



Trabajo Fin de Máster Universitario en Tecnología e Industria
Alimentaria

Procedimiento para la determinación de compuestos bioactivos en aceitunas mediante HPLC

Autora: **Laura Vázquez Granada**

Tutores: **María Teresa Morales Millán**
José María Castellano Orozco
Mirella Rada

Sevilla, diciembre de 2016



Trabajo Fin de Máster Universitario en Tecnología e Industria
Alimentaria

Procedimiento para la determinación de compuestos bioactivos en aceitunas mediante HPLC

Autora: Laura Vázquez Granado

Tutores: María Teresa Morales Millán
José María Castellano Orozco
Mirella Rada

Sevilla, diciembre de 2016



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE SEVILLA

MARÍA TERESA MORALES MILLÁN, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, JOSÉ MARÍA CASTELLANO OROZCO, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de la Grasa de Sevilla, y MIRELA RADA, Titulada Superior en el Instituto de la Grasa de Sevilla, Tutores del Trabajo Fin de Máster realizado por la Licenciada en Biología LAURA VÁZQUEZ GRANADO.

CERTIFICAN QUE: El Trabajo Fin de Máster titulado "*Procedimiento para la determinación de compuestos bioactivos en aceitunas mediante HPLC*", desarrollado por **Dña. Laura Vázquez Granado**, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarla.

Sevilla, diciembre 2016

Fdo. M^{ra} Teresa Morales Millán

Fdo. José M^a Castellano Orozco

Fdo. Mirela Rada

V^oB^o, Tutores de Trabajo Fin de Máster

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer la oportunidad que el Instituto de la Grasa me ha dado, junto con la Universidad de Sevilla, al abrirme sus puertas para realizar este trabajo fin de máster.

Gracias a la Dr. María Teresa Morales, por la aceptación de la tutoría del mismo y por su inestimable asesoramiento.

De igual modo, la elaboración de este proyecto ha sido posible gracias al apoyo fundamental de todos los componentes del grupo AGR-130 del Instituto de la Grasa. Gracias al Dr. José María Castellano por su confianza y ánimo constante, así como los consejos y aportaciones que a lo largo de este tiempo me ha ido transmitiendo. Y a la Dra. Mirela Rada por su paciencia, amabilidad y ayuda en el laboratorio, haciendo más sencillo lo que al comienzo resultaba complicado. A ambos, gracias por guiarme en el mundo de la investigación, por vuestro apoyo y enseñanzas.

A mis compañeros de biología y del máster, Reyes y Manuel, por su amistad, compañía durante estos años, sin ellos no hubiese sido lo mismo.

A Leyre, quien sin saberlo hizo que se encendiera la chispa de la investigación y quien día tras día ha estado ahí, transmitiéndome su entusiasmo y energía por seguir aprendiendo.

A mis amigas de toda la vida, Cristina, Jéssica, Patricia, Estefanía y Rosa, que me entienden y siempre estarán cerca.

A mis padres, por regalarme una vez más la oportunidad de poder seguir formándome en lo que me apasiona.

Y a Julio, porque este trabajo ha sido compartido contigo desde el principio y porque todos los días aprendo algo nuevo gracias a ti.

Título: PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ACEITUNAS MEDIANTE HPLC.

Autora: Laura Vázquez Granado

Tutores: María Teresa Morales Millán
José María Castellano Orozco
Mirela Rada

RESUMEN

El fruto del olivo (*Olea europaea*), y los productos derivados, representan una fuente valiosa de compuestos naturales con importante bioactividad. El presente Trabajo de Fin de Máster describe dos nuevos procedimientos, rápidos y precisos, para la extracción y el análisis de los compuestos bioactivos más importantes de la aceituna: oleuropeína y sus metabolitos, manitol, y los ácidos maslínico y oleanólico. Si bien ambos métodos se caracterizan por unos porcentajes de recuperación muy elevados, aquel que incluye la homogenización del fruto en seco ha rendido extractos con los más altos contenidos de los diferentes compuestos diana.

Palabras claves: *Olea europaea*, compuestos bioactivos, SPE, HPLC, oleuropeína, ácido maslínico, manitol.

ABSTRACT

The olive fruit (*Olea europaea*) and derived products represents a valuable source of natural compounds with important bioactivity. This Master's Thesis describes two new fast and accurate procedure for the extraction and analysis of the most important bioactive compounds of olives: oleuropein and its metabolites, mannitol and also maslinic and oleanolic acids. Although both methods are characterized by very high recovery rates, that procedure including the dry homogenization of the fruit has yielded extracts with the highest contents of the different target compounds.

Keywords: *Olea europaea*, bioactive compounds, SPE, HPLC, oleuropein, maslinic acid, mannitol.

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	El olivo	3
2.1.1	Origen y expansión del cultivo del olivo	3
2.1.2	Distribución geográfica actual y producciones del olivo	4
2.1.3	Botánica del olivo	8
2.1.4	Variedades de olivo	10
2.2	La aceituna	13
2.2.1	Biología y fases del desarrollo	13
2.2.2	Composición química de la aceituna	15
2.3	Compuestos bioactivos de la aceituna	16
2.3.1	Compuestos fenólicos	16
2.3.1.1	Naturaleza química	17
2.3.1.2	Diferencias entre variedades y evolución del contenido de compuestos fenólicos a lo largo del desarrollo del fruto	20
2.3.1.3	Influencia de factores ambientales	23
2.3.2	Azúcares y Poliols	24
2.3.2.1	Naturaleza química de los poliols	25
2.3.2.2	Evolución a lo largo del desarrollo y diferencias entre variedades	26
2.3.3	Compuestos triterpénicos pentacíclicos	26
2.3.3.1	Naturaleza química	28
2.3.3.2	Compuestos más importantes dentro del grupo	29
2.3.3.3	Evolución a lo largo del desarrollo y diferencias entre variedades	30
2.4	Actividad biológica de los diferentes grupos de compuestos bioactivos	31
2.4.1	Compuestos fenólicos	32
2.4.2	Poliols	35
2.4.3	Compuestos triterpénicos	36
2.5	Valorización de la aceituna como alimento funcional	37
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
3.1	Hipótesis	39
3.2	Objetivos	39
4	MATERIAL Y MÉTODOS	40
4.1	Material vegetal	40

4.2	Disolventes y patrones	40
4.3	Equipamiento de laboratorio	41
4.3.1	Homogeneizador	41
4.3.2	Equipo de filtración a vacío	41
4.3.3	Rotavapor	41
4.3.4	Sistema de extracción en fase sólida	42
4.3.5	Cromatógrafo líquido HPLC-DAD	42
4.3.6	Cromatógrafo líquido HPLC-IR	42
4.3.7	Cromatógrafo líquido HPLC-UV	43
4.3.8	Otros	43
4.4	Procedimientos de extracción	43
4.4.1	Método basado en la homogeneización en seco (Método 1)	44
4.4.2	Método basado en la extracción en húmedo (Método 2)	45
4.5	Fraccionamiento de los extractos. Recuperación de triterpenos pentacíclicos.	46
4.6	Fraccionamiento de los extractos. Recuperación de azúcares y compuestos fenólicos.	47
4.7	Análisis de las distintas fracciones por HPLC	48
4.7.1	Determinación de triterpénicos pentacíclicos por HPLC_UV	48
4.7.2	Determinación de azúcares y polioles mediante HPLC-IR	48
4.7.3	Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-PDA	48
4.8	Análisis estadístico	49
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1	Extracción e identificación de los compuestos bioactivos de la aceituna	50
5.2	Aplicación de los procedimientos a frutos de las variedades Picual y Arbequina	54
5.3	Eficiencia en la recuperación de los compuestos bioactivos por ambos métodos	59
6	CONCLUSIONES	62
7	BIBLIOGRAFÍA	63
8	ANEXO	73
8.1	Análisis de los compuestos triperpénicos por Cromatografía Gaseosa	73

1 RESUMEN

Durante muchos siglos, los extractos de hoja y el fruto del olivo han sido asociados con la salud y la conservación. En los últimos años, existe un interés creciente en la obtención de compuestos biológicamente activos de origen natural, entre los que se incluyen aquellos que poseen actividad antioxidante.

Es conocida la asociación entre dietas ricas en antioxidantes y la reducción del riesgo de padecer enfermedades en cuyo desarrollo interviene el estrés oxidativo, como las patologías cardiovasculares y neurodegenerativas, la diabetes y algunos tipos de cáncer.

