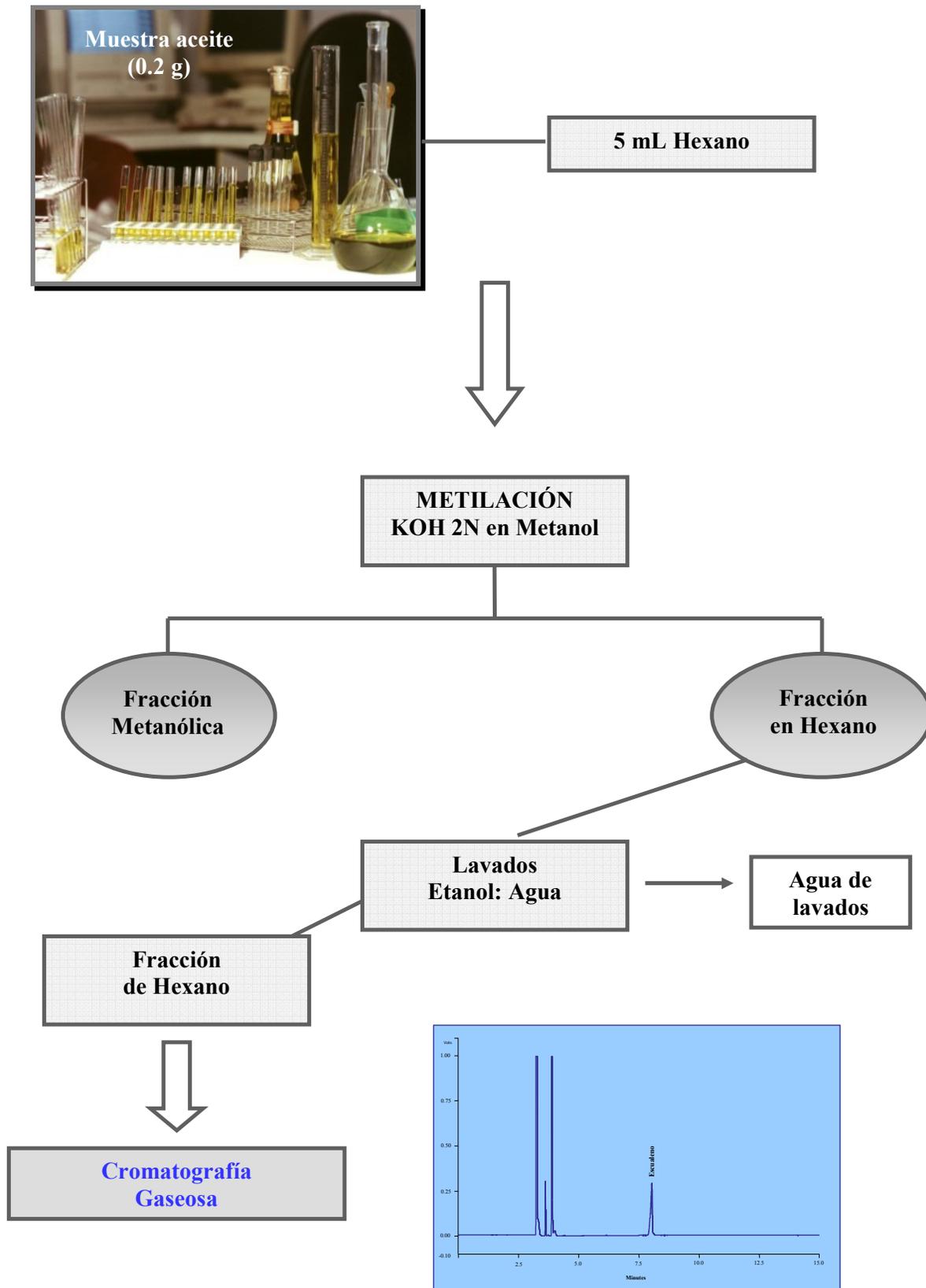


Figura 3: Esquema analítico para la determinación de Escualeno

2.1.2. Estudio del contenido en β -Caroteno del aceite de oliva virgen extra

MATERIAL

- **Muestras**

En el presente estudio se han seleccionado un total de 39 aceites de oliva virgen extra, los mismos analizados en el apartado anterior 2.1, la extracción de todas las muestras se realizó también por triplicado. Todos los aceites se almacenaron a 4°C en ausencia de luz, empleando botellas de vidrio color ámbar hasta su análisis. Las muestras pertenecientes a la campaña 2001-2002, estuvieron almacenadas un año hasta su análisis para la determinación de β -Caroteno, en las condiciones óptimas descritas.

- **Reactivos**

Se detallan a continuación, todos los reactivos empleados en la determinación del β -Caroteno en los aceites de oliva analizados:

Tabla 1. Standard de referencia

Nombre	Proveedor
B-Carotene type II synthetic 25 mg	Sigma- Aldrich (Madrid, España)

Tabla 2. HPLC reactivos

Nombre	Proveedor
Metanol	Panreac (Barcelona, España)
Agua bidestilada desionizada	Sistema Milli-Q de Millipore. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia)
1- Butanol	Panreac

Tabla 3. Reactivos utilizados en la obtención de la muestra

Nombre	Proveedor
L(+) Ácido Ascórbico	Merck
Etanol Absoluto	Panreac
Hidróxido Potásico 85%	Panreac
Agua bidestilada desionizada	Sistema Milli-Q de Millipore. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia)
Metanol	Panreac
Cloruro Sódico para análisis	Panreac
n-Hexano	Panreac
Acetato de Etilo	Panreac
Nitrógeno comprimido	Air-liquide, Alpha Gaz (Madrid, España)

- **Instrumentación**

La instrumentación empleada en la determinación del contenido en β -Caroteno en las muestras descritas, se enumera a continuación:

1. Cromatógrafo líquido de alta eficacia

- Perkin- Elmer, Series 200 equipado con inyector automático, bomba binaria y detector diodo-array (P-E., Madrid, España) y software TotalChrom v6.2 con LCI.
- Columna HPLC Tracer Extrasil ODS2 5 μ m, 15 x 0.4 cm Teknokroma[®] (Barcelona, España)

2. Instrumentación y Material de laboratorio

- Tubo de ensayo T. Rosca SVL C.40, 22 x 200 M (Sigma- Madrid).
- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Baño de agua termostatzado P-Selecta[®] (Barcelona, España).
- Rotavapor 144 Büchi (Suiza)
- Filtros de uso único Osmonics inc, Magna, 0.45 micron, 13mm, 100/ PK.
- Filtros de uso único Osmonics inc, Magna, 0.45 micron, 47mm, 100/ PK.
- Inserto Kimble Chromatography KG33, 0.25 mL, 6mm, Scharlau (Barcelona, España).
- Viales automuestrador 12x32mm, 1.8 mL. Kimble K633. Scharlau
- Vortex Reax Control. Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Mocupipetas Transferpette[®], de 100, 200,500 y 1000 μ L, Brand, (Alemania)
- Pipetas Pasteur 2mL, 150mm Pobel (Madrid, España)
- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo).

3. Tratamiento estadístico de los resultados

- Se ha empleado el programa informático SPSS[®], versión 12.0.

MÉTODO

- **Fundamento**

En la presente memoria se pretende determinar el contenido en β -Caroteno, hidrocarburo tetraterpénico poliinsaturado [Fig. 1], precursor de la vitamina A (*Mataix et al., 2001*), independiente al contenido global de carotenoides existentes en las muestras de aceite de oliva virgen extra analizadas, ó de cada compuesto por separado, como describen muchos autores.

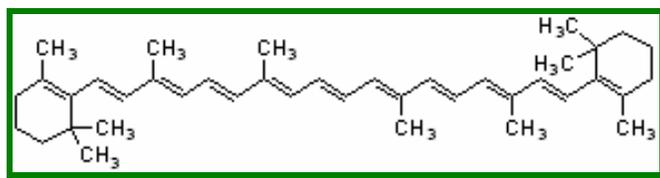


Figura 1. Estructura química del β - caroteno

Se emplea la técnica descrita por Gimeno y col. (*Gimeno et al., 2000*), que permite cuantificar el contenido en β -Caroteno, de forma más rápida y minimiza la cantidad de muestra y solventes empleados, en comparación a otros métodos descritos por otros autores. Emplea en el proceso de saponificación, sustancias antioxidantes que evitan la pérdida de vitaminas liposolubles, y que no interfieren en el análisis cromatográfico (*Kimura et al., 1990; Servili et al., 1996; Escrivá et al. 2002*).

Muchos trabajos describen diversas condiciones para realizar la saponificación, empleando temperaturas y tiempos diferentes (*Romera et al., 1994; Albalá- Hurtado et al., 1997; Sánchez- Machado et al., 2002; Escrivá et al., 2002*).

Se hace mucha referencia a las posibles pérdidas de carotenoides (*Khachik et al., 1986; Kimura et al., 1990*) y las posibilidad de minimizarlas empleando sistemas enzimáticos

(Lietz *et al.*, 1997) ó adicionando sustancias antioxidantes (Servili *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1990; Gimeno *et al.*, 2000;).

Es importante seleccionar los solventes más adecuados, tanto en el proceso de extracción como en el análisis cromatográfico por HPLC, para evitar o minimizar cualquier posible alteración. Según Gimeno y col (*Gimeno et al.*, 2000), se ensayaron muchas solventes como fases móviles en el ensayo cromatográfico, que permitieran la óptima elución de los componentes carotenoides de la muestra.

Se empleó una mezcla de hexano- acetato de etilo, como mejor solvente para favorecer la extracción de la fracción insaponificable y de los componentes carotenoides, en comparación al hexano sólo ó cualquier mezcla de otros.

El metanol es el solvente empleado mayoritariamente en la fase móvil, a pesar de que el β -Caroteno es poco soluble en él, aunque no presenta este inconveniente usado a bajas concentraciones. Es recomendado por muchos autores (*Nierenberg et al.*, 1985; *Epler et al.*, 1992), en comparación con el acetonitrilo, que puede prolongar el tiempo de retención e incrementar la duración del análisis (*Escrivá et al.*, 2002), al igual que el butanol, que permite conseguir la retención deseada e incremento en la solubilidad y selectividad frente a disolventes como el cloroformo, tetrahidrofurano y acetato de etilo.

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS (*Gimeno et al.*, 2000).

- Hidróxido potásico al 76 %: se pesan 89.41g de KOH 85%, y se disuelve en 100 mL de agua desionizada.
 - Cloruro sódico (25 g/L): se pesan 2.5g de NaCl y se disuelven en 100 mL de agua desionizada

- Disolución estándar de β -Caroteno 0.5 mg/mL (disolución madre): se parte de 25 mg de β - caroteno, que se disuelven en 50 mL de metanol. Se tiene una concentración de 0.5 mg/ mL (500 ppm), a partir de la cual se preparan las disoluciones de menor concentración de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 ppm.

b. PROCEDIMIENTO DE SAPONIFICACIÓN Y EXTRACCION

Se usa, en todo el proceso de extracción, material adecuado para evitar al máximo posibles alteraciones de la muestra, que se almacenaron hasta su análisis en condiciones óptimas a 4°C, en ausencia de luz, en botellas de vidrio color ámbar.

Se emplea la técnica propuesta por Gimeno y col. (*Gimeno et al., 2000*), muy similar a la descrita por Manzi y col. 1998 (*Manzi et al., 1998*), y Escrivá y col. (*Escrivá et al., 2002*), con algunas variaciones.

Se requiere el tratamiento previo de la muestra, que consiste en una saponificación que permite la hidrólisis de los enlaces éster, la liberación de los ácidos grasos y la separación de la fracción que contiene el β -Caroteno; aunque tiene el inconveniente de que puede ocasionar pérdidas en el proceso de su extracción que hace menos precisa la cuantificación.

Se pesan 400 mg de aceite, en tubos con tapón de rosca de vidrio color topacio, con volumen adecuado, para evitar pérdidas y alteraciones. Se adiciona, como sustancia antioxidante que evite las pérdidas de vitaminas liposolubles, durante la saponificación y extracción, 0.2 g de ácido ascórbico, 15 mL de etanol absoluto y 4 mL de hidróxido potásico al 76%, bajo atmósfera de nitrógeno.

Las condiciones empleadas, finalmente, en la presente memoria, permiten la adecuada saponificación, incubando los tubos en agitación continua a 70°C durante 30 minutos.

Tras enfriar la muestra, colocando los tubos en un baño de hielo, se adiciona 5mL de NaCl al 2.5% para favorecer la separación de las fases y se con una mezcla de n-hexano/acetato de etilo (85:15 v/v), para extraer la fracción insaponificable.

Las fases orgánicas obtenidas se evaporan hasta sequedad en el rotavapor, controlando la temperatura con un baño de agua termostaticado a 40°C, el residuo se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisuelve en metanol. Previa a la inyección en el HPLC se filtra para evitar la presencia de partículas que puedan obstruir el sistema en el análisis cromatográfico, y se inyecta inmediatamente para evitar la oxidación y descomposición del β -Caroteno. En caso de no poder realizar la inyección de forma inmediata se almacena a temperatura de congelación de -20°C, nunca un tiempo superior a una semana, que es el tiempo máximo de estabilidad de la muestra.

- **Método Cromatográfico**

Se analiza el contenido en β -Caroteno presente en las muestras de aceite pertenecientes a las campañas olivareras 2001- 2004, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) que presenta una mayor especificidad que los métodos colorimétricos y fluorimétricos (*Gimeno et al., 2000*), y es un método excelente para separar y cuantificar los componentes carotenoides y sus isómeros (*Lietz et al., 1997*).

a. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se utiliza el método cromatográfico propuesto por Gimeno y col. (*Gimeno et al., 2000*), que usa una técnica en fase reversa (RP- HPLC), emplea fases móviles polares y permite separar los compuestos en función de su polaridad y solubilidad.

La inyección no se hizo de la muestra directamente sino tras previa extracción y saponificación del aceite, para eliminar las clorofilas y lípidos que pueden interferir en el posterior análisis.

Las fases móviles empleadas fueron:

A: Metanol
B: Agua Milli-Q
C: Butanol

Al emplear altas presiones es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los caños y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector (*McNair et al., 1973*). Para evitarlo, los solventes y las muestras a inyectar se filtraron y desgasificaron al vacío, manteniéndolas en estas condiciones durante el tiempo de análisis. Se hizo siempre una inyección de 50 μ L.

El gradiente de elución empleado se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Gradiente de elución para la determinación de β - Caroteno

Tiempo (min)	Paso	Flujo mL/min	% A	% B	% C
0	0	2.0	92	3	5
3	1	2.0	92	3	5
1	2	2.0	92	0	8
5	3	2.9	92	0	8
10	4	2.0	92	3	5

El flujo de elución es de 2.0 mL/min y la temperatura de la columna cromatográfica es de 45°C, el eluyente adquiere la temperatura de 45°C a su paso por el horno antes de entrar en la columna.

Existe un control de la temperatura para evitar oscilaciones en la medida de la línea base y para obtener tiempos de retención constantes. La duración de cada análisis es de 20 minutos. Los análisis se realizaron por triplicado, y la zona de longitud de onda estudiada ha sido a 450 nm (*Gimeno et al., 2000*). Es un método que permite, en menos de 8 minutos, de forma rápida y completa la identificación y cuantificación del β -Caroteno en los aceites de oliva virgen extra estudiados.

b. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACIÓN DEL β -CAROTENO

Se prepara una disolución patrón de 0.5 mg/mL de β -Caroteno, empleando como disolvente metanol, y se almacena a temperatura de congelación a -20°C , en botes adecuados para evitar las posibles alteraciones.

La identificación del compuesto carotenoide se realizó mediante la comparación del espectro del compuesto y del patrón correspondiente, y por contraste en el tiempo de retención (t_R). Se realizó además, la adición de los patrones a varias muestras problema, para comprobar el aumento de área de los picos cromatográficos.

La cuantificación de un compuesto determinado en una muestra se hace en función de la señal de área que da dicho compuesto a la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorbancia en el cromatograma.

En la presente memoria se emplea la técnica del estándar externo. Se preparan muestras del patrón de concentración conocida que se analizan y permiten construir una curva de calibrado para el componente a cuantificar. La técnica de estándar externo presenta como inconvenientes: la necesidad de medir exactamente el volumen inyectado, tanto del patrón como de la muestra a analizar, el volumen de inyección es crítico, que el instrumento debe estar perfectamente equilibrado; como ventajas destacan: que no es necesario que se detecten todos los compuestos, que se eluyan todos los compuestos y la necesidad sólo de calibrar los picos de interés.

El principio de esta técnica es que la concentración de un producto es proporcional al área del pico cromatográfico correspondiente.

Las disoluciones se preparan a partir de la disolución madre (0.5 mg/mL), a concentraciones menores y cercanas al contenido esperado en el aceite para construir la recta de calibrado de cuantificación, y el área del pico identificado en la muestra se interpola en la ecuación obtenida.

Las disoluciones de menor concentración fueron de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 ppm, referidas a un litro, al inyectar 50 μ L, se hace la transformación para expresar todas las concentraciones de la curva de calibrado en mg/ 50 μ L.

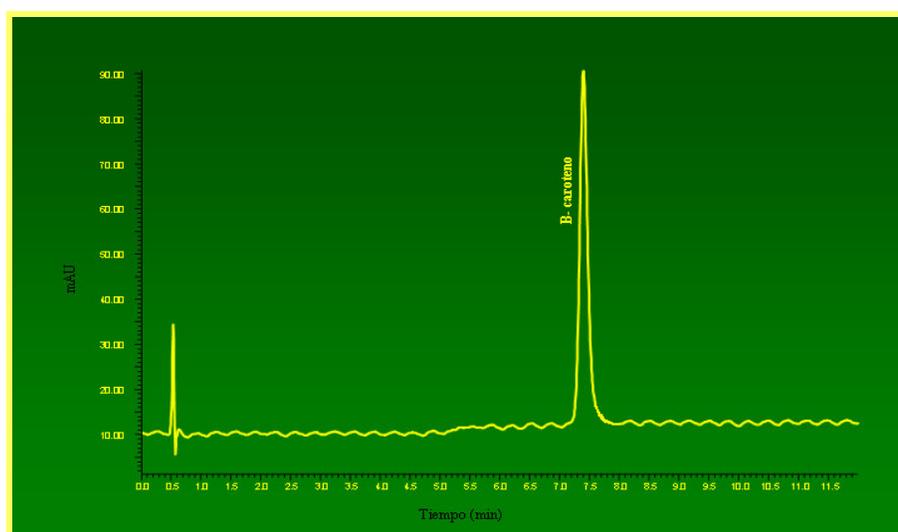
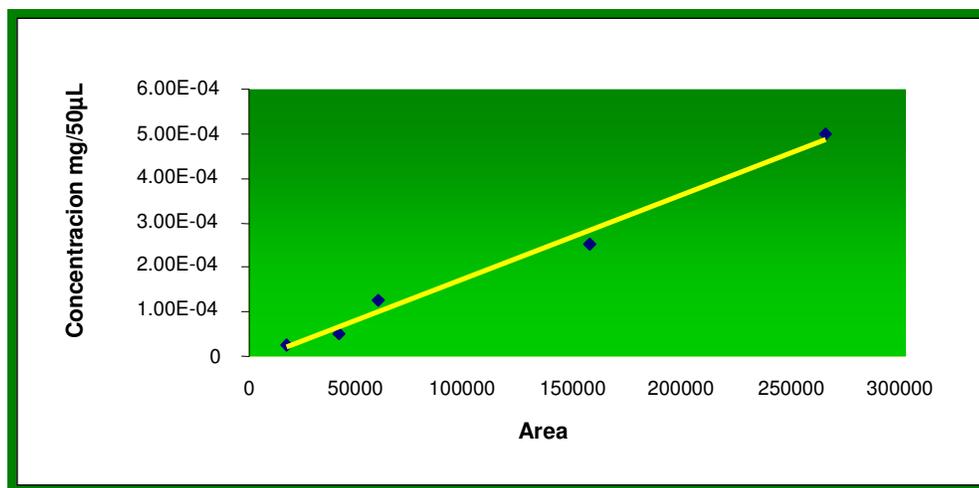


Figura 2: Cromatograma HPLC-Vis, del patrón puro de β -caroteno medido a 450 nm, a concentración de 2.5 ppm

Figura 3. Curva calibrado patrón β -CarotenoTabla 4. Ecuación recta de calibrado patrón β - Caroteno

Compuesto	Ecuación ^a	Coefficiente de correlacion (r)
Beta- Caroteno	$y = 2 \cdot 10^{-9} x - 1 \cdot 10^{-5}$	0.9999

^a $y = ax + b$, y = concentración del compuesto expresada en mg/ 50 μ L, x = área

Esquema del proceso de obtención del β - Caroteno

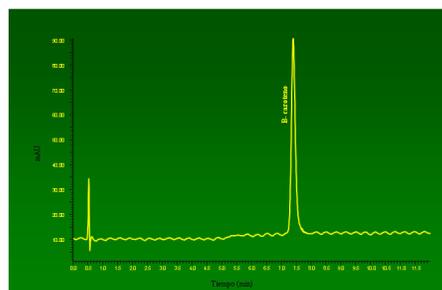
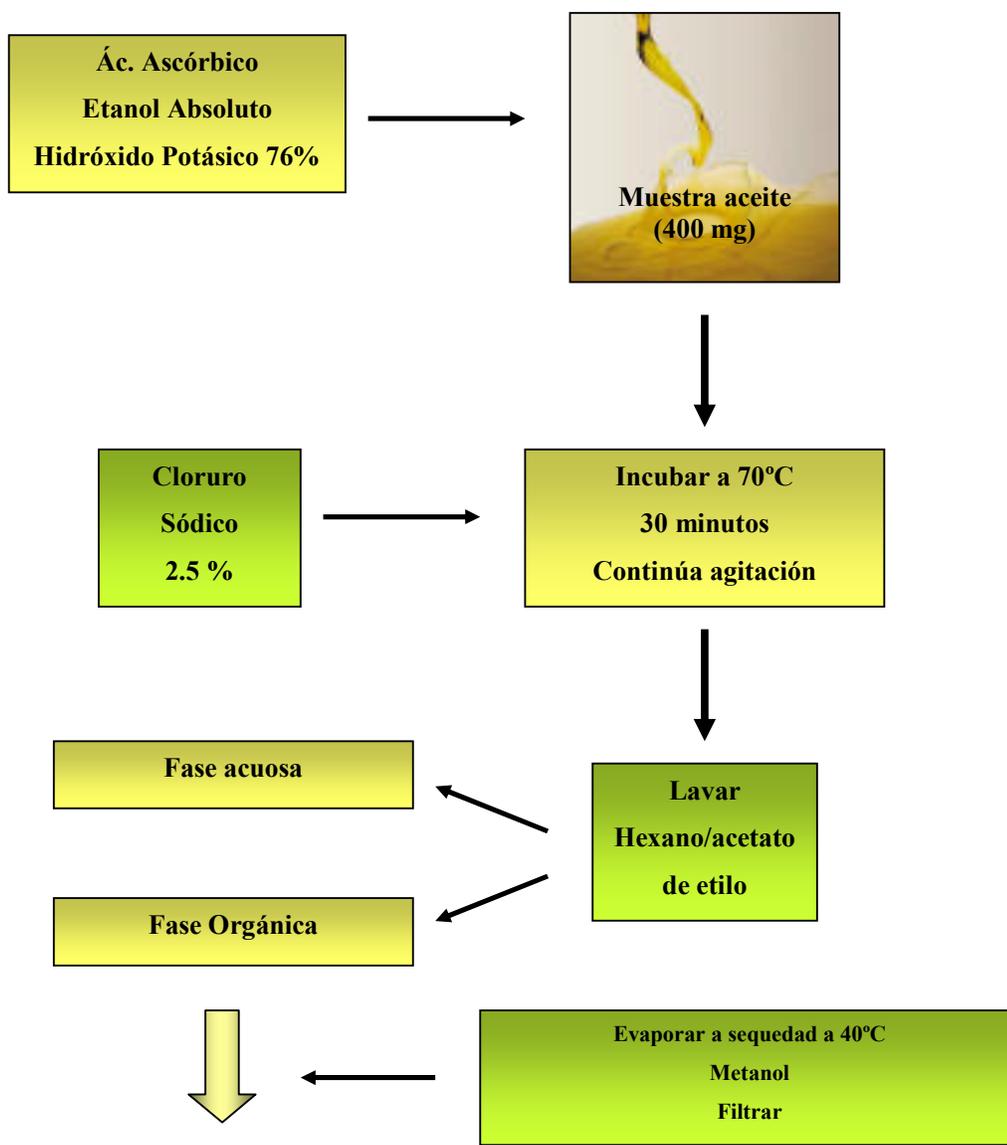


Figura 4: Esquema analítico para la determinación de β - Caroteno

2. ESTUDIO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1. Estudio del contenido en Escualeno del Aceite de Oliva Virgen Extra

- **Evolución e influencia de las técnicas de extracción, saponificación y cuantificación del escualeno en el aceite de oliva virgen extra.**

Los hidrocarburos actúan como intermediarios de las estructuras lipídicas en aceites vegetales, y constituyen alrededor del 32- 50 % del material insaponificable, siendo el más abundante el escualeno. Un estudio realizado por Cattaneo y col. en 1945, en aceites de oliva, demostró la influencia de este hidrocarburo en la fracción del insaponificable, ya que debido a una rancidez oxidativa existe una disminución en el contenido insaponificable, por la ruptura de escualeno y la formación de productos ácidos, que se pueden asociar a cambios en las características organolépticas del aceite de oliva.

El método descrito con anterioridad para la identificación y cuantificación del escualeno en las muestras de aceite de oliva virgen extra, pertenecientes a las campañas olivareras 2001-2004, se basa en una cromatografía en fase gaseosa empleando como gas portador el nitrógeno, que es inerte para evitar posibles interacciones y adecuado al detector empleado en nuestra técnica que es un detector de ionización a la llama (FID).

Giacometti y col. emplearon la cromatografía gaseosa para la determinación de alcoholes alifáticos, α - tocoferol, esteroides y escualeno en aceites de oliva, sólo trabajando con la fracción del insaponificable sin previo empleo de la cromatografía en capa fina. La técnica descrita es muy semejante a la empleada en la presente memoria, con

saponificación y aislamiento de la fracción insaponificable, que facilita la determinación de los componentes menores en el aceite de oliva. Esta técnica se caracteriza por presentar una alta sensibilidad (*Giacometti et al., 2001*).

En aceites con alta concentración en escualeno como en el aceite de oliva virgen, la posible interferencia de otros hidrocarburos en el análisis cromatográfico es insignificante pero si la concentración en escualeno es baja, como ocurre en los aceites vegetales, se recomienda el uso de columnas capilares de mayor longitud, para evitar la interferencia con otros hidrocarburos saturados (*Moreda et al. 2001*).

Durante el almacenaje, se comprobó la degradación del tocoferol, escualeno, compuestos fenólicos y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), en aceites de oliva vírgenes extra italianos, empleando técnicas diferentes de cuantificación y almacenado simulando las condiciones más habituales de conservación. La principal causa de descenso en la concentración de los compuestos analizados, se debe al incremento en los niveles de oxígeno en las botellas que tienen el aceite envasado. El tocoferol fue la primera molécula en oxidarse (aproximadamente un 20% a los 2 meses y un 92% a los 12 meses). El contenido de escualeno y *o*-difenoles permaneció estable en los primeros meses por la presencia del tocoferol, y comenzó a descender a los 6-8 meses (del 45-50 % a los 12 meses), el descenso en los AGPI comenzó al disminuir la concentración de las sustancias antioxidantes.

En la cuantificación del escualeno las muestras están diluidas en hexano y se emplea la cromatografía gaseosa (*Rastrelli et al., 2002*). Se observó que no interfería la presencia de luz durante el almacenaje. Hay autores que consideran la luz y la exposición al oxígeno los factores más relevantes en la degradación del escualeno que la temperatura (*Psomiadou et al., 2000*).

Muchos trabajos publicados con anterioridad a este estudio experimental, emplearon diversos métodos alternativos a la cromatografía gaseosa, o diferentes formas de obtención de la muestra en el proceso de extracción.

Eisner y col. (*Eisner et al., 1965*), fueron de los primeros en estudiar la fracción completa del insaponificable en aceites de oliva, concluyendo que dentro del contenido en hidrocarburos el escualeno representaba del 85- 90% del contenido total, posteriormente muchos trabajos determinaron el contenido global de estos hidrocarburos, basándose en su fraccionamiento empleando cromatografía en capa fina y su cuantificación por cromatografía gaseosa, en aceites de oliva vírgenes procedentes de diferentes variedades de aceitunas (Arbequina, Cornicabra, Empeltre, Hojiblanca y Picual) (*Guinda et al., 1996*).

Los trabajos publicados diez años atrás, emplean en su mayoría, la saponificación de la muestra grasa, extracción de la materia insaponificable y fraccionamiento de la misma por cromatografía en capa fina, obteniendo la fracción correspondiente a los hidrocarburos que son analizados posteriormente por cromatografía gaseosa (*Bondioli et al., 1993; Lanzón et al., 1994; Guinda et al., 1996*), también se han empleado métodos espectrofotométricos que requieren un proceso de desecación prolongado, e incluso trazas de los solventes pueden interferir alterando el color desarrollado (*Mendelsohn et al., 1997*), pero poco a poco estas técnicas han dejado de usarse, ya que las muestras a analizar son sometidas a múltiples pasos, que provoca posibles pérdidas y alteraciones en los procesos de saponificación y extracción previos al análisis y dan lugar a falseamientos en los resultados.

En 1998, Manzi y col. emplean HPLC en fase normal, para cuantificar el escualeno en aceites de oliva virgen italianos, al igual que otros componentes minoritarios de la fracción insaponificable del aceite, empleando una mezcla de n-hexano/2-propanol como fase móvil. Paralelamente se analizaron varias muestras por HPLC en fase reversa, obteniendo resultados comparables (*Manzi et al 1998*).

Nenadis y col. determinaron el contenido de escualeno en aceites de oliva, empleando una mezcla de metanol/ acetona en la extracción y como fase móvil acetona/acetonitrilo, usando RP- HPLC y medida de absorción a 208 nm, sin previa saponificación y extracción de la fracción insaponificable (*Nenadis et al., 2002; Psomiadou et al., 2002*)

Un trabajo publicado por Lu y col. en el 2004, emplea la cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodo-array (HPLC- DAD) en la determinación de escualeno en aceites de oliva, es un método simple y rápido con alta sensibilidad y precisión, utiliza en la extracción metanol/acetona, y emplea como fase móvil acetonitrilo (100%) en lugar de metanol o acetona/acetonitrilo (*Murkovic et al., 2004*), al comprobar que la acetona tiene un elevado ruido provocando una baja sensibilidad, y el metanol, a la inversa, un bajo ruido y elevada sensibilidad (*Lu et al., 2004*).

Son muchos los disolventes orgánicos empleados en la extracción del escualeno, como el hexano, etanol y diclorometano, que presentan la ventaja de un menor tiempo de retención pero una peor separación del escualeno.

Ni los ésteres metílicos formados ni los componentes disueltos en el hexano interfieren en el análisis cromatográfico, ya que los primeros son más volátiles y salen al principio del registro cromatográfico y los segundos se posicionan detrás del escualeno.

A continuación se muestra el cromatograma de una muestra de aceite de oliva virgen extra perteneciente a la última campaña estudiada:

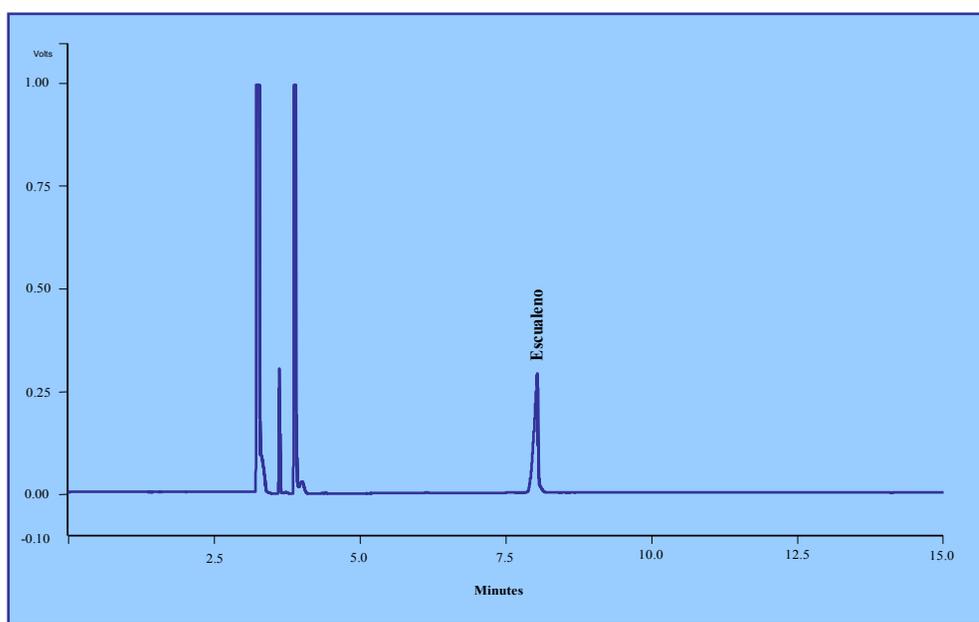


Figura 1: Cromatograma de una muestra de aceite de oliva virgen extra de la campaña 2003- 2004

- **Contenido de escualeno en el aceite de oliva virgen extra.**

El contenido en escualeno disminuía considerablemente, en aceites de oliva refinados, aproximadamente del 25%, con valores de 340 mg /100 g, con respecto a los aceites de oliva virgen extra, que oscilaban entre 424- 800 mg /100g (*Owen et al., 2000*) y en otros aceites vegetales (maíz: 19- 36 mg/100g, girasol: 8- 19 mg/100g, soja: 7- 17 mg/100g (*Kiritsakis, 1992*)).

Estas diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto al aceite de oliva virgen extra en la fracción de hidrocarburos, se debe principalmente al conjunto de reacciones durante el proceso de refinado, que favorece la formación de nuevos hidrocarburos (isómeros del escualeno, compuestos terpénicos, etc.). La presencia de estos productos es la base, de los métodos oficiales de análisis para diferenciar entre aceites crudos y aceites refinados (*Moreda et al., 2001*).

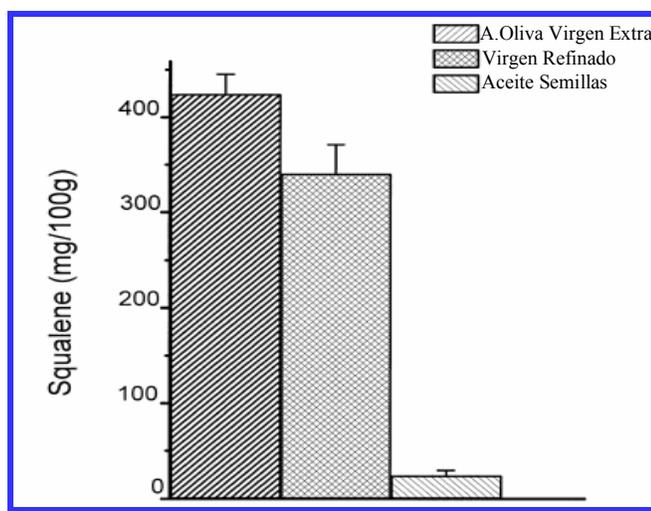


Figura 2: Contenido de escualeno en aceites (*Owen et al., 2000*)

A continuación se muestra el contenido de escualeno, hidrocarburo más abundante en el aceite de oliva, con importante función antioxidante de las muestras de aceite correspondientes a las tres campañas de nuestro estudio. Los resultados se expresaron

como media y desviación estándar ($x \pm SD$), que nos da idea de la variabilidad de los datos. Se determinó otro parámetro estadístico para medir el grado de dispersión de las *medias* de todas las posibles muestras que pudieran extraerse de la población, el error estándar de la media (*EE*).

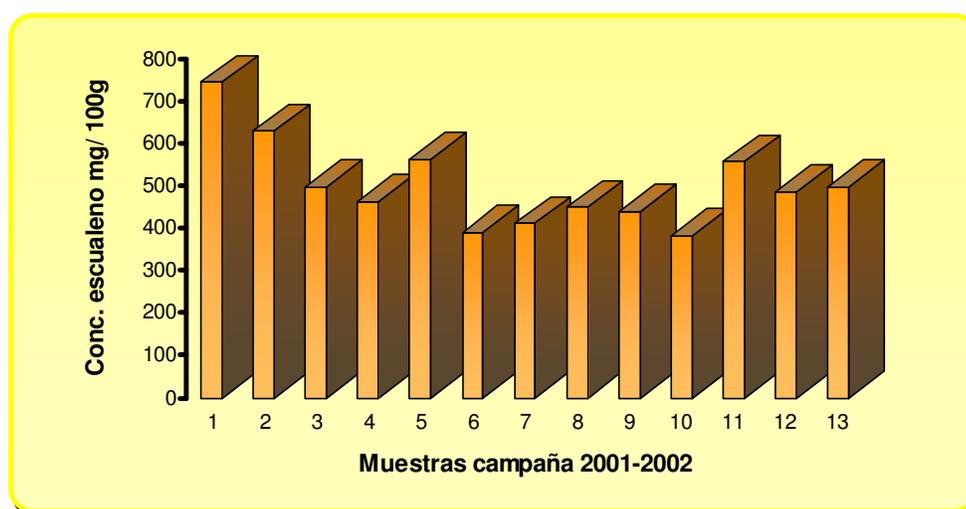


Figura 3: Concentración de escualeno en las muestras de aceite de oliva virgen del 2001-2002. La concentración media de escualeno ha sido 501.27 ± 102.14 mg/ 100g aceite (n=13).

Todas las muestras analizadas son aceites obtenidos de la variedad Picual, con un sistema de extracción de dos fases, procedentes de distintas almazaras que forman parte de la misma Denominación de Origen. Los valores obtenidos en esta primera campaña (2001-2002), oscilaron entre 382.67 y 744.8 mg/100g, con un valor medio de 501.27 (D.E.: 102.14) y en la campaña siguiente se obtuvo valores de 583.93 mg/100g, de valor promedio (D.E.: 90.60), existe poca variación en los resultados obtenidos entre las dos campañas, en general la diferencia puede deberse a factores genéticos, agronómicos y ambientales, influyendo en la composición de un mismo aceite de una campaña a otra, al igual que las características de recolección, almacenamiento y obtención del mismo. Se calculó otro parámetro estadístico, el error estándar de la media (*EE*) para medir el grado de dispersión de las medias de todas las posibles muestras que pudieran extraerse de la población, obteniendo un valor de 28.32 y 25.12 para las campañas 2001-2002 y 2002-2003 respectivamente, este valor estima la desviación típica de un grupo imaginario

formado por las medias de las posibles muestras de tamaño 13 que se pueden obtener de la población de la que procede cada muestra.