En este Trabajo de Fin de Máster se describen dos procedimientos, reproducibles, rápidos y precisos para la extracción y el análisis de los compuestos bioactivos más importantes de la aceituna: oleuropeína y sus metabolitos, manitol, y los ácidos maslínico y oleanólico.

Para la extracción se ha utilizado etanol de melaza del 96%. Se ha optado por este disolvente no tóxico, amigable con el medioambiente, a la vez que relativamente barato, por ser un buen agente extractante para todos los compuestos diana, y ser selectivo, además, para el manitol frente a otros azúcares presentes en la aceituna. El análisis de los componentes bioactivos presentes en el extracto alcohólico de aceituna, se ha llevado a cabo mediante cromatografía HPLC.

Ambos procedimientos han sido aplicados en la extracción y análisis de los compuestos bioactivos mayoritarios de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.

Estos protocolos se caracterizan por unos porcentajes de recuperación de los compuestos diana muy elevados, superiores al 95%. Adicionalmente, las técnicas cromatográficas HPLC utilizadas en el análisis de los diferentes grupos de compuestos han demostrado su adecuación y sencillez.

Consideramos por todo ello que este protocolo de extracción y análisis es una herramienta útil para el control de los niveles de estos componentes naturales a lo largo de la ontogenia del fruto, así como en aquellos procesos que soporta la aceituna con vistas a su consumo de mesa o la elaboración de aceite de oliva virgen.

Es un procedimiento pertinente, además, por el protagonismo adquirido por la aceituna como alimento funcional, consecuencia de la presencia en su composición de estas moléculas bioactivas con probados efectos saludables frente al estrés oxidativo y la inflamación.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 El olivo

2.1.1 Origen y expansión del cultivo del olivo

El olivo tal como lo conocemos (*Olea europaea* L.) pertenece al género *Olea*, de la familia *Oleaceae*. Se asume que es un árbol originario de la región sirio-palestina, aunque también se ha sugerido que procede del cruce de especies próximas: *Olea africana*, originaria de Arabia y Egipto; *Olea ferruginosa*, procedente del área asiática, y *Olea laperrini*, de las montañas del sur de Marruecos. Otros autores consideran que procede del acebuche (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*), conocido desde el Neolítico (Fogher et al., 2010).

Es un árbol de copa ancha y hoja perenne, que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años, y cuya existencia se remonta a los albores de la historia. Se han encontrado fósiles de hojas de olivo en depósitos del Plioceno de Mongardino (Italia); en estratos rocosos del período Paleolítico Superior en el Norte de África y en excavaciones de la Era de Bronce en España.

Generalmente, se considera que la región que se extiende desde el sur del Cáucaso hasta Irán y las costas mediterráneas de Siria y Palestina es el lugar de origen del cultivo de olivo, alrededor de 6000 años atrás. Otras evidencias arqueológicas indican que los habitantes de Creta cultivaban olivos durante la Civilización Minoica, en el 3000 a.C. (Ghanbari et al., 2012).

En el siglo 16 a.C., los fenicios comenzaron a diseminar el cultivo del olivo en las islas griegas, para luego introducirlo en la Grecia continental, entre los siglos 14 y 12 a.C., donde su cultivo creció y ganó importancia. A partir del siglo 6 a.C., el olivo se extendió por la cuenca mediterránea llegando a Libia, Túnez

y la isla de Sicilia. Luego, ingresó en el sur de Italia, progresando de sur a norte, desde Calabria a Liguria (Chazau-Gillings, 1994).

Los romanos continuaron la expansión del olivo hacia los países que bordeaban el Mediterráneo, usándolo como estrategia pacífica para la consolidación de la población en los territorios conquistados. Fue introducido en la costa mediterránea francesa alrededor del 600 a.C. y, desde allí, diseminado hacia todo el territorio galo.

El cultivo del olivo en España fue introducido como consecuencia del comercio marítimo de los fenicios (1050 a.C.) (Chazau-Gillings, 1994), pero no se desarrolló en extensiones notorias hasta la dominación romana, con la llegada de Publius Cornelius Scipio (212 a.C.). Ya en tiempos de la Tercera Guerra Púnica (149-146 a.C.), los olivos ocupaban una gran franja del valle de Baetica y se extendían hacia el centro y la costa mediterránea de la Península Ibérica, incluyendo Portugal.

A partir del siglo VIII, los árabes introdujeron sus propias variedades de olivo en el sur de España, e influenciaron tanto la ampliación del cultivo que los vocablos españoles almazara, aceituna y aceite, tienen raíces árabes.

Con el descubrimiento de América (Siglo XV), el cultivo del olivo se extendió más allá de los confines del Mediterráneo. Los primeros olivos fueron llevados desde Sevilla a las Indias Occidentales, y luego al continente americano. Hacia 1560 se cultivaban olivos en México, y luego en Perú, California, Chile y Argentina. En la actualidad continua su expansión, y hoy día se cultiva en lugares tan alejados de su origen como Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia, Japón y China (Wang et al., 2010).

2.1.2 Distribución geográfica actual y producciones del olivo

El olivo es un árbol robusto, capaz de resistir en invierno temperaturas de 6-7 grados bajo cero, y de soportar largas sequías en verano. Es cultivado en

áreas con pluviosidad media de 350-400 mm anuales y temperaturas veraniegas de hasta 40 grados en regiones climáticas del tipo mediterráneo. El olivo llega a desarrollarse y a conseguir una completa maduración de sus frutos hasta los 600-700 metros sobre el nivel del mar, aunque en algunas regiones de España y Marruecos también se cultiva más allá de los 1.000 metros de altura (Gómez del Campo y Barranco, 2009). El área más característica de crecimiento es la ribera del Mediterráneo, comprendida entre los paralelos 35° y 45° de latitud Norte, aunque también encontramos olivares en regiones lejanas como los Estados Unidos, o en países del hemisferio austral como Argentina, Nueva Zelanda o Australia.

A día de hoy, se cultivan en el mundo más de 750 millones de olivos, y aproximadamente el 90 % de estos árboles se localizan en países de la cuenca mediterránea. Según una estimación de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en 2014, existían 10.305.183 hectáreas (ha) plantadas con olivos, siendo España, con una superficie total cultivada de 2.515.800 ha, el mayor productor, seguido de Italia (1.156.784 ha) y Grecia (945.520 ha). Sobre la base de los datos de la FAO, diez de los principales países olivareros están ubicados en la región mediterránea, los cuales producen el 95% de las aceitunas del mundo, como se muestra en la Tabla 1 (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>). Más del 75% de la producción mundial de aceituna se produce en Europa, que cultiva 500 millones de olivos, seguido por Asia (13%), África (8%) y América (3%).

A nivel nacional, el olivar ocupa el 5% de la superficie total de España, lo que supone el 14% de la superficie cultivable del país y el 51 % de toda la tierra dedicada a los cultivos leñosos. La implantación del olivo en nuestro país está condicionada por las exigencias climáticas de la planta. El cultivo del olivar se concentra principalmente en el sur y este de la península, mientras que es escasa su presencia en la Meseta Norte, la Cornisa Cantábrica y Galicia. Porcentualmente, Andalucía agrupa la mayor superficie de olivar (62%) seguida por Castilla-La Mancha (14%), Extremadura (11%) y Cataluña (5%) (Gómez del Campo y Barranco, 2009). El olivar es un cultivo que tiene un marcado carácter

social y se estima que genera en España unos 55 millones de jornales cada campaña.

El aceite de oliva representa alrededor del 3% del mercado mundial de aceites comestibles. Su consumo ha ido aumentando de manera constante en las últimas décadas. La Unión Europea continúa siendo el mayor consumidor mundial de aceite de oliva, seguida de Estados Unidos. Otros importantes consumidores en la cuenca mediterránea son Siria, Turquía, Túnez y Marruecos, y también se han producido incrementos apreciables del consumo en Australia, Japón, Canadá y Brasil.

Tabla 1. Principales países productores de oliva en 2014
(<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>).

País	Producción (toneladas)	Área cultivada (hectáreas)
Mundo	15.516.981	10.305.183
España	4.577.800	2.515.800
Italia	1.963.676	1.156.784
Grecia	2.283.820	945.520
Turquía	1.768.000	938.080
Marruecos	1.191.520	886.440
Egipto	558.610	64.020
Argelia	482.860	383.443
Portugal	455.373	352.351
Siria	392.214	697.028
Túnez	376.000	1.588.620
Argentina	175.880	63.570
Jordania	155.764	62.656

Según la FAO, la producción mundial de aceite de oliva, en la campaña 2013-2014, alcanzó las 3.270.500 toneladas, y se espera que aumente de forma gradual en los próximos años, debido a la consolidación del olivar en países que intensificaron su plantación en la década de 2000, sobre todo Argentina, Perú, Australia y China. España es el primer productor mundial de aceite de oliva, con 1.775.800 toneladas en la campaña 2013-2014, lo que supone un 54,3% de la cosecha mundial. El valor de esta producción se estima en 1.886 millones de € como promedio de 2007 a 2012. Esa cifra representa el 4,6% del valor de la producción agraria nacional y el 7,6% de la producción vegetal. El cultivo del olivar se caracteriza por su marcado carácter vecero que supone la alternancia de producciones altas y bajas, en unas y otras cosechas. En la campaña 2012/13 se puso en evidencia este comportamiento del olivar, con una producción de 618.107 t, muy inferior a las anteriores.

España es también el primer exportador mundial de aceite de oliva. Las exportaciones representan el 60% del comercio total del aceite de oliva en España, con más de 100 países de destino, y con una media en las campañas 2007/08 – 2012/13 de 745.700 t.

Las variedades mayoritariamente cultivadas en Andalucía son Picual, Hojiblanca y Lechín, que producen el 85% del aceite de oliva español (Talhaoui et al., 2015). Es importante destacar la producción de Jaén (485.000 t) donde prevalece la variedad Picual en toda la provincia. Tras Andalucía, Castilla La Mancha aparece como segunda comunidad autónoma española en producción de aceite de oliva, representando alrededor del 6% y sobresaliendo la Cornicabra como primera variedad productiva. En un tercer puesto se sitúa Extremadura con las variedades Cacereña y Verdial como mayoritarias, seguida de Cataluña con la variedad Arbequina. El resto de Comunidades Autónomas con superficies destinadas al olivar, en su conjunto no representan más del 5% del total nacional, no obstante, es importante tenerlas en cuenta ya que su producción puede resultar muy interesante por la calidad de sus aceites monovarietales.

En cuanto a la aceituna de mesa, España también es líder mundial en su producción y exportación. Según los datos de la Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA), en la campaña 2014-2015 la producción nacional de aceituna de mesa fue de 546.761 toneladas. Alcanzando las producciones situadas en Andalucía un total de 451.114 toneladas, lo que supone el 82% de la producción nacional. En este sentido, Sevilla con 335.502 toneladas, seguida de Córdoba y Málaga con 55.529 y 53.919 toneladas, respectivamente, son las provincias con mayor producción. Por su parte, las plantaciones ubicadas en Extremadura generaron 89.498 toneladas de aceitunas de mesa, lo que supone el 17% de la producción nacional, correspondiendo a la provincia de Badajoz 41.327 t y a la de Cáceres 48.171 t.

La producción española de aceituna de mesa representa aproximadamente el 71% de la producción de la UE y el 22% de la mundial. La producción media de las últimas campañas (2008/09-2014/15) ha superado las 518.200 t, de las cuales, el 70% aproximadamente se destina para su consumo como aceituna verde y el resto para aceituna negra. España es el primer exportador mundial de aceituna de mesa, destinándose a ese fin, como media en los últimos 6 años, el 68% de la producción española. La aceituna española está presente en más de 100 países en los cinco continentes.

En España, la Manzanilla de Sevilla es la variedad claramente predominante, con una producción que responde del 70% del total, seguida a gran distancia de los cultivares Hojiblanca (10%), Manzanilla Cacereña (8%), Gordal (4%) y Aloreña (4%).

2.1.3 Botánica del olivo

El olivo pertenece a la familia *Oleaceae* y al orden de los *Ligustales*. La familia de las *Oleáceas* incluye alrededor de 30 géneros y 600 especies. El género *Olea* L. consta de unas 185 especies, aunque sólo 35 están aceptadas al tratarse el resto de meros sinónimos, que se distribuyen en Europa, Asia, Oceanía y África, siendo *Olea europaea* L. la única especie cultivada. Destaca

la existencia de seis subespecies naturales ampliamente distribuidas: *Olea europaea ssp. europaea*, en la cuenca mediterránea; *Olea europaea ssp. laperrini*, presente en los macizos del Sahara; *Olea europaea ssp. cuspidata*, presente desde Sudáfrica hasta el sur de Egipto, y desde Arabia hasta el norte de India y suroeste de China; *Olea europaea ssp. guanchica*, presente en las Islas Canarias; *Olea europaea ssp. maroccana*, presente en el suroeste de Marruecos; *Olea europaea ssp. cerasiformis*, presente en Madeira (Fogher et al., 2010).

El olivo es un árbol muy longevo que puede ser productivo durante cientos de años. Su tamaño es mediano y, aunque varía dependiendo de la variedad y de las condiciones de cultivo, su altura suele oscilar entre los cuatro y los ocho metros. Su porte natural es abierto, y se caracteriza por una ramificación inicial ortogeótopa, si bien hay variedades que presentan un porte erguido o llorón. La forma de la copa es redondeada (hemisférica) y la tendencia natural de la especie es a producir una copa densa, aunque las prácticas habituales de poda permiten aclararla para favorecer la penetración de la luz.

El olivo es perennifolio, de hojas simples con forma entre elíptica y lanceolada, que presentan los bordes enteros, y viven una media de tres años. El limbo tiene una longitud de 3-9 cm y la anchura oscila de 1-1'8 cm. El nervio central es muy marcado frente a los secundarios y el peciolo tiene una longitud que no supera los 0'5 cm. El haz de la hoja del olivo es generalmente de color verde-oscuro brillante, debido a la existencia de una cutícula gruesa. El envés está cubierto por abundantes pelos aparasolados que le confieren un color gris-plateado.

El tronco es de color gris-verde durante sus primeros diez años; después se vuelve nudoso, con surcos profundos y retorcidos, y toma un color oscuro, casi negro.

La morfología de la raíz depende de cómo se haya originado el árbol y también del suelo. Si el árbol procede de semilla, durante los primeros años se forma una raíz principal (pivotante) que domina el sistema radical, dado que no se

forman raíces laterales importantes. En cambio, si el árbol se ha producido por propagación vegetativa mediante enraizamiento de estaquillas semi-leñosas (método habitual en árboles comerciales), se forman múltiples raíces adventicias que se comportan en su mayoría como raíces principales. Las raíces más jóvenes, de color blanco, están recubiertas por un elevado número de pelos y son las más activas en la absorción del agua y nutrientes. Las raíces maduras son de color marrón debido a la suberización de las mismas. El sistema radicular se extiende horizontalmente hasta 2-3 veces la altura de la planta y en los suelos más fértiles pueden alcanzar una profundidad de 1'5 o 2 metros.

La inflorescencia del olivo es una panícula, posee un eje central del cual salen ramificaciones que a su vez también pueden ramificarse. En las ramificaciones de la inflorescencia, las flores pueden estar aisladas o formar grupos de tres a cinco elementos. El número de flores por inflorescencia oscila entre 10 y 40, dependiendo de la variedad, de las condiciones ambientales y fisiológicas del árbol.

La flor del olivo es hermafrodita y de tamaño pequeño. El cáliz es de color blanco verdoso y está constituido por cuatro sépalos. La corola está formada por cuatro pétalos dispuestos en cruz, de color blanco o blanco-amarillento. Posee dos estambres que se insertan en la corola. Éstos se componen de un filamento corto y una gran antera donde se forman los granos de polen de color amarillo intenso. El pistilo consta de un ovario súpero, estilo pequeño y un estigma muy desarrollado bilobulado y papiloso.

2.1.4 Variedades de olivo

El cultivo del olivo ha avanzado en los últimos siglos consiguiendo mejorar las características del fruto y ofreciendo una importante diversidad de cultivares. Existen numerosas variedades locales, muy antiguas, que han sido trasladadas a ámbitos geográficos diferentes.

En general, resulta ampliamente aceptado clasificar las variedades de olivo en función del destino de sus frutos: variedades de aceituna de mesa y variedades de almazara o para aceite.