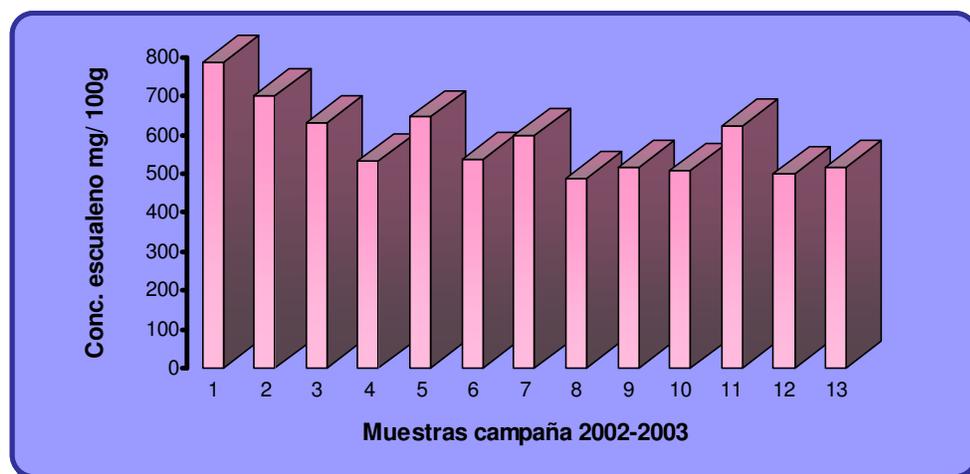


Figura 4: Concentración de escualeno en las muestras de aceite de oliva virgen del 2002-2003. La concentración media de escualeno ha sido 583.93 ± 90.60 mg/ 100g aceite (n=13).

En la última campaña analizada (2003-2004) la mayoría de las muestras han sido obtenidas por el sistema de extracción bifásico al igual que las muestras anteriores estudiadas, exceptuando algunas obtenidas por un sistema patentado de rodillos.

Así las muestras 1,2 y 3 de la última campaña, presentaban valores muy por encima del resto de las muestras de aceite analizadas, lo que explica el incremento en la desviación estándar en la última campaña, siendo importante comentar que estas muestras que presentan mayor contenido de escualeno, son los aceites obtenidos con el sistema patentado de rodillos que no adiciona nada de agua durante la obtención de los mismos. Aunque esta diferencia estadísticamente no se considera, al ser un número de muestras muy poco representativo del total. Los valores medios obtenidos son de 650.27 ± 121.31 mg/100g, con un valor de *EE* de 33.64.

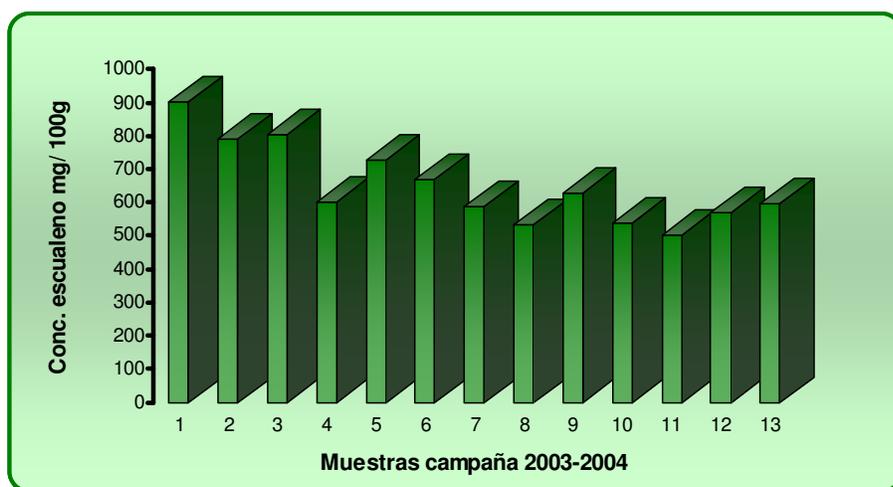
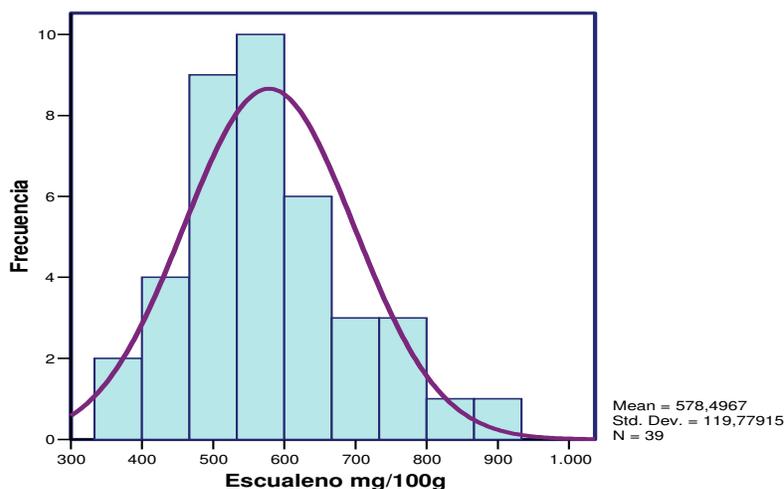


Figura 5: Concentración de escualeno en las muestras de aceite de oliva virgen del 2003-2004. La concentración media de escualeno ha sido 650.27 ± 121.31 mg/ 100g aceite (n=13).

Considerando el global de todos los valores obtenidos, los niveles de escualeno en los aceites de oliva virgen extra estudiados oscilaron entre 382.67 y 901.2 mg/ 100g, y variaban según campaña con valor promedio de 578.49 ± 119.77 mg/100g (n= 39), el error estándar de la media para medir el grado de dispersión de las medias de todas las posibles muestras que pudieran extraerse de la población es de 19.18. Se comprobó que el global de los valores obtenido presentaba una distribución normal, válida para realizar posteriormente los ensayos estadísticos.

Figura 6: Histograma de resultados empíricos obtenidos de escualeno. Distribución normal



En la figura 7, se observa el contenido en escualeno en las muestras de aceite de las tres campañas estudiadas, observando la diferencia en las muestras obtenidas por el sistema de extracción por rodillos aunque no existen diferencias significativas importantes. En el resto de las muestras el contenido en escualeno es muy similar en todas las campañas, variando ligeramente de unos años a otros. En general las características del aceite de oliva, son dependientes de factores genéticos, agronómicos y ambientales, influyendo en la composición de un mismo aceite de una campaña a otra, al igual que las características de recolección, almacenamiento y obtención del mismo.

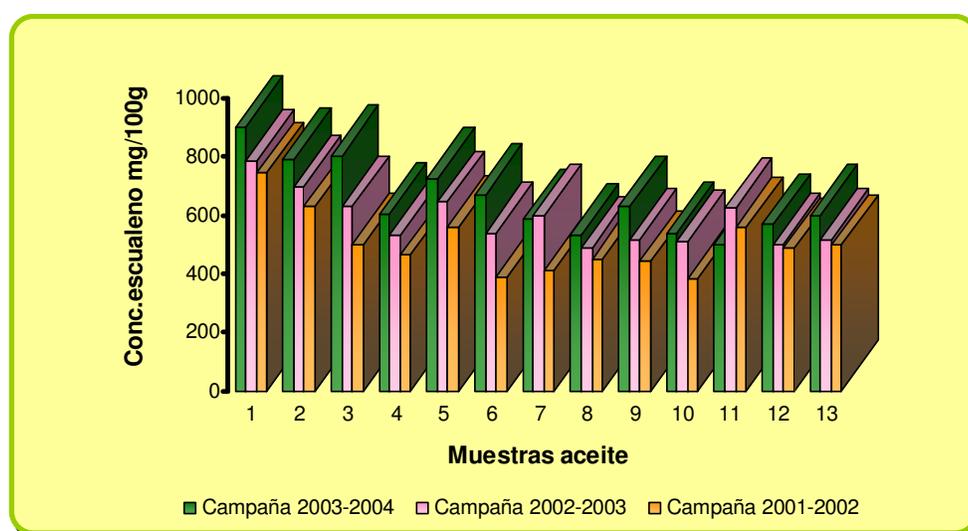


Figura 7: Comparación en el contenido de escualeno en las muestras de aceite de oliva virgen de las tres campañas estudiadas.

Se puede observar, que no existen diferencias en el contenido de escualeno entre las muestras procedentes de las distintas almazaras que componen una misma denominación de origen. El tratamiento estadístico que se ha realizado sobre los resultados obtenidos de las muestras en el ensayo incluye el análisis de la varianza (ANOVA), no existiendo diferencias significativas entre las tres campañas (se han considerado significativamente diferentes los datos obtenidos con una $p \leq 0,05$).

Los resultados de escualeno obtenidos son similares a los encontrados en la bibliografía. Así, se han recogido valores de escualeno en aceites de oliva vírgenes entre 136-708 mg /100g (*Kiritsakis et al., 1992*), 80-1200 mg/100g (*Cert et al., 2000*), 125-750 mg/100g (*Mataix et al., 2001*), 300-545 mg/100g (*Giacometti et al., 2001*), 200-700 mg/100g (*Assmann et al., 2003*), 120-750 mg/100g (*Moreno, 2003*), 20-750 mg/100g (*Aguilera et al., 2005*), 100-800 mg/kg (*Hrncirik et al., 2005*).

Manzi y col. investigaron la relación entre aceites obtenidos de diferentes variedades de aceitunas italianas, con algún constituyente de la fracción del insaponificable con actividad antioxidante (tocoferol, escualeno, y carotenos), concluyendo que el contenido de escualeno en el fruto y en el aceite de variedades italianas de la campaña olivarera 1995-1996, con diferente índice de maduración y sistema de obtención, es mayor en el aceite que en el fruto, con valores entre 342-450 mg/100g y que las pérdidas de escualeno son mayores que las de otros componentes (caroteno y tocoferol) alrededor de un 26-47%, durante un periodo elevado de almacenaje. Dicha tendencia puede deberse a los diferentes mecanismos antioxidantes de estos componentes (*Manzi et al., 1998*). Estos resultados descritos, contradice los obtenidos por Psomiadou y col., que midió los cambios en el contenido de escualeno en aceites de oliva vírgenes griegos, almacenados durante 24 meses a 18-28 °C, existiendo un descenso insignificante entre aceites en contacto con oxígeno y otros no manipulados durante todo el periodo de almacenaje (*Psomiadou et al., 2002*), participando en la estabilidad del aceite durante la autooxidación, lo que supone la importancia de incorporar en nuestra dieta, alimentos ricos en escualeno como el aceite de oliva y su papel protector frente a ciertos cánceres.

Rastrelli y col. concluyeron que la principal causa de descenso en la concentración de los compuestos analizados, se debe al incremento en los niveles de oxígeno en las botellas que tienen el aceite envasado (*Rastrelli et al 2002*).

En la presente memoria, se realizó la determinación de escualeno en algunas muestras de aceite de la campaña 2002-2003, almacenadas correctamente en ausencia de luz y a temperatura adecuada durante un periodo de un año, y se observó una disminución en el contenido de escualeno de un 50 % aproximadamente.

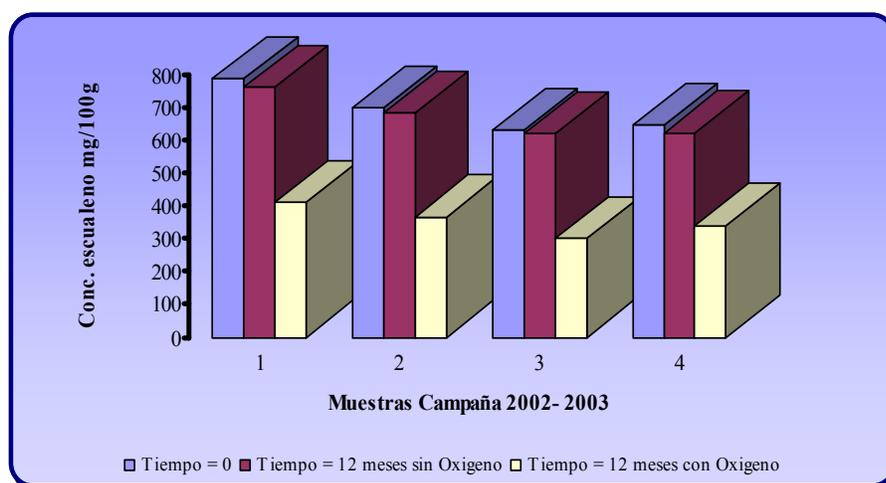


Figura 8: Contenido en escualeno en muestras almacenadas en presencia o ausencia de oxígeno durante 12 meses

Así las muestras 1, 2, 3 y 4 de la campaña 2002-2003, con valores iniciales de 788.07 mg/100g, 700.16 mg/100g, 630,2 mg/100g y 646 mg/100g han disminuido significativamente a valores de 410.43 mg/100g, 365.98 mg/100g, 300.56 mg/100g y 339 mg/ 100g respectivamente, al estar expuestas a la presencia de oxígeno durante su almacenamiento. En comparación, las mismas muestras almacenadas en presencia de nitrógeno como gas inerte (*Rastrelli et al., 2002*) y ausencia total de oxígeno, presentaban una disminución en el contenido de escualeno sin significación estadística.

Previamente se comprobó que cada variable cumplía una distribución normal y se llevó a cabo en cada muestra analizada, el estudio estadístico del test de la *t* de Student para muestras relacionadas, verificando que no existía diferencias significativas en las muestras medidas a tiempo cero y las almacenadas durante doce meses en ausencia de oxígeno, y la diferencias significativas ($p < 0.001$) existente entre las almacenadas con oxígeno.

Se puede concluir, que la presencia de oxígeno es uno de los factores más influyentes en la degradación del escualeno, más que la luz y la temperatura. Ya que existen muestras de aceite obtenidas a diferentes temperaturas (9, 21.5 y 33° C), no existiendo diferencias entre el contenido final obtenido.

Hrcirik y col., estudiaron la variación de algunos parámetros de calidad del aceite, conjuntamente a la disminución en los componentes menores (caroteno, escualeno, compuestos fenólicos etc.) al someterlos a un proceso de inducción oxidativa (almacenaje acelerado a 60°C). Concluyendo que existía una importante disminución en los componentes menores (o-difenoles, tocoferol, carotenos y clorofilas), mientras el escualeno presentaba una alta estabilidad frente a la inducción oxidativa (menor al 20% dentro del 100% de inducción), no existiendo ninguna relación entre la degradación del escualeno y otros componentes minoritarios del aceite de oliva virgen (*Hrcirik et al., 2005*).

Los resultados en el contenido de escualeno, obtenidos en aceites de oliva vírgenes griegos, oscilaron entre 390-960 mg/100g (*Murkovic et al., 2004*) 20-1200 mg/100g (*Psomiadou et al., 2002*), e italianos 364-597mg/100g (*Rastrelli et al., 2002*), siendo comparables al contenido en aceites españoles.

Los valores obtenidos por Lu y col. de escualeno en el aceite de oliva virgen es de 480 mg /100g, con un porcentaje de recuperación del 89.7 %, muy por debajo de los resultados obtenidos por nosotros empleando la técnica de cromatografía gaseosa.

2.2.2. Estudio del contenido en β -Caroteno del aceite de oliva virgen extra

- **Influencia de las condiciones de extracción del β -Caroteno en el aceite de oliva virgen extra.**

En la presente memoria, se cuantifica el contenido individual de β -Caroteno en muestras de aceite de oliva virgen extra de la variedad *Picual*, obtenidas por el sistema bifásico de extracción.

La cuantificación se realiza a 450 nm, longitud de onda de máxima absorción del β -Caroteno, y todas las medidas se hacen por triplicado.

El cromatograma obtenido de las muestra es relativamente simple [Figura 1, 2], con una alta resolución e identificación del compuesto en menos de 8 minutos. En la mayoría de los trabajos encontrados el tiempo de elución total, es muy similar al empleado en nuestra técnica. La comparación con el patrón externo, en función al tiempo de retención y análisis de los espectros, ha permitido la identificación del caroteno.

La temperatura de la columna en el desarrollo cromatográfico fue un factor importante a tener en cuenta para la mejora del procedimiento.

Se emplea como patrón una solución de β -Caroteno, que se analiza directamente por HPLC-DAD, ya que los patrones de carotenos son muy susceptibles a la oxidación y degradación, y según Gimeno y col. los existentes en el mercado presentan una pureza menor a la esperada (*Gimeno et al., 2000*).

Resultados y Discusión

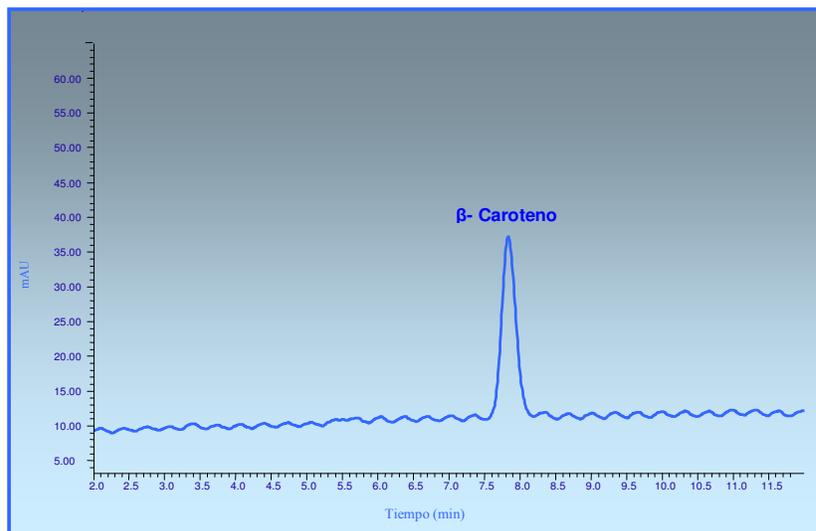


Figura 1: Cromatogramas de una muestra de aceite de oliva virgen extra de la campaña 2003-2004.

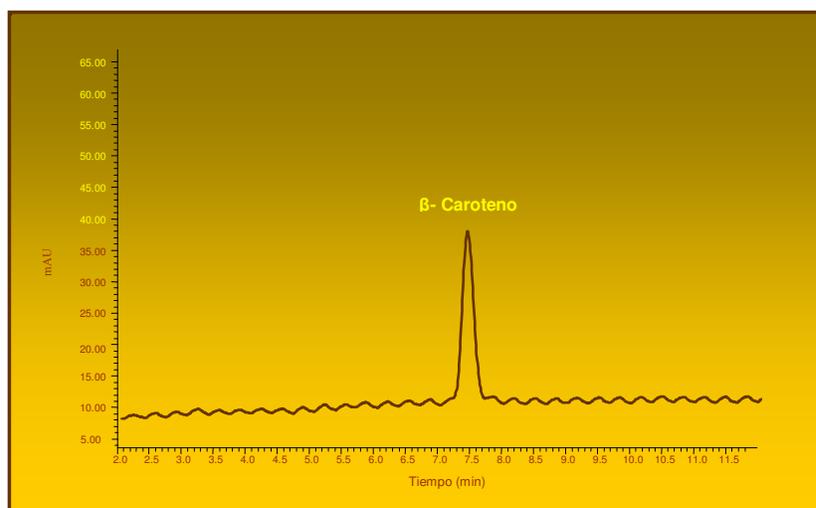


Figura 2: Cromatogramas de una muestra de aceite de oliva virgen extra de la campaña 2002-2003.

Se muestra a continuación el contenido en β -Caroteno, de las muestras de aceite correspondientes a las campañas olivareras 2001, 2002, y 2003. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar ($x \pm SD$), que nos da idea de la variabilidad de los datos en mi trabajo de investigación.

Tabla 1: Valores de β -Caroteno en las muestras de aceite de oliva virgen extra

	Muestra	β - Caroteno ^a		Muestra	β - Caroteno ^a		Muestra	β - Caroteno ^a
CAMPAÑA 2003 - 2004	1	1.249 \pm 0.11	CAMPAÑA 2002 - 2003	1	0.813 \pm 0.12	CAMPAÑA 2001 - 2002	1	0.428 \pm 0.02
	2	0.978 \pm 0.11		2	0.760 \pm 0.08		2	0.297 \pm 0.04
	3	0.884 \pm 0.20		3	0.626 \pm 0.09		3	0.330 \pm 0.07
	4	0.721 \pm 0.16		4	0.483 \pm 0.02		4	0.148 \pm 0.05
	5	0.567 \pm 0.07		5	0.553 \pm 0.05		5	0.257 \pm 0.05
	6	0.511 \pm 0.17		6	0.396 \pm 0.03		6	0.258 \pm 0.13
	7	0.432 \pm 0.04		7	0.423 \pm 0.04		7	0.184 \pm 0.02
	8	0.501 \pm 0.02		8	0.365 \pm 0.04		8	0.280 \pm 0.04
	9	0.686 \pm 0.05		9	0.410 \pm 0.03		9	0.211 \pm 0.05
	10	0.597 \pm 0.15		10	0.392 \pm 0.27		10	0.172 \pm 0.07
	11	0.345 \pm 0.08		11	0.370 \pm 0.04		11	0.198 \pm 0.05
	12	0.522 \pm 0.09		12	0.314 \pm 0.03		12	0.096 \pm 0.06
	13	0.371 \pm 0.07		13	0.290 \pm 0.11		13	0.128 \pm 0.02
	Promedio	0.643 \pm 0.26		Promedio	0.476 \pm 0.16		Promedio	0.229 \pm 0.09

^a expresado en mg/100g. Cada medida es la media y la desviación estándar de la muestra procesada por triplicado (n= 13)

El valor *EE* para las campañas 2003-2004, 2002-2003 y 2001-2002, ha sido 0.072, 0.045 y 0.025 respectivamente, y mide el grado de dispersión de las medias de todas las posibles muestras que pudieran extraerse de la población.

Las medidas en las muestras pertenecientes a la primera campaña objeto de estudio (2001- 2002), se llevaron a cabo un año después de su obtención, y se mantuvieron almacenadas en las mejores condiciones, lo que explica que presenten un contenido muy por debajo de los valores obtenidos en las campañas posteriores. Como se puede observar, existen diferencias entre las muestras procedentes de las distintas almazaras que componen una misma denominación de origen.

El estudio estadístico realizado sobre los valores de las dos últimas campañas, no mostró diferencias significativas y ambos eran significativamente diferentes a la primera campaña estudiada ($p < 0.05$) (*t* de Student para muestras independientes). Previamente se

han comprobado que se cumplen las condiciones de aplicación del test t para comparar dos medias: normalidad y homogeneidad de varianzas.

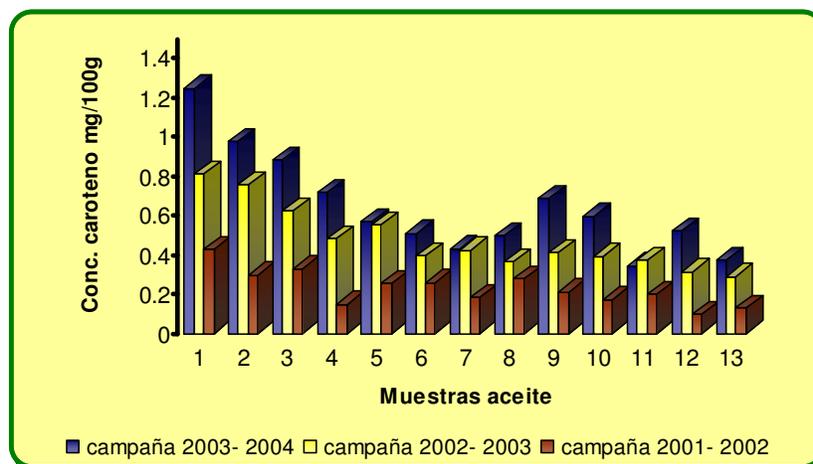


Figura 2: Concentración de β - Caroteno (mg /100g) en las muestras de aceite de oliva de las tres campañas estudiadas.

Estos niveles están por encima de los valores recogidos en bibliografía para el aceite de oliva virgen de variedades de aceitunas españolas, que pueden variar desde 0.085 hasta 0.496 mg/100g (*Mataix, 2001*), 0.275 mg /100g (*Gimeno et al., 2000*), 0.03-0.36 mg /100g (*Kiritsakis et al., 1992; Assmann et al., 2003*), y el contenido global de carotenoides oscilaban ente 0.226-2.96 mg /100g (*Beltrán et al., 2005*), 0.954-1.297 mg/ 100g (*Cichelli et al., 2004*).

Las concentraciones en β -Caroteno, variaban según sistema de extracción empleado en la obtención del aceite y grado de maduración de las aceitunas. El contenido empleando el sistema bifásico de extracción, al igual que los aceites estudiados en la presente memoria, eran de 0,284 mg /100g para aceitunas verdes y de 0.158 mg /100g en frutos más maduros (*Gimeno et al., 2002*).

Los aceites de oliva vírgenes italianos contienen niveles de β -Caroteno muy similares a los estudiados, y al resto de referencias encontradas en otros trabajos sobre aceites de oliva vírgenes españoles y griegos, 0.019- 0.216 mg/ 100g (*Zonta et al., 1987b*), 0.085-0.496 mg /100g (*Zonta et al., 1987a*) que informaron que la concentración variaba según la calidad

de los aceites. Manzi y col. estudiaron el contenido de β - caroteno en el fruto y en el aceite de variedades italianas de la campaña olivarera 1995-1996, concluyendo que existe un mayor contenido en los aceites, de 0.125- 0.439 mg/100g (*Mazi et al., 1998*). Psomiadou determinó el contenido de tocoferoles, clorofilas y carotenoides en aceites de oliva vírgenes griegos, oscilando los niveles de β -Caroteno desde 0.03mg /100g hasta 0.44 mg /100g (*Psomiadou 1998*), variando el contenido según el sistema de extracción del aceite y la temperatura empleada en el proceso de obtención del mismo, en general los resultados encontrados en β -caroteno para los aceites de oliva vírgenes griegos e italianos son comparables al contenido en aceites españoles.

Hrcirik y col., cuantificaron el contenido de β -Caroteno, en aceites de oliva virgen extra griegos, italianos y españoles de las variedades de aceituna Koroneiki, Coratina y Picual, de la campaña 2001- 2002, con valores de 0.11, 0.17 y 0.13 mg /100g respectivamente, y la disminución progresiva del contenido si se inducía a una oxidación (*Hrcirik et al., 2005*).

Se estudió la precisión del método, con diez determinaciones de β -Caroteno, en la misma muestra, empleando los mismos reactivos e instrumentos con valores promedio de 0.087 ± 0.007 mg/ 100g. La sensibilidad del método se comprobó con la determinación del límite de detección ($0.1 \cdot 10^{-4}$ mg/50 μ L) y el límite de cuantificación entre ($0.5 \cdot 10^{-4}$ mg/50 μ L y $5 \cdot 10^{-4}$ mg/50 μ L).

En general el método empleado es sensible, preciso y exacto y permite la cuantificación de este compuesto en el aceite de oliva, y se podría también emplear en otros tipos de aceites.

Un trabajo publicado en el 2002, por Gimeno y col. demostraron los efectos que el grado de maduración y los diferentes métodos de extracción (dos y tres fases) tenían sobre el contenido en antioxidantes en el aceite de oliva virgen, existiendo un mayor contenido en β -caroteno y compuestos fenólicos en aceites procedentes de aceitunas verdes, que en aceites de frutos más maduros, no existiendo diferencia significativa en cuanto al contenido en caroteno y tocoferol si el sistema de extracción del aceite es de dos fases o de

tres fases, debido a su elevada liposolubilidad, en comparación al contenido fenólico que sí se ve afectado, con valores que varían de 123.82 ± 26.33 mg/kg en el de dos fases a 72.93 ± 20.13 mg/kg en el de tres fases, por adicionar agua y favorecer la dilución de los compuestos fenólicos. Como resultado el aceite obtenido por el sistema de dos fases es más rico en tocoferoles y fenoles, y presenta una mayor estabilidad frente a la oxidación (*Gimeno et al. 2002*).

Cichelli y col. especificaron que el contenido pigmentario varía según el sistema de extracción empleado en la obtención del aceite, conjuntamente a la variedad y proceso de maduración, observando que los aceites obtenidos con un sistema continuo o por centrifugación contienen una mayor cantidad de pigmentos, en comparación al sistema tradicional que emplea altas presiones. También influye la variedad de aceituna en el contenido final de pigmentos, relacionados a su vez con las condiciones geográficas que favorecen el cultivo de determinadas variedades de aceitunas en diferentes zonas. Finalmente la proporción de estos pigmentos, está estrechamente relacionado con el grado de maduración del fruto, cuyo contenido será menor si se excede en el tiempo de maduración (*Cichelli et al., 2004*).

Existen múltiples trabajos, cuyo objetivo ha sido el aislamiento de los componentes carotenoides en diversos alimentos: vegetales, frutas, aceites (*Hart et al., 1995; Lietz et al., 1997; Albalá- Hurtado et al., 1997; Verzera et al., 2002*) empleando diferentes solventes en el proceso de saponificación, en el de extracción que favorece el aislamiento, y en las condiciones cromatográficas que pueden diferir un poco con la técnica final empleada en la presente memoria.

Se emplea en todo el proceso de extracción, material adecuado, para evitar en lo máximo posibles alteraciones de la muestra, se almacenaron hasta su análisis en condiciones óptimas a 4°C en ausencia de luz en botellas de vidrio color ámbar, Caponio y col. (*Caponio et al., 2005*), investigaron cómo la influencia de la luz durante el almacenaje, afectaba la calidad del aceite de oliva, concluyendo que los aceites almacenados en presencia de luz, tenían una menor concentración de tocoferoles, carotenoides y clorofilas

que los mismos almacenados en oscuridad y Di Giovacchino y col., emplearon nitrógeno, para mejorar la estabilidad del aceite de oliva virgen durante su conservación (*Di Giovacchino et al., 2002; Rastrelli et al., 2002*).

Muchos autores, han estudiado como la conservación y mantenimiento de los aceites de oliva virgen, puede variar el perfil de sus distintos componentes, aunque se intente realizar en las condiciones más óptimas y adecuadas (*Psomiadou et al., 1998; 2002; Gallardo- Guerrero et al., 2005*)

Según un estudio reciente de Gallardo y col. (*Gallardo- Guerrero et al., 2005*), a pesar de almacenar el aceite en condiciones óptimas, existe una variación en el perfil de los compuestos que aportan color al aceite, el estudio se hizo en aceites almacenados durante una año en oscuridad a 15 °C, observando que el contenido total de pigmentos permanece constante, pero existen cambios en la contribución individual de cada pigmento.

El β -Caroteno, es sensible a la oxidación y a la luz ultravioleta, siendo necesario añadir en la saponificación sustancias antioxidantes, y realizarla bajo atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz para minimizar las posibles alteraciones que se puedan dar durante el proceso de análisis.

Durante la saponificación, se hace mucha referencia a las posibles pérdidas de carotenoides (*Khachik et al., 1986; Kimura et al., 1990*) y las posibilidad de minimizarlas empleando sistemas enzimáticos (*Lietz et al., 1997*) ó adicionando sustancias antioxidantes como el ácido ascórbico (*Kimura et al., 1990; Gimeno et al., 2000;*), BHT (*Servili et al., 1996; Hosotani et al., 2003*), que puede polimerizarse en la saponificación, provocando una serie de picos que coeluyen e interfieren con la medida de retinol, tocoferoles y clorofilas (*Craft et al., 1992*).

Nierenberg y col. comprobaron que existe una mayor cantidad de carotenos cuando no se realiza la saponificación (*Nierenberg et al., 1992*), en cambio un trabajo publicado por Hosotani y col. en el 2003, desarrollaron un método para mejorar la determinación conjunta de retinol y β - caroteno en suero humano e hígado de ratones, concluyendo que la

cantidad de β - caroteno en suero ($\mu\text{g/L}$) e hígado ($\mu\text{g/g}$) es significativamente mayor cuando se lleva a cabo la saponificación, de 586.9 ± 9.8 y 0.53 ± 0.05 respectivamente, en comparación a cuando ésta no se realiza, 220 ± 42.3 y 0.36 ± 0.05 (Hosotani et al., 2003).

Se realiza una saponificación, con modificaciones del método propuesto por la AOAC 1990, para determinar el contenido de caroteno en el aceite de oliva. La temperatura de saponificación finalmente usada fue de $70\text{ }^\circ\text{C}$, con agitación durante treinta minutos, descrita por muchos autores (Gimeno et al. 2000; Escrivá et al., 2002), en muchos trabajos se propuso realizarla durante toda la noche a temperatura ambiente, siendo incompleta la saponificación (Albalá-Hurtado et al., 1997; Escrivá et al 2002), ó a 37°C durante 15h con agitación continua, que favorece la completa saponificación pero produce emulsiones que son difíciles de romper en el proceso de extracción (Escrivá et al., 2002)

El solvente empleado en la extracción e inyección de carotenoides y resto de vitaminas liposolubles, juega un papel importante en el análisis.

Se emplea una mezcla de hexano/acetato de etilo, para favorecer la extracción (85:15 v/v) (Gimeno et al., 2000), muchos trabajos emplean diferentes disolventes en la extracción de vitaminas liposolubles. Cichelli y col. (Cichelli et al., 2004) y Stancher y col. (Stancher et al. 1983a; 1983b), emplearon hexano y éter dietílico, obteniendo una recuperación de $14.1 \pm 0.7\%$ con hexano y $89.8 \pm 1.4\%$ con el éter dietílico. Otros autores emplean hexano y afirman que se obtienen mayores porcentajes de recuperación (Albalá-Hurtado et al., 1997; Su et al., 1998; Psomiadou et al., 2000; De; Burri et al., 2003;), aunque la extracción depende de la concentración de etanol en el medio de saponificación y disminuye a mayores porcentajes del alcohol. Hosotani y col. comprobaron la eficacia de extracción del β - caroteno con n-hexano, en comparación al cloroformo (Hosotani et al., 2003). Lietz y col. (Lietz et al., 1997), empleó una mezcla de éter de petróleo y dietílico a partes iguales, que favorece una extracción más efectiva de carotenos y vitaminas liposolubles que si sólo se emplea el éter de petróleo (Craft et al., 1992), aunque presenta el inconveniente de la volatilidad y solubilidad de diversas sustancias del saponificable, aunque en menor grado que cuando la extracción se realiza sólo con éter dietílico (Escrivá et al., 2002).

Anteriormente se empleaban diversas técnicas espectrofotométricas, para cuantificar el contenido total de clorofilas y carotenoides en la región del visible, caracterizado por unas bandas típicas para ambos componentes, actualmente se emplean técnicas de cromatografía líquida con detectores de UV-visible y fluorescencia, que permite medir simultáneamente varios compuestos y obtener resultados menos discordantes que con las técnicas tradicionales (*Psomiadou et al., 1998; Cert et al., 2000*).

Cinchelli y col., afirman que la técnica por HPLC es útil tanto para la identificación y cuantificación de pigmentos en el aceite de oliva, cómo para identificar adulteraciones en el aceite con sustancia colorantes naturales ó sintéticas. Roca y col. describieron índices que relacionan la composición de clorofilas y carotenos, y se emplean para determinar la autenticidad de los aceites de oliva virgen (*Roca et al., 2000*), y cómo el índice entre las dos fracciones pigmentarias (clorofila/ carotenos) disminuye con la maduración de los frutos, con el proceso de extracción del aceite, y a medida que aumentamos el periodo de almacenamiento.

Un estudio realizado en 1988 por Khachick y col. concluyó que la solubilidad y polaridad de los solventes empleados en la extracción y en la fase móvil del análisis cromatográfico, debería ser compatible para evitar distorsiones en los cromatogramas obtenidos, que podían darse empleando solventes como cloroformo, benceno, tetrahidrofurano y tolueno. (*Khachick et al., 1988*).

En el ensayo cromatográfico, puesto a punto en la presente memoria el metanol es el solvente empleado mayoritariamente en la fase móvil, a pesar de que el β -Caroteno sea poco soluble en él, aunque no presenta este inconveniente usado a bajas concentraciones. Es recomendado por muchos autores (*Nierenberg et al., 1985; Epler et al., 1992*), en comparación con el acetonitrilo, que puede prolongar el tiempo de retención e incrementar la duración del análisis (*Escrivá et al., 2002*), al igual que el butanol, que permite conseguir la retención deseada e incremento en la solubilidad y selectividad frente a disolventes como el cloroformo, tetrahidrofurano y acetato de etilo. Bezbradica y col.

investigaron cómo los solventes empleados, pueden influir en la estabilidad y cinética de los extractos carotenoides obtenidos (*Bezbradica et al., 2005*).

La mayoría de los trabajos, que describen técnicas de medida de los componentes carotenoides en diferentes alimentos, emplean técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC), con columna C18 y detector de diodo array (*Albalá-Hurtado et al., 1997; Gimeno et al., 2000; Verzera et al., 2002; Cichelli et al., 2004; Luaces et al., 2005*). Muchos los autores emplean la técnica cromatográfica en fase normal (NP- HPLC), para cuantificar los componentes carotenoides (*Manzi et al., 1996,1998; Psomiadou et al., 1998*), pero se comprobó que presenta mayores ventajas la RP-HPLC frente a la técnica en fase normal, en cuanto a una mejor estabilidad de la columna y reproducibilidad en los tiempos de retención (*Shin et al., 1993; Dionisi et al., 1995*).

Existen también muchos estudios, sobre el contenido global de carotenoides en aceites de oliva vírgenes españoles e italianos, que serán superiores a los antes descritos, ya que considera el contenido global de carotenoides presentes en el aceite de oliva virgen (neoxantina, violaxantina, luteína..), así los resultados obtenidos por Beltrán y col. en aceites de oliva vírgenes españoles pertenecientes a las campañas olivareras de 1996-1999, presentaban valores desde 0.226 mg/100g hasta 2.96 mg/100g (*Beltrán et al., 2005*), sin embargo las concentraciones medidas por Cichelli y col. en aceites de oliva vírgenes italianos variaban según grado de maduración del fruto, desde 1.297 mg /100g en frutos verdes a 0.954 mg /100g en frutos muy maduros, aún así presentan valores muy inferiores a los encontrados en los aceites españoles.