Entre las principales **variedades de aceituna de mesa** destacan:

Manzanilla de Sevilla: Es la variedad de olivo de mesa más difundida internacionalmente debido a su productividad y calidad del fruto. Presenta una elevada relación pulpa/hueso y sin adherencia. Su cultivo en España se concentra en las provincias de Sevilla (50.000 ha), Badajoz (30.000 ha) y Huelva (4.000 ha). Fuera de España también se cultiva en Portugal, Estados Unidos, Israel, Argentina y Australia. En España se la encuentra con la denominación de “Manzanilla” en la provincia de Sevilla y con la de “Carrasqueña”, en la de Badajoz.

Gordal Sevillana: Conocida internacionalmente con la denominación de “Sevillano”, es un cultivar apreciado fundamentalmente por el gran tamaño de sus frutos que alcanzan un peso medio de 12’5 gramos, entre 100/120 frutos por kilo. Se extiende su cultivo por la Andalucía baja. Su aspecto es acorazonado, de color verde con pintas blancas. Su contenido en aceite es bajo, por lo que su consumo es de aderezo, siendo muy consumida a nivel mundial.

Hojiblanca: Su cultivo cubre gran parte de las provincias de Córdoba, Málaga, Sevilla y Granada. Se trata de una variedad de maduración tardía, muy apreciada para su elaboración como aceitunas negras aderezadas y en salmuera. También conocida como “Lucentino”, es apreciada por su resistencia a suelos calizos. Tiene doble aptitud y se considera muy adecuada para aderezo en negro tipo “Californiano” por la textura firme de su pulpa. Sus frutos presentan un contenido en aceite bajo, aunque apreciado por su calidad, y una elevada resistencia al desprendimiento que dificulta su recolección mecanizada.

Cacereña: Similar en cuanto a aspecto a la Manzanilla, aunque de color más claro. Como su nombre indica se extiende por toda la provincia de Cáceres y Salamanca. Su elaboración principal es de aceituna negra aderezada.

Verdial: Cultivada principalmente en Andalucía, su consumo se destina al tipo aderezo en verde.

Otras: Cañivana, Picolimón, Gordalilla, Aloreña, Rapazalla, Picuda, Cordobí y Cuquillo.

Las **variedades de aceituna de almazara** más empleadas son:

Picual: Extraordinaria por su rendimiento graso, su rápida entrada en producción y su fácil mecanización durante la recolección. Rinde un aceite muy estable. Este árbol es muy susceptible a *Verticillium*.

Arbequina: Muy buen rendimiento graso y muy buena calidad de aceite. Presenta el inconveniente de frutos muy pequeños y ramos que transmiten muy mal la vibración durante la recolección. Tiene un porte arbustivo que permite mayores densidades de plantación.

Hojiblanca: Como ya hemos mencionado es una variedad de doble aptitud, aunque mediocre en los dos casos. Como variedad de mesa se conoce con el nombre de perlas del Guadalquivir. Este cultivar exhibe alta tolerancia a suelos calizos y rinde frutos de tamaño aceptable.

Picudo: Variedad que vegeta muy bien y produce un aceite de excelente calidad, pero es muy sensible al "Repilo", enfermedad causada por el hongo *Cycloconium oleaginum*. Presenta un fruto grande que termina en un pezón que le hace merecedor de su nombre, y que se dispone de forma asimétrica. También se caracteriza por la aparición de hojas bífidas u hojas dobles, aunque de forma general son ovaladas y de gran tamaño.

Cornicabra o cornezuelo: De fruto muy alargado y asimétrico, ofrece un elevado rendimiento graso, con muy buena calidad de aceite, pero tiene muy mal comportamiento frente a las principales plagas y enfermedades.

2.2 La aceituna

2.2.1 Biología y fases del desarrollo

Botánicamente, la aceituna es una drupa oleaginosa bicarpelar, con una sola semilla generalmente. Tiene forma elipsoidal o globosa, que dependiendo de la variedad, tiene un tamaño medio de 1 a 4 centímetros de longitud y de 0.6 a 2 centímetros de diámetro. En los árboles silvestres, el peso de los frutos oscila entre dos y cuatro gramos, si bien puede llegar a más de 10 gramos en algunas variedades cultivadas.

La aceituna presenta tres tejidos perfectamente diferenciados. El exocarpio o epicarpio es la fina piel de la aceituna, y está compuesto por la epidermis y una cutícula cérea, brillante y de tacto suave. Es de color verde durante el crecimiento y desarrollo del fruto, pasando a color morado-rojizo o negro en su plena madurez (Montaño et al., 2010). Finamente soldado a la piel está el mesocarpio, que constituye la pulpa o tejido carnoso de la aceituna (parte comestible). Representa aproximadamente las dos terceras partes del fruto. El contenido de aceite en el mesocarpio del fruto es de aproximadamente el 75% del peso fresco, lo que representa más del 95% de la cantidad total. El endocarpio o hueso de la aceituna encierra en su interior la almendra o semilla, que ocupa casi en su totalidad todo el endocarpio, conteniendo el embrión.

Durante el crecimiento del fruto aparecen tres fases distintas: dos fases de crecimiento rápido y una intermedia de crecimiento lento. En la primera etapa se produce una multiplicación celular intensa, que determina el tamaño final del fruto, y se ve influenciada por la genética y edad del árbol, pero también por las condiciones climáticas y de cultivo. Por ejemplo, si hay más humedad en el

suelo, se multiplicarán más células en el fruto dando una aceituna de mayor tamaño, y acumulando azúcares y otras sustancias de reserva.

El endurecimiento del hueso marca el final de esta primera etapa, pasando a una segunda fase en la que el crecimiento celular se ralentiza. Es el periodo en el que se completa el endurecimiento del endocarpo, coincidiendo con el máximo crecimiento del embrión y la semilla. Además, en esta fase se inicia la acumulación de ácidos grasos.

En la última etapa, de crecimiento rápido, se produce un incremento notable del tamaño del fruto como consecuencia de la acumulación de aceite en las vacuolas de las células mesocárpicas. El fruto en un principio acumula reservas en forma de azúcares y posteriormente las transforma en ácidos grasos, que constituyen los triglicéridos del aceite. Esta fase termina cuando se inicia el cambio de color de la epidermis de la aceituna, momento que señala la viabilidad germinativa de la semilla. Durante la maduración propiamente dicha, decrece el potencial de germinación con respecto al estadio anterior, en este momento el color verde intenso de los frutos es sustituido por una gama cromática que va del rojo al negro brillante (envero). Esta transformación refleja la destrucción de clorofilas y carotenoides, y la síntesis *de novo* de otros compuestos coloreados como las antocianinas, responsables de las tonalidades rojas-violáceas. El envero marca la maduración total del fruto y coincide con la máxima concentración de aceite en su interior. Es tal la diversidad de manifestaciones de color que llegan a dar nombre a algunas variedades, como la Royal (tonos rojos) o el caso más particular de la Verdial, que al tardar tanto en madurar se recoge incluso verde, de ahí su nombre.

Otra de las características más típicamente asociadas a la maduración es el reblandecimiento del fruto, debido a la modificación y/o degradación de los componentes de la pared celular. Los cambios en los polisacáridos de la pared celular (Mafra et al., 2001) y los enzimas asociados (Fernández-Bolaños et al., 1995) desempeñan un papel protagonista en la textura de la aceituna a lo largo de la maduración. Durante este proceso, se produce un aumento en la solubilización de polisacáridos pécticos y hemicelulósicos, así como un

aumento en la cantidad de arabinosa en los mismos y una disminución en el grado de metil-esterificación (Briante et al., 2002).

2.2.2 Composición química de la aceituna

La composición química de las aceitunas depende de varios factores, entre otros de la variedad, las condiciones de cultivo y el estado de madurez en el momento de la cosecha.

Los principales constituyentes del fruto del olivo son agua (60-75%) y lípidos (10-25%), presentando una relación inversa entre el contenido de humedad y el contenido de lípidos (aceite), para el mismo grado de madurez. La mayoría de lípidos son triglicéridos, pero también aparecen diglicéridos y ácidos grasos libres. En este sentido, la composición en ácidos grasos del aceite de oliva contribuye significativamente al alto valor biológico y nutritivo de estos frutos.

Los azúcares reductores y no reductores representan un 3-6% del peso fresco de la pulpa. El principal azúcar en el fruto del olivo es la glucosa, seguido de fructosa, galactosa y manitol, y en un nivel inferior, sacarosa. La distribución de las hexosas varía en función del cultivo, y durante la maduración de la aceituna se produce una disminución progresiva en el contenido de estos compuestos.