- **Evolución en el contenido de β -Caroteno dependiendo del grado de maduración, temperatura de obtención y condiciones de almacenaje.**

La composición del aceite de oliva varía dependiendo de la variedad de aceituna, grado de maduración, condiciones ambientales, agronómicas y tecnológicas del procesado y

almacenamiento, factores que pueden influir directamente en el color del aceite. El color verde-amarillento del aceite se debe a la presencia de varios pigmentos como las clorofilas, feofitinas y carotenoides (Cichelli *et al.*, 2004).

Al igual que en el apartado anterior 2.1, se determinó el contenido en β -Caroteno en las mismas muestras de la campaña 2002-2003, almacenadas correctamente en ausencia de luz y a temperatura adecuada durante un periodo de un año y se observó una disminución en el contenido, aunque el descenso no era muy significativo (25-30% aproximadamente) [Figura 3]. Se cuantificó también el contenido en β -Caroteno en aceites elaborados en las distintas etapas de la campaña, comparando muestras obtenidas al inicio (noviembre-diciembre), con los aceites obtenidos de aceitunas de mayor grado de maduración en los meses finales de la campaña (enero-febrero), comprobando el posible descenso en la concentración de dicho antioxidante.

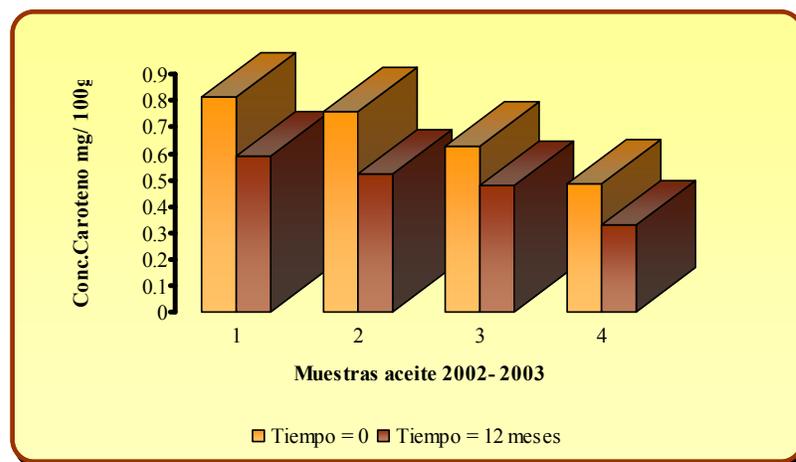


Figura 3: Contenido en β -Caroteno en muestras almacenadas durante 12 meses

Las muestras 1, 2, 3 y 4 analizadas con valores de 0.813 mg/100g, 0.76 mg/100g, 0.626 mg/100g y 0.483 mg/100g, almacenadas durante un año presentan pérdidas en el contenido en β -Caroteno del 27, 31, 22 y 30% respectivamente, observando que no disminuía de forma significativa, por almacenarse en ausencia de luz y oxígeno, que frenaban en parte los fenómenos oxidativos.

Se puede concluir, que los aceites analizados un año después de su obtención (campaña 2001-2002), presentan valores por debajo de los esperados, debido posiblemente al tiempo que se mantuvieron almacenados hasta poner a punto la técnica descrita para la cuantificación de β -Caroteno.

Se observó en muestras obtenidas al principio de la campaña y las mismas molturadas en los últimos meses, que las concentraciones de β -Caroteno disminuían de forma significativa ($p < 0.001$) (*t* de Student para muestras relacionadas para una misma variable antes y después de someterla a unas condiciones específicas) [Figura 4,5] al aumentar el grado de la maduración de la oliva, verificando así los resultados descritos por muchos autores que relacionaban el descenso en la concentración de este hidrocarburo al incrementarse el grado de maduración (*Gimeno et al., 2002; Cichelli et al., 2004*).

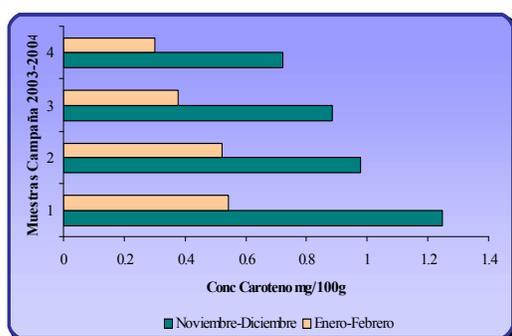


Figura 4: Influencia del grado de maduración en la concentración de Caroteno en aceites de la campaña 2003-2004. Existen diferencias significativas ($p < 0.001$)

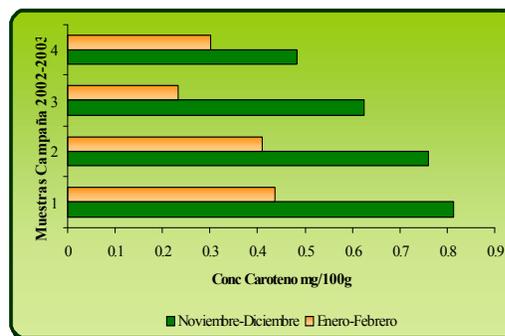


Figura 5: Influencia del grado de maduración en la concentración de Caroteno en aceites de la campaña 2002-2003. Existen diferencias significativas ($p < 0.001$).

Un trabajo publicado en 2005, verifica los resultados descritos en cuanto a la influencia del grado de maduración de la aceituna, en la disminución de los componentes pigmentarios (clorofilas y carotenos) (*Beltrán et al., 2005*).

El descenso, por el grado de maduración de la aceituna, de las clorofilas se puede deber a dos causas, una de origen enzimático por acción de la clorofilasa que actúa hidrolizando el grupo fitol de las clorofilas, de ahí la presencia de las clorofilidas, otra por

la acción del pH ácido del medio, que actúa reemplazando el ión magnesio por hidrógeno en la estructura molecular.

Mínguez-Mosquera y col. han puesto a punto múltiples técnicas y realizado varios estudios en aceitunas de diversos tipos (Hojiblanca, Picual, etc.), para identificar y cuantificar los diferentes tipos de componentes pigmentarios existentes, que influyen directamente en el posterior color del aceite de oliva (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1985; 1986 a; 1986 b; 1987; 1988; 1989 a; 1989 b; 1990). Determinaron la evolución cualitativa y cuantitativa de clorofilas y carotenoides en diferentes variedades de aceitunas, en el proceso de maduración y cómo se va modificando el pH del medio, que directamente está asociado a variaciones en el contenido de ambos componentes (mg/kg), Mínguez y col. (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990 b) analizaron cómo durante 210 días y con variación del pH desde 6.12 a 3.90, disminuía el contenido de clorofila a y b, y de clorofilidas, aumentando el valor de la feofitina (a, b) y feoforbida (a, b) a valores de pH próximo a cinco. A igualdad de condiciones existe muy poca variación en el caso de la luteína y β -caroteno, solo hay variación en aquellos componentes que como resultado de su estructura molecular son sensibles al medio ácido (neoxantina, violaxantina y neocromo).

Luaces y col. (Luaces *et al.*, 2005) señalaron que existen pérdidas del 80 % y 40% de clorofilas y carotenoides respectivamente durante el proceso de extracción del aceite de oliva, y que se incrementa a medida que aumentamos el tiempo de almacenaje.

Uno de los primeros trabajos publicados que separa al completo todos los componentes pigmentarios fue en 1998, se identificó y cuantificó de forma individual cada uno de ellos, empleando HPLC en fase normal (Psomiadou *et al.*, 1998), presentando algunos inconvenientes, como la aparición en los cromatogramas de picos desconocidos mayoritariamente asociados a los compuestos clorofílicos. Se cuantificó un contenido en β -Caroteno comprendido entre 0.3-4.4 mg /kg, valor que disminuye si se somete a la aceituna en el batido, a temperaturas inferiores a 45°C y a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento del aceite.

Luaces y col. demostraron como incrementaba el contenido en clorofilas, feofitinas y carotenoides, en particular la luteína más que el β -Caroteno, al aplicar un tratamiento térmico sobre el fruto del olivo, previo a someterlo al proceso de extracción del aceite por los métodos más habituales de obtención, vieron también que no existe correlación entre el contenido de carotenoides y la temperatura usada en el tratamiento. Si se comprobó un descenso brusco en el contenido pigmentario en el aceite, si tras someter el fruto a temperaturas de 60°C durante 3 minutos, se disminuía bruscamente la temperatura hasta 4°C (*Luaces et al., 2005*). García y col. investigaron la influencia en el contenido en carotenos que tenía el someter el fruto de la aceituna, previo a la obtención del aceite, a altas temperaturas (de 60- 72 °C), concluyendo que los aceites extraídos de frutos sometidos a altas temperaturas, presentan una mayor concentración en carotenos y clorofilas, y no existe variación en los parámetros de calidad del aceite (acidez, índice de peróxidos etc.) (*García et al., 2005*).

El tratamiento tecnológico es importante en la estabilidad del aceite. Psomiadou y col. estudiaron la concentración de β -Caroteno en aceites griegos elaborados por el sistema tradicional, de dos y tres fases, obtenidos a 30°C ó 45°C y han indicado que las condiciones de molturación no influyeron en el nivel de caroteno (*Psomiadou et al., 2002*).

Se ha comprobado en muestras de aceite de una misma almazara, que conforme se va incrementando la temperatura de obtención del aceite para mejorar el rendimiento, la composición en β -Caroteno disminuye pero no de forma significativa, existiendo muy poca variación en el contenido en aceites obtenidos a 9 °C, a 21.5°C y a 33 °C.

3. ESTUDIO IN VITRO DE DIFERENTES MÉTODOS DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

- **Muestras**

En el presente estudio se han seleccionado un total de 22 muestras de aceites, todos ellos de oliva virgen extra pertenecientes a las campañas 2001-2002 (4 muestras), 2002-2003 (5 muestras) y 2003-2004 (13 muestras). Se emplearon aquellos aceites que presentaban un mayor contenido en los antioxidantes descritos en los apartados anteriores (Escualeno y β - Caroteno), y elevado perfil polifenólico.

- **Reactivos**

Se detallan a continuación, todos los reactivos empleados en los diferentes métodos de medida de la capacidad antioxidante [Tabla 1-5].

Tabla 1. Patrones de antioxidantes de referencia

Método	Nombre	Proveedor
ABTS	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-	Aldrich
ORAC	tetrametilcromano-2-	
DPPH	carboxílico (Trolox)	
B-Caroteno/Ac.Linoleico	BHT (Buthyl-hidroxyyl-toluene)	Aldrich

En el estudio de la actividad antioxidante, con los diferentes métodos de medida se ha verificado en cada jornada de trabajo la estabilidad de los diferentes radicales empleados (ABTS, DPPH) en el tiempo.

Tabla 2. Reactivos utilizados en el método ABTS⁺⁺

Nombre	Proveedor
Sal diamónica del Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)	Sigma
Persulfato potásico	Panreac
Etanol	Merck, Barcelona (España)
n-Hexano	Merck, Barcelona (España)

Tabla 3. Reactivos utilizados en el método ORAC

Nombre	Proveedor
2,2'-Azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH)	Wako Chemicals
Fluoresceína Sódica	Fluka
Sodio di-hidrógeno fosfato (NaH ₂ PO ₄)	Panreac
Di-potasio hidrogeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	Panreac
Metanol	Merck, Barcelona (España)

Tabla 4. Reactivos utilizados en el método DPPH

Nombre	Proveedor
1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	Fluka
Metanol	Merck, Barcelona (España)

Tabla 5. Reactivos utilizados en el método β-caroteno/Ac.Linoleico

Nombre	Proveedor
Ácido Linoleico	Sigma
Tween-40	Fluka
B-Caroteno Type I	Sigma
Cloroformo	Merck, Barcelona (España)
Etanol	Merck, Barcelona (España)

- **Instrumentación**

1. Espectrofotómetro:

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Spectrophotometer Model U-2800 UV-Vis (Digilab[®] Hitachi), para los métodos de medida de la actividad antioxidante ABTS^{•+}, DPPH y el β -caroteno-ácido linoleico, empleando cubetas de 10mm de vidrio y cuarzo Hellma[®].

En el método de medida de la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (ORAC), las medidas de fluorescencia se realizaron en un Espectrofotómetro de Fluorescencia F-2500 Hitachi, y se emplearon micro cubetas de cuarzo de 10mm Hellma[®].

2. Instrumentación y Material de laboratorio

- Balanza Mettler AE 260 Delta Range
- Baño de ultrasonido P Selecta[®]
- Rotavapor BÜCHI R-200
- Baño de agua termostatzado Digiterm 3000542 P Selecta
- Centrífuga Sorvall[®] TC
- Agitador Vibromatic-384 P-Selecta[®]
- pH-metro Orion[®] 420 A
- Micropipetas Eppendorf[®], 10-100 μ L; 100-1000 μ L

- **EXPRESION DE LOS RESULTADOS**

Los resultados se expresan en función al análisis realizado. Todos tienen como objetivo indicar de forma cuantitativa la capacidad de una sustancia de evitar la oxidación de un sustrato

Los resultados obtenidos con los distintos métodos se expresan en forma de índices para poder comparar las actividades de las diferentes muestras.

- VALOR TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox)

Los métodos que miden la capacidad antioxidante, y emplean el valor TEAC al expresar sus resultados se basan en la habilidad de las moléculas antioxidantes para captar un radical, ya sea el catiónico ABTS^{•+} o el DPPH[•], con capacidad de absorción a 734 nm y a 515nm respectivamente (*Pellegrini et al., 2003*).

Los resultados obtenidos se expresan con el valor **TEAC**, que se define como la concentración de Trolox que tiene la misma actividad antioxidante, que una concentración 1mM de la sustancia a ensayar (*Pellegrini et al., 1999; 2001, Van den Berg et al., 1999*). El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, se usa como estándar antioxidante, ampliamente usado por ser soluble en fases acuosas y orgánicas (*Arnao et al., 2001a*).

El ensayo de la decoloración de TEAC se utiliza para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos puros, mezclas de antioxidantes, muestras complejas tales como plantas medicinales, plasma de sangre y tejido orgánico, alimentos y bebidas (*Ivekovic et al., 2005*).

Se observan diferencias en los ensayos TEAC desarrollados, con gran variación en los resultados obtenidos, incluso con un mismo procedimiento el valor TEAC de un componente puede variar (*Arts et al., 2004*).

El valor TEAC se emplea para expresar los resultados en el métodos ABTS, diluyendo directamente las muestras en n-hexano, permitiendo así la contribución de todos los componentes antioxidantes como los polifenoles, tocoferoles y carotenoides (*Pellegrini et al., 2003*) y en el método DPPH obtenido a partir del extracto metanólico del aceite de oliva virgen extra. En general, la reducción en la concentración de $ABTS^{*+}$ y $DPPH^{\bullet}$, inducida por los componentes antioxidantes, se relaciona directamente con la inducida por el Trolox, obteniéndose así el valor TEAC de esos antioxidantes (*Arts et al., 2004*).

Este índice se obtiene una vez alcanzado el estado de equilibrio en la reacción para los métodos de ABTS y DPPH respectivamente, por medio de una curva de calibrado, se representan distintas concentraciones de Trolox, frente a las variaciones de absorbancia del radical correspondiente, obteniendo así regresiones lineales con una buena correlación:

$$A_{734nm} = 2.5024 + 0.30217 [\text{Trolox}] \quad r = 0.99576 \quad (\text{Método ABTS})$$

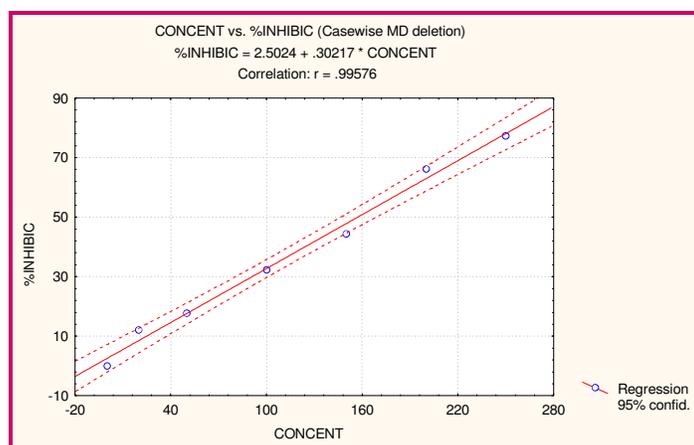


Figura 1: Recta de calibrado del Trolox. Método ABTS

El valor TEAC se obtiene interpolando el descenso de absorbancia, expresado como porcentaje de inhibición, de la muestra ensayada (en la dilución correspondiente), siempre estando la variación de absorbancia dentro del intervalo de la recta de Trolox, se obtiene así una concentración de Trolox correspondiente a una concentración 1mM.

$$A_{515\text{nm}} = 6.8201 + 77.872 [\text{Trolox}] \quad r = 0.99243 \quad (\text{Método DPPH})$$

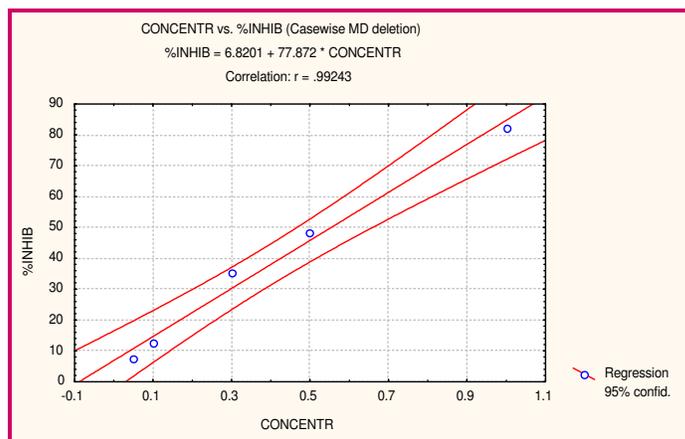


Figura 2: Recta de calibrado del Trolox. Método DPPH

Los aceites se diluyeron en n-hexano y metanol, según método ABTS y DPPH respectivamente, buscando en cada método la dilución idónea de las muestras de aceite, para que esté dentro del intervalo de respuesta lineal. Para cada dilución ensayada se obtiene un valor Trolox determinado, el valor TEAC se calcula utilizando el factor de dilución (Villaño *et al.*, 2005)

$$\text{TEAC}_{\text{solución}} = \text{Concentración Trolox}_{\text{dilución}} * \text{factor de dilución}$$

El valor TEAC en el método ABTS se expresa en mmol Trolox/L y la actividad antioxidante total (TAA) se expresa en mmol/Kg (Pellegrini *et al.* 2001) de aceite, y en el método DPPH en $\mu\text{mol/Kg}$ de aceite (Prakash. 2001; Gómez-Alonso *et al.*, 2003).

El ensayo de la decoloración de TEAC se utiliza para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos puros, mezclas de antioxidantes, muestras complejas tales

como plantas medicinales, plasma de sangre y tejido orgánico, alimentos y bebidas (Ivekovic et al., 2005).

Se observan diferencias en los ensayos TEAC desarrollados, con gran variación en los resultados obtenidos, incluso con un mismo procedimiento el valor TEAC de un componente puede variar (Arts et al., 2004).

➤ VALOR DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (% AA)

Mide el descenso de la decoloración oxidativa del caroteno en una emulsión ácida de β -caroteno/ácido linoleico (Chanwitheesuk et al., 2005). La actividad antioxidante (AA) del extracto del aceite se valoró en términos basados en la decoloración del β -Caroteno (Gorinstein et al., 2003):

$$AA = 100 \times [1 - (A_o^m - A_f^m / A_o^o - A_f^o)]$$

A_o^m y A_o^o = medida de la absorbancia a tiempo cero, para la muestra y el blanco.

A_f^m y A_f^o = medida de la absorbancia de la muestra y el blanco respectivamente, tras la incubación a 120 minutos.

Katalinic y col. determinaron la actividad antioxidante en vinos en comparación con la (+)-catequina, expresando los resultados como coeficiente de actividad antioxidante (AAC), teniendo en cuenta el factor de dilución (Katalinic et al., 2004).

➤ VALOR ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno)

Se emplea como medida de la capacidad antioxidante el área bajo la curva (AUC) de emisión de fluorescencia, a diferencia de otros métodos de medida de la actividad

antioxidante descritos, y permite recoger simultáneamente información de intensidad y tiempo.

Se expresa usando equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/g}$) (*Ou et al., 2001; Prior et al., 2003*):

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{mol Trolox equivalente/g}) = k a h (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

h: Concentración de Trolox nmol/mL

k: Factor de dilución de la muestra

a: relación entre volumen (mL) del extracto metanólico y los gramos de aceite

S: Área bajo la curva de descenso de fluorescencia de la muestra, del Trolox o del blanco y se calcula: (*Huang et al., 2002; Prior et al., 2003*)

$$S = (0.5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_i/f_0) \times CT$$

f_0 = fluorescencia inicial a tiempo 0

f_i = fluorescencia medida a tiempo i (70 minutos)

CT = ciclo de tiempo en minutos (5 minutos)

Algunos autores expresaron el resultado con el valor HORAC (Capacidad de absorbancia de radicales hidroxilo) expresados como μmol de ácido gálico/g en muestras sólidas y en μmol de ácido gálico/ L en las líquidas (*Ou et al., 2002*).

MÉTODOS

3.1.1. Método del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

- **Fundamento**

El método consiste en verificar cómo los antioxidantes son capaces de atrapar los radicales libres presentes en el medio. La actividad antioxidante de una sustancia se puede medir como la habilidad de capturar radicales libres o de inhibir su formación, en el caso del radical ABTS^{•+}, los compuestos antioxidantes suprimen su absorbancia en un grado y una duración dependiente de su capacidad, el método se basa en la inhibición por el antioxidante de la absorbancia del radical catiónico del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), compuesto cromóforo muy estable, soluble en agua y con máximo de absorción a 340 nm.

El radical catiónico es de color verde-azulado, con un espectro de absorción en el intervalo ultravioleta-visible (*Pellegrini et al., 1999*). Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable, al añadir la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido [Figura 1].

Se emplea el ensayo de “post- adicción”, se genera antes el radical a la adición de la muestra, para evitar que los componentes de la misma puedan reaccionar con los reactivos (*Cano et al., 1998a; Prior et al., 2005*), y las sustancias antioxidantes presentes puedan oxidarse, conllevando a una sobreestimación en la capacidad antioxidante (*Strube et al., 1997*).

La determinación de la actividad antioxidante se realiza por medio de una curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración de antioxidante presente.

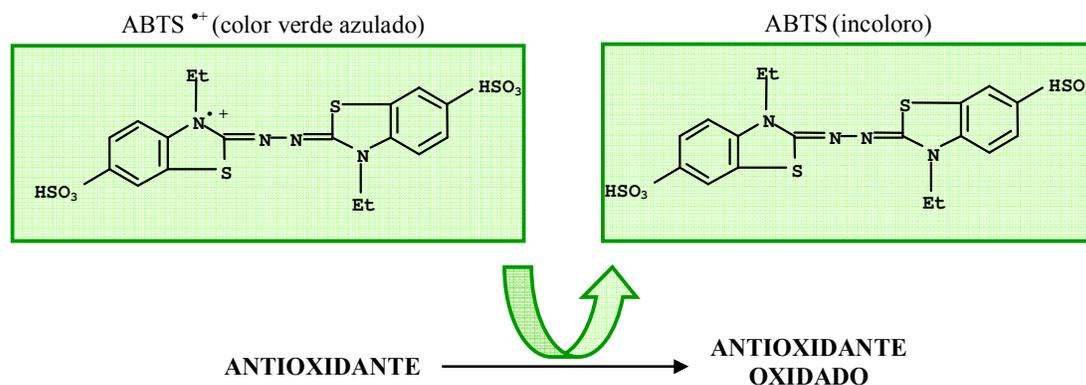


Figura 1: Reacción del antioxidante con el radical ABTS^{•+}

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Disolución de ABTS: se pesan 0.096 g de sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelven en 25 mL de agua desionizada, obteniendo así una concentración final de 7mM ABTS en solución acuosa. (*Pellegrini et al., 1999; Re et al., 1999; Arts et al., 2004; 2003*).
- Disolución de Persulfato Potásico: para conseguir una concentración final de 140 mM, se pesan 0.945 g de K₂S₂O₈ y se disuelven en 25 mL de agua desionizada.
- Preparación radical ABTS^{•+}: se hace reaccionando el ABTS y el persulfato potásico. Se parte de una concentración de 5 mL de 7mM de ABTS y de 88μL de 140mM de K₂S₂O₈, (*Arts et al., 2004*), la reacción estequiométrica es de 1:0.5, la oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta las 6 horas, la mezcla se mantiene en oscuridad de 12-16h, a temperatura ambiente. El radical catiónico es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad. La solución se diluye en etanol (1:150), hasta que su absorbancia sea a 734 nm de 0.70 ± 0.02, en cubetas de cuarzo de 10mm a 30°C. Se hace el espectro

del ABTS^{•+}:etanol (1:150) desde 250-900nm.(*Pellegrini et al., 1999, Re et al., 1999*)

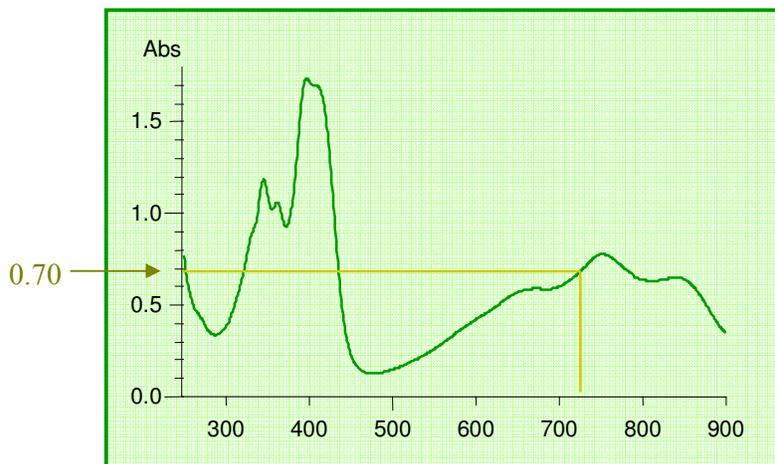


Figura 2: Espectro de absorción del radical ABTS^{•+}

b. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA TROLOX

Se prepara una concentración madre de 5mM de Trolox en etanol, a partir de la cual se preparan diluciones de 0-200 μ M en etanol para preparar la curva estándar, referida al porcentaje de inhibición, con respecto a las diferentes concentraciones de Trolox. Se mide la absorbancia con cubetas de vidrio estándar de 10mm, a 734nm de 2 mL de la solución etanólica ABTS^{•+} (1:150), obteniendo así el valor de la absorbancia a tiempo cero, posteriormente se adiciona 100 μ L de las diferentes concentración μ M de Trolox, se agita durante 30 segundos y se mide la absorbancia pasado un minuto de la mezcla a 734nm cada minuto durante 30 minutos, la reacción del Trolox con el ABTS^{•+} es inmediata, se obtiene así el valor de la Absorbancia final, pudiendo calcular el % de inhibición:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - (A_f/A_o) \times 100 \quad \text{ó} \quad A_o - A_f/A_o \times 100$$

$$A_{734 \text{ nm}} = 2.5024 + 0.30217 [\text{Trolox}] \quad r=0.99576$$

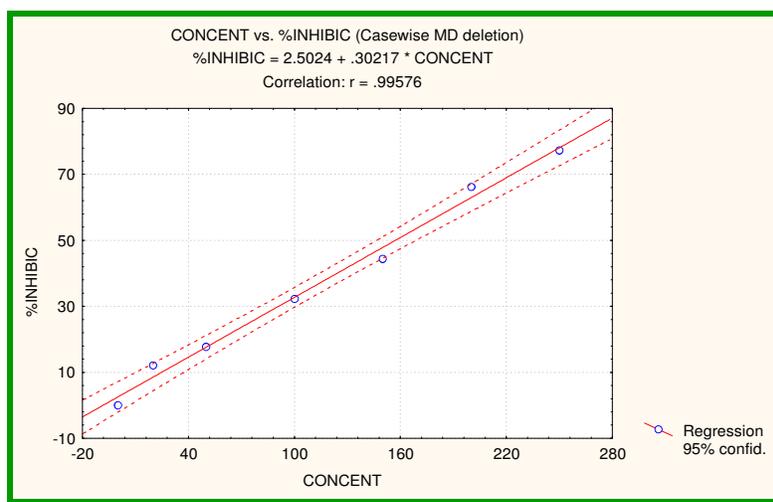


Figura 3: Recta de calibrado del Trolox. Método ABTS.

c. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS

Se han ensayado distintas diluciones de cada aceite en n-hexano, buscando la linealidad de la respuesta. La muestra se diluye para satisfacer que la concentración de antioxidantes en la muestra diluida sea tal que se encuentre dentro de un intervalo de respuesta lineal y la dilución minimice el efecto de la absorbancia debido a otros compuestos del aceite.

Se han ensayado 5 diluciones del aceite en n-hexano (diluido entre 4-20 veces), representando gráficamente la actividad antioxidante producida (expresada como % de inhibición) frente a la dilución del aceite ensayada:

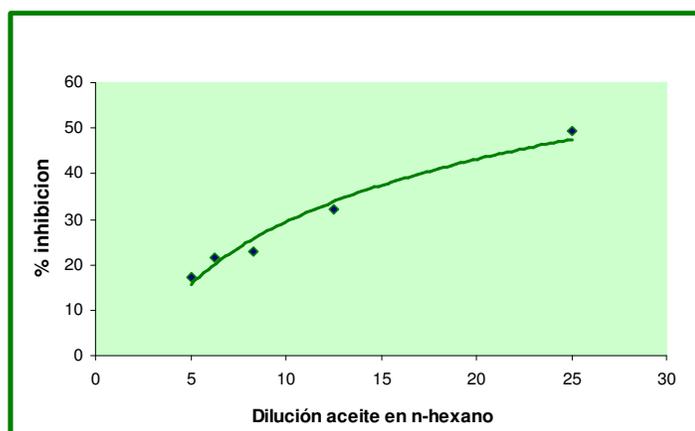
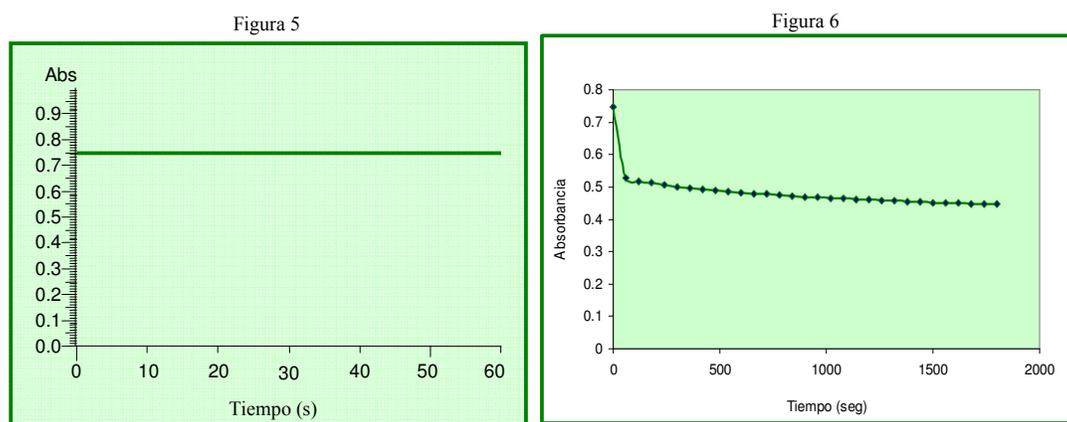


Figura 4: Relación entre el porcentaje de inhibición y diferentes diluciones en n-hexano

Se toman 2 mL del radical $ABTS^{\bullet+}$, se mide su absorbancia inicial a 734nm (A_0) [Figura 5], y se añaden 100 μ L de la muestra de aceite a ensayar en la dilución adecuada. Posteriormente, se mezcla bien durante 30 segundos y un minuto después de la adición se mide la absorbancia a 734nm cada minuto durante 30 minutos (A_t) [Figura 6] (*Pellegrini et al., 1999; 2001; Villaño et al., 2004*). Todas las medidas se han realizado por duplicado.



Se forma primero el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable. Al añadir la sustancia antioxidante (Aceite de Oliva Virgen Extra), la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido, ya sí se puede cuantificar empleando una curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración del antioxidante de referencia.

Originalmente en este método el punto final se medía a los 2 minutos de reacción (*Cano et al., 1998*). La bibliografía posterior recomienda realizar medidas a diferentes tiempos, debido a una cinética de la reacción bifásica (*Van den Berg et al., 1999*).

3.1.2. Método DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil)

- **Fundamento**

Se evalúa la actividad antioxidante del aceite de oliva virgen extra, se emplea un radical coloreado el DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil), disuelto en solución metanólica. Se sigue como referencia el método descrito por Brand-Williams y col. con algunas modificaciones, evaluando la actividad antioxidante total de una muestra o un patrón por la disminución de la absorbancia del radical a 515 nm, que es proporcional a los compuestos antioxidantes que contiene la muestra o patrón empleado (*Brand-Williams et al., 1995*).

El radical DPPH[•] tiene un máximo de absorción a 515 nm, pero dicha absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AH) [Figura 7] ó un radical (R[•]):

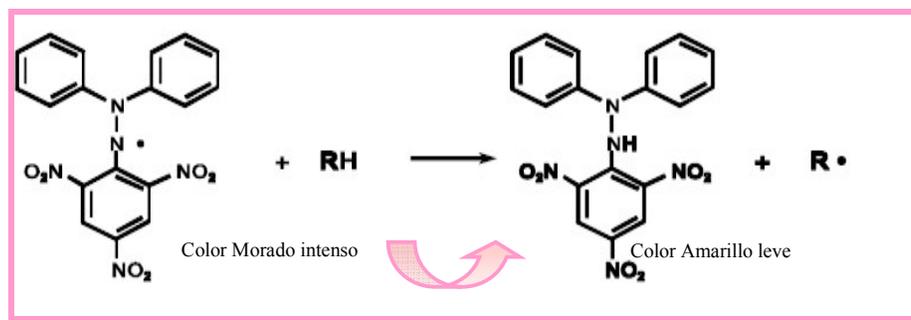


Figura 7: Reacción del antioxidante con el radical DPPH[•]

Se realiza una medida continua de la absorbancia hasta que alcanza valores prácticamente constantes, lo que indica que la reacción ha llegado al equilibrio (*Lavelli 2002*). El DPPH[•] ya se comercializa como radical estable.

En general, se evalúa la actividad antioxidante en la fase metanólica (MF) ó fracción polar, obtenida de las muestras de aceite de oliva virgen extra, que contienen la mayoría de los compuestos polifenólicos (hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico etc.), responsables de la acción antioxidante del aceite de oliva virgen extra. (*Valavanidis et al., 2004*).

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Radical DPPH[•] (0.06 mM), se pesan 2.3 mg de DPPH[•] y se disuelven en 100 mL metanol (*Brand-Williams et al., 1995*). El radical preparado es estable durante 12h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se comercializa ya estable, lo que facilita su preparación en el momento del análisis.
 - Preparación del estándar de referencia TROLOX: se emplea el Trolox en metanol, se prepara una disolución madre de 2mM y posteriormente se preparan diluciones de 0.05-1 mM en metanol (*Gomez-Alonso et al., 2003; Keceli et al., 2001*), para preparar la curva estándar referida al % inhibición con respecto a las diferentes concentraciones de Trolox. Se mide la absorbancia con cubetas de vidrio estándar de 10mm, a 515 nm de 2.9 mL del DPPH[•] (0.06mM), obteniendo así el valor de la absorbancia a tiempo cero, posteriormente se adiciona 100 µL de las diferentes concentraciones del Trolox, y se mide la absorbancia cada quince minutos, durante una hora (hasta alcanzar el equilibrio), se obtiene así el valor de la absorbancia final, pudiendo calcular el % de inhibición: (*Sacchetti et al., 2004; Gonzalez et al., 2004; Katalinic et al., 2004*).

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - (A_f/A_o) \times 100 \quad \text{ó} \quad A_o - A_f/A_o \times 100$$

La concentración inicial exacta del radical DPPH en la reacción se determinó por regresión lineal, con una curva de calibrado con la ecuación: (Gordon *et al.*, 2001).

$$A_{515\text{nm}} = 6.8201 + 77.872[\text{Trolox}] \quad r = 0.99243$$

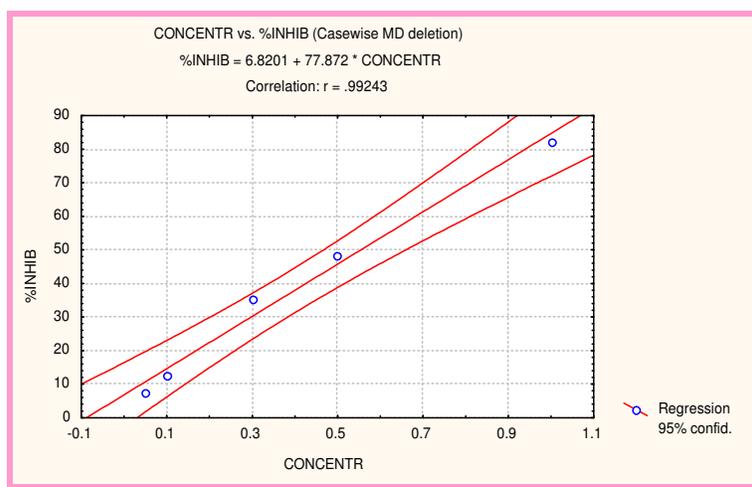


Figura 8: Recta de calibrado del Trolox

b. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS

Se extrae la fracción polar del aceite, según el método descrito por Lavelli y col. con algunas modificaciones (Lavelli *et al.*, 2002), se mezcla el aceite en metanol en proporción 1:1 v/v, se agita durante una hora y se centrifuga a 2500-3000 rpm durante diez minutos a 15°C, a continuación se extrae la fase metanólica, donde se encuentran los componentes solubles en metanol del aceite (compuestos polifenólicos), responsables en su mayoría del efecto antioxidante de los mismos (Boskou., 1996; Visioli *et al.*, 1998; Espin *et al.*, 2000; Pellegrini *et al.*, 2003; Valavanidis *et al.*, 2004).