La aceituna no resalta por su contenido proteico, que es relativamente bajo, generalmente entre 1-3% del peso fresco de pulpa. Este nivel se mantiene prácticamente constante a lo largo del crecimiento y la maduración del fruto. Parece que el contenido de proteínas es similar entre cultivos y que su composición de aminoácidos no difiere de manera significativa, a pesar de las diferencias ecológicas y fisiológicas.

El contenido de fibra cruda varía entre 1-4% de pulpa, siendo celulosa, lignina y hemicelulosa los componentes principales. Los polisacáridos y sustancias pectínicas, los principales constituyentes de las laminillas intercelulares, tienen función de cementación y juegan un papel importante en la textura de las

aceitunas. Los niveles de estos compuestos varían entre 0'3-0'6% (Montaño et al., 2010).

El contenido en cenizas varía de 0'6 a 1%, donde los elementos principales son, en orden decreciente de importancia, K, Ca, P, Na, Mg y S.

Los ácidos orgánicos (0'5-1% peso fresco de pulpa), son productos intermedios resultantes de la formación y degradación de otros compuestos (Cunha et al., 2001). El ácido cítrico y málico son los dos ácidos orgánicos más notables en aceitunas.

2.3 Compuestos bioactivos de la aceituna

En la aceituna existen diversos compuestos bioactivos de alto interés, muchos de los cuales son conocidos por las cualidades beneficiosas que aportan al aceite de oliva virgen. Entre ellos destacan los derivados fenólicos (Brianchi et al., 1993; Brenes et al., 2002), el escualeno, los tocoferoles, los ácidos y alcoholes triterpénicos hidroxipentacíclicos, y glúcidos como el manitol (Ghanbari et al., 2012).

2.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las clases más destacadas de metabolitos secundarios de las plantas. Su rol fisiológico está relacionado con la respuesta defensiva vegetal ante agresiones de depredadores y microorganismos, así como con la protección ante el daño oxidativo, por ejemplo, de la irradiación UV. La biosíntesis de estos compuestos está regulada genéticamente, pero también por factores ambientales (Martínez-Valverde et al., 2000).

2.3.1.1 Naturaleza química

La fracción fenólica tiene una notable importancia en la composición de las aceitunas, ya que representan entre el 1-5% del peso seco de este fruto. La naturaleza de los derivados fenólicos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glucósidos, conjugados con uno o más residuos de azúcar, generalmente unidos a los grupos hidroxilos fenólicos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones entre la molécula de azúcar y un carbono aromático. Los azúcares asociados a los compuestos fenólicos pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos (Martínez-Valverde et al., 2000).

Químicamente, los fenoles se caracterizan por contener en sus estructuras moleculares al menos un grupo fenol, un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. La biosíntesis de estos compuestos se inicia con la ruta del ácido shikímico, que produce fenilalanina, la cual se utiliza en la ruta de los fenilpropanoides para dar lugar a una gran cantidad de derivados fenólicos como cumarinas, flavonoides, lignanos, ácidos benzoicos y derivados hidroxicinámicos. Sin embargo, es necesaria la acción de otra ruta, la del ácido mevalónico, para que partiendo del ácido deoxilogánico e incorporando los derivados hidroxicinámicos, se formen los compuestos secoiridoides.

En la aceituna, los principales compuestos fenólicos presentes son ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides. Los ácidos fenólicos se pueden subdividir en dos grupos: ácidos benzoicos, que presentan un esqueleto básico C6-C1, como los ácidos benzoico, *p*-hidroxibenzoico, protocatético, vanílico, sirínico y gálico; y ácidos cinámicos, con una estructura básica de C6-C3, como los ácidos cinámico, cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-cumárico y *o*-cumárico (Figura 1).

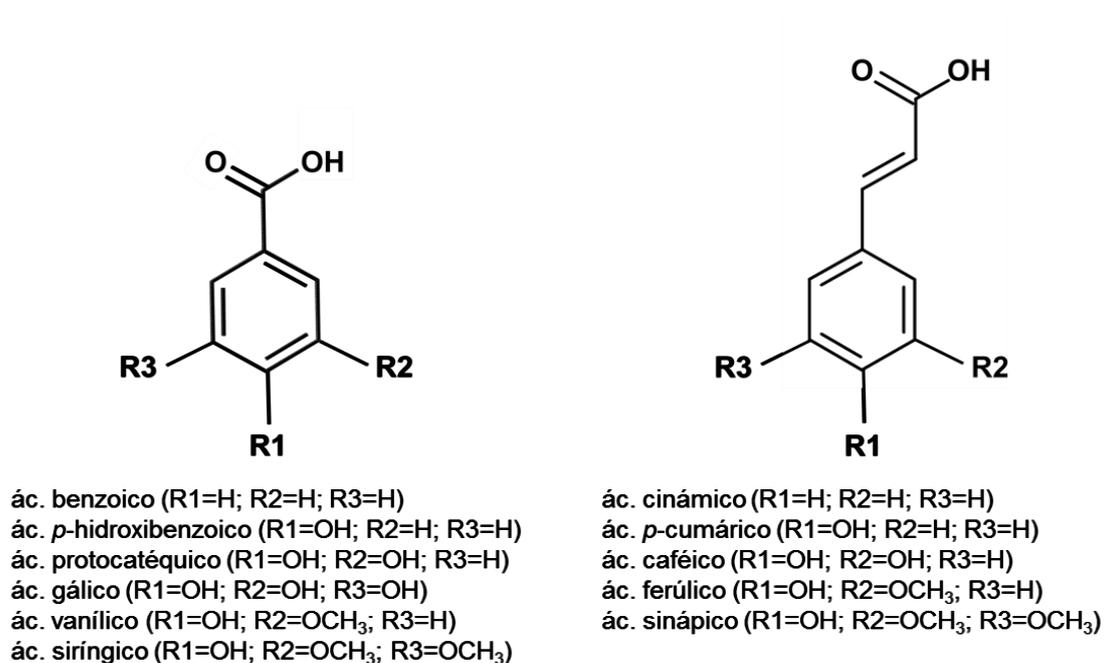
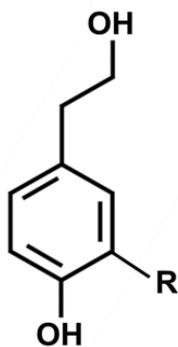


Figura 1. Principales ácidos fenólicos de la aceituna

El 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y el *p*-hidroxifeniletanol (tirosol) son los alcoholes fenólicos más abundantes en las aceitunas (Ghanbari et al., 2012) (Figura 2).



tirosol (R=H)
 hidroxitirosol (R=OH)

Figura 2. Tirosol e hidroxitirosol, los dos alcoholes fenólicos presentes en la aceituna

Los flavonoides constituyen otra de las familias importantes de derivados fenólicos. Su estructura básica está constituida por 2 anillos bencénicos conectados mediante un anillo heterocíclico, piran o pirona. Se clasifican en flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianidinas, flavanonas e isoflavonas. Los flavonoides glicosilados más importantes de la aceituna son luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, quercetina-3-ramnósido y quercetina-3-rutinósido (Ghanbari et al., 2012). También han sido identificados en este fruto dos lignanos, el pinoresinol y el acetoxipinoresinol (Brenes et al., 2002) (Figura 3).

Mientras que los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y flavonoides se encuentran bien distribuidos en el reino vegetal, los secoiridoides están presentes exclusivamente en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae* que incluye *Olea europaea* L. (Angerosa et al., 2004).