Se mide la absorbancia en diferentes diluciones metanólicas del extracto (1:2, 1:5 y 1:10), para buscar la linealidad de la respuesta, representando gráficamente la actividad

antioxidante producida (expresada como % de inhibición) (*Sacchetti et al., 2004; González et al., 2004*) frente a la dilución del aceite ensayada:

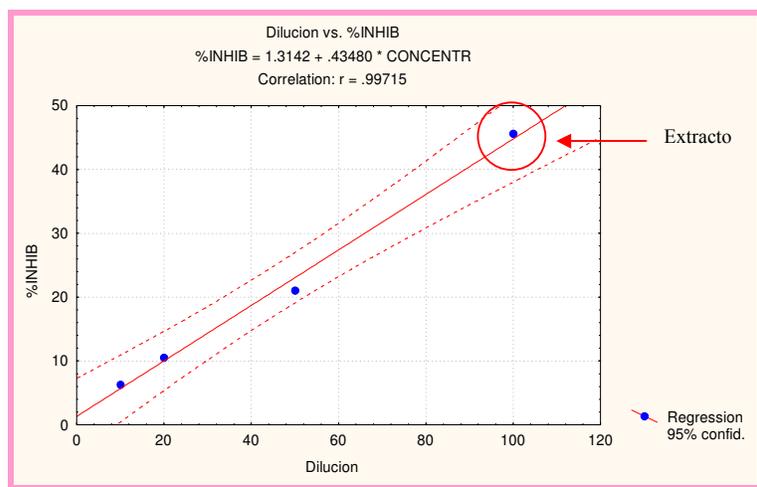


Figura 9: Relación lineal entre dilución del aceite y el %inhibición

Se trabajó directamente con el extracto obtenido, al ver que todos mantenían una relación lineal, y por tanto contener mayor cantidad de los componentes antioxidantes, ya que no se encuentran disueltos en metanol.

Se toman 2.9 mL del radical DPPH[•], se le mide la absorbancia a 515nm (A₀) [Figura 10], y se añaden 100μL del extracto metanólico del aceite a ensayar. Se agita y se mide su absorbancia cada 15 minutos durante una hora, alcanzándose el equilibrio (A_f) [Figura 11] (*Keceli et al., 2001*). Todas las medidas se han realizado por duplicado.

Figura 10

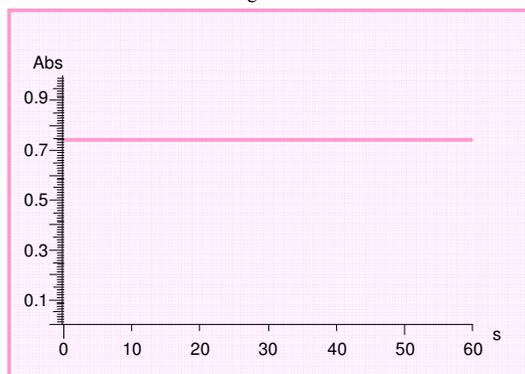
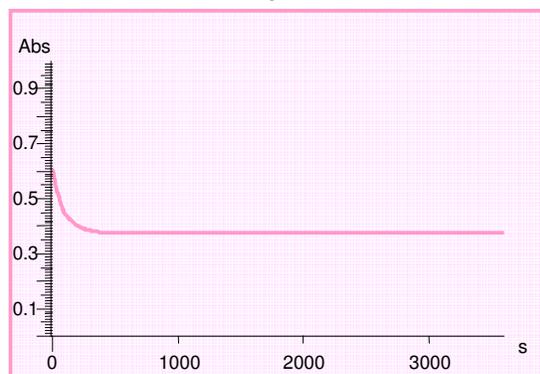


Figura 11



Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar, hasta obtener una absorbancia estable, al añadir la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido, este descenso es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra analizada.

3.1.3. Método Beta-Caroteno/Ácido linoleico

- **Fundamento**

Este método se fundamenta en el descenso de la decoloración oxidativa del caroteno en una emulsión ácida de β -caroteno/ácido linoleico (*Chanwitheesuk et al., 2005*). Se determina la desaparición de la molécula diana, el β -caroteno, debida a su destrucción por parte de los productos de degradación del ácido linoleico, por espectrometría.

Se comparó la medida de las muestras del extracto de aceite, con un control positivo con BHT y con un control negativo en ausencia de caroteno (*Bruni et al., 2004*), se prepara cada emulsión de igual manera que las muestras a analizar.

Debido a los productos de oxidación del ácido linoleico, se produce una disminución en la decoloración del β -caroteno, al añadir la sustancia antioxidante de referencia (BHT) ó el extracto de la muestra objeto de estudio se retrasa la pérdida de coloración del β -caroteno (*Fukumoto et al., 2000; Jayaprakasha et al., 2001*), se puede así determinar la actividad antioxidante de las muestras analizadas, existiendo una relación inversa a la disminución de la coloración, medida por espectrofotometría.

En este método el objetivo es la medida de la actividad antioxidante por la habilidad de las sustancias a minimizar las pérdidas del β -caroteno, en una asociación oxidativa con el ácido linoleico. Son muchos los autores que describen esta técnica, empleando como método original el de Gorinstein y col. y Bruni y col. (*Gorinstein et al., 2003; Bruni et al., 2004*) con algunas modificaciones.

La capacidad antioxidante del extracto obtenido de las muestras de aceite en etanol se comparó con el antioxidante sintético de referencia empleado (BHT), y con un blanco (etanol), en ausencia de caroteno (*Tepe et al., 2005*).

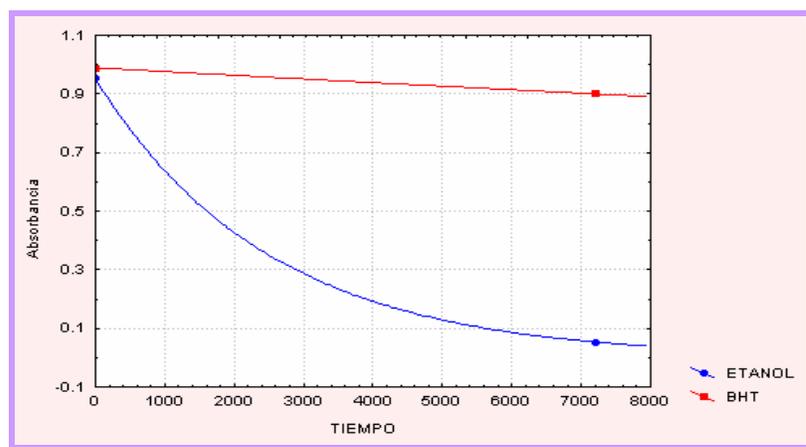


Figura 13: Pérdida absorbancia en el tiempo del etanol y antioxidante de referencia BHT

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Se disuelven 0.2 mg de β -caroteno en 1mL de cloroformo (*Cheung et al., 2003; Ubando-Rivera et al., 2005*).
 - Se mezclan 20 mg de ácido linoleico con Tween 40 (*Bruni et al., 2004*).

- Preparación del antioxidante de referencia: BHT empleado en la técnica a diferentes concentraciones 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 5 mg/0.2 mL etanol, se utiliza finalmente la concentración de 0.1 mg/ 0.2 mL por ser la que presenta una mayor estabilidad en el tiempo, las más concentradas tienen una elevada turbidez lo que dificulta la medida de la absorbancia. Se pueden usar diferentes antioxidantes sintéticos de referencia, como el BHA y el TBHQ, pero se vio que apenas existían cambios significativos en la medida de la absorbancia (*Sun et al., 2005*) [Figura 12].

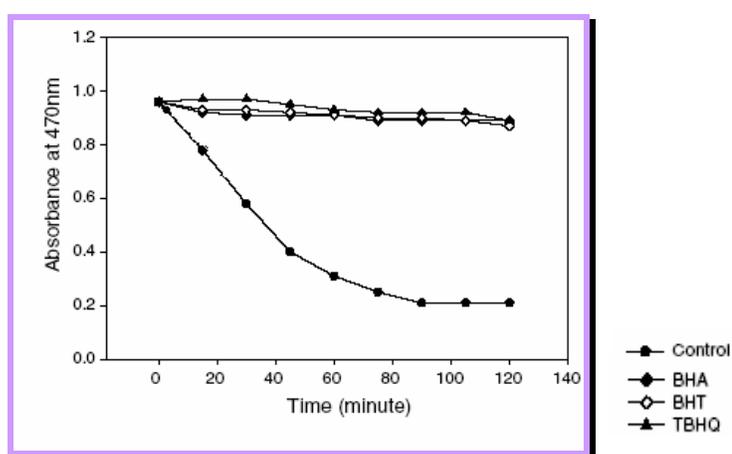


Figura 12: Variación de absorbancia entre antioxidantes de referencia

b. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS

b.1. Blanco y Control:

- *Preparación del blanco:* se pesa ácido linoleico (0.02g) con tween 40 (0.2g), se agita suavemente y se mezcla con 1 mL cloroformo, se evapora a sequedad en rotavapor a 50°C, durante 5 minutos, se añade tras evaporación del cloroformo 50mL de agua destilada, lentamente con continua agitación, hasta formar una emulsión estable. Se caracteriza este control negativo por ausencia de caroteno (*Bruni et al., 2004*).

- *Preparación control:* con β -caroteno, se mezcla el ácido linoleico, tween- 40 y 1 mL de la disolución de caroteno en cloroformo, se sigue igual procedimiento que el anterior descrito (Cheung et al., 2003; Bruni et al., 2004).

b.2. Muestras de Aceite:

- *Preparación muestras aceite:* las muestras de aceite de las diferentes campañas 2001-2004, se mezclan con etanol (v/v) (Gorinstein et al., 2003; Dapkevicius et al., 1998) para obtener el extracto, se agitan durante 10 minutos y se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos. Se extrae el sobrenadante y del extracto obtenido se hacen diferentes diluciones en etanol, buscando la dilución idónea dentro de los límites del etanol y del BHT (0.1 mg/0.2mL) [Figura 13, 14]. Todas las medidas se realizaron por duplicado (n=2).

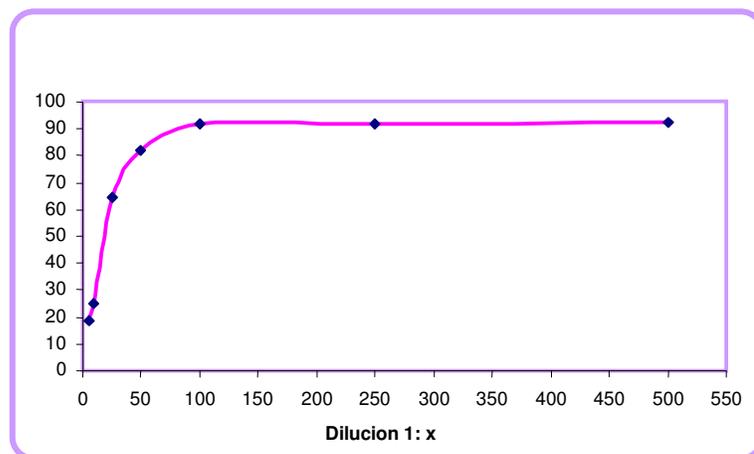


Figura 13: Relación entre la dilución del extracto de aceite ensayado y el porcentaje de pérdida de absorbancia a 470 nm

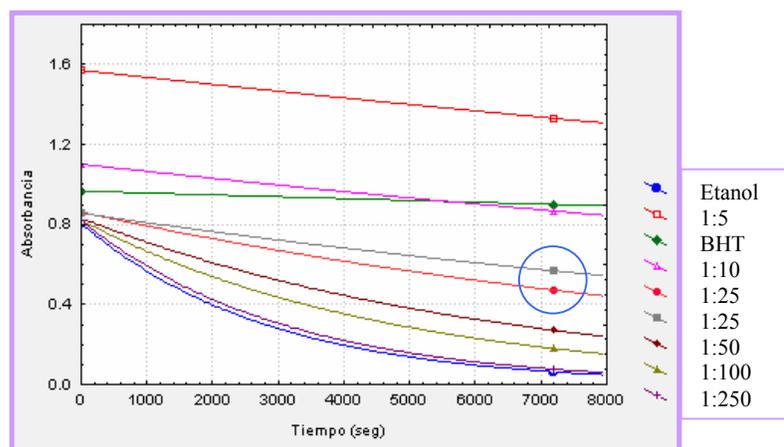


Figura 14: Pérdida de absorbancia de distintas diluciones de aceite medida a 470 nm

- Técnica:* en diferentes tubos se adiciona 200 μ L de las diferente diluciones del extracto de aceite en etanol respectivamente, se adiciona 5 mL del control preparado y se agita bien durante 1 minuto, se mide la absorbancia a 470 nm, cada 15 minutos durante 2horas (*Ubando-Rivera et al., 2005*), manteniendo las muestras incubadas a 50°C. Cada una de las muestras se comparó con una emulsión preparada de la forma descrita pero sin β -caroteno (blanco), en tubos que contenían 200 μ L de etanol en el caso del blanco y de BHT (0.1mg/0.2 mL) en el caso del antioxidante de referencia. Se mide la actividad antioxidante (AA), (*Gorinstein et al., 2003*).

$$AA = 100 \times [1 - (A_o^m - A_f^m / A_o^o - A_f^o)]$$

3.1.4. Método ORAC (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno)

- **Fundamento**

Se evalúa la actividad antioxidante de los aceites usando como referencia el daño oxidativo a las proteínas. En ensayo ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno) se basa en la protección que sustancias antioxidantes ejercen sobre la pérdida de fluorescencia de la proteína fluoresceína (*Ou et al., 2001*), a causa de un daño químico que afecta a su conformación e integridad química.

La especie reactiva empleada es el AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), que sufre una descomposición térmica de sus componentes azo, y genera los radicales peroxilos solubles en agua, capaces de iniciar el proceso oxidativo, y los más importantes tanto a nivel fisiológico como patológico (*Ghiselli et al., 2000*).

Se emplea el ensayo ORAC creado por Cao y col., con pequeñas variaciones en el método, se mide el descenso de fluorescencia de la proteína fluoresceína, más estable y menos reactiva que otras proteínas ensayadas (*Prior et al., 2005*). Se compara con el Trolox, antioxidante de referencia usado y empleando en el ensayo, el extracto fenólico del aceite de oliva virgen extra.

La pérdida de fluorescencia en presencia de radicales peroxilos no sigue una cinética de orden cero y las formas de descenso de las curvas difieren en presencia de antioxidantes diferentes y con concentraciones diferentes del mismo antioxidante (*Frankel et al., 2000*). Los radicales peroxilos disminuyen la fluorescencia de la fluoresceína, mientras que la adición de un antioxidante que reacciona rápidamente con los radicales inhibe la pérdida de la intensidad de la fluorescencia y su inhibición es proporcional a la actividad antioxidante. El efecto de una sustancia antioxidante, se mide por el área bajo la curva de

descenso de fluorescencia (AUC) de las muestras, en comparación a un blanco exento de sustancia antioxidante (Prior *et al.*, 2005) [Figura 15].

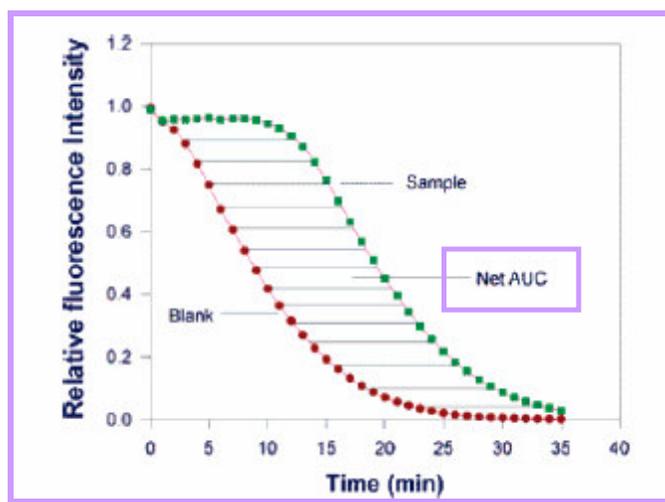


Figura 15: Descenso de fluorescencia de una muestra y el blanco. Medida del AUC

- **Preparación de la muestra**

- a. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Tampón fosfato (75mM, pH 7) (Cao y Prior, 1999):

- **Solución A:** Se prepara una disolución de K_2HPO_4 0.75M, se pesan 13.063 g y se disuelven en 100mL de agua desionizada.
 - **Solución B:** Se prepara una disolución NaH_2PO_4 0.75M, se pesan 10.349 g y se disuelven en 100mL de agua desionizada.

Se mezclan en proporción K_2HPO_4/NaH_2PO_4 75/25 y se diluye con agua desionizada (1:9 v/v), siempre el pH de esta disolución debe ser 7.

- Fluoresceína (2.934 mg/L): Se prepara una disolución madre de 44mg/100mL en tampón fosfato. La disolución empleada en el ensayo se obtiene diluyendo con tampón fosfato la solución madre: 200 μ L en 29.8 mL de tampón.
- AAPH (2,2'- Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro) 221,25 mM se pesan 0.6 g de AAPH y se disuelven en 10mL de tampón fosfato.
- Preparación del estándar de referencia TROLOX (20 μ M): Se prepara una solución madre de 5mM en tampón fosfato a partir de esta se toman 40 μ L y se enrasa hasta 10 mL, obteniendo así una concentración de 20 μ M en tampón fosfato.

b. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS

b.1. Descripción del método:

El ensayo ORAC se lleva a cabo a 37°C en micro cubetas fluorimétricas. Se mide la fluorescencia (excitación 490 nm y emisión a 515 nm) (*Ou et al., 2001*), cada 5 minutos durante 70 minutos, hasta que desciende aproximadamente a 0 o a menos de un 5% del valor inicial, la reacción ensayada es:

- **Muestra:** el aceite se diluye en metanol al 80% en agua (1:1 peso/volumen) (*Montedoro et al., 1992; Ninfali et al., 2001; 2002*), la mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se recoge y se repite la operación (preferentemente dos veces). El extracto fenólico se diluye en tampón fosfato pH7 (1:20) y se busca la dilución correcta para cada aceite de oliva en tampón fosfato, asegurándose el descenso de la fluorescencia

150 μ L extracto diluido + 150 μ L fluoresceína (2.934 mg/L) + 75 μ L AAPH (221.25mM) (*Fernández-Pachón et al., 2004; 2005*)

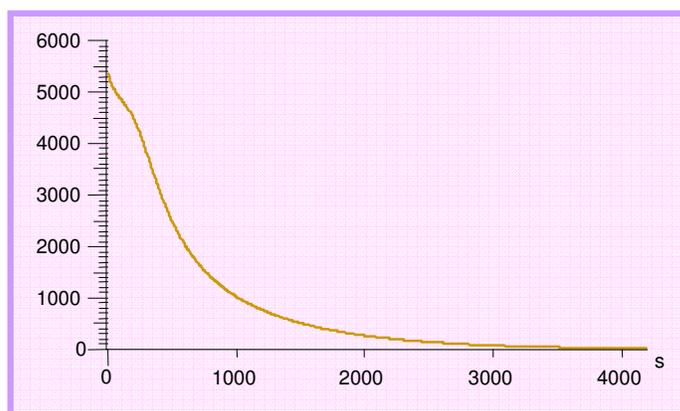


Figura 16: Descenso fluorescencia de una extracto de aceite de oliva virgen extra de la campaña 2003-2004

- **Blanco:** se hace la medida igual que en la muestra pero se emplea como blanco metanol diluido 1:20 en tampón fosfato pH7.

150 μ L metanol en tampón fosfato (75mM, pH7) (1:20) + 150 μ L fluoresceína (2.934 mg/L) + 75 μ L AAPH (221.25mM) (Fernández-Pachón *et al.*, 2004; 2005)

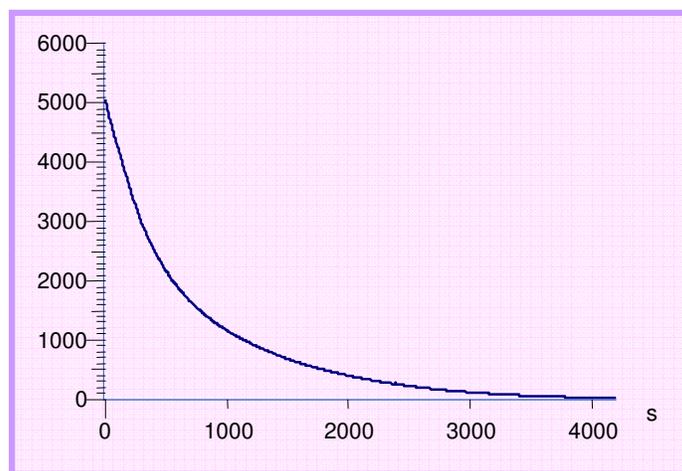


Figura 17: Descenso fluorescencia del Tampón fosfato pH7

➤ **Estándar** se emplea Trolox 20 μ M: (Fernández-Pachón *et al.*, 2004; 2005)

150 μ L solución de Trolox (20 μ M) + 150 μ L fluoresceína (2.934 mg/L) + 75 μ L AAPH (221.25mM)

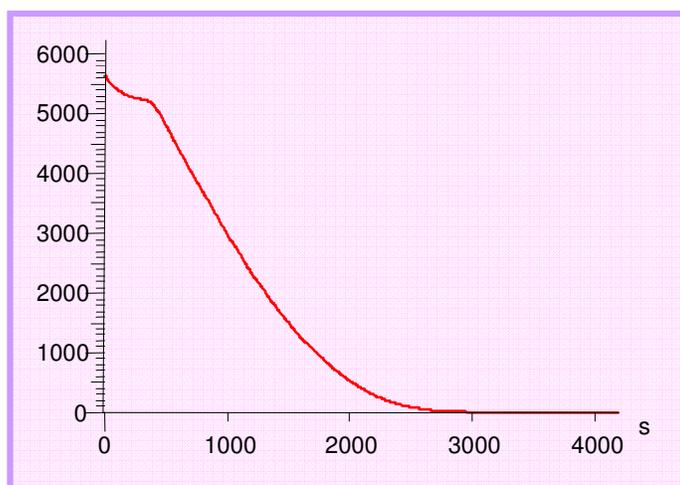


Figura 18: Descenso fluorescencia del estándar Trolox 20 μ M

b.2. Expresión de los resultados:

El descenso de la fluorescencia no es lineal con el tiempo, y la forma de la curva de descenso difiere en presencia de diferentes antioxidantes y con diferentes concentraciones de un mismo antioxidante (Frankel *et al.*, 2000).

Se expresan como Valor ORAC, se usa para la cuantificación el área debajo de la curva (AUC) de emisión de fluorescencia, que se obtiene calculando la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia de la fluoresceína a lo largo del tiempo entre el blanco y la muestra de aceite. Se expresa usando equivalentes de Trolox (μ mol/g) (Ninfali *et al.*, 2001; 2002; Prior *et al.*, 2005)

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{mol Trolox equivalente/g}) = kah (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

h: Concentración de Trolox nmol/mL

k: Factor de dilución de la muestra

a: relación entre volumen (mL) del extracto metanólico y los gramos de aceite

S: Área bajo la curva de descenso de fluorescencia de la muestra, del Trolox o del blanco y se calcula: (*Prior et al., 2003*)

$$S = (0.5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{70}/f_0) \times CT$$

f_0 = fluorescencia inicial a tiempo 0

f_i = fluorescencia medida a tiempo i (70 minutos)

CT = ciclo de tiempo en minutos (5 minutos)

3.1.5. Tratamiento Estadístico de los Resultados

En el estudio in vitro de los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante en el aceite de oliva virgen extra descritos en la presente memoria, se han realizado distintos tratamiento estadísticos sobre los resultados obtenidos de las muestras en los ensayos realizados. Todas las medidas se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como media y desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), que nos da idea de la variabilidad de los datos. Para ello se ha empleado el programa informático SPSS[®], versión 12.0.

Entre los análisis realizados se incluyen:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) ($p < 0.05$).
- Análisis de Regresión Lineal.

Material y Métodos

3. ESTUDIO IN VITRO DE DIFERENTES MÉTODOS DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1. Método del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

En esta memoria se empleó el método de oxidación con persulfato potásico, empleado por Pellegrini y col. en aceites de oliva (*Pellegrini et al., 2001*), la reacción entre el ABTS y persulfato potásico se hace a temperatura ambiente, en la oscuridad durante 12-16 horas. La reacción es inmediata alcanzando el máximo de absorbancia a las 6 horas. Para evaluar la actividad antioxidante, el radical se diluye en etanol hasta un valor de absorbancia a 734 nm de 0.07 ± 0.02 (*Pellegrini et al., 1999; 2001; Re et al., 1999; Arnao et al., 2001*).

Se mezcla el radical con la sustancia a ensayar (aceite de oliva virgen diluido en n-hexano) y se mide la absorbancia a 734 nm durante 30 min (*Re et al., 1999; Pellegrini et al 1999; 2001; Villaño et al., 2004*).

En nuestro estudio, la medida se hizo a los 30 minutos, aunque se comprobó que no existen diferencias entre los valores TEAC obtenidos a los 2, a los 15 y a los 30 minutos, lo que permite concluir que los compuestos antioxidantes del aceite de oliva virgen extra reaccionan mayoritariamente en la primera fase. En el método ABTS, se recomienda según algunos autores, realizar las medidas a los 30 minutos (*Pellegrini et al., 1999*) o a los 15 minutos (*Cano et al., 1998; Van den Berg et al., 1999*) para que de tiempo a reaccionar a todos los compuestos.

En general el valor TEAC es tiempo-dependiente, existen trabajos publicados con un valor mayor a los 15 minutos en comparación al valor obtenido a los 2 minutos, pero con una correlación con el IPT mayor a los 2 minutos ($r = 0.9012$) que a los 15 minutos ($r = 0.8462$) (Villaño *et al.*, 2004).

Se emplea etanol en la generación del radical, ya que se demostró que otros solventes orgánicos como el metanol o la acetona, porque aunque requieren menor tiempo de generación el radical formado es menos estable (Cano *et al.*, 2000). En el caso de los aceites, la actividad antioxidante total se mide directamente en aceites disueltos en n-hexano, que evita soluciones turbias que dificultan la medida espectrofotométrica (Pellegrini *et al.*, 1999; 2001) y permiten la contribución de todos los componentes antioxidantes presentes en el aceite, como los compuestos polifenólicos, tocoferoles y carotenoides (Boskou., 1996; Pellegrini *et al.*, 2003).

La muestra de aceite se diluye con el fin de conseguir que la concentración de antioxidantes en la muestra diluida se encuentre dentro de un intervalo de respuesta lineal. Se diluye el aceite en n-hexano de 4-20 veces, buscando el intervalo que presenta la respuesta lineal, al representar el porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical frente a la dilución del aceite se ha comprobado que la linealidad se produce en un intervalo determinado de concentraciones, por encima del cual las medidas no pueden considerarse válidas.

Se han ensayado 5 diluciones del aceite en n-hexano (diluido entre 4-20 veces), representando gráficamente la actividad antioxidante producida (expresada como % de inhibición) frente a la dilución del aceite ensayada:

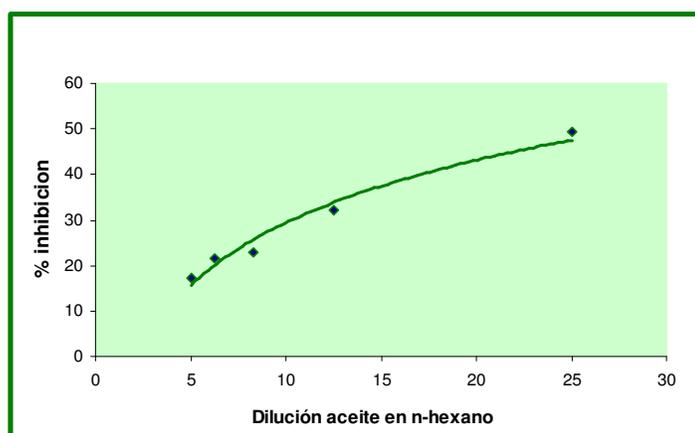


Figura 1: Relación entre el porcentaje de inhibición y diferentes diluciones de aceite en n-hexano

- **Actividad antioxidante en las muestras de aceite de oliva virgen extra.**

De todos los métodos descritos anteriormente, el empleado para generar el radical es el persulfato potásico, el más empleado en la bibliografía para muestras oleosas. El método original es el descrito por Pellegrini y col. (1999) con algunas pequeñas modificaciones. Este método es ampliamente usado en trabajos posteriores. Se emplea el ensayo de post-adición, formando primero el radical en ausencia de la muestra hasta tener una señal estable, cuando se añade la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se mide el descenso producido (Villaño *et al.*, 2004;2005 Prior *et al.*, 2005)

Son muchos los trabajos publicados que emplean el método ABTS para medir la actividad antioxidante en diversos alimentos: vino, aceite, frutas, cerveza etc., basándose en la habilidad de las diferentes sustancias para inhibir el radical catiónico generado en comparación a un antioxidante de referencia, el Trolox, el ácido ascórbico o la crisina (Arts *et al.*, 2004a). La crisina presenta como inconveniente la reacción con el $ABTS^{•+}$ de sus productos formados al reaccionar con el radical, en comparación a la reacción entre el Trolox y el $ABTS^{•+}$, que genera una quinona como producto secundario que no reacciona con el radical. El Trolox es el más empleado por reaccionar de forma inmediata con el radical, lo que reduce el tiempo de análisis (Van den Berg *et al.*, 1999; Arts *et al.*, 2004).

Se ha relacionado el contenido polifenólico total de los aceites (IPT), descrito en el capítulo 1 de la presente memoria, con la actividad antioxidante que presentan las muestras de aceites de las diferentes campañas.

En la Tabla 1 se muestran los valores de la Actividad Antioxidante Total (TAA) e IPT (Índice de Polifenoles Totales) de las muestras de aceite estudiadas.

	Muestra	ABTS (mM) ^a	IPT (mg/kg) ^b
2003-2004	1	1.23 ± 0.15	2201
	2	1.10 ± 0.06	1241
	3	1.11 ± 0.21	1069
	4	0.99 ± 0.13	1131
	5	1.04 ± 0.09	1037
	6	0.96 ± 0.03	975
	7	1.03 ± 0.08	1001
	8	0.91 ± 0.16	993
	9	0.85 ± 0.15	823
	10	0.93 ± 0.09	825
	11	1.08 ± 0.07	1113
	12	0.98 ± 0.08	998
	13	0.81 ± 0.11	710
		Media ± S.D	1.001 ± 0.11
2002-2003	1	0.88 ± 0.02	1929
	2	1.02 ± 0.04	2000
	3	0.82 ± 0.10	1293
	4	0.73 ± 0.04	852
	5	0.81 ± 0.02	958
		Media ± S.D	0.852 ± 0.10
2001-2002	1	0.91 ± 0.06	1785
	2	0.51 ± 0.01	1053
	3	0.38 ± 0.03	877
	4	0.43 ± 0.12	1043
		Media ± S.D	0.557 ± 0.24

Tabla 1: Valores TAA e IPT de los aceites de oliva virgen extra.
a: expresado en mmol Trolox /Kg aceite. Cada valor es la media y desviación estándar de la muestra procesada por duplicado.
b: expresado como equivalentes de ácido gálico (mg/ Kg aceite).

Con los resultados obtenidos se observa que las muestras de aceite que tienen un mayor perfil polifenólico, son las que presentan un mayor valor TAA (mM). Los aceites de la Campaña 2003-2004, son los que poseen un mayor contenido fenólico, que varía desde 2201

a 710 mg/ Kg, con un valor medio de 1085 mg/ Kg para un total de 13 muestras analizadas, el valor TAA encontrado oscila entre 1.23 y 0.81 mm Trolox /Kg aceite (valor medio de 1.001 mg/Kg). En la Campaña 2002-2003 el IPT tiene valores entre 2000-852 mg/Kg (valor medio 1406.4 mg/Kg), con valor TAA de 1.02 a 0.73 mg/Kg para un total de 5 muestras. Los 4 aceites analizados de la campaña más antigua 2001- 2002, presentan valores TAA de 0.91 a 0.38 mg/Kg y contenido fenólico de 1785 a 877 mg/Kg aceite. El descenso en el valor TAA en las muestras de aceite analizadas de la primera campaña 2001-2002, puede deberse a la disminución durante el almacenamiento prolongado de los componentes antioxidantes presentes en el aceite, como los compuestos polifenólicos, tocoferoles y carotenoides, existiendo una relación directa entre el valor TEAC y el contenido individual de los componentes antioxidantes del aceite (*Okogeri et al., 2002; García et al., 2002*).

La medida se hizo en todas las muestras analizadas a los 30 minutos. En algunas se realizaron medidas a los 2, a los 15 y a los 30 minutos, no existiendo diferencias importantes en los valores obtenidos a los 15 y a los 30 minutos, y siendo un poco menor el valor medido a los 2 minutos.

Muestra	TAA 2 min	TAA 15 min	TAA 30 min
1	0.94	1.15	1.23
2	0.70	0.93	1.03
3	0.68	0.85	0.93

Tabla 2: Valores TAA expresados en mmol Trolox/Kg aceite a los 2, 15 y 30 minutos

Aunque el valor TAA es mayor a los 30 minutos, al estudiar el coeficiente de correlación entre el IPT y el valor TAA encontramos que éste es mayor a los 2 minutos ($r = 0.992$), a los 15 minutos ($r = 0.990$) a los 30 minutos ($r = 0.977$).

En la primera fase reaccionarían los compuestos más afines al radical formándose productos de reacción que, junto con los compuestos de reactividad más lenta darían lugar a la segunda fase. El aumento del tiempo de reacción con el radical posibilita la actuación de todas las sustancias antioxidantes presentes. En el método ABTS, se recomienda realizar las

medidas a los 30 minutos (*Pellegrini et al., 1999*) o a los 15 minutos (*Cano et al., 1998; Van den Berg et al., 1999*) para que de tiempo a reaccionar a todos los compuestos.

Se concluye que la evaluación de la actividad antioxidante depende, no sólo de la estructura química de los componentes, sino también de los productos de reacción formados y su capacidad de reacción con el radical ABTS^{•+}.

Los valores TAA obtenidos son similares a los encontrados en la bibliografía para aceites. Así, Pellegrini y col. recogieron valores TAA para aceites de oliva virgen extra, entre 2.69 y 0.61 mmol Trolox /Kg e IPT de 369 a 251 mg/Kg (*Pellegrini et al., 2001; 2003*) y valores de 2.64 y 078 mmol Trolox/ Kg (*Gorinstein et al., 2003*).

El método ABTS es ampliamente usado en diferentes alimentos; zumo de frutas (*Gil et al., 2000; Kim et al., 2002; Shui et al., 2006*), vino (*Villaño et al., 2005*), cerveza (*Oñate-Jaén et al., 2006*), té (*Alonso et al., 2002; Ivekovic et al., 2005*).

Existen diferencias en la composición de antioxidantes entre los aceites de oliva virgen extra y los aceites de oliva, con diferencias en el valor TAA del 50%. Los aceites obtenidos por presión son mucho más ricos en compuestos fenólicos que los aceites refinados extraídos con solventes. Los aceites de oliva presentan un porcentaje de aceite de oliva virgen extra que puede variar del 33 al 95% (*Andrikopoulos et al., 1989*), lo que afecta a la cantidad de antioxidantes presentes, y por tanto al valor TAA (*Pellegrini et al., 2001*).

El método ABTS se realizó en muestras de aceite de oliva, para comparar el valor TAA con el resultado de las muestras de aceite de oliva virgen extra evaluadas, se realizó en un total de 4 aceites de oliva, obteniendo valores de 0.28 ± 0.08 , 0.34 ± 0.02 , 0.14 ± 0.11 y 0.25 ± 0.09 mg/Kg aceite. El descenso es aproximadamente del 50 % con respecto a algunos valores obtenidos para el aceite de oliva virgen extra.

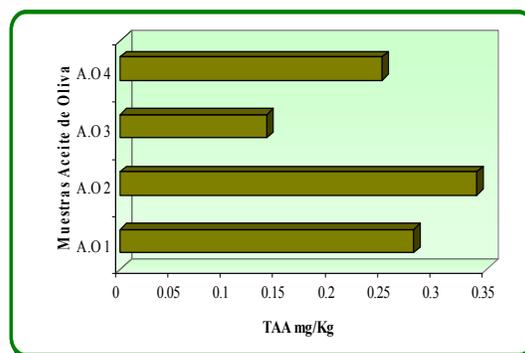


Figura 2: Valor TAA en muestras de aceite de oliva, expresado en mmol Trolox/Kg aceite. Muestras de aceite de oliva: A.O.

El valor TAA, se debe a la diferente contribución de los antioxidantes individuales del aceite (polifenoles, caroteno, escualeno, tocoferol etc.), algunos trabajos intentaron demostrar la contribución de cada componente individual en el valor final TAA obtenido, demostrando finalmente que la capacidad antioxidante total en los aceites de oliva virgen, es debido principalmente a su contenido fenólico, y que el análisis directo de la actividad antioxidante total (TAA) es un método simple y efectivo que engloba la contribución de todos los antioxidantes (*Pellegrini et al., 2001*).

En ensayo ABTS presenta como ventajas: que el radical catiónico reacciona rápidamente con las sustancia antioxidante (generalmente en un tiempo inferior a los 30 min), que se puede emplear en un amplio rango de pH y puede ser usado para estudiar efectos de pH sobre mecanismos antioxidantes (*Lemanska et al., 2001*), es también soluble en solventes acuosos y orgánicos lo que permite determinar la capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica de extractos y fluidos biológicos (*Prior et al., 2005*). Presenta una serie de inconvenientes: es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el ABTS (0.68V), el punto final de la reacción varía en función a la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos ó muy elevados que pueden interferir en los resultados TEAC finales.

3.2.2. Método DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil)

- **Medida de la Actividad Antioxidante en aceites de oliva virgen extra.**

El método DPPH se ha empleado ampliamente por muchos autores para evaluar la actividad antioxidante del extracto fenólico de aceites de oliva virgen (*Mosca et al., 2000; Frankel et al., 2000; Gordon et al., 2001; Gómez-Alonso et al., 2003*).

Se considera el tiempo final de medida cuando se alcanza el equilibrio [Figura 3], lo que asegura que la reacción no continúa progresando, la medida no sea errónea y se asegura que todos los compuestos antioxidantes hayan reaccionado con el radical DPPH[•].

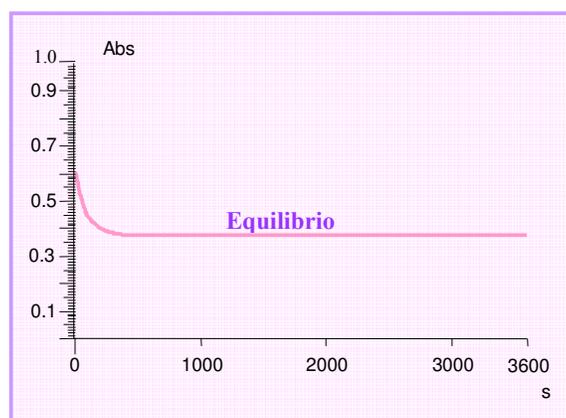


Figura 3: Cinética de reacción del antioxidante y el radical DPPH[•]

Villaño y col. estudiaron la cinética de los compuestos polifenólicos frente al radical DPPH[•], en general la absorbancia desciende rápidamente en los primeros minutos, debida a la transferencia al radical de los átomos de hidrógeno con más facilidad de donación. Seguidamente una etapa de caída más lenta, hasta el equilibrio, debido a la actividad remanente de los productos de oxidación y degradación (*Villaño, 2005*).

En la Tabla 3 se muestran los valores de la Actividad Antioxidante Total (TAA) en $\mu\text{mol Trolox/ Kg}$ y mmol Trolox/ Kg e IPT (Índice de Polifenoles Totales) de las muestras de aceite estudiadas.

	Muestra	DPPH (μM) a	DPPH (mM) b	IPT (mg/kg) c
2003-2004	1	779.14 \pm 72.10	0.779 \pm 0.07	2201
	2	660.09 \pm 41.05	0.660 \pm 0.04	1241
	3	627.00 \pm 33.12	0.627 \pm 0.03	1069
	4	600.89 \pm 120.01	0.600 \pm 0.12	1131
	5	620.00 \pm 62.90	0.620 \pm 0.06	1037
	6	590.99 \pm 90.18	0.590 \pm 0.09	975
	7	598.56 \pm 61.91	0.598 \pm 0.06	1001
	8	550.54 \pm 20.30	0.550 \pm 0.02	993
	9	431.89 \pm 32.12	0.431 \pm 0.03	823
	10	567.12 \pm 63.89	0.567 \pm 0.06	825
	11	615.89 \pm 41.12	0.615 \pm 0.04	1113
	12	590.34 \pm 40.32	0.590 \pm 0.04	998
	13	409.78 \pm 23.76	0.409 \pm 0.02	710
	Media \pm S.D	587.86 \pm 92.79	0.587 \pm 0.09	1085.9 \pm 363.69
2002-2003	1	217.89 \pm 78.87	0.217 \pm 0.07	1929
	2	273.71 \pm 33.54	0.273 \pm 0.03	2000
	3	176.84 \pm 19.65	0.176 \pm 0.01	1293
	4	156.33 \pm 23.21	0.156 \pm 0.02	852
	5	198.43 \pm 52.02	0.198 \pm 0.05	958
	Media \pm S.D	204.64 \pm 44.97	0.204 \pm 0.04	1406.4 \pm 535.43
2001-2002	1	313.26 \pm 43.12	0.313 \pm 0.04	1785
	2	179.08 \pm 56.09	0.179 \pm 0.05	1053
	3	274.69 \pm 31.78	0.274 \pm 0.03	877
	4	232.07 \pm 22.78	0.232 \pm 0.02	1043
	Media \pm S.D	249.77 \pm 57.62	0.249 \pm 0.05	1189.5 \pm 405.12

Tabla 3: Valores TAA e IPT de los aceites de oliva virgen extra.

a: expresado en μmol Trolox /Kg aceite. Cada valor es la media y desviación estándar de la muestra procesada por duplicado.

b: expresados en mmol Trolox /Kg.

c: expresado como equivalentes de ácido gálico (mg/ Kg aceite).

Los aceites pertenecientes a la última campaña presentan valores TAA que oscilan entre 409.78 y 779.14 μmol Trolox/ Kg de aceite, con un valor medio de 587.86, muy por encima de los valores obtenidos en las campañas anteriores que presentan valores medios TAA de 204.64 y 249.77 μmol Trolox/ Kg de aceite en la campaña 2002-2003 y 2001-2002 respectivamente. Todos los métodos de medida antioxidante, se pusieron a punto pasado un tiempo desde la obtención de los aceites, que se almacenaron en las condiciones más óptimas para intentar mantener y conservar intactas todas sus propiedades y componentes, aún así se puede observar como para las mismas muestras de aceite pertenecientes a campañas diferentes, el valor TEAC obtenido disminuye significativamente entre campañas.

El tratamiento estadístico que se ha realizado sobre los resultados obtenidos de las muestras en el ensayo incluye el análisis de la varianza (ANOVA), existiendo diferencias significativas entre las tres campañas ($p < 0.05$).

El descenso de la absorbancia al ponerse en contacto el aceite de oliva virgen extra con el radical es rápido, al incrementarse el periodo de almacenamiento y por tanto la oxidación del aceite, el descenso a 515 nm era menor, por existir una menor concentración de antioxidantes en los aceites de oliva virgen extra almacenados durante un periodo prolongado (*Michele et al., 1969*), lo que puede explicar la baja actividad antioxidante en los aceites de la primera campaña estudiada 2001-2002, a pesar de almacenarse en condiciones adecuadas.

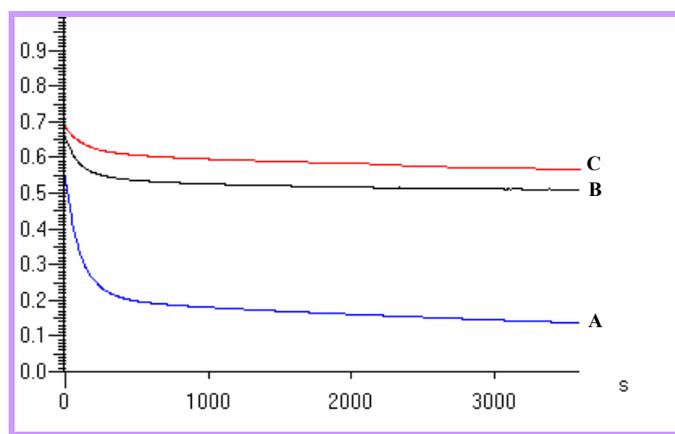


Figura 5: Cinética de reacción del antioxidante y el radical DPPH
A: descenso de absorbancia a 515 nm de un aceite de la campaña 2003-2004
B: descenso de absorbancia a 515 nm de un aceite de la campaña 2002-2003
C: descenso de absorbancia a 515 nm de un aceite de la campaña 2001-2002

Gómez-Alonso y col. estudiaron los cambios en la composición fenólica y en la actividad antioxidante en aceites de oliva virgen de la variedad Cornicabra, tras someterlos a elevadas temperaturas (fritura), empleando como método de medida de la actividad antioxidante el DPPH, concluyendo que los aceites expuestos a temperaturas de fritura (180°C) durante un tiempo prolongado, disminuía la actividad antioxidante desde valores de $750 \mu\text{mol Trolox/ Kg}$ a valores por debajo de $250 \mu\text{mol Trolox/ Kg}$.

Se comprueba para las muestras de las campañas 2002-2003 y 2001-2002, si se cumplen las condiciones de aplicación del test t para medias independientes: una distribución normal, que se confirma con los test de normalidad (Shapiro-Wilks y Kolmogorov-Smirnov) que dan un valor de p no significativo en ambos grupos y la homogeneidad de varianzas no existiendo diferencias significativas entre las varianzas, se cumplen por tanto las dos condiciones para aplicar la prueba de la t de Student. Aplicando este estudio estadístico, se comprobó que no existen diferencias significativas entre las campañas 2002-2003 y 2001-2002 y sí existen diferencias significativas entre la campaña 2003-2004 y las dos anteriores ($p < 0.05$), lo que explica que en los aceites de las dos primeras campañas que han permanecido más tiempo almacenados, hay un mayor descenso en los componentes antioxidantes, como los compuestos polifenólicos, tocoferoles y carotenoides, responsables directamente de los bajos valores TEAC obtenidos en nuestro estudio.

Los valores obtenidos son similares a los encontrados en la bibliografía para aceites de oliva vírgenes españoles, así Gómez-Alonso y col. recogieron valores TAA para aceites de oliva virgen extra, entre 693 y 746 $\mu\text{mol Trolox/ Kg}$ (Gómez-Alonso *et al.*, 2003). Gorinstein y col. trabajaron con aceites de oliva de las variedades Arbequina, Hojiblanca y Picual y un aceite de oliva virgen extra, empleando diferentes métodos de medida de la actividad antioxidantes, los valores obtenidos en el método DPPH expresados como % de actividad anti radical (% RSA (radical scavenging activity)) son de 23.1 ± 2.3 , 26.8 ± 1.7 , 27.2 ± 1.2 y 29.4 ± 1.4 respectivamente, el mayor potencial antioxidante se observó en los aceites de oliva virgen extra, en el caso de aceites lampantes el valor disminuía a valores de 9.8 ± 0.9 (Gorinstein *et al.*, 2003).

El antioxidante de referencia utilizado al igual que el método ABTS, es el Trolox, ampliamente empleado en la bibliografía consultada (Choi *et al.*, 2000). Los resultados se expresan como valor TEAC ($\mu\text{mol/ Kg aceite}$) (Prakash, 2001; Gómez-Alonso *et al.*, 2003) o con el parámetro, eficacia antioxidante (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998), empleado preferentemente en el caso de compuestos puros que se calcula a partir de dos índices: el

valor **EC₅₀** (Concentración Eficaz 50) (*Visioli et al., 1998; Gordon et al., 2001; Lavelli et al., 2002; Rotondi et al., 2004*) que se define como la concentración de compuesto necesaria para producir el 50% de inhibición del radical y el valor **TEC₅₀** (Tiempo Eficaz 50) que se define como el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio cuando la concentración de muestra ensayada corresponde a la Concentración Eficaz 50 (*Villaño, 2005*).

Son muchos los antioxidantes estándar empleados en la medida de la capacidad antioxidante por el método DPPH[•]: Trolox, Vitamina E, BHT y Ácido ascórbico con valores de actividad antioxidante expresado en $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de 400, 201, 395 y 442 respectivamente (*Prakash et al., 2001*) o con valor EC_{50} de 1.31×10^{-5} , 5.04×10^{-6} , 1.05×10^{-4} para la vitamina C, vitamina E y BHT respectivamente (*Visioli et al., 1998*).

Un inconveniente importante a la hora de emplear este método de medida, es la solubilidad del radical DPPH en disolventes orgánicos, que limita su uso frente a antioxidantes hidrofílicos (*Arnao et al., 2001*), en comparación al método ABTS, anteriormente descrito, que presenta una elevada solubilidad en ambos solventes. Lavelli y col. estudiaron la actividad antioxidante de los aceites de oliva virgen extra extraídos con diferentes solventes: metanol 100% y mezclas de acetona/ agua (30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 90:10), por el método DPPH. Los extractos acetona/agua (90:10) tienen la misma actividad antioxidante que el extracto metanólico (100 ± 6 y 100 ± 2 respectivamente), dicha actividad va disminuyendo a medida que aumenta el porcentaje en agua (*Lavelli et al., 2002; Valavanidis et al., 2004*).

En nuestro trabajo se extrae la fracción polar con metanol, que contiene la mayoría de los compuestos polifenólicos responsables de la acción antioxidante del aceite de oliva virgen extra.

Keceli y col. midieron la actividad antioxidante y la estabilidad de la fracción fenólica de aceitunas verdes y de aceites de oliva virgen extra de variedades turcas, expresando con el valor **EC₅₀**, los resultados obtenidos de aplicar el método de medida antioxidante DPPH.

Los extractos de aceituna contienen una mayor concentración (1940-5800 mg/ Kg) de componentes fenólicos que el extracto de aceite de oliva (180 mg/ Kg), esta diferencia se puede explicar por la elevada concentración de antioxidantes solubles, que se arrastran en el proceso de lavado durante la extracción del aceite. Se obtuvieron valores EC_{50} a los 60 minutos por existir componentes en ambos extractos, que reducen más lentamente la concentración del DPPH. Se comparó el valor obtenido con compuestos fenólicos de referencia: oleuropeina, ácido cafeico y α - tocoferol, que reaccionan rápidamente con el radical DPPH a los 15 minutos, el ácido cafeico y la oleuropeina presentan una mayor acción frente al radical DPPH que el α - tocoferol tanto a los 15 como a los 60 min. Se concluye que algunas variedades de aceituna contienen un mayor efecto frente al radical y una concentración de componentes activos más elevada que el aceite de oliva (*Keceli et al., 2001*).

En general el método DPPH es simple, fácil de realizar y es un radical estable, sin embargo puede dar lugar a errores de interpretación al existir compuestos que interfieren a 515 nm (carotenoides) (*Noruma et al., 1997*), y presenta inespecificidad en la reacción ya que actúa como radical y como oxidante, y su color puede perderse por reacción con el radical, por reducción, por reacciones desconocidas o por moléculas con mayor afinidad estérica por el radical, lo que provoca una sobreestimación de los resultados de la capacidad antioxidante. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o no reaccionar con el DPPH por su inaccesibilidad estérica. Se concluye por tanto, que no se puede sólo definir la capacidad antioxidante de una sustancia, por su habilidad a reaccionar con el DPPH (*Prior et al., 2005*), es necesario desarrollar otros métodos de medida y comparar los resultados obtenidos.

3.2.3. Ensayo antioxidante Beta-Caroteno/Ácido Linoleico

- **Medida de la Actividad Antioxidante (AA) en aceites de oliva virgen extra.**

Se emplean diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos, unos basados en la oxidación de sustratos lipídicos o lipoproteínas, evaluando la actividad antioxidante en función a la capacidad del método empleado en inhibir la oxidación (*Ben-Aziz et al., 1971; Kanner et al., 1977; 1994; Suja et al., 2005*), otros se basan en la habilidad de un antioxidante para bloquear radicales libres, generados habitualmente, de forma artificial (ABTS, DPPH).

Este método se basa en la decoloración del β -caroteno por la acción de peróxidos originados durante la oxidación del ácido linoleico. Se determina la oxidación de la molécula diana, el β -caroteno, debida a su destrucción por parte de los productos oxidación del ácido linoleico (compuestos orgánicos volátiles e hidroperóxidos conjugados), por espectrofotometría. Este método es muy empleado en la determinación de la actividad antioxidante, porque se realiza en emulsión, un estado muy frecuente en alimentos (*Pérez et al., 2003; Suja et al., 2005*).

En este test los antioxidantes actúan en una emulsión de ácido linoleico y β -caroteno. El ácido linoleico forma miscelas en sistemas acuosos, que poseen propiedades coloidales que pueden afectar la conducta de las sustancias antioxidantes y de los iniciadores de la oxidación (*Frankel et al., 2000; Ubando-Rivera et al., 2005*).

El fundamento de este método se basa en la acción protectora de las sustancias antioxidantes estudiadas, frente a la oxidación del ácido linoleico, y por tanto el retardo en la pérdida de color del β -caroteno. El radical libre formado del ácido linoleico por pérdida de un átomo de hidrógeno, ataca a la molécula de β -caroteno a la que oxida por rotura de

su doble enlace, que conduce a un descenso en su coloración naranja. El índice de decoloración se evalúa por diferencia de medida de su absorbancia en un tiempo inicial ($t = 0$ min) y pasado 2 horas. Con frecuencia se emplea el β -caroteno como diana en los procesos de oxidación, su decoloración puede ocurrir por múltiples causas, es por tanto un método poco específico que puede dificultar la interpretación de los resultados obtenidos (Prior *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, se trabajó con el extracto etanólico del aceite de oliva virgen extra que contiene la mayoría de compuestos que contribuyen significativamente a su actividad antioxidante, en alimentos hidrofílicos se emplea medio acuoso en la obtención del extracto, presentando una actividad antioxidante significativamente mayor el extracto acuoso que el extracto metanólico (Cheung *et al.*, 2003), relacionado a su vez con un mayor contenido en polifenoles totales, que depende también del solvente empleado en la extracción.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al aplicar este método de medida de la actividad antioxidante en las muestras de aceite pertenecientes a las tres campañas olivícolas estudiadas.

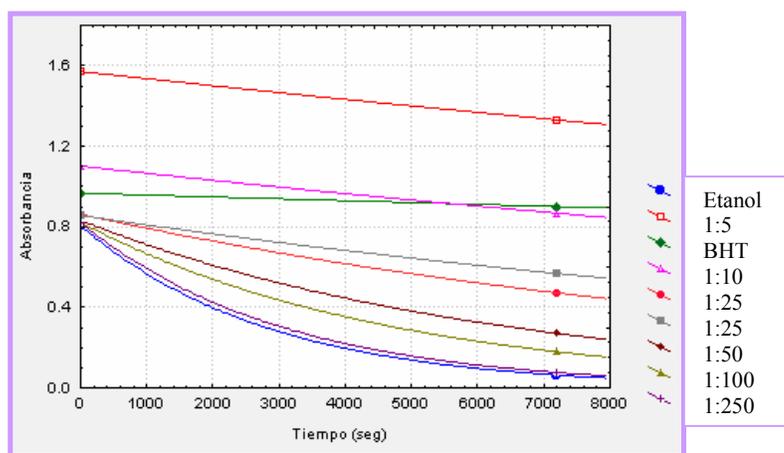


Figura 6: Cambios en la absorbancia a 470 nm para distintas diluciones de un extracto de una misma muestra de aceite.

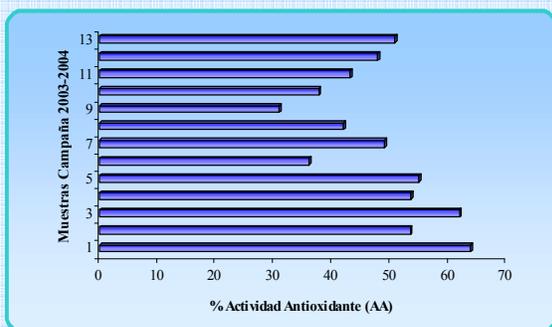


Figura 7: Valores de % AA- β -caroteno del extracto de aceite de la campaña 2003-2004. (n = 13)

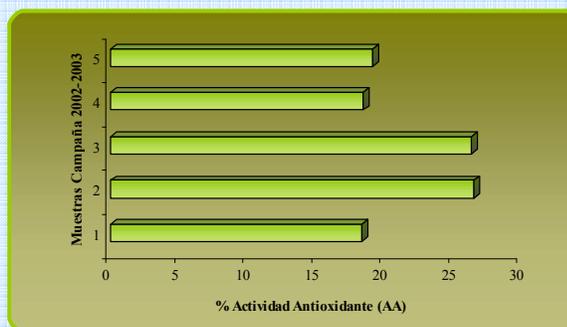


Figura 8: Valores de % AA- β -caroteno del extractos de aceite de la campaña 2002-2003. (n = 5)

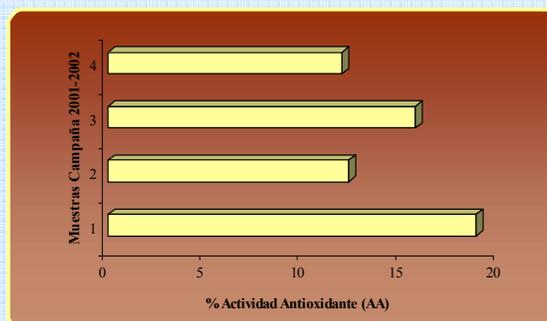


Figura 9: Valores de % AA- β -caroteno del extractos de aceite de la campaña 2002-2001. (n = 4).

En las Figuras 7, 8 y 9 se recogen los valores de la Actividad Antioxidante (% AA) del extracto etanólico de las muestras de aceites analizadas por campañas, en la dilución idónea dentro del intervalo del blanco (etanol) y el control (BHT) [Figura 6]. En la campaña 2003-2004 se analizan un total de 13 muestras, con valores entre $63.79 \pm 2.69 \%$ y $30.78 \pm 1.74 \%$ y un valor medio de $48.06 \pm 9.86 \%$, en las dos campañas anteriores a ésta, la 2002-2003 y 2001- 2002 se analizaron las muestras que presentaban un mayor perfil polifenólico, y se mantuvieron hasta el momento del análisis almacenadas en condiciones óptimas para evitar en lo máximo posibles alteraciones. En la campaña 2002-2003 los valores oscilaron entre $26.54 \pm 4.99 \%$ y $18.33 \pm 2.60 \%$ para un total de 5 muestras, con valor promedio de $21.75 \pm 4.29 \%$, los aceites pertenecientes a la primera campaña objeto de estudio la 2001-2002 (n = 4), el valor % AA obtenido en las muestras

analizadas, son inferiores a los resultados de las otras campañas y difieren mucho de los valores de la campaña 2003-2004, oscilando entre $18.87 \pm 1.98 \%$ y $11.98 \pm 0.69 \%$ ($14.73 \pm 3.24 \%$), este descenso se debe fundamentalmente al periodo de tiempo desde su obtención hasta su análisis, a pesar de estar almacenados en ausencia total de luz y en atmósfera inerte, para frenar o retardar su oxidación y evitar la pérdida de los compuestos relacionados directamente con la capacidad antioxidante del aceite. El estudio también se realizó en aceites pertenecientes a las tres campañas estudiadas, almacenadas en presencia de luz y de oxígeno, para comprobar la variación en la actividad antioxidante medida con el test β -caroteno/ácido linoleico. Los valores disminuyeron entre un 75-80 % y en algunas muestras de la campaña 2001-2002 no llegó a detectarse ningún valor de actividad antioxidante, existiendo diferencias significativas importantes ($p < 0.001$) (test de t de Student para muestras relacionadas).

Es muy escasa la información bibliográfica sobre la aplicación de este método de medida de la actividad antioxidante, basado en de decoloración oxidativa, en aceites de oliva. Es por tanto, difícil comparar los valores obtenidos de AA con los descritos por otros autores. Gorinstein y col. en un trabajo publicado en el 2003, trabajaron con diferentes tipos de aceites de oliva españoles de variedades diferentes de aceitunas, encontrando valores de % AA que oscilan entre $33.2 \pm 3.3 \%$ y $40.4 \pm 2.9 \%$ (Gorinstein *et al.*, 2003). Los valores obtenidos en nuestro estudio son muy similares a los descritos, incluso en algunos casos lo superan. El descenso en los resultados se observa en las muestras que han permanecido más tiempo almacenadas.

Previamente al tratamiento estadístico (ANOVA) de los datos obtenidos con el método de medida de la actividad antioxidante β -caroteno/ácido linoleico, se comprobó si los valores siguen o no una distribución normal, empleando diferentes test estadísticos. Es importante considerar el tamaño de muestra, ya que al existir pocos datos casi nunca se dispondrá de evidencias para rechazar la normalidad [Tabla 4].

Tests of Normality							
Caroteno	campaña	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	1.00	.105	13	.200*	.975	13	.945
	2.00	.332	5	.075	.735	5	.021
	3.00	.272	4	.	.892	4	.393

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Tabla 4: Pruebas de Normalidad. Resultados del los test de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. ($p > 0.05$)

Ambos test de normalidad dan un valor de p no significativo en los tres grupos, por lo tanto no hay evidencias para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Se comprueba también con el test de asimetría en cada campaña que cumplen los tres requisitos (asimetría, curtosis y valores entre la media ± 3 desviación estándar), concluyendo por tanto que existe una distribución normal de la variable. El tipo de variable dependiente es cuantitativa y la independiente es cualitativa, y se comprueba la homogeneidad de las varianzas no existiendo diferencias significativas. Se cumplen por tanto las tres condiciones para que los resultados de un análisis de varianza (ANOVA) puedan considerarse válidos.

El tratamiento estadístico que se ha realizado sobre los resultados obtenidos de las muestras en el ensayo incluye el análisis de la varianza (ANOVA), existiendo diferencias significativas entre las tres campañas ($p < 0.05$). Al aplicar el test de la t de Student para muestras independientes, una vez comprobada la distribución normal de las variables, se comprobó que no existen diferencias significativas entre ambas campañas estudiadas ($p < 0.05$) (2002-2003 y 2001-2002) y sí existen diferencias significativas entre la campaña 2003-2004 y las dos anteriores. Estos resultados están de acuerdo con los valores (%AA) obtenidos para los aceites estudiados, que explica que en las muestras de las dos primeras campañas (2001-2002 y 2002-2003) que han permanecido más tiempo almacenado, están más deteriorados y oxidados y por tanto, hay un mayor descenso en los componentes antioxidantes

El efecto antioxidante del extracto de aceite de oliva virgen extra, previene la peroxidación del ácido linoleico retardando por tanto la decoloración de la molécula de β -caroteno, presentando elevados valores en la actividad antioxidante (AA).

Un trabajo publicado en 1971, describió un método para determinar de forma directa por espectrofotometría la decoloración oxidativa del β -caroteno en solución acuosa, el descenso de absorbancia se mide a 460 nm. Se estudió en efecto inhibidor de algunos antioxidantes sobre la decoloración oxidativa del β -caroteno (*Ben-Aziz et al., 1971*).

Son muchas las sustancias antioxidantes existentes, naturales y sintéticas, como el BHT (*Suja et al., 2005; Tepe et al., 2005*) empleado en nuestro método que actúa como antioxidante sintético de referencia, al igual que el BHA (*Gorinstein et al., 2003; Sacchetti et al., 2004; Geckil et al., 2005*), TBHQ (*Cheung et al., 2003*), utilizados en ensayos de grasas y alimentos oleosos para prevenir la degradación oxidativa (*Lölicher, 1991*), se observó que no había cambios significativos en la medida de la absorbancia (*Fukumoto et al., 2000; Sun et al., 2005*) [Figura 10]. Al ser ensayos *in vitro*, no se considera el efecto carcinogénico encontrado para el BHA y BHT (*Branen., 1975; Botterweck et al., 2000; Matthaus., 2002; Cheung et al., 2003*), sí es necesario considerar sus propiedades físicas, la inestabilidad a altas temperaturas y su alta volatilidad (*Dapkevicius et al., 1998*). El valor máximo permitido de antioxidantes sintéticos en alimentos es de 200 ppm, en la mayoría de los estudios *in vitro* que lo emplean intentan no sobrepasar dicho valor (*Suja et al., 2005*).

Un estudio del 2004, compara la capacidad antioxidante de la catequina con otros antioxidantes puros (Trolox, Vitamina C y BHT) no detectándose ninguna actividad en los dos primeros y el valor más elevado con el BHT (*Katalinic et al., 2004*).

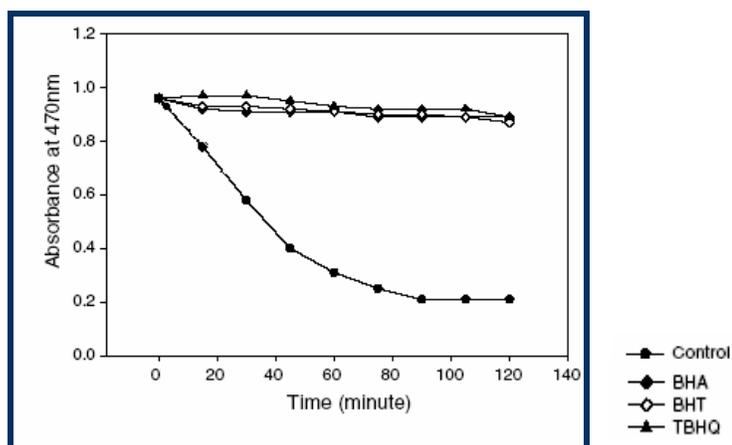


Figura 10: Variación de absorbancia entre antioxidantes de referencia. Sun *et al.*, 2005.

Este método de medida de la actividad antioxidante es ampliamente empleado, pero puede presentar resultados que difieran mucho de los obtenidos con otro método de medida debido a los diferentes mecanismos en el proceso de oxidación y al comportamiento lipofílico e hidrofílico de los antioxidantes. Bruni y col emplearon para un mismo aceite esencial, el método de medida de la capacidad antioxidante DPPH, que es independiente a la polaridad del antioxidante y el test de decoloración oxidativa del β -caroteno, dependiente a la polaridad de la sustancia antioxidante, presentando un comportamiento diferente al bloqueo de radicales libres y como inhibidores del proceso oxidativo. Así moléculas con cierta polaridad pueden presentar una menor efectividad para prevenir la oxidación del ácido linoleico (Bruni *et al.*, 2004).

En la mayoría de la bibliografía consultada, se emplea este método de medida de la actividad antioxidante en aceites esenciales (Sacchetti *et al.*, 2004; Bruni *et al.*, 2004), hierbas y plantas autóctonas (Dapkevicius *et al.*, 1998; Chanwitheesuk *et al.*, 2005; Suja *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005) vinos (Kanner *et al.*, 1994; Katalinic *et al.*, 2004), vegetales (Cheung *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2004; Motalleb *et al.*, 2005) y compuestos puros (Von Gadow *et al.*, 1997). En aceites de oliva virgen extra es muy escasa la bibliografía que recoge la aplicación de este método, como medida de la actividad antioxidante (Gorinstein *et al.*, 2003).

Gorinstein y col. compararon el contenido de algunos compuestos bioquímicos (esteroles, ácidos grasos, compuestos fenólicos, tocoferoles, etc.) y la actividad antioxidante de aceites de oliva vírgenes de variedades de aceitunas españolas, empleando diferentes métodos de medida. El valor de la Actividad Antioxidante (AA) de las muestras de aceite analizadas por el test del β -caroteno/ácido linoleico, es de 33.2 ± 3.3 , 38.1 ± 3.5 , 40.4 ± 2.9 , 38.7 ± 2.0 y 13.2 ± 1.1 % para aceites de oliva de la variedad Arbequina, Hojiblanca, AOVE, Picual y lampante respectivamente. Se correlaciona el contenido en polifenoles totales y los resultados obtenidos con los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante para comparar la sensibilidad de los diferentes test empleados. El mejor método para la determinación de la actividad antioxidante en aceites de oliva es el test del β -caroteno ($r = 0.9958$), y el menor valor se obtuvo con el método ABTS (TAA) ($r = 0.9197$). En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio determinan que el aceite de oliva virgen extra es el que presenta mayores propiedades organolépticas, el mayor contenido en componentes antioxidantes y por tanto el de mayor actividad antioxidante (Gorinstein et al., 2003).

Una sustancia antioxidante minimiza la oxidación de los compuestos lipídicos de las membranas celulares, inhiben los compuestos orgánicos volátiles y los peróxidos dienos conjugados generados por la oxidación del ácido linoleico, que presentan acción cancerígena. Tepe y col. demostraron en un estudio realizado en el 2005, que los extractos polares presentan una mayor actividad antioxidante que la fracción no polar, son por tanto, los compuestos polifenoles y flavonoides los que juegan un papel importante en la capacidad antioxidante (Tepe et al., 2005).

3.2.4. Método ORAC (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno)

- **Actividad antioxidante en las muestras de aceite de oliva virgen extra.**

Los datos aportados por nuestro estudio resultan similares a los encontrados en la literatura revisada para el aceite de oliva, incluso en algunas de nuestras muestras se superan los valores encontrados para el aceite. Así, Ninfali y col. obtuvieron valores ORAC para el aceite de oliva virgen extra, entre 1.78 ± 0.16 $\mu\text{mol Trolox/g}$ y 5.08 ± 0.26 $\mu\text{mol Trolox/g}$, y relacionaron el valor obtenido con el contenido fenólico total que oscilaba entre 50 ± 6.4 y 236 ± 20 mg/Kg . Se estudió el contenido en polifenoles totales y el valor ORAC en aceites sometidos a varias extracciones sucesivas con metanol, observando que el valor de la primera y segunda extracción es muy superior al encontrado en el tercer y cuarto tratamiento, con valores ORAC de 4.83 ± 0.28 $\mu\text{mol Trolox/g}$ e IPT de 254 ± 21 mg/Kg (extracción 1ª y 2ª) y de 0.54 ± 0.12 y 0.48 ± 0.11 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en la tercera y cuarta extracción respectivamente, y un contenido insignificante en el contenido fenólico. Por tanto, es evidente que el 98% aproximadamente de los polifenoles se recuperan en las dos primeras extracciones. El valor ORAC se refiere al obtenido de la primera y segunda extracción, aunque el valor de capacidad antioxidante de las extracciones sucesivas era significativo, del orden de 0.5 $\mu\text{mol Trolox/g}$ que puede deberse a compuestos carotenoides y a aldehídos de cadena corta, y es probable que estos compuestos se sigan extrayendo en cada paso. La composición y concentración de estas sustancias en el aceite de oliva virgen extra es muy baja y muy similar, por lo que su capacidad de bloqueo de radicales peroxilo no influye mucho en la medida del valor ORAC, lo mismo que otras moléculas (tocoferoles) cuyo contenido no cambia significativamente entre diferentes tipos de aceites de oliva virgen extra, sin embargo el tipo y composición de los compuestos fenólicos varía entre los aceites, por ello la capacidad antioxidante de un tipo de aceite está determinada mayoritariamente por el tipo y concentración de fenoles presentes (Ninfali et al., 2001; 2002).

En la Tabla 5 se muestran los valores ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) expresados en μmol Trolox equivalente/g, de todos los aceites estudiados ($n=22$).

Los resultados obtenidos en las muestras de aceite son mayores en la campaña 2003-2004 duplicando los valores obtenidos en las campañas anteriores, con valores que oscilan entre 6.43 ± 0.28 y 3.70 ± 0.27 μmol Trolox equivalente/g con valor medio de 4.97 ± 0.87 μmol Trolox equivalente/g, los valores de la campaña anterior con valores entre 2.54 ± 0.08 y 2.25 ± 0.33 μmol Trolox equivalente/g, y valor medio de 2.40 ± 0.12 μmol Trolox equivalente/g, en la última campaña 2001-2002 los valores ORAC obtenidos son muy bajos de 1.89 ± 0.41 y 115 ± 0.55 μmol Trolox equivalente/g, y promedio de 1.46 ± 0.35 μmol Trolox equivalente/g, presenta valores muy por debajo de los encontrados en la bibliografía consultada, en general este descenso puede deberse al tiempo que permanecieron almacenados los aceites antes de llevar a cabo la medida de su actividad antioxidante por el método ORAC.

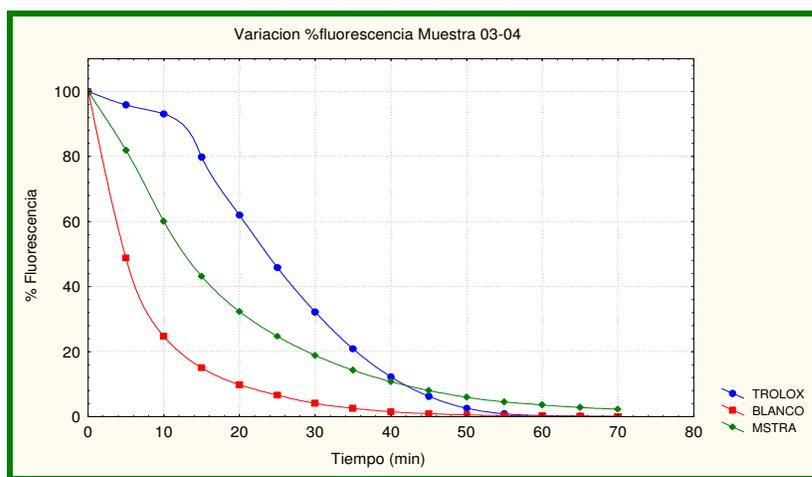


Figura 11: Fluorescencia relativa de la FL frente al tiempo en presencia de AAPH en el Trolox (20 μM), blanco (100% tampón fosfato) y la muestra (extracto metanólico del aceite, dilución 1:100)

Se busca la dilución idónea, de modo que al final del ensayo la fluorescencia descienda aproximadamente a 0 o a menos de un 5% del valor inicial. En la Figura 11, se observa la fluorescencia relativa obtenida en mi estudio, en presencia de AAPH y FL, del blanco (tampón fosfato 100%), Trolox (20 μ M) y una muestra de la última campaña de estudio diluida 100 veces en tampón. En la Figura 12 para varias muestras de la campaña 2003-2004 con la dilución idónea.

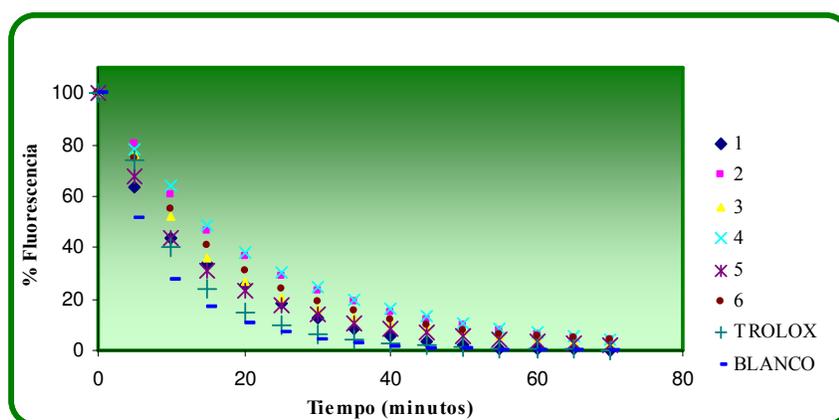


Figura 12: Fluorescencia relativa de la FL frente al tiempo en presencia de AAPH en presencia de Trolox (20 μ M), blanco (100% tampón fosfato) y la muestra (extracto metanólico del aceite dilución 1:100 de muestras de la campaña 2003-2004)

Al igual que los ensayos descritos anteriormente, para determinar la capacidad antioxidante en las muestras de aceite pertenecientes a las campañas 2001-2004, el tratamiento estadístico incluye el análisis de la varianza (ANOVA), existiendo diferencias significativas entre las tres campañas ($p < 0.05$).

En general, el rango de valores ORAC oscila entre 1 y 10 μ mol Trolox equivalente/g, y los aceites con valor entre 6-8 μ mol Trolox/g son considerados como aceites de elevada calidad (Ninfali *et al.*, 2002). Ardo y col. definieron valores ORAC para el aceite de oliva virgen extra que oscilaban entre 1.39 y 11.67 μ mol Trolox equivalente/g (Ardo *et al.*, 2004). No existe aún así mucha bibliografía de valores ORAC en aceites de oliva virgen extra, se emplea con más frecuencia en otro tipo de alimentos y fluidos biológicos.