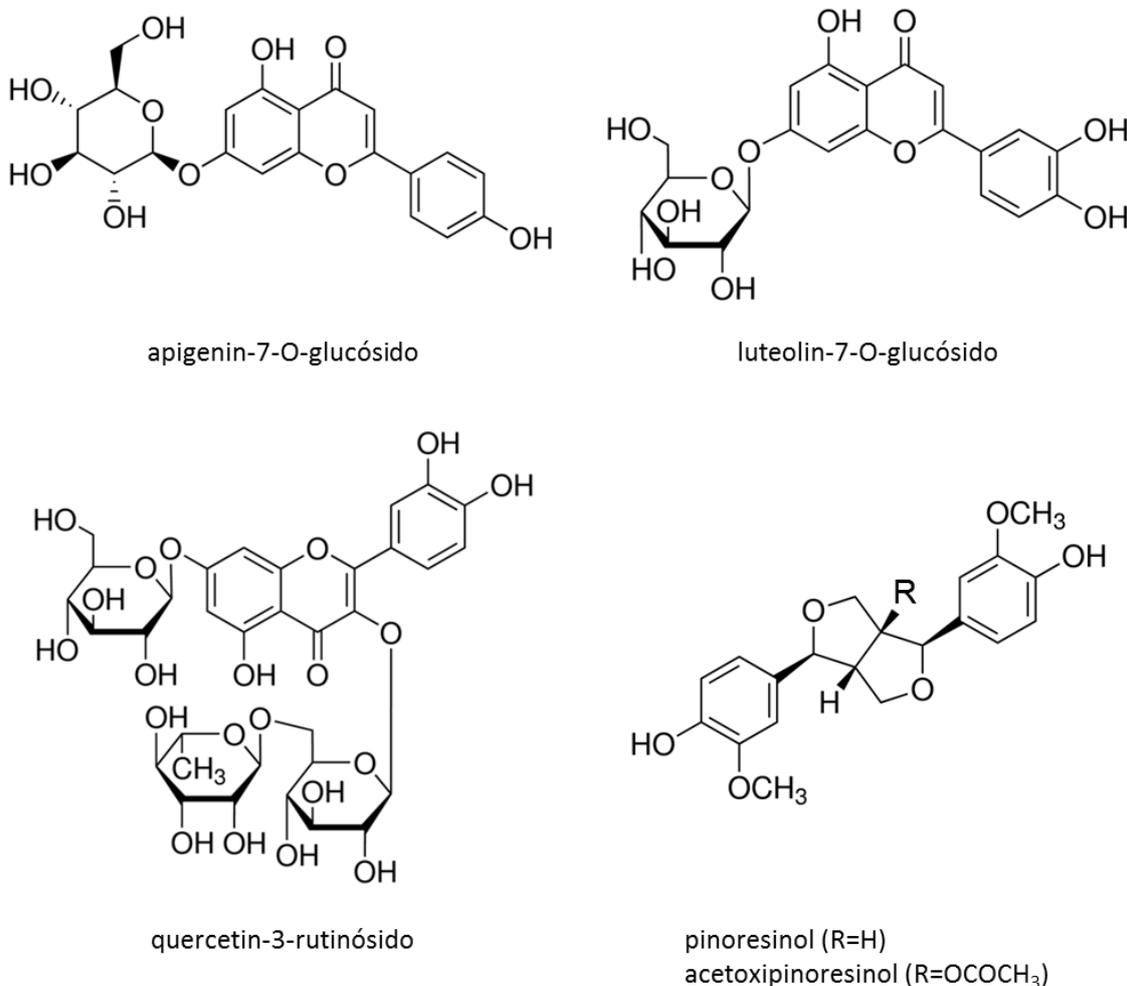


Figura 3. Flavonoides y lignanos de la aceituna

Los secoiridoides mayoritarios del olivo son oleuropeína, dimetiloleuropeína y ligustrósido. La oleuropeína y el ligustrósido son formas glucosiladas de ésteres del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol, respectivamente (Soler-Rivas et al., 2000), mientras que la demetiloleuropeína corresponde a la forma ácida de la oleuropeína. Otro compuesto presente en la aceituna, de estructura química análoga, es el verbascósido, en el que residuos de hidroxitirosol y ácido caféico se encuentran unidos a través de un residuo de neohesperidosa (Figura 4). La mayoría de compuestos fenólicos contenidos en el fruto del olivo se encuentran en la pulpa. No obstante, algunos derivados fenólicos de tipo secoiridoide, como nuzhenida, la nuzhenida-oleósido o salidrósido han sido identificados en su endocarpio (Ghanbari et al., 2012).

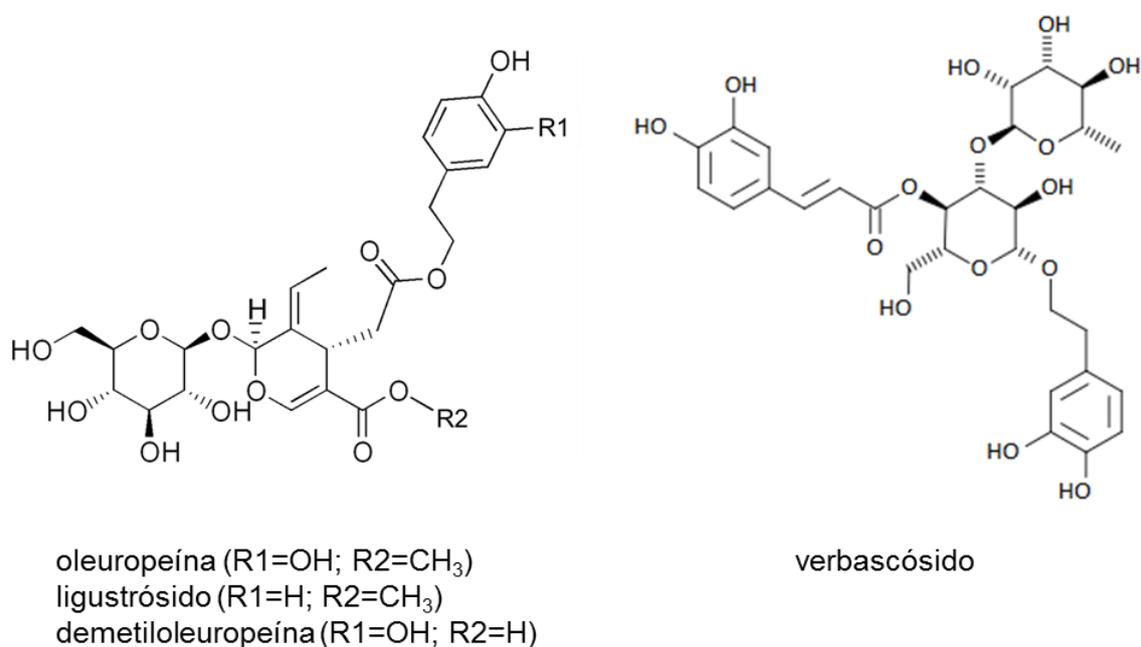


Figura 4. Principales secoiridoides de la aceituna

2.3.1.2 Diferencias entre variedades y evolución del contenido de compuestos fenólicos a lo largo del desarrollo del fruto

La composición fenólica de la aceituna se ve afectada cualitativa y cuantitativamente por la variedad de olivo. Los estudios que describen los perfiles fenólicos de diferentes cultivares (Briante et al., 2002; Vinha et al., 2005) muestran que la oleuropeína es generalmente el compuesto más

abundante, con concentraciones entre 35 y 2400 mg/kg fruto. Por otro lado, algunos fenoles pueden ser propuestos como identificadores varietales, porque no son comunes a todos los cultivares. Este es el caso de la demetiloleuropeína, que fue cuantificada en sólo dos (Coratina y Leccino) de ocho variedades italianas analizadas por Esti et al. (1998), en dos de once variedades francesas estudiadas por Amiot et al. (1989) y en una (Arbequina) de seis variedades españolas estudiadas por Gómez-Rico et al. (2008).

Durante las primeras etapas del desarrollo del fruto, se produce un incremento importante en el contenido de oleuropeína, llegando a alcanzar valores de hasta el 15% de peso seco a mediados de agosto. Al progresar la maduración, los niveles de oleuropeína y ligustrósido descienden rápidamente (Amiot et al., 1989), tendiendo a cero cuando el fruto es completamente negro (Bianco et al., 1993). Otros estudios, sin embargo, han descrito un repunte del contenido de oleuropeína en algunas variedades como Picholine, Zrappola, Tanche, Salonenque (Amiot et al., 1989), Manzanillo (Ryan et al., 1999), Arbequina y Morrut (Morelló et al., 2004), antes de la caída definitiva que se produce al final de la maduración.

En cuanto al verbascósido, este compuesto no es detectado en el fruto inmaduro. Se ha indicado que alcanza su máximo nivel después que la oleuropeína, para descender más tarde conforme avanza la maduración. Se ha sugerido una relación metabólica entre oleuropeína y verbascósido durante la maduración, en base a una degradación parcial del primer compuesto que podría ser responsable de la formación del segundo. Por su parte, Amiot et al. (1989) han reportado un incremento de demetiloleuropeína y oleósido durante la maduración del fruto.