Campana 2003-2004	Muestra Aceite	Fd	ORAC ($\mu\text{mol/g}$)	Media ORAC \pm S.D
	1	100	6.64	6.43 \pm 0.28
			6.23	
	2	100	4.86	5.12 \pm 0.37
			5.39	
	3	100	5.06	6.01 \pm 1.33
			6.95	
	4	100	5.01	4.89 \pm 0.16
			4.77	
	5	100	4.31	4.24 \pm 0.09
			4.18	
	6	100	3.90	3.70 \pm 0.27
			3.51	
7	100	5.30	5.75 \pm 0.63	
		6.20		
8	100	4.82	4.67 \pm 0.21	
		4.52		
9	100	3.98	4.10 \pm 0.17	
		4.22		
10	100	4.15	4.90 \pm 1.06	
		5.65		
11	100	5.17	5.98 \pm 1.14	
		6.79		
12	100	4.87	5.10 \pm 0.32	
		5.33		
13	100	3.45	3.83 \pm 0.53	
		4.21		
Promedio \pm S.D.			4.97 \pm 0.87	
Campana 2002-2003	Muestra Aceite	Fd	ORAC ($\mu\text{mol/g}$)	Media ORAC \pm S.D
	1	100	2.38	2.41 \pm 0.04
			2.44	
	2	100	2.58	2.54 \pm 0.08
			2.50	
	3	100	2.74	2.49 \pm 0.34
2.25				
4	40	2.01	2.25 \pm 0.33	
		2.49		
5	40	2.54	2.29 \pm 0.35	
		2.04		
Promedio \pm S.D.			2.40 \pm 0.12	
Campana 2001-2002	Muestra Aceite	Fd	ORAC ($\mu\text{mol/g}$)	Media ORAC \pm S.D
	1	100	2.18	1.89 \pm 0.41
			1.60	
	2	40	1.54	1.15 \pm 0.55
			0.76	
3	40	1.68	1.62 \pm 0.07	
		1.57		
4	40	0.96	1.20 \pm 0.33	
		1.44		
Promedio \pm S.D.			1.46 \pm 0.35	

Tabla 5: Valor ORAC expresado en μmol Trolox equivalente/g. El valor es la media y desviación estándar de las muestras analizadas por duplicado. Fd = factor de dilución.

- **Ventajas del ensayo ORAC y diferencias con otros ensayos de capacidad antioxidante**

En un principio este método estaba diseñado para medir la capacidad de antioxidantes hidrofílicos, poco a poco se ha ido modificando y ya tiene la ventaja de poder adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos (*Naguib, 1998*).

La especie reactiva empleada es el AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro), que sufre una descomposición térmica de sus componentes azo y genera los radicales peroxilos solubles en agua (*Niki., 1990*), capaces de iniciar el proceso oxidativo tanto a nivel fisiológico como patológico (*Ghiselli et al., 2000*), con una intensidad determinada primariamente por la temperatura. Así las muestras que contienen antioxidantes no les afecta dicha intensidad debido a la estructura química y a la altísima razón molar (> 2000) del AAPH frente a la muestra de antioxidante (*Cao et al., 1998*) lo que le confiere al ensayo ORAC una elevada especificidad y sensibilidad superior al del ensayo TEAC. En el ensayo TEAC pueden existir interacciones entre la muestra del antioxidante y los reactivos, bloqueando la formación de los radicales y también tiene en cuenta el porcentaje de inhibición a un tiempo fijo. La técnica AUC (área bajo la curva) [Figura 13] empleada en el método ORAC integra los porcentajes de inhibición en el tiempo completo que dura la inhibición, cuantificando la capacidad antioxidante de una muestra biológica, y evita por tanto que distintos antioxidantes puedan tener un mismo porcentaje de inhibición a un tiempo dado pero distinto a otro tiempo determinado. EL AUC obtenida tras el descenso en la fluorescencia es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra en comparación al AUC obtenida con el Trolox como referencia (*Ninfali et al., 2001*).

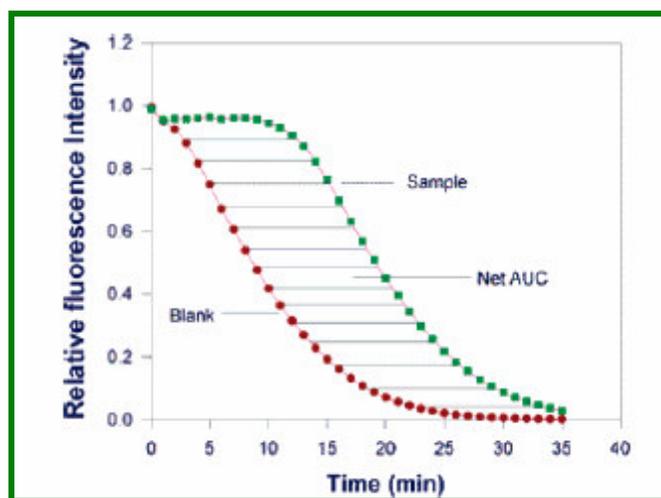


Figura 13: Cálculo del valor ORAC expresado como área bajo la curva (AUC).

Es un método dependiente de la temperatura ya que a 37 °C provoca la descomposición de la especie reactiva empleada y la formación de los radicales peroxilos, que reaccionan con la proteína y favorece el descenso de la fluorescencia, por tanto, pequeñas variaciones en la temperatura puede disminuir la reproducibilidad del ensayo (*Lussignoli et al 1999 ; Prior et al., 2005*), algunos autores proponen precalentar a 37°C, 10 minutos antes de adicionar el AAPH, ya que con sólo un minuto se favorece la descomposición térmica y generación del radical peroxilo (*Huang et al., 2002*).

Se han descrito muchos tipos de especies reactivas: Cu^{2+} -ascorbato (*Glazer, 1990; Antolovich et al., 2002*), aniones-superóxido, radicales hidroxilo (*Ou et al., 2002*) y peróxido de hidrógeno (*Ghiselli et al. 2000*), que generan radicales libres, e intervienen directamente en el proceso de oxidación, pero están menos relacionadas con la situación fisiológica. En general, una misma sustancia antioxidante tendrá una mayor o menor actividad, en función a la especie reactiva empleada en el método. Ou y col. emplearon como especie reactiva radicales hidroxilos generados por la oxidación de un metal (hierro y cobre) con el peróxido de hidrógeno, el mecanismo de actuación es el mismo que el método descrito, el radical hidroxilo generado actúa sobre la proteína y produce una disminución de la fluorescencia, el resultado se expresa con valor HORAC. En presencia de una sustancia antioxidante se inhibe en parte la formación del radical, por reacción del

antioxidante con el metal, generando un producto que no reacciona con el peróxido de hidrógeno (*Ou et al., 2002*).

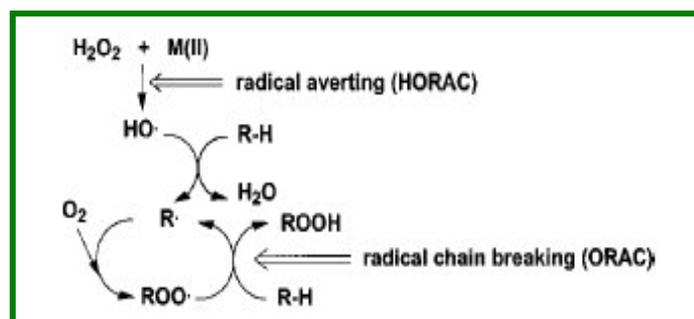
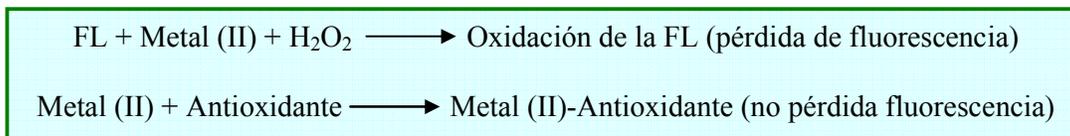


Figura 14: Relación entre HORAC y ORAC. *Ou et al., 2002*

No existe correlación entre el valor HORAC y ORAC, así antioxidantes más comunes como el Trolox y la vitamina C según un estudio de Ou y col. presentaba valores de 0 equivalentes de ácido gálico (GAE) y 1.0 equivalentes de Trolox (TE) y de 0 GAE y 0.95 TE respectivamente, no existiendo valores HORAC significativos (*Ou et al., 2002*). Son ensayos diferentes pero igualmente importantes en la medida de las propiedades antioxidantes, presentando en común que miden la protección de una proteína a ser oxidada por un radical. El HORAC refleja la habilidad de absorción del radical obtenido por quelación de un metal y el ORAC la capacidad de absorción de radicales peróxido, y ambos miden la protección de una proteína, así las muestras con alto valor HORAC no necesariamente tienen que tener valores elevados ORAC y viceversa. La Figura 14 muestra las diferencias químicas entre el ensayo HORAC y ORAC en la medida de la actividad antioxidante.

Son muchos los autores que emplean en el ensayo ORAC la ficobiliproteína β -ficoeritrina (B-PE), aislada de la *Porphyridium cruentum* (*Cao et al., 1998; Ninfali et al.,*

2001; 2002; Antolovich et al., 2001; Fernández-Pachón et al., 2004; 2005; Aldini et al., 2006) altamente fluorescente, pero se comprobó que el descenso de la fluorescencia de esta proteína es mucho más rápido que el de la fluoresceína (FL) al someterla a una excitación de luz, es fotosensible (Ou et al., 2001; Huang et al., 2002; 2002a; Dávalos et al., 2004; Prior et al., 2005), presenta mucha variabilidad al reaccionar con los radicales peroxilos y se observó que la (PE) puede interaccionar con algunos polifenoles (Haslam et al., 1981), generando errores en los resultados obtenidos. La fluoresceína o diclorofluoresceína no interacciona con antioxidantes, presenta una elevada estabilidad a la luz y reduce el coste del experimento (Ou et al., 2001; Dávalos et al., 2004). Huang y col. comprobaron la estabilidad de la fluoresceína (FL) en presencia de luz en comparación a la PE, en igualdad de condiciones experimentales: exposición a 490 nm de luz de excitación en ausencia de AAPH durante 35 minutos, concluyendo que para la FL no existen cambios significativos en la intensidad de la señal de fluorescencia, siendo por tanto estable a la luz, en comparación a la PE, que presenta una pérdida del 50-53% en la intensidad de la señal presentando baja estabilidad a la luz.

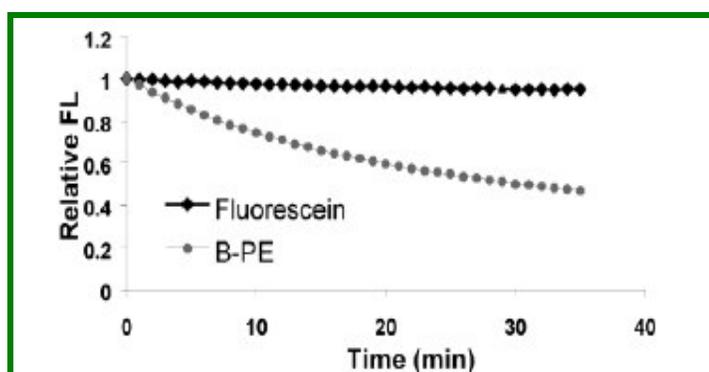


Figura 15: Cinética de caída en la fluorescencia de la B-PE y FL en ausencia de AAPH a 37°C. La B-PE presenta una pérdida de la fluorescencia del 50% en comparación a la FL, que no presenta variación en la señal. Huang et al., 2002

Un estudio realizado por Dávalos y col. demostró como la señal de la FL es constante al no adicionar el AAPH, lo que demuestra la estabilidad de la FL al ser sometida a condiciones de excitación, al añadir el AAPH la fluorescencia cae rápidamente. En presencia del Trolox, existe un retardo en la caída de la fluorescencia, lo mismo ocurre al realizar el ensayo con la muestra a analizar que contiene una cierta cantidad de sustancias antioxidantes (vino y suplementos dietéticos). La señal de fluorescencia FL no se afecta en

presencia del antioxidante, y éste no emite señal fluorescente por sí mismo (Dávalos *et al.*, 2004).

Estos análisis se realizaron en nuestro estudio, en la Figura 16 se observa la señal de FL en ausencia de AAPH, no existiendo descenso en la fluorescencia [a], la caída rápida al añadir el AAPH que reacciona con la proteína en ausencia de antioxidantes [b], el retardo en la caída en presencia de Trolox [c], y del extracto del aceite [d] y la ausencia total de señal en el extracto de aceite sin FL [e].

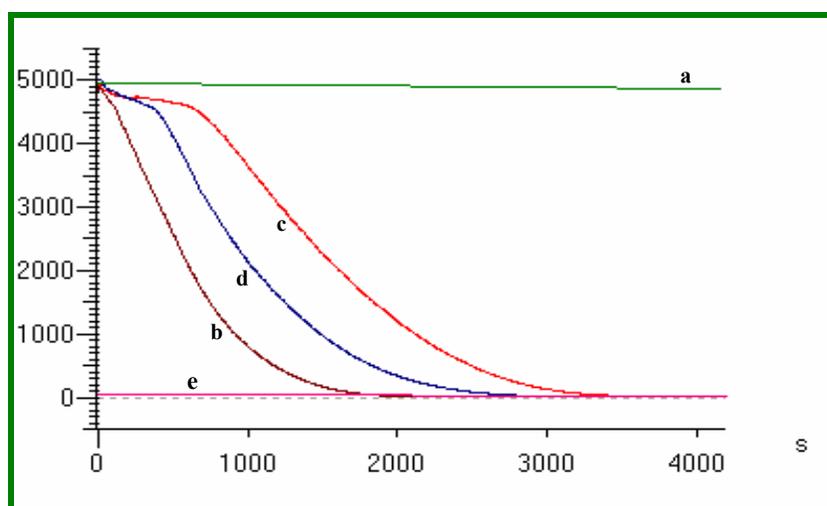


Figura 16: Cinéticas de reacción en el ensayo ORAC. Diferencias en la caída de fluorescencia.

Se emplea como antioxidante estándar para determinar la actividad antioxidante de las muestras de aceite, un análogo de la vitamina E soluble en agua, el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) y el tiempo total del ensayo supera los 30 minutos para evitar obtener valores inferiores en la actividad antioxidante y permitir la contribución de los productos secundarios con actividad antioxidante en los resultados finales (Prior *et al.*, 2005), aunque este tiempo prolongado de análisis (aprox. 1 hora) limita mucho su uso cuando se analizan un número elevado de muestras, lo que hizo desarrollar nuevos métodos automatizados que acorta el tiempo de análisis y elimina completamente los errores humanos que pueden darse en la preparación de las muestras (Calwell, 2000; Huang *et al.*, 2002). Se describe también el empleo de α -tocoferol y ácido

gálico expresando el valor como HORAC (μmol de ácido gálico/g en muestras sólidas y en μmol de ácido gálico/L en las líquidas). La función del α -tocoferol y el Trolox como antioxidantes se debe a su habilidad a transferir un átomo de hidrógeno de su grupo fenólico al radical generado (Naguib, 1998). Se empleó el Trolox en nuestro estudio ya que a igualdad de concentración con el AAPH, la reacción es más rápida con el Trolox que con el α -tocoferol [Figura 17] (Huang *et al.*, 2002).

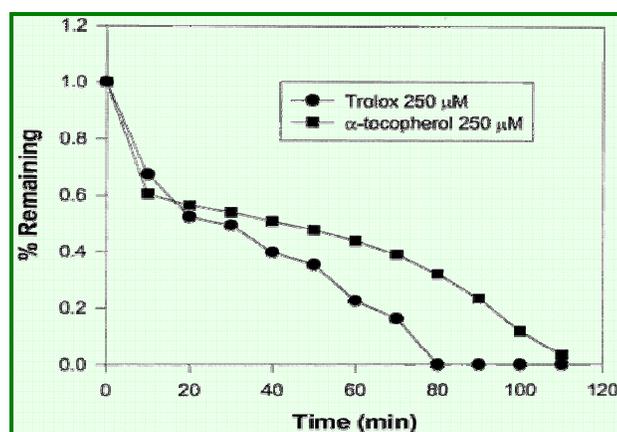


Figura 17: Cinética del Trolox y α -tocoferol en presencia de AAPH, a igualdad de concentración

Por la similitud en la estructura química [Figura 18] entre el Trolox y el α -tocoferol se esperaba que presentasen valor ORAC semejante, Huang y col. comprobaron que el valor ORAC para el α -tocoferol es un 50% menor que para el Trolox, y se debe fundamentalmente a la cinética y mecanismo de reacción del Trolox/ α -tocoferol con el AAPH (Huang *et al.*, 2002a).

Resultados y Discusión

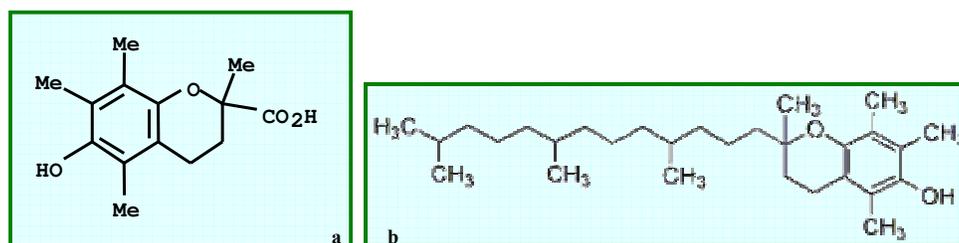


Figura 18: Estructura química del Trolox (a), y α -tocoferol (b)

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno se emplea como índice de calidad y estabilidad en el aceite de oliva virgen, ya que mide la eficacia de los compuestos fenólicos y su protección frente a radicales peroxilo (Ninfali *et al.*, 2001; 2002; Bacchiocca *et al.*, 2001).

Este método es ampliamente empleado en el análisis de la actividad antioxidante en compuestos puros (Huang *et al.*, 2002; Ou *et al.*, 2001) o diversos alimentos: aceite, vino (Ninfali *et al.*, 2001; 2002; Fernández-Pachón *et al.*, 2004; Villaño *et al.*, 2005; 2006; Aldini *et al.*, 2006), té (Cao *et al.*, 1996; Prior *et al.*, 1998), frutas (Wang *et al.*, 1996), vegetales (Ninfali *et al.*, 2003; 2005), suplementos dietéticos (Dávalos *et al.*, 2004) y en fluidos biológicos (Cao *et al.*, 1998; Ou *et al.*, 2001; Fernández-Pachón *et al.*, 2005).

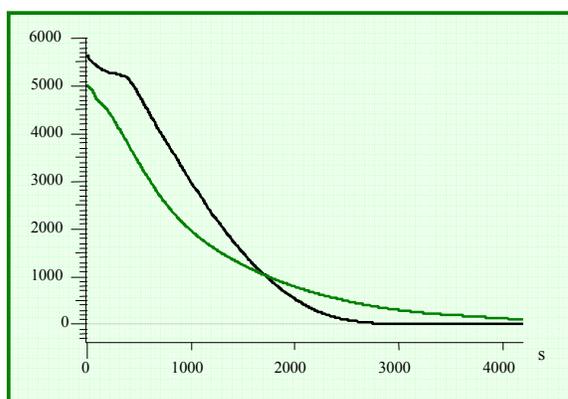


Figura 19: Descenso de la fluorescencia con el tiempo (seg.), del Trolox (—), y del extracto metanólico de una muestra de aceite (—).

Al igual que hace referencia Ninfali y col. se pudo observar como el extracto metanólico obtenido, en la dilución óptima de trabajo, en comparación con el Trolox como control, tiene un rápido descenso inicial en la fluorescencia, seguida de un descenso más lento en la etapa final [Figura 19]. Este comportamiento se encontró tanto en soluciones con un solo antioxidante, como en soluciones que contenían una mezcla de antioxidantes. El ensayo ORAC emplea como blanco metanol diluido en tampón fosfato, observando que no existe diferencia si se emplea tampón fosfato sólo. Tanto en la prueba con el Trolox y con el extracto del aceite, al alcanzar la estabilidad se adiciona el AAPH, midiendo el descenso de fluorescencia. El ensayo ORAC muestra una buena reproducibilidad con el aceite de oliva (*Ninfali et al., 2001; 2002*)

3.2.5. Estudio estadístico de los resultados de los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante.

Se examina la posible relación entre el contenido de de los principales compuestos antioxidantes (IPT) (Capítulo 1, apartado 1.2.3) y la actividad antioxidante total de los aceites estudiados, en las diferentes campañas, al aplicar distintos métodos de medida ya descritos en la Tabla 1, 3 y 5 del presente capítulo [Grafica 20- 31].

Se emplea la técnica estadística de la *regresión lineal simple*, que está dirigida a describir de una manera completa cómo es la relación entre dos variables, incluso se puede predecir cuál va ser el valor de una variable, una vez que se sabe el valor de la otra. Analiza la relación entre dos variables cuantitativas, tratando de verificar si dicha relación es lineal. Se emplea el coeficiente de determinación R^2 , que se interpreta como el porcentaje de variabilidad total de la variable dependiente que es explicada por la variable independiente.

Muchos trabajos publicados estudian la relación que existe entre el IPT y los diversos métodos de medida de la actividad antioxidante en diferentes alimentos (*Velioglu et al., 1998; Alonso et al., 2002a: 2002b; Gorinstein et al 2003; Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2006*).

Campaña 2003-2004

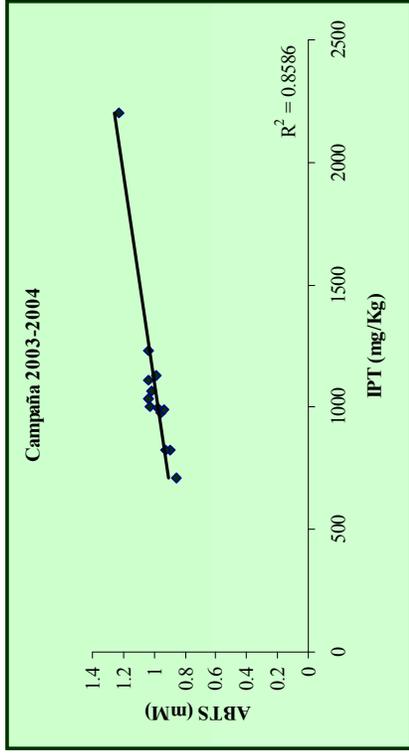


Figura 20: Relación IPT con el método ABTS

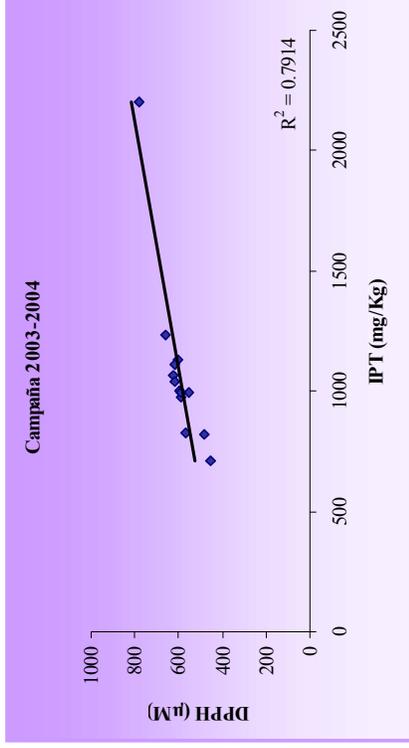


Figura 21: Relación IPT con el método DPPH

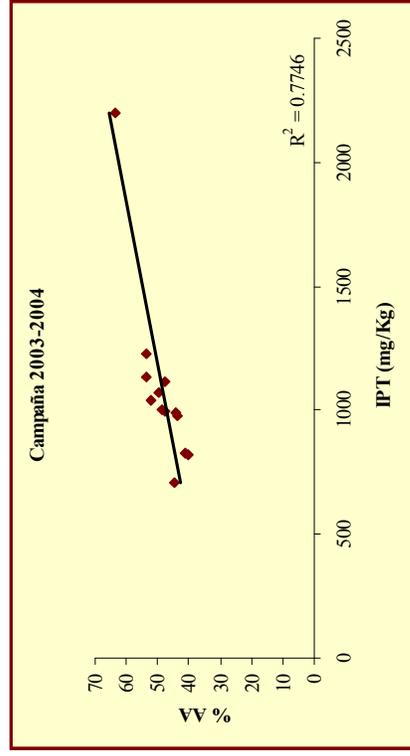


Figura 22: Relación IPT con el método β -Caroteno/ácido linoleico

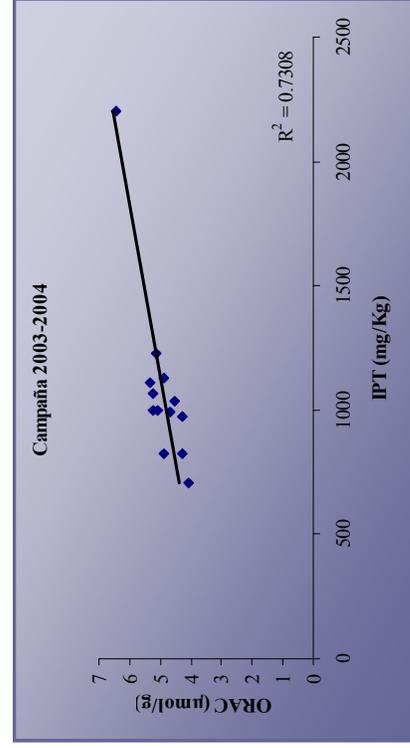


Figura 23: Relación IPT con el método ORAC

Campaña 2002-2003

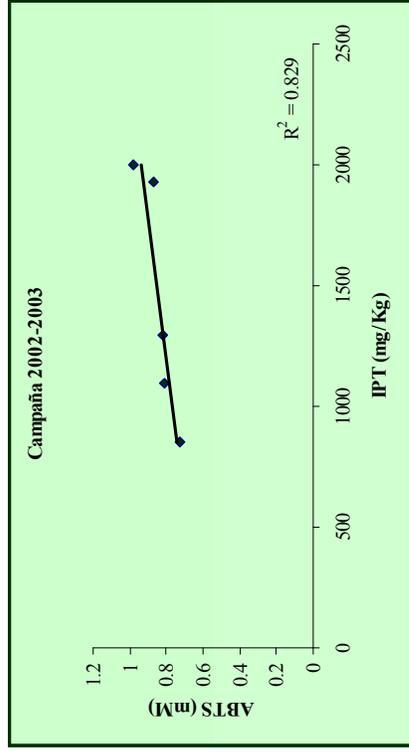


Figura 24: Relación IPT con el método ABTS

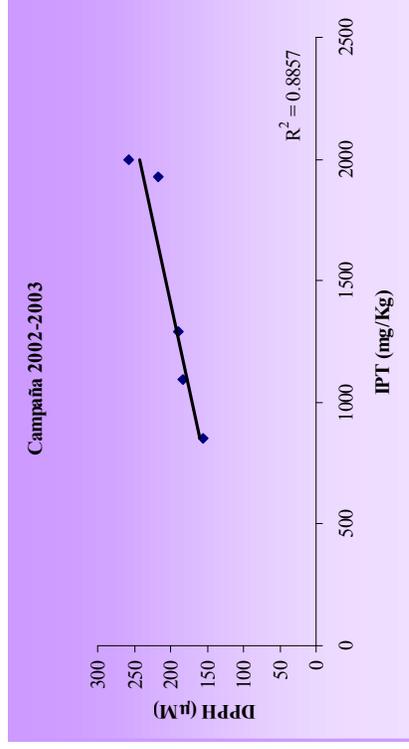


Figura 25: Relación IPT con el método DPPH

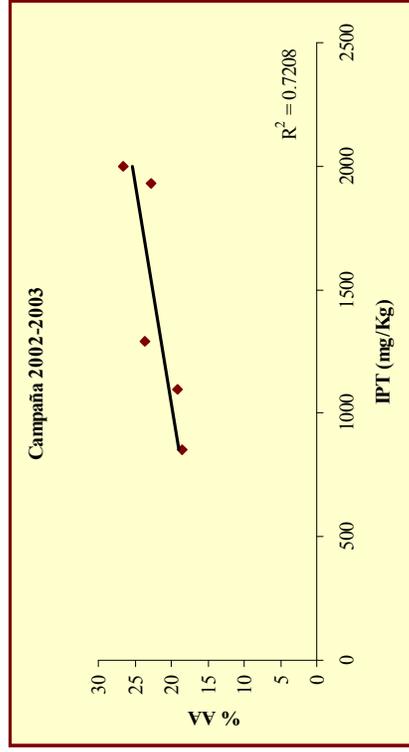


Figura 26: Relación IPT con el método β -Caroteno/ácido linoleico

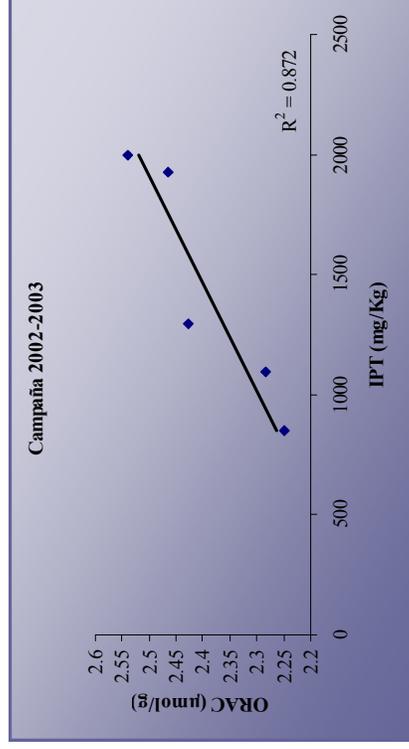


Figura 27: Relación IPT con el método ORAC

Campana 2001-2002

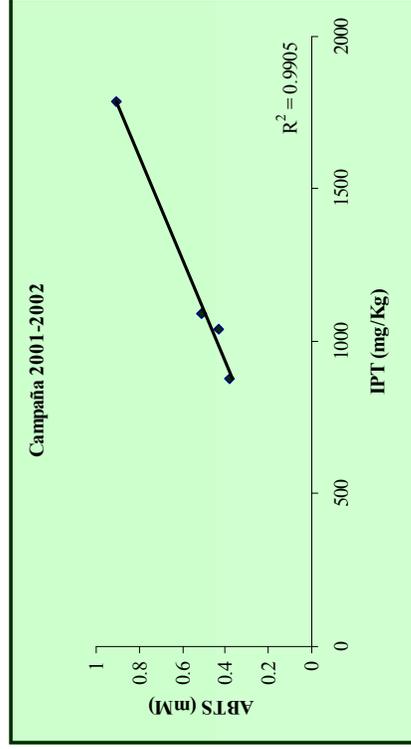


Figura 28: Relación IPT con el método ABTS

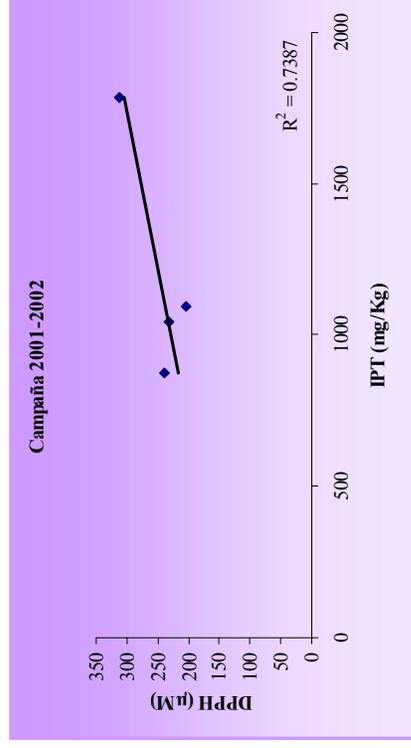


Figura 29: Relación IPT con el método DPPH

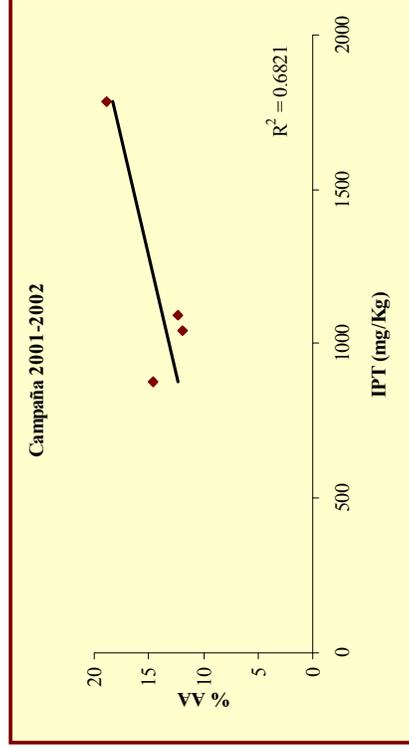


Figura 30: Relación IPT con el método β -Caroteno/ácido linoleico

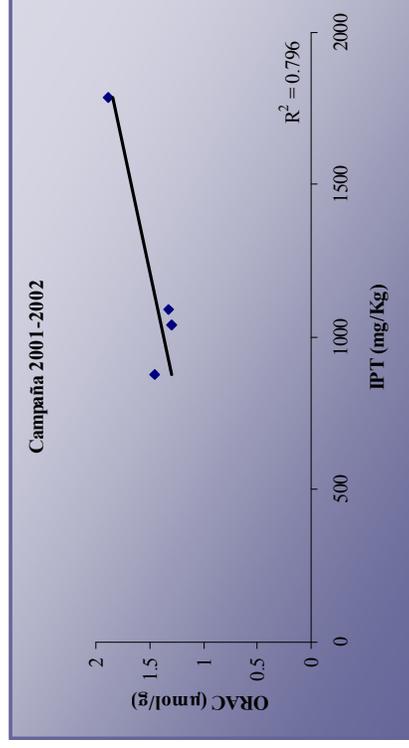


Figura 31: Relación IPT con el método ORAC

A la vista de los resultados el método ABTS hace aconsejable su utilización en la determinación de la actividad antioxidante en el aceite, ya que la correlación entre este método y el índice de polifenoles totales es mayor que con los otros métodos.

La reproducibilidad de los resultados es buena y los coeficientes de variación obtenidos por los diferentes métodos son aceptables. En general, todos los métodos se pueden aplicar para medir la actividad antioxidante en aceites.

En las dos primeras campañas estudiadas, la 2001-2002 y la 2002-2003, la correlación con el IPT puede ser menor debido al número escaso de muestras y/o la posible deficiencia en el almacenamiento de las muestras, hasta su análisis.

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación es obvio que no existe un único método de prueba, que refleje de forma completa el perfil antioxidante de la muestra estudiada (*Pérez et al., 2003*), por eso los datos obtenidos por diferentes investigadores son difíciles de comparar e interpretar (*Frankel et al., 2000*).

Son muchos los trabajos que correlacionan el contenido total polifenólico con la actividad antioxidante total para diferentes alimentos. Así, un trabajo publicado en el 2003, relaciona el contenido fenólico total de diferentes tipos de aceites, con cuatro métodos de medida de la capacidad antioxidante total. Concluyendo, que los polifenoles son los compuestos que aportan mayor capacidad antioxidante en el aceite y de acuerdo a los resultados de su investigación, el mejor método para determinar la capacidad antioxidante en aceites de oliva es el del β -caroteno/ácido linoleico (*Gorinstein et al., 2003*).

La correlación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante, medida con los métodos más comúnmente usados, ha sido ampliamente estudiada para diversos alimentos: frutas y vegetales (*Tian et al., 2004*), vinos (*Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2006*), plantas (*Velioglu et al., 1998*), semillas (*Holasova et al., 2002*), aceite de oliva (*Gorinstein et al., 2003; Del Carlo et al., 2004*). En todos los alimento se

relaciona el contenido en polifenoles totales con la actividad antioxidante de ese alimento, porque contribuyen a su estabilidad y por su capacidad para bloquear radicales libres. Una disminución en la concentración de polifenoles va asociado a un descenso en la actividad antioxidante.

En general, son muchos los métodos de medida de la capacidad antioxidante total. Cada uno presenta una serie de limitaciones en cuanto a reactivos empleados, tipo de cinética, tiempo de análisis, dando diferentes resultados difíciles de comparar para una misma muestra a analizar, que depende directamente del método empleado. Por ello, se determina la capacidad de bloqueo de los radicales libres por diferentes métodos, aunque lo ideal sería estandarizar un único método analítico de medida de la capacidad antioxidante (*Prior et al., 2005*).

Resultados y Discusión

4. ESTUDIOS IN VIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Capacidad Antioxidante en el plasma tras la ingesta de AOVE.

MATERIAL

- **Sujetos**

El estudio se ha realizado en 11 voluntarios sanos (3 mujeres y 8 hombres), no fumadores, con edades comprendidas entre los 20-30 años (25 ± 2.44), con valores de IMC dentro de la normalidad ($21.46 \pm 2.12 \text{ kg /m}^2$) (rango 17.16- 25.28).

Todos los participantes presentan buen estado de salud, sin ninguna patología cardiaca, hepática, gastrointestinal ni renal. No consumieron, durante las cuatro semanas que duró el estudio, ningún tipo de medicamento, ni suplemento vitamínico o mineral y los parámetros bioquímicos (glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, proteínas totales, bilirrubina, enzimas, etc.) y hematológicos, realizados en el laboratorio de análisis clínicos, estaban dentro de los valores de normalidad.

Se recomendó, a cada participante, no consumir el día anterior a la extracción alimentos ricos en sustancias antioxidantes (té, chocolate, cerveza, vino, frutas, aceite de oliva virgen y bebidas alcohólicas), que pudieran interferir en la medida plasmática de la capacidad antioxidante. Y durante el periodo total del estudio, se evitó ingerir alimentos ricos en antioxidantes [Tabla 1].

Tabla 1: Dieta baja en polifenoles

	ALIMENTOS A EVITAR	ALIMENTOS QUE PUEDEN SER COMIDOS
VEGETALES	Maíz, Cebolla, Ajo, Coles de Bruselas, Jengibre, Apio, Pepinillos, Nabos, Espinacas, Endivias, Berenjenas, Espárragos, Cebolleta, Pimientos, Remolacha, Brócol y Coliflores.	Patatas (sin piel), Pepino (sin piel), Zanahorias, Champiñones, Guisantes, Lechuga Iceberg y Rábanos.
FRUTAS	Manzanas, Naranjas, Melocotones, Pomelos, Limones, Tomates, Nectarinas, Ciruelas, Melones, Cerezas, Kivi, Bayas, Mango y Uvas.	Peras, Aguacate, Plátanos y Piña.
BEBIDAS	Te: Negro, Verde o de Hierbas, Café, Vino Blanco o Tinto, Cerveza, Sidra, Chocolate Caliente y Zumos de Frutas.	Agua, Colacao, Sprite-7 Up, Leche y Zumo de Piña
HUEVOS Y PRODUCTOS LACTEOS	Cualquiera que contenga fruta.	Mantequilla, Queso (sin hierbas), Natillas, Yogures (sin fruta, cereales o chocolate), Helados (sin fruta, cereales o chocolate), Leche, Nata y Huevos.
CARNE Y PESCADOS	Pasteles de carne y salchichas.	Pollo, Cordero, Ternera, Pavo, Pescados sin ahumar, Bacón, Jamón y Marisco
PRODUCTOS DE DESAYUNO	Evitar cereales como: All Bran, Weetabix, Muesli, Mermelada y Nocilla.	Cornflakes, Cereales de arroz, Croissants y Miel.
PAN Y PASTAS	Pan con cereales y Pizzas.	Pan blanco, Pan chapata, Pasta blanca, Arroz blanco, Fideos y Fajitas.
VARIOS	Espicias, Frutos secos, Avecrem, Ketchup, Lentejas, Pasas, Guacamole, Sopas de lata, Productos de Soja, Cacahuets, Aceitunas y Fruta escarchada.	Mayonesa, Aceite de Oliva, Aceite Vegetal, Vinagre (no más de 2 cucharadas diarias), Pasteles (sin fruta o chocolate), Sal y Caramelos.