Ortega-García y Peragón (2009) han sugerido una relación entre las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO) y la concentración de fenoles a lo largo de la maduración de la aceituna, ya que el nivel de actividad PAL (enzima que regula la biosíntesis de fenilpropanoides) disminuyó en paralelo con la disminución del contenido de compuestos fenólicos, mientras

que la actividad de PPO (enzima que participa en la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos) aumentó durante la maduración.

Gómez-Rico et al. (2008) compararon los compuestos fenólicos de los frutos de las variedades Arbequina, Cornicabra, Morisca, Picolimón, Picudo y Picual a tres índices de maduración diferentes (verde, envero y negra), observando que la concentración de hidroxitirosol aumentó a medida que avanzaba la maduración en cuatro de las seis variedades analizadas. Este incremento podría ser resultado de la degradación enzimática de la oleuropeína por β -glucosidasa (Limiroli et al, 1995).

La disminución de oleuropeína, ligustrósido y verbascósido coincide con un incremento en el contenido de antocianos. En los estudios de Gómez-Rico et al. (2008) y Vinha et al. (2005), con frutos de variedades españolas y portuguesas, respectivamente, se identificaron cianidina-3-O-rutinósido y cianidina-3-O-glucósido cuando los frutos mostraban un color negro. El estudio de Limiroli y colaboradores (1995) también mostró que dos flavonoides, rutina y luteolina-7-glucósido, incrementaban su concentración durante la maduración. Este hecho ya había sido observado anteriormente en las variedades Coratina y Leccino por Esti et al. (1998).

Así pues, puede establecerse que el desarrollo del fruto y las primeras fases de la maduración están dominados por secoiridoides, pero que al progresar la maduración, fenoles y flavonoides simples pasan a ser los componentes fenólicos mayoritarios (Fernández-Bolaños et al., 2006).

Por otro lado, el tamaño del fruto está relacionado con la concentración de fenoles, siendo las variedades con frutos pequeños las que presentan un alto contenido en oleuropeína y bajas cantidades de verbascósido, en comparación con las variedades de frutos grandes que presentan concentraciones inversas.

2.3.1.3 Influencia de factores ambientales

Existen diversos estudios que describen la influencia de factores ambientales en el contenido de fenoles de los frutos del olivo y de sus aceites. La influencia de la temperatura ha sido estudiada pero con resultados contradictorios. Un estudio de Ripa et al. (2008) afirma que una mayor cantidad de días con altas temperaturas desde la formación del fruto hasta su recolección origina un menor contenido de fenoles. Sin embargo, el trabajo de Tura et al. (2008) concluye que la cantidad de fenoles en el fruto se incrementa a medida que aumenta el número de días con altas temperaturas. Por otro lado, el estudio de Morelló et al. (2003) ha mostrado una disminución del contenido de compuestos fenólicos en aceites de oliva de la variedad *Arbequina*, después de una atípica helada en el mes de diciembre, en la que las aceitunas soportaron temperaturas inferiores a los -5°C durante 110 horas consecutivas. Estos autores postularon que la formación de cristales de hielo en el seno del mesocarpio de los frutos pudo causar la descompartimentación celular, permitiendo así la puesta en contacto de PPO con sustratos fenólicos.

Asimismo, estudios llevados a cabo en aceites de la variedad *Arbequina* han mostrado una relación entre el contenido fenólico y la pluviometría acumulada (Romero et al., 2003), determinándose que en años con baja pluviometría el contenido en fenoles fue mayor. Este efecto puede estar relacionado con un mayor nivel de actividad PAL, que es conocido se incrementa con el estrés hídrico (Gómez-Rico et al., 2007; Servili et al., 2007).

También se ha estudiado del efecto de la altitud sobre el contenido fenólico de las aceitunas. Cimato et al. (1991) observaron que los aceites de oliva de las variedades Frantoio, Leccino, Moraiolo y Coratina cultivadas en zonas costeras (altitud $< 100\text{m}$) contenían el doble de fenoles totales que las cultivadas a mayor altura. Mousa et al. (1996) también observaron una mayor cantidad de fenoles en aceites griegos de la variedad Mastoides procedentes de frutos cultivados a 100m que de aquellos cultivados a 800m . De igual manera, Criado et al. (2004) han determinado una mayor cantidad de compuestos fenólicos en frutos de la variedad *Arbequina* cultivados en la zona olivarera de Tarragona

(300-400 metros de altitud) que en los cultivados en Jaén (500-700 metros sobre el nivel del mar). Estos resultados son contradictorios con los reportados por Dabbou et al. (2010) e Issaoui et al. (2010) en las variedades Sigoise, Chemlali y Chétoui cultivadas en Túnez, quienes observaron que a mayor altura de la plantación, mayor cantidad de fenoles en el fruto.

El contenido en fenoles también está influenciado por el tipo de suelo de la plantación. El estudio realizado por Montedoro et al. (1993) exhibió una mayor concentración de fenoles en aceites de olivos de la variedad Moraiolo cultivados en suelos calcáreos que en los obtenidos de árboles cultivados en suelos arcillosos. Por su parte, Bucelli et al. (2011) determinaron un contenido de fenoles un 30% mayor en aceites de las variedades Moraiolo y Frantoio cultivados en suelos arcillosos que cultivados en suelos limosos. Así pues, parece establecerse una relación inversa entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad del terreno para retener agua.

Finalmente, hay que mencionar el trabajo de Benito et al. (2012), quienes han estudiado la composición fenólica de aceites procedentes de plantaciones de olivo de alta densidad, observando una acumulación de estos compuestos en frutos orientados hacia el norte, con respecto a los orientados hacia el sur, lo que también denotaría una relación inversa con el nivel de irradiación solar. Resultados similares fueron obtenidos por Palese et al. (2010).

2.3.2 Azúcares y Polioles

El manitol y la glucosa, productos fotosintéticos primarios, junto con fructosa y sacarosa, son los azúcares predominantes, y representan más del 90% de los carbohidratos solubles totales en la aceituna (Fernández-Bolaños et al., 2006). De este grupo, el compuesto cuya bioactividad es más interesante es el D-manitol.

El manitol (Figura 5) es un hexitol acíclico derivado de D-fructosa, y es el poliol más abundante en la naturaleza, aún más que su C2-epímero, el D-sorbitol. Es

componente natural de frutas y verduras y es sintetizado por ciertas bacterias, levaduras, hongos filamentosos y algas. En la industria alimentaria, su utilidad primaria es como edulcorante, referido como aditivo alimentario E421 en la Unión Europea. Otra propiedad interesante del manitol como aditivo alimentario es la menor tendencia a cristalizar, en comparación con otros azúcares, lo que contribuye a alargar la vida útil de los alimentos.

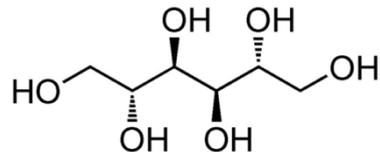


Figura 5. Estructura química del manitol

2.3.2.1 Naturaleza química de los polioles

Los polioles tienen la fórmula general $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CHOH})_n-\text{CH}_2\text{OH}$. La mayoría tiene cadenas de cinco o seis carbonos, ya que derivan de pentosas y hexosas, respectivamente. A diferencia de los azúcares, que aparecen como anillos, los polioles presentan estructuras acíclicas. No obstante, pueden deshidratarse para dar éteres cíclicos (Schiweck et al., 2012).

Los polioles más importantes de interés alimentario (sorbitol, xilitol y manitol), son sintetizados por la reducción del grupo aldehído o cetona de un monosacárido, o por la reducción del grupo carbonilo libre, si lo tiene, de un oligosacárido. Esta reducción se lleva a cabo a escala industrial, fundamentalmente, por hidrogenación de jarabes de fructosa, sacarosa o glucosa/fructosa, en presencia de níquel como catalizador, aunque también puede llevarse a cabo mediante métodos biotecnológicos que implican sistemas enzimáticos o fermentación microbiana.

En el caso de los obtenidos a partir de disacáridos, los polialcoholes también tienen el anillo cerrado de uno de los monosacáridos, pero con el grupo carbonilo en forma no reductora (Alper et al., 2002; Poitr et al., 2003).

2.3.2.2 Evolución a lo largo del desarrollo y diferencias entre variedades

En general, la concentración de azúcares reductores en la aceituna es relativamente baja, como en la mayoría de los frutos, y disminuye conforme avanzan las etapas del crecimiento y desarrollo. En las últimas fases de la maduración este descenso es menor y los valores permanecen prácticamente constantes hasta la senescencia. Estos compuestos juegan un papel protagonista en el aporte de energía metabólica, y actúan como precursores en la biosíntesis del aceite de oliva (Cataldi et al., 2000).