Durante todo el estudio y 15 días previos al inicio del mismo, los voluntarios evitaron consumir alimentos con alto contenido fenólico, que se verificó al cumplimentar durante todo el periodo encuestas alimentarias de recuerdo de 24 horas.

La extracción se realizó tras ayuno de 12 a 14 horas por punción venosa, siguiendo el protocolo de extracción del laboratorio, utilizando como recipientes contenedores de las muestras de sangre, tubos con EDTA para la determinación del hemograma, tubos de suero

con separador de gelosa para las pruebas bioquímicas y tubos con heparina de litio para la determinación de antioxidantes.

Los parámetros bioquímicos y hematológicos se procesaron inmediatamente siguiendo los PNT establecidos para cada muestra. El plasma, para la determinación de antioxidantes, se obtuvo mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10-15 minutos. Las muestras obtenidas se almacenaron a temperatura de congelación (-70°C), hasta su posterior análisis.

Se obtuvieron dos muestras de sangre de cada sujeto, antes (valor basal $t=0$) y tras ingerir 50 mL diarios de AOVE durante 15 días.

Todos los voluntarios tomaron el mismo tipo de aceite, procedente de la misma variedad de aceituna y cosecha, lo que confiere la máxima homogeneidad en cuanto a perfil de ácidos grasos y sustancias antioxidantes. El aceite fue seleccionado por tener una alta concentración de polifenoles totales y un elevado valor *in vitro* de actividad antioxidante de todos los estudiados.

El método antioxidante empleado para la medida en el plasma de la capacidad antioxidante, es el ORAC con fluoresceína, por ser el que más se asemeja a las condiciones *in vivo*.

El aceite de oliva virgen extra procede de aceitunas de la variedad Picual, obtenido a temperatura de 25°C por sistema de centrifugación bifásico de la pasta de aceituna. Todos los parámetros de calidad del aceite (acidez, índice de peróxidos, k_{270} , etc.) según Reglamento (CE) nº 1989/2003 presentan un contenido dentro del límite legal permitido, y se considera un aceite de oliva virgen extra (AOVE).

- **Reactivos**

Todos los reactivos empleados en el desarrollo de método ORAC, ya se han descrito en el capítulo 3, apartado 3.1.

- **Instrumentación**

1. Espectrofluorímetro:

En el método de medida de la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (ORAC), las medidas de fluorescencia se realizaron en un Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer instruments LS55 luminescence Spectrometer. Software FL Winlab. Micro cubetas de cuarzo de 10 mm, Hellma[®].

2. Instrumentación y Material de laboratorio:

- pH-metro BASIC 20, Crisol[®]
- Micropipetas Eppendorf[®], 10-100 μL ; 100-1000 μL .
- Centrífuga Universal 32, Hettich (Madrid-España).
- Pipetas Pasteur 2mL, 150 mm, Pobel (Madrid, España).
- Baño de agua termostatzado Julabo Fio P Selecta[®]

3. Tratamiento estadístico de los resultados

- Se ha empleado el programa informático SPSS[®], versión 12.0.

MÉTODO

- **Fundamento**

El fundamento del método es el mismo que el descrito en el capítulo anterior. Se basa en la medida del área bajo la curva entre el blanco, patrón de referencia (Trolox) y la muestra de plasma.

Se emplea como especie reactiva la proteína AAPH, a igual concentración anteriormente descrita, y la fluoresceína como proteína que es atacada y sufre un cambio químico que origina el descenso en la señal de fluorescencia. Se busca la dilución apropiada que no provoque saturación en la señal y permita la cuantificación. En este caso se diluye 250 veces en tampón fosfato.

El ensayo ORAC se lleva a cabo a 37°C en micro cubetas fluorimétricas. Se mide la fluorescencia (excitación 490 nm y emisión a 515 nm) (Ou et al., 2001; Fernández-Pachón et al., 2005), cada 5 minutos durante 70 minutos, hasta que desciende aproximadamente a 0 o a menos de un 5% del valor inicial. La mezcla final de los componentes es:

150 μ L plasma diluido + 150 μ L fluoresceína (2.934 mg/L) + 75 μ L AAPH (221.25mM)

Se busca la dilución idónea del plasma en tampón fosfato (pH 7.4), para favorecer la caída de la señal de fluorescencia a valores que permita su cuantificación, en comparación al blanco (tampón fosfato) y al Trolox. Las muestras se diluyeron 1500 veces con tampón fosfato.

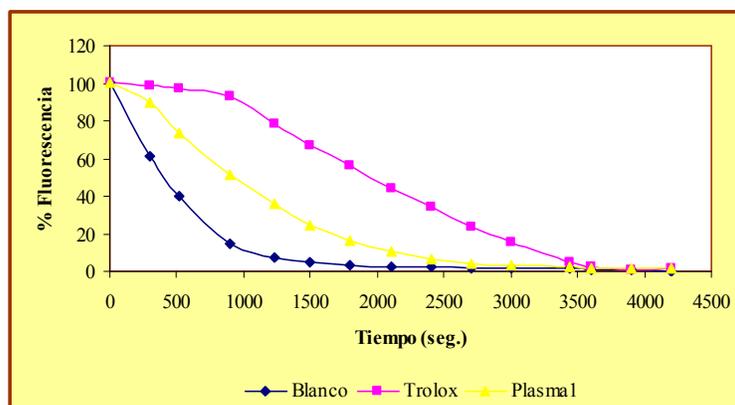
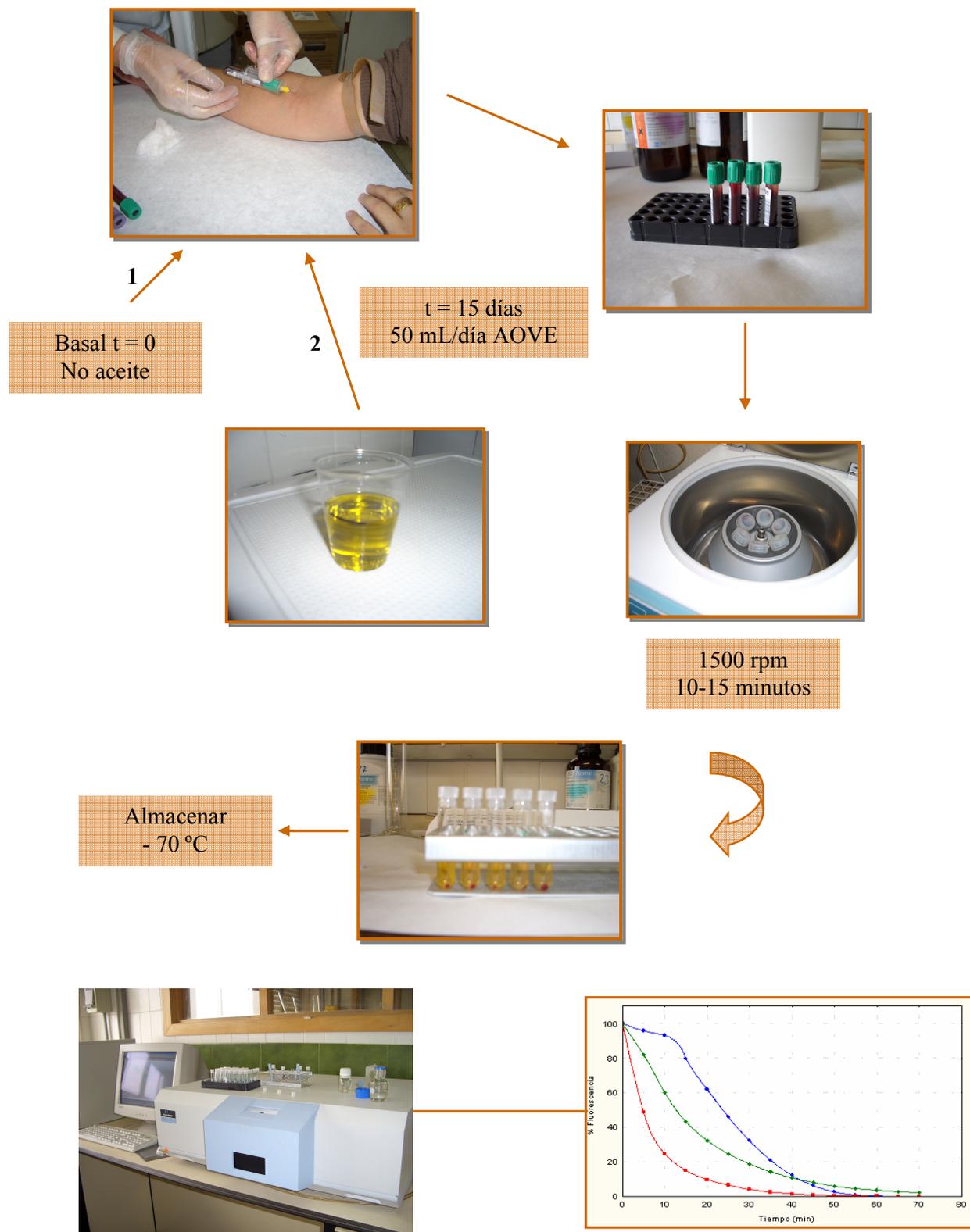


Figura 1: Fluorescencia relativa de la FL (1: 250) frente al tiempo en presencia de AAPH en el Trolox (20 μ M), blanco (100% tampón fosfato) y plasma diluido 1500 veces en tampón.

Material y Métodos



4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Capacidad Antioxidante en el plasma tras la ingesta de AOVE.

Todos los voluntarios tomaron el mismo tipo de aceite que se seleccionó por presentar una elevada actividad antioxidante *in vitro* (ORAC-FL), un alto contenido en polifenoles totales y los parámetros analíticos de calidad dentro de la normalidad según Reglamento (CE) nº 1989/2003 [Tabla 1].

Acidez (%)	Índice Peróxidos (mEqO ₂ /Kg)	Ceras (ppm)	K270	IPT (mg/Kg)	ORAC-FL (μM)
0.4	≤ 15	≤ 200	≤ 0.15	2287	6,715 ± 1,27

Se selecciona el método ORAC porque aporta información importante acerca de la capacidad antioxidante total en muestras biológicas, desde compuestos puros (melatonina, dopamina, flavonoides, etc.) a matrices más complejas (té, frutas, aceites, etc.) (Cao *et al.*, 1998a). Es el único método que mide la reacción completa del antioxidante con la especie reactiva, cuantificándolo con el área bajo la curva (AUC), y al emplear AAPH como generador de la especie reactiva el ensayo ORAC mide la acción de todos los antioxidantes no enzimáticos conocidos (ácido ascórbico, bilirrubina, flavonoides, glutatión, metionina, beta-caroteno, ácido úrico, etc.), ya sean hidrofílicos o lipofílicos (Cao *et al.*, 1998b; Prior *et al.*, 2003). En general, el ensayo ORAC tiene una elevada especificidad y responde a diversos antioxidantes

El resto de métodos descritos aunque presentan buena respuesta *in vitro*, no mimetizan bien la situación *in vivo*, ya que la mayoría miden la captura directa de radicales libres y el ORAC mide protección directa a una proteína.

Nuestro estudio se realiza en muestras de plasma, aunque son muchos los autores que emplean en la determinación de la capacidad antioxidante el suero (Cao *et al.*, 1998; 1998a; Apak *et al.*, 2005).

Se midió la actividad antioxidante en plasma y suero de un mismo voluntario, obteniendo resultados muchos más elevados en el plasma que el suero con valores de $14095 \pm 852.46 \mu\text{M}$ (cv % 6.04) y $9873 \pm 1132.98 \mu\text{M}$ (cv % 11.47) respectivamente. El coeficiente de variación (cv) está por debajo del 15 % aceptado según AOAC para muestras biológicas (Huber., 1998).

Ghiselli y col. explican el descenso de AC (capacidad antioxidante) en el suero con respecto al plasma, por un aumento durante la agregación plaquetaria a temperatura ambiente, de especies reactivas que pueden influir en la medida de la actividad antioxidante (Ghiselli *et al.*, 2000; Fernández-Pachón *et al.*, 2005). Aún así, estos valores pueden diferir en el plasma y en el suero, según las condiciones específicas de cada sujeto (ciertas patologías, fumador, etc.).

En el presente estudio, se puso a punto la técnica ORAC-FL buscando la dilución idónea en tampón fosfato de la muestra de plasma, que al reaccionar con la fluoresceína y la especie reactiva, dé un descenso en la señal fluorescente que se pueda cuantificar. Se mide el AUC entre el blanco y la muestra a analizar y se emplea como solución estándar el Trolox en tampón fosfato [Figura 1]:

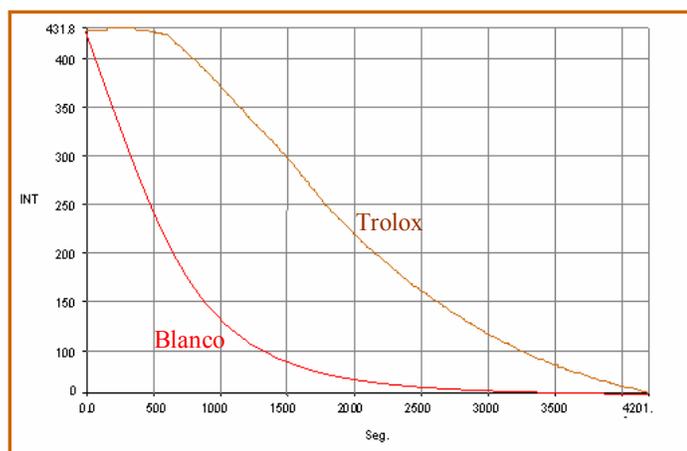


Figura 1: Descenso de fluorescencia del blanco (Tampón fosfato) y el trolox, en presencia de AAPH y fluoresceína (1: 250 en tampón)

En la Tabla 2 se muestran los valores de la capacidad antioxidante plasmática determinada en los once voluntarios con el método ORAC, en condición basal ($t = 0$) y tras la ingesta de aceite de oliva virgen extra (50 mL/ día) a los 15 días ($t = 15$ d):

Voluntarios	ORAC μM ($t = 0$)	ORAC μM ($t = 15\text{d}$)
V 1	5307.09 \pm 1095.57	9653.05 \pm 1930.01
V 2	9903.49 \pm 894.99	13419.89 \pm 984.73
V 3	12309.27 \pm 1166.49	17070.42 \pm 1053.36
V 4	14095.67 \pm 852.46	17338.09 \pm 521.16
V 5	18308.46 \pm 661.20	23387.73 \pm 764.84
V 6	16150.10 \pm 750.60	18025.57 \pm 722.01
V 7	12724.54 \pm 1068.62	16331.94 \pm 953.60
V 8	14923.45 \pm 621.26	19011.88 \pm 1025.56
V 9	15723.96 \pm 813.92	16732.76 \pm 1432.17
V 10	16162.54 \pm 652.32	17192.74 \pm 817.16
V 11	15118.64 \pm 1544.30	17380.22 \pm 1359.87
Valor medio \pm S.D.	13702.41 \pm 3588.96	16867.66 \pm 3366.35

Tabla 2: Valor ORAC plasmático a $t = 0$ y a los 15 días de la ingesta de AOVE. El valor es la media y desviación estándar (S.D.) de la medida por triplicado de cada muestra.

Los valores pueden variar de un individuo a otro debido a la variabilidad en los procesos de absorción y metabolismo, aunque el grupo sea lo más homogéneo posible, influyen los hábitos de vida y las características físicas de cada persona.

Se empleó en el estudio estadístico el test de la t de student para muestras apareadas, encontrando un aumento, estadísticamente significativo de la capacidad antioxidante tras la ingesta de aceite ($p < 0.001$).

Los resultados muestran como la capacidad antioxidante total del plasma determinado por el método ORAC, usando el área bajo la curva, se incrementa significativamente tras la suplementación en la dieta diaria de aceite de oliva virgen extra, lo que demuestra que existe un efecto biológico *in vivo* por el consumo de aceite de oliva.

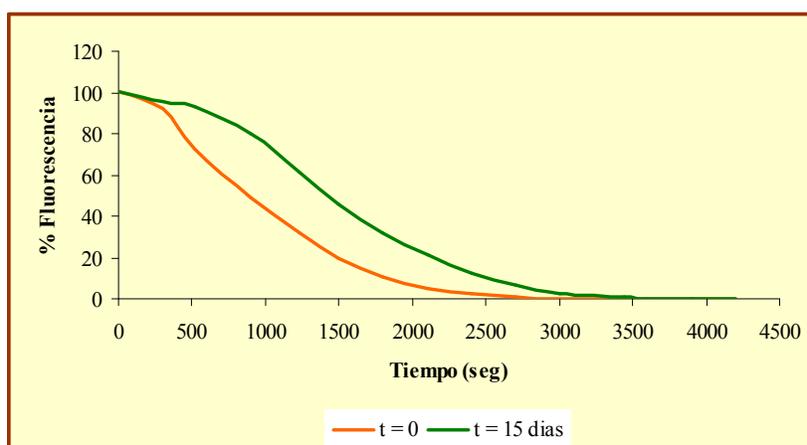


Figura 2: Fluorescencia relativa de la FL en presencia de AAPH, para una muestra a tiempo cero y tras ingerir aceite 15 días (voluntario V8).

Es difícil comparar nuestros resultados con los de otros trabajos publicados, no existe un criterio unánime sobre la cuantificación de la capacidad antioxidante en plasma debido a que existen distintos métodos, como el FRAP (ferric reducing trapping parameter) (Serafini *et al.*, 2003; Dragsted *et al.*, 2004), TRAP (total radical trapping parameter), ORAC (Cao *et al.*, 1998b; Prior *et al.*, 1999; Ghiselli *et al.*, 2000a; Fernández-Pachón *et al.*, 2005), TEAC (Miller *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2005). Todos los métodos miden de

forma global la capacidad antioxidante en el suero o en el plasma, por la dificultad de medir cada compuesto antioxidante de forma individual y las posibles interacciones existentes entre estos compuestos (*Ghiselli et al 2000*).

En la actualidad se cuestiona, si una dieta rica en compuestos antioxidantes, puede incrementar la capacidad antioxidante global o modificar de forma individual la concentración de compuestos antioxidantes en el organismo humano.

La capacidad antioxidante plasmática es un equilibrio complejo entre nuestras defensas antioxidantes adquiridas y genéticas y los estímulos prooxidantes. Los factores que afectan a este delicado equilibrio son múltiples y es difícil que el consumo de un determinado alimento rico en antioxidantes pueda producir un incremento muy evidente en la capacidad antioxidante.

Por lo tanto, lo que confirmamos con nuestro estudio es que la ingesta de cantidades adecuadas para una dieta equilibrada, de productos ricos en antioxidantes, como el aceite de oliva objeto de nuestro estudio, produce un aumento moderado pero significativo en la actividad antioxidante plasmática. Este efecto se debe sumar a otras medidas que lleven a una reducción de nuestro estrés oxidativo y en definitiva, a una menor prevalencia de muchas enfermedades de nuestro entorno, que tienen un origen importante en el estrés oxidativo.

- **Características que influyen en el estudio *in vivo* de la AC**

Debido a la inestabilidad de los antioxidantes en las muestras biológicas, especialmente si están expuestos al aire o a la luz a temperatura ambiente, hace que no pueda usarse por igual, en la determinación de la AC el suero y el plasma. Algunos autores, emplean el plasma (*Ghiselli et al., 2000; 2000a; Fernández-Pachón et al., 2005; Fischer et al., 2005*) y otros el suero (*Cao et al., 1998; 1998a; Woodford et al., 1998*), no existiendo diferencias en el valor obtenido en algunos casos, o encontrando valores más elevados en el suero que en el plasma. Resultados estos últimos un poco sorprendentes, ya que para la obtención del

suero se requiere un proceso de coagulación a temperatura ambiente (22 °C) durante un tiempo (30 min.). Ambos factores (tiempo y temperatura) pueden interferir con algunos antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión, que pueden influir en un descenso del valor AC medido en el suero. Se emplea, por tanto, el plasma en la medida de la AC por todos los motivos descritos anteriormente, y para evitar las especies reactivas generadas en el proceso de la coagulación, que también influyen negativamente en la medida de la capacidad antioxidante. Se recomienda centrifugar el plasma bajo temperatura de refrigeración para evitar en lo máximo un estrés térmico en los antioxidantes presentes (*Ghiselli et al., 2000*).

Es interesante considerar las condiciones de almacenamiento de las muestras de plasma obtenidas. Se aconseja el análisis inmediato de la AC una vez obtenido el plasma, para evitar la pérdida o alteración de ciertos componentes antioxidantes. Ghiselli y col. estudiaron la estabilidad de las muestras plasmáticas almacenadas a – 80°C a diferentes tiempos. Así, el valor de la AC desciende levemente en las primeras 4 horas de almacenamiento, seguido de un descenso brusco a los tres días que se mantiene ya estable en el tiempo. Por tanto, se aconseja determinar de forma inmediata la AC después de la extracción de la sangre y separación del plasma, y si las condiciones no lo permiten realizarlo en un plazo de 3 días (*Ghiselli et al., 2000*).

Muchos son los trabajos de investigación realizados en humanos para demostrar el incremento de la actividad antioxidante en plasma y en suero tras la ingesta de alimentos ricos en compuestos antioxidantes (vino, frutas, vegetales, etc.), existiendo en la mayoría un incremento significativo en los valores de AC.

Fernández-Pachón y col. evaluaron la modificación en los valores plasmáticos de la AC antes y después de ingerir 300 mL de vino (30, 55 y 120 min.). Emplearon como métodos de medida, el ensayo ORAC con fluoresceína y ficoeritrina, y el ensayo FRAP que mide la capacidad de reducir iones metálicos. En los tres ensayos obtuvieron resultados similares, siendo estadísticamente significativos el incremento en la AC,

alcanzándose el máximo valor a los 55 min tras la ingesta de vino (*Fernández-Pachón et al., 2005*).

Una ingesta de espinacas, fresas y vino, alimentos ricos en compuestos fenólicos, puede incrementar la capacidad antioxidante sérica y plasmática en humanos. A estas conclusiones llegó Cao y col. aplicando el ensayo ORAC, TEAC y FRAP (*Cao et al., 1998a; 1998b*).

Fito, estudió el efecto antioxidante del aceite de oliva en humanos. La influencia sobre el estrés oxidativo postprandial y a las 24h de la ingestión de aceite de oliva virgen extra, y el mismo efecto a corto y largo plazo. Concluyendo que el consumo regular de aceite de dosis moderadas de aceite de oliva puede proporcionar protección sobre la oxidación de la LDL en relación directa con el contenido fenólico presente en el aceite de oliva, y por tanto un efecto beneficioso frente a riesgo cardiovascular (*Fito, 2003; 2005*).

Es importante considerar que un incremento en los niveles séricos y plasmáticos de la capacidad antioxidante, no está siempre relacionado con un efecto beneficioso. Así, personas con patologías renales crónicas pueden presentar una elevada capacidad antioxidante total, debido a los altos niveles de ácido úrico en el suero, no estando relacionado con el estrés oxidativo. Al igual que un descenso en la capacidad antioxidante sérica o plasmática, puede ir ligada a una disminución importante de especies reactivas, teniendo un efecto beneficioso (*Prior et al., 1999*).

En conclusión, en nuestro estudio, descartando estas situaciones específicas, se puede decir que una suplementación diaria de aceite de oliva virgen extra puede estar relacionada directamente con un incremento en la capacidad antioxidante del plasma en humanos.

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

IV. CONCLUSIONES

1. En los Aceites de Oliva Virgen Extra estudiados, se encuentra un contenido en ceras y un valor insaponificable de acuerdo con los valores establecidos por la legislación para este tipo de aceites.
2. Los niveles de polifenoles determinados en estos aceites son elevados lo que nos orienta sobre la variedad de aceituna utilizada, la Picual.
3. Se ha podido observar que existe una disminución significativa en el contenido de polifenoles al avanzar el grado de maduración de la aceituna. De igual manera se pone de manifiesto una disminución de los niveles de los mismos al incrementar la temperatura del proceso de extracción del aceite.
4. Son aceites ricos en componentes antioxidantes, como el escualeno y β -Caroteno. Es importante considerar que el grado de maduración, temperatura de extracción y condiciones de almacenamiento, pueden influir negativamente en la concentración de ambos componentes.
5. Se han puesto a punto diferentes métodos (ABTS, DPPH, ORAC y el del β -caroteno) para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* de muestras de aceite. Siendo el método ABTS el más idóneo para el estudio de este tipo de muestras, al presentar mejor correlación con el índice de polifenoles totales.
6. La capacidad antioxidante del plasma humano determinada por el método ORAC (al ser más idóneo para este tipo de muestras), antes y después del consumo de aceite, ha puesto de manifiesto un incremento de la misma de forma significativa

Conclusiones

después de la suplementación de la dieta diaria con el aceite de oliva virgen extra seleccionado.

7. Se demuestra en este estudio que existe un efecto biológico *in vivo* beneficioso tras el consumo de aceite de oliva virgen extra rico en antioxidantes y de cuidada elaboración.

Conclusiones

V. BIBLIOGRAFIA

Aguilera, Y; Dorado, M.E; Prada, F.A; Martínez, J.J; Quesada, A; Ruiz-Gutiérrez, V. (2005). The protective role of Squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. *Experimental eye research*. 80, 535- 543.

Alba, J; Hidalgo, F; Ruiz, M.A; Martínez, F; Moyano, M.J; Cer, A; Pérez- Camino, M.C; Ruiz, M.V. (1996). Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación. *Grasas y Aceites*, 47, 163- 181.

Alba, J. (1999). Elaboración del aceite de oliva virgen. Junta de Andalucía. Mundi Prensa. Madrid.

Albalá- Hurtado, S; Novella- Rodríguez, S; Veciana_ Nogués, M.T; Mariné- Font, A. (1997). Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 1-2, 243-246.

Aldini, G; Piccoli, A; Beretta, G; Morazzoni, P; Riva, A; Marinello, C; Facino, R. (2006). Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, 77, 121- 128.

Alonso, A.M; Domínguez, CC; Guillén, D.A; Barroso, C.G.(2002a). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem*, 50, 3112- 3115.

Alonso, A.M; Guillén, D.A; Barroso, C.G; Puertas, B; García, A. (2002b). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem*, 50, 5832- 5836.

Bibliografia

Amelio, M; Rizzo, R; Varazini, F. (1993). Separation of wax esters from olive oils by high- performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 793- 796.

Amelio, M; Rizzo, R; Varazini, F. (1998). Separation of stigma- 3,5-diene, squalene isomers, and wax esters from olive oils by single high- performance liquid chromatography run. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 527- 530.

Amelloti, G; Dachetta, A; Grieco, D; Martin, K. (1973). Analysis of pressed olive oils in Liguria in relation to the olive harvesting period. *Riv. Ital. delle Sost. Grasse*, 50, 350.

Andrews, P; Johanneke, L; Busch, H.C; De Joode, T; Groenewegen, A; Alexandre, H. (2003). Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-Ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. 51, 1415-1420.

Andrikopoulos, N.K; Hassapidou, M.N; Manoukas, A.G. (1989). The tocopherol content of Greek olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 46; 503- 509.

Angerosa, F; D'Alessandro, N; Corona, F; Mellerio, G. (1996). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 736, 195- 203.

Antolovich, M; Prenzler, P.D; Patsalides, E; McDonald, S; Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183- 198.

Aparicio, R; Roda, L; Albi, M.A; Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agri. Food Chem*, 47, 4150- 4155.

Aparicio, R; Aparicio-Ruiz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881 (1-2), 93-104.

- Aparicio, R; Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. AMV Ediciones. Madrid.
- Ardo, S; Lan, P; John, W; Yu, L. (2004). Fatty acid composition and antioxidant properties of selected commercial olive oils. *Abstract paper*, 22-26. AGFD- 103.
- Arnao, M. B; Cano, A; Acosta, M. (1998). Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem.* 2, 893- 905.
- Arnao, M. B. (2001). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419-421.
- Arnao, M. B; Cano, A; Acosta, M. (2001a). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Arts, M.J.T.J; Dallinga, J.S; Voss, H.P; Haenen, G.R.M.M; Bast, A. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, 80, 409- 414.
- Arts, M.J.T.J; Dallinga, J. S; Voss, H.P; Haenen, G.R.M.M; Bast A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88, 567-570.
- Arts, M.J.T.J; Guido, R.M.M; Haenen, G.R.M.M; Voss, H.P; Bast A. (2004a). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 45- 49.
- Assmann, G; Wahrburg, U. (2002). Health effects of minor components of olive oil *Nutrition*, 4, 1, 5-15.

Bibliografía

Assmann, G; Wahburg, U. (2003). Efectos para la salud de los componentes secundarios del aceite de oliva (1ª y 2ª parte). *Biblioteca de información médica sobre el aceite de oliva en Europa*.

Babbs, C.F. (1990). Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 8(2), 191-200.

Bacchiocca, M; Aluigi, G; Servili, M; Begliomini, A. L; Montedoro, G. F; Ninfali, P. (2001). Validation of the ORAC method for prediction of the stability of extra virgin olive oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 78(3), 151-155.

Baldioni M. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc.*, 73, 1589-1593.

Barranco, A; Alonso-salces, R.M; Crespo, I; Berruela, L.A; Gallo, B; Vicente, F; sarobe, M. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods. *J. Food Prot.* 67(12), 2786- 2791.

Basic, M; Bastic, L; Jovanovic, J.A; Spritteler, G. (1978). Hydrocarbons and other weakly polar unsaponifiables in some vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 888.

Basu, H.N; Del Vecchio, A.J; Flider, F; Orthofer, F.T. (2001). Nutricional and potencial disease prevention properties of carotenoids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 665-675.

Beltrán, G; Jimenez, A; Aguilera, M.P; Uceda, M. (2000). Phenolic fraction análisis by HPLC of Arbequina virgen olive oils. Relationship with bitterness K225 and oil stability. *Grasas y Aceites*, 51, 320- 324.

- Beltrán, G; Aguilera, M.P; Del Rio, C; Sánchez, S; Martínez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgen olive oils. *Food Chemistry*, 89, 207- 215.
- Benavente-Garcia, O; Castillo, J; Lorente, J; Ortuño, A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chem*, 68, 457- 462.
- Ben-Aziz, A; Grossman, S; Ascarelli, I; Budowski, P. (1971). Carotene bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry*, 10(7), 1445-1452.
- Bezbradica, D; Milic-Askračić, J; Petrović, S; Siler-marinković, S. (2005). An investigation of influence of solvent on the degradation kinetics of carotenoids in oil extracts of *Calendula officinalis*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70, 1, 115-124.
- Bianchi, G; Murelli, C; Vlahov, G. (1992). Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*, 31, 3503- 3506.
- Bianchi, G; Vlahov, G; Anglani, C; Murelli, C. (1993). Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry*, 32, 49- 52.
- Blasco, A.J; Rogelio, M.C; González, M.C; Escarpa, A. (2005). “Electrochemical Index” a a screening method to determine “total polyphenolic” in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237- 244.
- Blekas, G; Psomiadou, E; Tsimiadou, M; Boskou, D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgen olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 340- 346.
- Blekas, G; Vassilakis, C; Harizanis, C; Tsimidou, M; Boskou, D.G. (2002a). Biophenols in table olives. *J. Agri. Food Chem*, 50, 3688- 3692.

Bibliografía

Bondioli, P; Mariani, C; Lanzani, A; Fedeli, E; Muller, A. (1993). Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 70, 763-766.

Bonoli, M; Bendini, A; Cerretani, L; Lercker, G; Gallina-Toschi, T. (2004). Qualitative and Semiquantitative análisis of phenolic compounds in extra virgen olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7026-7032.

Boskou, D. (1996). Olive oil composition. In: Olive oil: chemistry and technology (Boskou, D., ed) pp.52-83. AOCS Press, Champaign, IL.

Boskou, D. (1998). Química y tecnología del aceite de oliva. AMV Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Botterweck, A.A.M; Verhagen, H; Goldbohm, R.A; Kleinjans, J; Brandt, P.A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Hetherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 599-605.

Bouaziz, M; Grayer, R.J; Simmonds, M; Damak, M; Sayadi S. (2005). Identification and Antioxidant Potential of Flavonoids and Low Molecular Weight Phenols in Olive Cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* 53, 236-241.

Brand-Williams, W; Cuvelier, M. E; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28, 25-30.

Branen, A. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59- 63.

Brenes, M; García, A; García, P; Rios, J.J; Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agri. Food Chem*, 47, 3535- 3540.

Brenes M., García A., García P., Garrido P. (2000a). Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by means of a Colourometric Electrode Array System. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5178-5183.

Bruni, R; Medici, A; Andreotti, E; Fantin, C; Muzzoli, M; Dehesa, M; Romagnoli, C; Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415- 421.

Calwell, C.R. (2000). A device for the semiautomatic determination of oxygen-radical absorbance capacity. *Anal. Biochem.* 287, 226- 233.

Cano, A; Hernandez- Ruiz, J; Garcia- Cánovas, F; Acosta, M; Arnao, M.B. (1998). And end- point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis* , 196-200.

Cano, A; Acosta, M; Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5(6), 365-370.

Cano, A; Alacaraz, O; Acosta, M; Arnao, M.B. (2002). One- line antioxidant activity determination: comparision of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Free Radical Research*, 7(2), 103-109.

Cao, G; Alessio, H.M; Cutler, G. (1993). Oxygen- radical absorbance capacity assay for antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 301-311.

Cao, G; Sofic, E; Prior, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3426- 3431.

Bibliografia

Cao, G; Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44(6), 1309- 1315.

Cao, G; Russell, R.M; Lischner, N; Prior, R.L. (1998a). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 128, 2383- 2390.

Cao, G; Booth, S.L; Sadowski, J.A; Prior, R.L. (1998b). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 68, 1081- 1087.

Cao, G; Prior, R.L. (1999). Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in biological samples. *Methods in enzymology*, vol 299, cap 5, 50-60.

Capannesi, C; Palchetti, I; Mascini, M; Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, 71, 553- 562.

Caponio, F; Bilancia, M.T; Pasqualone, A; Sikorska, E; Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to Light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221, 1-2, 92-98.

Carluccio, M.A; Siculella, L; Ancora, M.A; Massaro, M; Scoditti, E; Storelli, C; Visioli, F; Distanti, A; De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1;23(4), 622- 629.

Carrasco-Pancorbo, A; Cerretani, L; Bendini, A; Segura-Carretero, A; Gallina-Toschi, T; Fernández-Gutierrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.*, 28, 837- 858.

Caruso, D; Berra, B; Giovanini, F; Cortesi, N; Fedeli, E; Galli, G. (1999). Effect of virgen olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 9, 102- 107.

Castillo, J; Benavente- García, O; Lorente, J; Alcaraz, M; Redondo, A; Ortuño, A; Del Rio, A. (2000). Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan- 3- ols from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (5), 1738- 1745.

Cattaneo, P; Karman, G. (1945). *Anales de la Asociación Química Argentina*, 33, 110- 119.

Ceriello, A; Mercuri, F; Quagliaro, L; Assaloni, R; Motz, E. (2001). Detection of nitrotyrosine inthe diabetic plasma: evidencce of oxidative stress. *Diabetología*, 44, 834- 838.

Cert, A; Moreda, W; Garcia-Moreno,J. (1997). Determinación de esterole y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites*, 48 (7), 207- 218.

Cert, A; Moreda, W; Pérez- Camino, M.C. (2000). Chromatographic análisis of minor constituents in vegetable oils. *J Chromatogr. A*, 881, 131- 148.

Chanwitheesuk, A; Teerawutgulrag, A; Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, 92, 491-497.

Bibliografía

Chen, B.H; Huang, J.H. (1998). Degradation and isomerization of chlorophyll a and beta-carotene as affected by various heating and illumination treatments. *Food Chemistry*. 62 (3), 299- 307.

Cheung, L.M; Cheung, P.C.K; Ooi, V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249-255.

Choi, H.S; Song, H.S; Ukeda, H; Sawamura, M. (2000). Radical- Scavenging Activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1- Diphenyl-2- picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161.

Christopoulo, E; Lazaraki, M. (1997). Variations in free and esterified alcohols of olive oils during storage. *Rev. Italiana Delle Sostanze Grasse*, 74, 191- 200.

Cichelli, A; Pertesana, G.P. (2004). High- performance liquid chromatographic análisis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgen olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046, 141- 146.

Cinquanta, L; Esti, M; La Notte, E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgen olive oil during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1259- 1264.

COI/T. 20/ Doc. nº 18/Rev 2. 2003.

Consejo Oleícola Internacional. Enciclopedia Mundial del olivo. Ed. Plaza & Janés. 1996.

Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial, junio 2002.

Craft, N.E; Granado- Lorenzo F. (1992). Effect of simple preparation on fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations.

- Cross, C.E; Halliwell, B; Borish, E.T; Pryor, W.A; Ames, B.N; Saul. R.L. (1987). Oxygen radical and human disease. *Ann Intern Med*, 107, 526- 545.
- Dapkevicius, A; Venskutonis, R; Van Beek T.A; Linssen, J.P.H. (1998). Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J. Sci Food Agric*, 77, 140-146.
- Dávalos, A;Gómz-Cordovés, C; Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48- 54.
- De la Puerta, R; Martinez-Dominguez, E; Ruiz-Gutierrez, V. (2000). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Journal of Biosciences* 55(9/10), 814-819.
- De Gaulejac, S.C; Provost, C; Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenolscavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.* 47, 425- 431.
- De Leonardis, A; Macciola, V; De Felices. (1998). Rapad determination of squalene in virgen olive oils using gas-liquid chromatography. *It. J. Food Sci.* 1, 75- 80.
- De Stefano, G; Piacquadio, P; Servili, M; Di Giovancchino, L; Sciancalepore, V. (1999). Effect of extraction system in the phenolic composition of virgen olive oils. *Fett/ Lipid*, 101, 328- 332.
- Del Carlo, M; Sacchetti, G; Di Mattia, C; Compagnone, D; Mastrocola, D; Liberatore, L; Cichelli, A. (2004). Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J. Agri. Food Chem*, 52, 4072- 4079.

Bibliografia

Dell'Agli, M; Bosisio, E. (2002). Minor polar compounds of olive oil: Composition, factors of variability and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27(Bioactive Natural Products (Part H)), 697-734.

Di Giovacchino, L. (1991). L'estrazione dell'olio con la centrifugazione delle paste di olive. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 68, 413- 417.

Di Giovacchino, L; Mucciarella, M.R; Costantini, N; Ferrante, M.L; Surricchio, G. (2002). Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 4, 339-344.

Dionisi, F; Prodolliet, J; Tagliaferri, E. (1995). Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography/amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. *J. Am. Oil Chem. Soc* 72, 12, 1505-1511.

Diplock, A.T; Charleux, J.L; Crozier, G; Kok, F.J; Rice-Evans, C.A; Roberfroid, M; Stahl, W; Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British J. Nutr.* 80, S77- S112.

Dragsted, L.O; Pedersen, A; Hermetter, A; Basu, S; Hansen, M. (2004). The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr.* 79, 1060- 1072.

Droge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Eisner, J; Iverson, J.L; Mozingo, A.K; Firestone, D. (1965). Gas chromatography of unsaponifiable matter. Identification of hydrocarbons, aliphatic alcohols, tocopherols, triterpenoid alcohols, and sterols present in olive oils. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 48, 417-433.

Epler, K.S; Sander, L.C. (1992). Evaluation of reserved-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 595, 1-2, 89-101.

Escarpa, A; González, M.C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparasion of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica chimica Acta*, 427, 119- 127.

Escrivá, A; Esteve, M.J; Farre, R; Frigola, A. (2002). Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 947, 313-318.

Espin, J.C; Soler- Rivas, C; Wichers, H.J. (2000). Characerization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2- diphenyl- 1- picylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 648- 656.

European Union Comisión, Regulation EEC/183/93. *Off. J. Eur. Común.*, L248. (1993).1.

Fernández- Pachón, M.S; Villaño, D; García- Parilla, M.C; Toncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113- 118.

Fernández-Pachon, M.S; Villaño, D; Troncoso, A.M; Garcia-Parrilla, M.C. (2005). Antioxidant Capacity of plasma alter red wine intake in human volunteers. *J. Agric. Food Chem.*, 53(12), 5024-5029.

Fischer, M.A.J.G; Gransier, T.J.M; Beckers, L.M.G; Bekers, O; Bast, A; Haenen, G.R.M.M. (2005). Determination of the antioxidant capacity in blood. *Clin Chem Lab Med*, 43(7), 735- 740.

Bibliografia

Fitelson, J. (1943). Occurrence of squalene in natural fats. *J Assoc Off Agric Chem*, 499.

Fitó, M; Covas, M.I; Lamuela- Raventos, R.M; Vila, J; Torrents, J; De la Torre, C; Marrugat, J. (2000). Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids*, 35, 633- 638.

Fitó, M; Gimeno, E; Covas, M.I; Miró, E; López-Sabater, C; Farré, M; De la Torre, R; Marrugat, J. (2002). Postprandial and short-term effects of dietary virgen olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids*, 37, 245- 251.

Fitó Colomer M. Efectos Antioxidantes del Aceite de Oliva y de sus Compuestos Fenólicos. Tesis Doctoral. Universidad Barcelona. 2003.

Fitó, M; Cladellas, M; De la Torre, R; Martí, J; Alcántar, M; Pujadas-Bastardes, M; Marrugat, J; Bruguera, J; López-Sabater, M.C; Vila, J; Covas, M.I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181, 149-158.

Fliesler, S.J; Keller et al., R.K. (1995). Isoprenoid metabolism in the vertebrate retina. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 29, 877- 894.

Folin, O; Denis, W. (1912). On phosphotungstic- phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12, 239- 243.

Folin, O; Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-. 650.

Fourati, H.; Cossentini, M.; Khlif, M. (2002). Study of the sterolic fraction of some free crossbreeding olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 586 (Vol. 1, Proceedings of the 4th International Symposium on Olive Growing, 2000, Vol. 1), 213-216.

Frankel, E.N; Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Review. J. Sci. Food Agric.*, 80, 1925-1941.

Fukumoto, L.R; Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidat Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem*, 48, 3597-3604.

Gallardo-Guerrero, L; Gandul-Rojas, B; Roca, M; Mínguez-Mosquera, M.I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgen olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc* 82, 1, 33-39.

Galli C., Visioli F. (1999). Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olives/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. *Lipids* 34, 23-26.

Galli, C; Visioli, F. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean diet. *Int J Vitam Nutr Res.* 71(3), 185-188.

Gandul- Rojas, B; Roca, M; Mínguez- Mosquera, M.I. (2000). Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgen olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 8, 853-858.

García, A; Brenes, M; Romero, C; García, P; Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgen olive oils of the Picual variety. *European Food Research and Technology*, 215, 407- 412.

García, J.M; Gutierrez, F; Castellano, J.M; Perdequero, S; Morilla, A; Albi, M.A. (1996). Influence of storage temperature on fruit ripening and olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.* 44, 264- 267.

Bibliografía

- García, J.M; Yousfi. K; Oliva, J; Garcia-Diaz, M.T; Perez-Camino, M.C. (2005). Hot water dipping of olives (*Olea europaea*) for virgin oil debittering. *J. Agric. Food Chem.* 19, 53 (21), 8248- 8252.
- Geckil, H; Ates, B; Durmaz, G; Erdogan, S; Yilmaz, I. (2005). Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and biotechnology*, 1(1), 27-31.
- Gerhbein, L.L; Sing, E.J. (1969). Hydrocarbons of dogfish and cod livers and herring oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46, 554- 557.
- Gey, K.F; Puska, P; Jordan, P; Moser, U.K. (1991). Inverse correlation between plasma vitamina E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr*, 53, 326S- 34S.
- Ghiselli, A; Serafini, M; Natella, F; Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free radical Biology & Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- Ghiselli, A; Hatella, F; Guidi, A; Montanari, L; Fantozzi, P; Scaccini, C. (2000a). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nytr. Biochem.* 11, 76- 80.
- Giacometti, J. (2001). Determination of aliphatic alcohols, squalene, α - tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *The Analyst*, 126, 472-475.
- Gil, M.I; Tomás-Barberán, F.A; Hess-Pierce, B; Holcroft, D.M; Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem*, 48, 4581- 4589.

Gimeno, E; Calero, E; Castellote, A.I; Lamuela-Raventós, R.M; De la Torre, M.C; López-Sabater, M.C. (2000). Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 1-2, 255-259.

Gimeno, E; Castellote, A.I; Lamuela- Raventos, R.M; De la Torre, M.C; López-Sabater, M.C. (2000a). Rapid method of vitamin E in vegetable oils by reserved- phase high-perfomance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 1-2, 251-254.

Gimeno, E; Castellote, A.I; Lamuela- Raventos, R.M; De la Torre, M.C; López-Sabater, M.C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolic, α - tocopherol, and β - carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78, 207-211.

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre-Boronat M.C., López-Sabater M.C. (2002a). The Effects of Harvest and Extraction Method on Antioxidants (Phenolics, α -Tocopherol and β -Carotene) Content in Virgin Olive Oil. *Food Chem.* 78, 207-211.

Glazer, A. (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*, 161-168.

Gómez-Alonso, S; Salvador, M.D; Fregapane, G. (2002). Phenolic Compound Profile of Cornicabra Virgin olive oil. *J. Agri. Food Chem*, 50, 6812- 6817.

Gómez-Alonso, S; Fregapane, G; Salvador, M.D; Gordon, M.H. (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgen olive oil during frying. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 667-672.

Bibliografía

Gonzalez, J; Cruz, J.M; Domínguez, H; Parajó, J.C. (2004). Production of antioxidant from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chemistry*, 84, 243- 251.

Gordon, M.H; Paiva-Martins, F; Almeida, M. (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2480-2485.

Gorinstein, S; Martin- Belloso, O; Katrich, E; Lojek, A; Cíz, M; Gligelmo- Miguel, N; Haruenkit, R; Park, Y; Jung, S; Trakhtenberg, S. (2003). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 154- 159.

Guinda, A; Lanzón, A; Albi, T. (1996). Differences in hydrocarbons of virgin olive oils obtained from several olive varieties. *J. Agric. Food Chem* 44, 1723-1726.

Gutfinger T. (1981). Polyphenols in Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 966-968.

Gutierrez, F; Jimenez, B; Ruiz, A; Albi, M.A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different component involved. *J. Agri. Food Chem*, 47(1), 121- 127.

Gutiérrez-Rosales, F; Ríos, J.J; Gómez-Rey, L. (2003). Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line HPLC Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6021-6025.

Gutteridge, J.M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41, 1819- 1828.

- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1341- 1348.
- Halliwell, B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. *Free Rad. Res.* 25, 57- 74.
- Hashim, Y.Z; Eng, M; Gill, C.I; McGlynn, H; Rowland, I.R. (2005). Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.* 63(11), 374- 386.
- Haslam, E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *J. Chem Soc.*, 309-311.
- Holasova, M; Fiedlerova, V; Smrcinova, H; Orsak, M; Lachmzn, J; Vavreinova, S. (2002). Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, 35, 207- 211.
- Hong, W.K; Itri, L.M. (1994). Retinoids and human cancer. *The retinoids*, 567- 630.
- Hosotani, K; Kitagawa, M. (2003). Improved simultaneous determination method of beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *Journal of Chromatography B*, 791, 305- 313.
- Hrcirik, K; Fritsche, S. (2005). Relation between the endogenous antioxidant system and the quality os extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *J. Agric. Food Chem*, 53, 2103-2110.
- Huber, L. (1998). Validation of analytical methods: review and strategy. *Lc-GC Int.* 96- 105.
- Huang, D; Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Flanagan, J.A; Prior, R.L. (2002). High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel

Bibliografía

liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4437- 4444.

Huang, D; Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Flanagan, J.A; Deemer, E.K. (2002a). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β - cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1815-1821.

Ivekovic, D; Milardovic, S; Roboz, M; Grabaric, B. S. (2005). Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *The Analyst*, 130, 708-714.

Jaspersen, H; Jones, R. (1947). *J. Soc. Chem. Ind.* 66, 13.

Jayaprakasha, G.K; Singh, R.P; Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285- 290.

Jiménez, A; Hermoso, M; Uceda, M. (1995). Elaboración del Aceite de Oliva Virgen Mediante Sistema Continuo en Dos Fases. Influencia de Diferentes Variables del Proceso en Algunos Parámetros Relacionados con la Calidad del Aceite. *Grasas y Aceites*. 46(4-5), 299-303.

Jiménez de Blas, O; Del Valle Gonzalez, A. (1996). Determination of sterols by capillary column gas chromatography. Differentiation among different types of olive oil: virgin, refined, and solvent-extracted. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12), 1685-1689.

Jiménez, J; Rondón, D; Martínez, L; Mataix, J. (2001). Composición química de los aceites de oliva. En: Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Universidad de Granada- Puleva Food. Granada.

Kanner, J; Mendel, H; Budowski, P. (1977). Prooxidant and antioxidant effects of ascorbic acid and metal salts in a β -carotene-linoleate model system. *J Food Sci*, 42(1), 60- 64.

Kanner, J; Frankel, E; Granit, R; German B; Kinsella, J.E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem*, 42, 64- 69.

Karleskind, A; Wolff, J.P. (1996). Oils and fats manual. Lavoisier Tec y Doc. London.

Katalinic, V; Milos, M; Modun, D; Music, I; Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86, 593- 600.

Keceli, T; Gordon, M.H. (2001). The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *J. Sci. food Agric*. 81, 1391-1396.

Khachik, F; Beecher, G.R; Whittaker, N.F. (1986). Separation, Identification, and Quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J.Agric. Food Chem*. 34, 603-616.

Kim, D.O; Lee, K.W, Lee, H.J; Lee, C.Y. (2002). Vitamina C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem*, 50, 3713- 3717.

Kimura, M; Rodriguez-Amaya, D.B; Godoy, H.T. (1990). Assessment of the saponification in the quantitative determination of carotenoides and provitamins A. *Food Chemistry*, 35, 3, 187-195.

Kiritsakis A. K. (1992). El Aceite de Oliva. Ed Madrid Vicente

Bibliografía

Kohno, Y; Egawa, Y; Itoh, S; Nagaoka, S; Takahashi, M; Mukai, K. (1995). Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by Squalene in n-butanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 52- 56.

Krinsky, N.I; Jonson, E.J. (2005). Carotenoids actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med.* 26 (6), 459- 516.

Lambert *et al.* (2005). Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols Evidence from Laboratory Investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 284.

Lanzón, A. (1990). Alteraciones producidas en los componentes del insaponificable de los aceites de oliva como consecuencia de los procesos de refinación. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.

Lanzón, A; Albi, T; Cert, A; Gracian, J. (1994). The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 71, 285- 291.

Lapidot T., Walker M.D., Kanner J. (2002). Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic Beta-Cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7220-7225.

Larrauri, J.A; Sánchez- Moreno, C; Rupére, P; Saura- Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the agig of selected red Spanish wines. *Journal of the Science of Food ans Agriculture*, 47, 1603-1606.

Lavelli, V. (2002). Comparison of the antioxidant activities of extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7704- 7708.

Lazzez, A.; Cossentini, M.; Khlif, M. (2002). Evolution of chlorophyllian pigments, minor compounds, and sterolic fraction extracted from oil of "Chemlali" variety during maturity. *Acta Horticulturae*, 586 (Vol. 2, Proceedings of the 4th International Symposium on Olive Growing, 2000, Vol. 2), 571-574.

- Lemanska, K; Szymusiak, H; Tyrakowska, B; Zielinski, R; Soffer, A.E.M.F; Rietjens, I.M.C.M. (2001). The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol. Med.* 31, 869- 881.
- Leone, A.M; Notte, E; Lamparelli, F. (1976). The sterols fraction of olive oil and its analytical significance. *Riv. Tech. Alim. Nutr. Um*, 6, 205.
- Lercker, G; Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *Journal of Chromatography, A*, 881, 105-129.
- Lesschaeve, I; Noble, A.C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 330S-335S.
- Lietz, G; Henry, C.J.K. (1997). A modified method to minimise losses of carotenoides and tocopherols during HPLC analysis of red palm oil. *Food Chemistry*, 60, 1, 109-117.
- Liu, G.C.K; Ahrens, E.H; Schreiberman, P.H; Crouse, J.R. (1976). Measurement of Squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J. Lipid Res.* 17, 38-45.
- Long, L.H; Kwee, B; Halliwell, B. (2000). The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay. *Free Radic. Res* 32, 181- 186.
- Lu, H.T; Jiang, Y; Chen, F. (2004). Determination of squalene using high- performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia*, 59, 367-371.

Bibliografía

Luaces, P; Pérez, A.G; García, J.M; Sanz, C. (2005). Effects of heat-treatments of olivefruit on pigment composition of virgen olive oil. *Food Chemistry*, 90, 169- 174.

Lussignoli, S; Fraccaroli, M; Andrioli, G; Brocco, G; Bellavite, P. (1999). A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Anal. Biochem.* 269, 38- 44.

Manzi, P; Panfili, G; Esti, M; Pizzoferrato, L. (1996). Normal and reserved phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in diary products. *Chromatographia*, 43, 89-93.

Manzi, P; Panfili, G; Esti, M; Pizzoferrato, L. (1998). Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgen olive oils from different cultivars. *J.Sci. food. Agric.* 77, 115-120.

Mariani, C; Fedeli, C. (1993). La cromatografía de gaseose en el análisis del aceite de oliva. *Olivae*, 45, 34- 39.

Mariani, C; Venturini, S; Fedeli, E. (1993). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 70, 321.

Mariani, C; Venturi, S. (1996). Sull'aumento delle cere durante la conservazione degli oli di oliva. (1996). *Rev. Italiana Delle Sostanze Grasse*, 73, 489- 498.

Martínez de Vitoria, E; Mañas, M. (1999). El aceite de oliva en la dieta y salud humana. En el cultivo del olivo. Junta de Andalucía. Mundi Prensa. Madrid.

Martínez Gonzalez, M.A; De Irala Estévez, J; Faulín Fajardo, F. (2001). Bioestadística Amigable. Ed. Diaz de Santos.

Martínez-Valverde, I; Periago, M.J; Provan, G; Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in comercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 82, 323- 330.

Mataix Verdú, J; Martínez de Vitoria, E. (1988). Bases para el futuro, El aceite de oliva. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.

Mataix, J; Martínez de Vitoria, E. (1988). El aceite de oliva. Bases para el futuro. Diputación provincial de Jaén. Jaén.

Mataix, J. Alimentación familiar: guía científico-práctica. Plenufarm. Madrid. 1993.

Mataix Verdú J. Aceite de Oliva Virgen: Nuestro Patrimonio Alimentario. Ed. Universidad de Granada, Puleva Food. Granada, 2001.

Mateos, R; Dominguez, M.M; Espartero, J.L; Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha- tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*, 51(24), 7170- 7175.

Mateos, R; Trujillo, M; Pérez-Camino, C; Moreda, W; Cert, A. (2005). Relationships between Oxidative Stability, Triacylglycerol Composition, and Antioxidant Content in Olive Oil Matrices. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5766-5771.

Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem*, 50, 3444- 3452.

McNair, H.M; Esquivel, B. (1973). Cromatografía líquida de alta presión. *Monografía científica de la OEA*, num. 10.

Mercuri, F; Quagliaro, L; Ceriello, A. (2000). Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes Technol Ther*, 2, 589- 600.

Bibliografía

Michele, L. (1969). Reaction between 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl and olive oil. *Oli, Grassi, Derivati*, 5(8-9), 62- 63.

Miles, E.A; Zoubouli, P; Calder, P.C; Phil, D. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*. 21, 389-394

Millar, N.J; Rice-Evans, C; Davies, M.J; Gopinathan, V; Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407- 412.

Mínguez- Mosquera, M.I; Garrido Fernandez, J. (1985). Eliminación de compuestos lipídicos durante la fase de extracción de pigmentos cloroplásticos en aceitunas *Olea europea*. *Grasas y Aceites*, 36, 376- 381.

Mínguez- Mosquera, M.I; Garrido Fernández, J. (1986a). Identificación de pigmentos carotenoides en frutos de distintas variedades de olivo *Olea europea* L. *Grasas y Aceites*, 37, 5, 272-276.

Mínguez- Mosquera, M.I; Garrido Fernández, J. (1986b). Composición y evolución de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y maduración de los frutos del olivo. *Grasas y Aceites*, 37, 6, 337- 342.

Mínguez- Mosquera, M.I; Garrido Fernández, J. (1987). Diferenciación de las variedades de olivo Hojiblanca y Manzanilla según su contenido pigmentario. *Grasas y Aceites*, 38, 1, 4-8.

Mínguez- Mosquera, M.I; Montaña Asquerino, A; Garrido Fernández, J; Gandul-Rojas, B. (1988). Aplicación de la HPLC para la separación e identificación de clorofilas y carotenoides en frutos del olivo. *Grasas y Aceites*, 39, 6, 363-366.

Mínguez- Mosquera, M.I; Garrido Fernández, J. (1989a). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europea*). *J.Agric. Food Chem.* 37, 1, 1-7.

Mínguez-Mosquera, M.I; Gandul-Rojas, B; Garrido-Fernández, J. (1989b). Método rápido de valoración de pigmentos en aceitunas verdes de mesa. *Grasas y Aceites*, 3, 206-212.

Mínguez-Mosquera, M.I; Gandul-Rojas, B; Garrido-Fernández, J; Gallardo-Guerrero, L. (1990 a). Pigments present in virgen olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 3, 192-196.

Mínguez-Mosquera, M.I; Gandul-Rojas, B; Garrido-Fernandez, J. (1990 b). Quantification of Pigments in fermented manzanilla and hojiblanca olives. *J.Agric. Food Chem.* 38, 1662-1666.

Montedoro, G.F; Servili, M; Baldioni, M; Miniati, E. (1992). Simple and Hydrolyzable phenolic compounds in virgen olive oil. 1. their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1571-1576.

Moreda, W; Pérez- Camino, M.C; Cert, A. (2001). Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, 936, 159- 171.

Moreda, W; Rodríguez-Acuña, R; Pérez-Camino, M.C; Cert, A. (2004). Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in refined olive pomace and other vegetable oils. *J Sci Food Agric.* 84, 1759- 1464.

Moreno, J.J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachinoid acid mobilization and metabolism by macrophages raw 264.7. *Free radical Biology & Medicine*, 35, 1073- 1081.

Morettini, A. (1972). Olivocultura. Ramo Editorial Degli Agricoltori. Roma.

Bibliografia

Mosca, L; De Marco, C; Visioli, F; Cannella, C. (2000). Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J. Agric. Food Chem*, 48, 297- 301.

Motalleb, G; Hanachi, P; Kua, S.H; Fauziah, O; Asmah, R. (2005). Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Biological Sciences*, 5(5), 648- 653.

Mukhtar, H; Ahmad, N. (1999). Green Tea Chemoprevention of Cancer. *Toxicol. Sci.* 52, 111-117.

Murkovic, M; Lechner, S; Pietza, A; Bratacos, M; Katzogiannos, E. (2004). Análisis of minor components in olive oil. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61, 155- 160.

Naguib, Y. M. A. (1998). A Fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Analytical Biochemistry*, 265, 290-298.

Nelly, G.S. (1999). Squalene and its potencial clinical uses. *Altern. Med Rev.* 4, 29- 36.

Nenadis, N; Tsimidou, M. (2002). Determination of squalene in olive oil using fraccional crystallization for simple preparation. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 79, 257-259.

Nergiz, C; Ünal, K. (1990). The effect of extraction systems on triterpene alcohols and Squalene content of virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 41, 117- 121.

Newmark, H.L. (1997). Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypótesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 1101- 1103.

Newmark, H.L.(1999). Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 889, 193- 203.

Nierenberg, D.W; Nann, S. (1992). A method for determining concentrations of retinol, tocopherol and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *American Journal of Clinical Nutrition*, 56, 2, 417-426.

Niki, E. (1990). Free radical initiators as source of water or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol*, 186, 100- 108.

Ninfali, P; Aluigi, G; Bacchiocca, M; Magnani, M. (2001). Antioxidant Capacity of Extra-Virgin Olive Oils. *JAACS*, 78,243-247.

Ninfali, P; Bacchiocca, M; Biagiotti, E; Servili, M; Montedoro, G. (2002). Validation of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) parameter as a new index of quality and stability of Virgin olive oil. *JAACS*, 79, 977-982.

Ninfali, P; Bacchiocca, M. (2003). Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *J. Agric. Food Chem*,9;51(8), 2222- 2226.

Ninfali, P; Mea, G; Giorgini, S; Rocchi, M; Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br J Nutr*. 93(2), 257-266.

Noruma, T; Kikuchi, M; Kawakami, Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 361- 370.

Nota, G; Naviglio, D; Romano, R; Sabia, V; Musso, S; Improta, C. (1999). Determination of the wax ester content in olive oils. Improvement in the method proposed by EEC Regulation 183/93. *J. Agric. Food Chem.* 47, 202- 205.

Bibliografía

Obied H., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 823-837.

Okogeri, O; Tasioula-Margari,M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and alpha-tocopherol of virgin olive oil during storage. *J. Agri. Food Chem*, 50(5), 1077- 1080.

Oliveras López, M^a Jesús. Calidad del Aceite de Olive Virgen Extra. Antioxidantes y Función Biológica. Universidad de Granada. 2005.

Oñate-Jaén, A; Bellido-Milla, D; Hernández-Artiga, M.P. (2006). Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chemistry*, 97, 361- 369.

Ostlund, R.E; Racette, S.B; Stenson, W.F. (2002). Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutr Rev.* 60 (11), 349- 359.

Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626.

Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Flanagan, J; Deemer, E.K; Prior, R.L; Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772- 2777.

Owen, R.W; Mier, W; Giacosa, A; Hull, W.E; Spiegelhalder, B; Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and Squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and Squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 647- 659.

Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner B., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000a). The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil. *Eur. J. Cancer.* 36, 1235- 1247.

Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner B., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000b). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 1, 107- 112.

Owen, R.W; Haubner, R; Wurtele, G; Hull, E; Spiegelhalder, B; Bartsch, H. (2004).Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev.* 13(4), 319- 326.

Paganuzzi, V; De Jorge, F; Maleaba, A. (1997). Influenza dell'invecchiamento e Della temperatura su alcuni parametri previsti dal Reg. CEE n° 2568/91 sull'olio di oliva. *Rev. Italiana Delle Sostanze Grasse*, 74, 231- 239.

Paganuzzi, V; Maleaba, A. (1999). Cere ed alcanoli nell'olio di oliva. Studio dell'influenza del tempo, temperatura ed illuminazione su contenuto e composizione. *Rev. Italiana Delle Sostanze Grasse*, 76, 205- 215.

Pellegrini, N; Re, R; Yang, M; Rice-Evans, C. (1999). Screening of Dietary carotenoids and carotenoid- rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2-2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline- 6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in enzymology*, 299, 379- 389.

Pellegrini, N; Visioli, F; Buratti, S; Brighenti. F. (2001). Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *J. Agric. Food Chem.*,49, 2532- 2538.

Pellegrini, N; Serafin, M; Colombi, B; Del Rio, D; Salvatore, S; Bianchi, M; Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in

Bibliografía

itally assessed by three different in Vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.

Pellegrini, N; Del Río, D; Colombi, B; Bianchi, M; Brighenti, F. (2003a). Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Assay to a Flow Injection System for the Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pure Compounds and Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 260- 264.

Pérez- Camino, M.C; Moreda, W; Mateos, R; Cert, A. (2003). Simultaneous determination of long- chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils. *Journal of Chromatography A*, 983, 283- 288.

Pérez, R.M; Vargas, R; Martínez, F.J; García, E.V; Hernández, B. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Boconá arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*, 44:1, 5-21.

Perona, J. S; Martinez-Gonzalez, J; Sanchez-Dominguez, J. M.; Badimon, L; Ruiz-Gutierrez, V. (2004). The unsaponifiable fraction of virgin olive oil in chylomicrons from men improves the balance between vasoprotective and prothrombotic factors released by endothelial cells. *Journal of Nutrition*, 134(12), 3284-3289.

Perona, J.S; Cabello-Moruno, R; Ruíz-Gutierrez, V. (2005). The role of virgen componentes in the modulation of endothelial function. *J. Nutr Biochem* (en prensa).

Pignatelli, A. (2003). Comparasion between analytic methods for determination of polyphenols in virgin olive oils. 42(428), 830- 835.

Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Analytical Progress*, Vol. 19, Number 2.

Prior, R.L; Cao, G; Martin, A; Sofic, E; McEwen, J; O'Brien, C; Lischner, N; Ehlenfeldt, M; Kalt, W; Krewer, G; Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as

influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2686- 2693.

Prior, R.L; Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173- 1181.

Prior, R.L; Hoang, H; Gu, L; Wu, X; Bacchiocca, M; Howard, L; Hampsch-Woodill, M; Huang, D; Ou, B; Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) of plasma and other biological and food samples. *J.Agric. Food Chem.*, 51, 3273-3279.

Prior, R.L; Wu, X; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J.Agric. Food Chem*, 53, 4290- 4302.

Proteggente, A.R; Pannala, A.S; Paganga, G; Van Buren, L; Wagner, E; Wiseman, S; Van De put, F; Dacombe, C; Rice- Evans, C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radicals Research*, 36(2), 217- 233.

Psomiadou, E; Tsimidou, M. (1998). Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5132-5138.

Psomiadou, E; Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autooxidation studies. *J. Agric. Food Chem*, 50, 716- 721.

Ranalli, A; Serraiocco, A. (1996). Evaluation of characteristics of olive oil produced by innovative or traditional processing Technologies. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 73, 303- 315.

Bibliografía

Ranalli, A; Ferrante, M.L; De Mattia, G; Costantini, N. (1999). Analytical evaluation of virgen olive oil of first and second extraction. *J. Agric. Food Chem.* 47, 417- 424.

Ranalli, A; cabras, P; Iannucci, E; Contento, S. (2001). Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgen olive oil are affected by processing technology. *Food Chemistry*, 73 (4), 445-451.

Rao, C.V; Newmark, H.L; Reddy, B.S. (1998). Chemopreventive effect of squaleno on colon cancer. *Carcinogenesis*. 19, 287- 290.

Rastrelli, L; Passi, S; Ippolito, F; Vacca, G; De Simone, F. (2002). Rate of degradation of α - tocopherol, Squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *J. Agri. Food Chem*, 50, 5566- 5570.

Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A.S; Yang, M; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231- 1237.

Reglamento (CE) nº1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003, que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L295 de 13.11.03).

Reglamento (CEE) nº2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L248 de 5.9.91).

Rice-Evans, C.A; Miller, N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzimology*, 234, 279- 293.

Rimm, E.B; Stampfer, M.J; ascherio, A; Giovannucci, E; Colditz, G.A; Willet, W.C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 328, 1450- 1456.

Rotondi,A; Bendini, A; Cerretani, L; Mari, M; Lercker, G; Toschi, T.G. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of Cv. Nostrana di Brisighella Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3649- 3654.

Ryan, D; robards, K; Lavee, S. (1998). Evaluación de la calidad del aceite de oliva. *Olivae*, 72, 23- 41.

Ryohei, K; Tomotaro, T. (1951). *J. Chem. Soc. Japan.* 54, 737.

Sacchetti, G; Maietti, S; Muzzoli, M; Scaglianti, M; Manfredini, S; Radice, M; Bruni, R. (2004). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 2004.

Salvador, M.D; Aranda, F; Fregapane, G. (1998). Chemical composition of comercial Cornicabra Virgen Olive Oils from 1995/96 to 1996/1997 crops. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1305- 1311.

Salvador, M.D; Aranda, F; Gómez-Alonso, S; Fregapane, G. (2001). Cornicabra virgen olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality an oxidative stability. *Food Chemistry*, 74, 267- 274.

Sánchez- Moreno, C; Larrauri, J.A; Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antirradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76, 270- 276.

Sánchez-Moreno, C; Plaza, L; De Ancos, B; Cano, M.P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of comercial orange juice. *J. Sci. Food Agric.* 83, 430- 439.

Bibliografia

Scalzo, J; Politi, A; Pellegrini, N; Mezzetti, B; Battino, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21, 207-213.

Serafini, M; Ghiselli, A; Ferro-Luzzi, A. (1994). Red wine, tea and antioxidants. *Lancet*, 344. 626.

Serafini, M; Maiani, G; Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enlances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* 128, 1003- 1007.

Serafini, M; Bugianesi, R; Salucci, M; Azzini, E; Raguzzini, A; Maiani, G. (2002). Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subject. *Br. J. Nutr.* 88, 615- 623.

Serafini, M; Bugianesi, R; Maiani, G; Valtuena, S; De Santis, S; Crozier, A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424, 1013.

Servili, M; Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 9-10, 602-613.

Shin, T.S; Samuel-Godber, J. (1993). Improved high-performance liquid chromatography of vitamin E vitamers on normal-phase columns. *J. Am. Oil Chem. Soc* 70(12), 1289-1291.

Shui, G; Leong, L.P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97, 277- 284.

Singleton, V.L; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144- 158.

Skevin, D; Rade, D; Strucelj, D; Mokrovcak, Z; Nederal, S; Bencic, D. (2003). The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 536- 541.

Smith, T.J; Yang, G.Y; Seril, D.N; Liao, J; Kim, S. (1998). Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and Squalene. *Carcinogenesis*. 19, 703- 706.

Smith, T.J. (2000). Squalene: potencial chemopreventive agent. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 9, 1841- 1848.

Stancher, B; Zonta, F. (1983a). High-performance liquid chromatography of fat-soluble vitamins. Simultaneous quantitative analysis of vitamins D2, D3, and E. Study of percentage recoveries of vitamins from cod liver oil. *Journal of Chromatography*, 256, 1, 93-100.

Stancher, B.; Zonta, F. (1983b). High-performance liquid chromatography (HPLC) of fat-soluble vitamins in cheese. A new method for determining total biological activity of vitamin A and E. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 60, 6, 371-5.

Stancher, B; Zonta, F; Bogoni, P. (1987). Determination of olive oil carotenoids by HPLC. *Journal of Micronutrient Analysis*, 3, 2, 97-106.

Standish, R. (1960). The first of trees: the store of the olive. *Phenix House Ltd. London*.

Strandberg, T.E; Tilvis, R.S; Miettinen, T.A. (1989). Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous Squalene in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1001, 150- 156.

Bibliografia

Strandberg, T.E; Tilvis, R.S; Miettinen, T.A. (1990). Metabolic variables of cholesterol during Squalene feeding in humans: comparasion with cholestyramine treatment. *J. Lipid Res.* 31, 1637- 1643.

Strube, M; Haenen, G.R.M.M; Van Den Berg, H; Bast, A. (1997). Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radical Research*, 26(6), 515-521.

Suja, K.P; Jayalekshmy, A; Arumughan, C. (2005). Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, 91, 213-219.

Sun, T; Ho, C.T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90, 743-749.

Taga, M. S; Miller, E. E; Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid . *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(5), 928-31.

Tepe, B; Dimitra-Daferera, D; Sokmen, A; Sokmen, M; Polissiou, M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333- 340.

Tian, D; Yang, R. (2004). Studies on the relation of total phenols content to the antioxidant activity of fruits and vegetables. 45(2), 70-73.

Tiscomia, E; Forina, M; Evangelisti, F. (1982). Chemical composition of olive oil and variations induced by refining. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.*, 59, 519- 556.

Tombesi, A; Cartechini, A. (1986). L'effetto dell'ombreggiamento della chioma sulla differenziazione delle gemme a fiore dell'olivo. *Riv. Ortoflorofrutti It.*, 70, 277-285.

Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *J. Food Sci.* 10, 99- 116.

Tsimidou, M.z; Georgiou, A; Koidis, A; Boskou, D. (2005). Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*, 93, 377- 383.

Ubando-Rivera, J; Navarro-Ocaña, A; Valdivia-López, M.A. (2005). Mexican lime peel: Comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. *Food Chemistry*, 89, 57-61.

Uceda M., Hermoso M. La Calidad del Aceite de Oliva. El Cultivo del Olivo. Eds Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. Junta de Andalucía. Sevilla, 1997.

Ursini, F; Maiorino, M; Brigelius-Flohé, R; Aumann, K.D; Roveri, A; Schomburg, D; Flohé, L. (1995). The diversity of glutathione peroxidasa. *Methods in Enzimol.* 252, 38-53.

Valavanidis, A; Nisiotou, C; Papageorgiou, Y; Kremli, I; Satravelas, N; Zinieris, N; Zygalki, H. (2004). Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2358-2365.

Van den Berg, R; Haenen, G.R.M.M; Van den Berg, H; Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511-517.

Van der Sluis, A; Dekker, M; Van Boekel, N. (2005). Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1073-1080.

Van Nederkassel, A.M; Daszykowski, M; Massart, D.L; Vander Heyden, Y. (2005). Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modelling. *Journal of Chromatography A*, 1096, 177- 186.

Bibliografía

Vazquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, Maria L. (1973). Determination of total polyphenols in olive oils. *Grasas y Aceites*, 24, 6, 350-7.

Vázquez Roncero, A. (1980). A study of the polar compounds in olive oil by gas chromatography. *Grasas y Aceites*, 31, 309.

Velasco, J; Dobarganes, C. (2002). Oxidative Stability of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 661-679.

Velioglu, Y.S; Mazza, G; Gao, L; Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem*, 46, 4113- 4117.

Verzera, A; Zappala, M; Bonaccorsi, I; Trozzi, A; Cotroneo, A. (2002). HPLC determination of carotenes and xanthophylls in different food matrixes. *Rivista Italiana EPPOS*, 33, 29-34.

Vichi, S; Pizzale, L; Conte, L.S; Buxaderas, S; Lopez-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1090(1-2), 146-154.

Villaño, D; Fernández-Pachón, M.S; Troncoso, A.M; Garcia-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by ABTS^{•+} method: influence of simple dilution and time. *Talanta*, 64, 501- 509.

Villaño Valencia, Débora. Comparación de diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante del vino y su relación con la composición fenólica. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 2005.

Villaño, D; Fernández-Pachón, M.S; Troncoso, A.M; Garcia-Parrilla, M.C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, 538, 391-398.

Villaño, D; Fernández- Pachón, M.S; Troncoso, A.M; García- Parilla, M.C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95, 394- 404.

Viola, P. (1997). El aceite de oliva y salud. *Consejo Oleicola Internacional*. Madrid.

Violi, F; Micheletta, F; Iluliano, L. (2002). Antioxidants and Atherosclerosis. *Eur. Heart J. Suppl.* 4, 17-21.

Visioli F., Galli C. (1998). Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4292-4296.

Visioli, F; Bellomo, G; Galli, C. (1998a). Free Radical-Scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 60- 64.

Visioli F., Galli C. (1999). Free Radical-Scavenging Actions of Olive Oil Phenolics. *Lipids.* 34 S315.

Visioli, F; Galli, C. (2000). Olive oil: more than just oleic acid. *Am J Clin Nutr.* 72(3), 848- 853.

Visioli, F; Borsani, L; Galli, C. (2000a). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemical. *Cardiovasc. Rev.* 47(3), 419-425.

Visioli, F; Galli, C. (2001). Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep.* 3(1), 64- 67.

Bibliografia

Visioli, F; Poli, A; Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res. Rev.* 22(1), 65- 75.

Visioli F., Galli C. (2002a). Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 209-221.

Visioli, F; Grande, S; Bogani, P; Galli, C. (2004). The role of antioxidants in the Mediterranean diets; focus on cancer. *Eur J Cancer Prev.* 13(4), 337- 343.

Visioli, F; Caruso, D; Grande, S; Bosisio, R; Villa, M; Galli, G; Sirtori, C; Galli, C. (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 44(2), 121- 127.

Visioli, F; Bogani, P; Grande, S; Galli, C. (2005a). Mediterranean food and health: building human evidence. *J Physiol Pharmacol.* 56(1), 37-49.

Vitagliano, M; Leone, A.M; Vodret, A. (1960). Determining the purity of olive oil by gas chromatography. *Olearia*, 14, 177.

Von Gadow, A; Joubert, E; Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.

Wang, H; Cao, G; Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44, 701- 705.

Wayner, D.D.M; burton, G.W, Ingold, K.U; Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: the important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letter*, 187, 33- 37.

Woodford, F.P; Whitehead, T.P. (1998). Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful?. *Amm. Clin. Biochem.* 35, 48- 56.

Yu, T.W; Ong, C.N. (1999). Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'- azinobis- (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation. *Analytical Biochemistry*, 275, 217-223.

Zonta, F; Stancher, B. (1987a). Carotenoid content and the quality of olive oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64, 2, 53-55.

Zonta, F; Stancher, B; Marletta, G.P. (1987b). Simultaneous high- performance liquid chromatographic analysis of free carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Chromatography A*, 403, 207-215.