Se ha informado de una reducción de los contenidos de glucosa, galactosa y sacarosa, en paralelo con un incremento en el contenido de aceite de la aceituna. En cambio, los niveles de fructosa aumentan considerablemente durante la maduración. También se ha sugerido que la cantidad relativa de manitol en el fruto podría ser indicadora del potencial de un cultivar para la biosíntesis de aceite. Por lo tanto, el manitol en la aceituna, así como otros polioles en muchas otras plantas superiores, podría ser de importancia específica en la transformación metabólica y la síntesis de las sustancias de reserva del fruto (Marsilio et al., 2001).

2.3.3 Compuestos triterpénicos pentacíclicos

Los triterpenos pentacíclicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, que destacan por su gran variedad estructural. Los ácidos ursólico, oleanólico y betulínico, y los alcoholes α -amirina, β -amirina y lupeol, son los triterpenos pentacíclicos con mayor presencia en las plantas (Peng et al., 2014). La utilización de plantas conteniendo triterpenos ha sido práctica habitual desde tiempos inmemoriales en la medicina popular, especialmente la asiática. Se han descrito más de 200 especies vegetales portadoras de cantidades relevantes de compuestos triterpénicos (Bianchi et al., 1994), pero pocas de ellas representan un cultivo socio-económicamente tan significativo como el olivo.

Actualmente, los ácidos oleanólico y maslínico, y sus análogos estructurales, se encuentran en el punto de mira de múltiples estudios por su actividad biológica multifactorial con efectos favorables en la salud humana, y están siendo considerados como productos naturales que pueden sustituir o complementar la acción de fármacos convencionales en el tratamiento de muy diversas patologías.

El fruto y la hoja del olivo (*Olea europaea* L.) han sido largamente conocidos por contener una amplia variedad de esteroides y triterpenoides pentacíclicos en su epidermis (Vázquez-Roncero y Janer, 1969). En ambos órganos, los ácidos triterpénicos se encuentran en forma de ácidos libres, mientras que los triterpenoles pentacíclicos pueden encontrarse libres o esterificados con ácidos grasos (Pérez-Camino y Cert, 1999). El análisis de las ceras de la cutícula de la aceituna ha demostrado que los triterpenoides de tipo oleanano son, con mucho, los predominantes (Bianchi et al., 1994). El ácido maslínico puede llegar a representar hasta el 80% de las ceras de la piel de este fruto (Reyes et al., 2006).

Durante la elaboración del aceite de oliva, los triterpenoides de la aceituna se transfieren en menor o mayor medida al aceite. La concentración resultante depende fundamentalmente del cultivar y del estadio de maduración del fruto, aunque también se ha demostrado muy recientemente la influencia de las operaciones básicas implicadas en el proceso (molienda, termobatido y centrifugación) (Allouche et al., 2010). En cualquier caso, los niveles encontrados en los aceites de oliva vírgenes comerciales son bajos, con contenidos de los ácidos maslínico y oleanólico inferiores a 50 mg/kg aceite. En aceites refinados, la concentración final de triterpenos es extremadamente baja y dependiente del método de refinación. En la refinación química, estos compuestos son completamente eliminados durante las etapas de neutralización y decoloración, mientras que en la refinación física cantidades muy significativas de triterpenos se pierden durante la etapa de desodorización. En los aceites de orujo crudos pueden encontrarse concentraciones importantes de triterpenos, pero en la práctica, la casi totalidad de estos aceites

han de ser refinados para ser aptos para el consumo humano (Reyes et al., 2006).

Por otro lado, en la hoja de olivo, el contenido de triterpenos es muy superior al encontrado en el fruto. El análisis de la composición química de las ceras epidérmicas de la hoja muestra que los triterpenoides pentacíclicos son los predominantes, y dentro de ellos, los mayoritarios son igualmente los derivados de tipo oleanano (Bianchi et al., 1993).

El rol fisiológico que juegan estos compuestos en la fisiología de las plantas no está bien establecido, aunque se asume su implicación en los mecanismos defensivos de la planta frente a condiciones ambientales adversas o el ataque de microorganismos u otros depredadores. En este sentido, se ha revelado una relación inversa entre los contenidos de los ácidos maslínico y oleanólico en la aceituna y la deposición de huevos de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) (Cayuela et al., 2014).

2.3.3.1 Naturaleza química

Los alcoholes y ácidos triterpénicos son biosintetizados por la ruta citoplasmática acetato/ácido mevalónico. Su esqueleto policíclico de 30 átomos de carbono proviene de la condensación « cabeza-cabeza » de dos moléculas de farnesil pirofosfato, que da lugar primero a la formación de escualeno y posteriormente de (3S)-2,3-epóxido de escualeno (OS). A partir de aquí, la diversidad de estructuras triterpénicas resultantes está controlada por la conformación estereoquímica del OS que imponen los enzimas que catalizan la reacción, denominados OS ciclasas (OSCs) o triterpeno sintasas (Humphrey e y Beale, 2006). La ciclación del 2,3-epóxido de escualeno constituye un punto de bifurcación entre el metabolismo primario (ruta de los esteroides) y el secundario (biosíntesis de triterpenoides) (Stiti et al., 2007).

Una de estas oxidoescualeno ciclasas es β -amirina sintasa, el enzima que cataliza la conversión de oxidoescualeno en β -amirina (12-oleanan-3 β -ol), el

precursor biosintético de eritrodíol y los ácidos oleanólico y maslínico. De igual forma, la α -amirina sintasa rinde α -amirina, que es el precursor de uvaol y del ácido ursólico (Servili et al., 2007).

2.3.3.2 Compuestos más importantes dentro del grupo

El Grupo de Investigación AGR-130, del Instituto de la Grasa-CSIC, ha estudiado la composición triterpénica de frutos y hojas de olivo, y ha constatado que el contenido total de triterpenoides en la aceituna representa aproximadamente un 0.2% del peso seco. El ácido maslínico es el componente claramente mayoritario (1.3-1.8 mg/g peso seco), acompañado por contenidos menores de ácido oleanólico (0.4-0.6 mg/g peso seco) (Figura 6).

En contraste, la hoja de olivo presenta unos contenidos de triterpenoides pentacíclicos 30 veces superiores al fruto. El ácido oleanólico es el componente claramente mayoritario y aparece en cantidades muy importantes en forma de ácido libre, llegando a representar un 3.0-3.5% del peso seco de hoja. Por su parte, el nivel de ácido maslínico se sitúa entre el 0.50 y el 0.75%. También en contraste con la aceituna, en la hoja se detecta ácido ursólico, que representa aproximadamente un 0.3% del peso de hoja seca, y niveles menores de los dialcoholes triterpénicos (entre 50 y 150 mg/Kg), siendo los contenidos de uvaol y eritrodíol similares (Guinda et al., 2010).

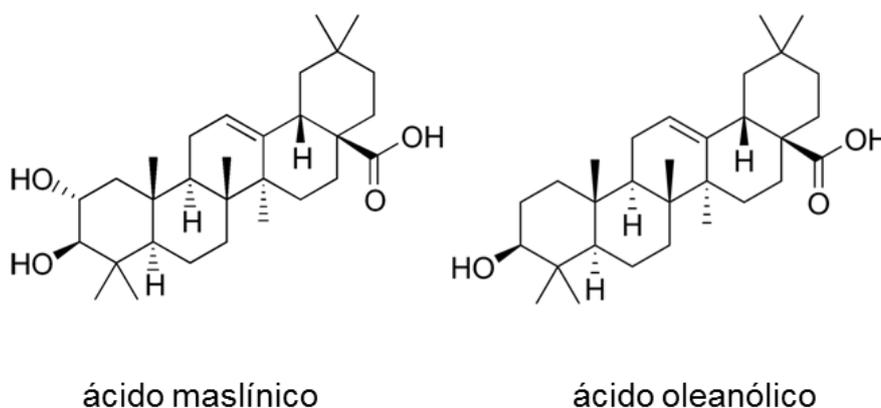


Figura 6. Triterpenos pentacíclicos presentes en la aceituna

2.3.3.3 Evolución a lo largo del desarrollo y diferencias entre variedades

El Grupo AGR-130 ha comparado las fracciones triterpénicas de aceitunas de algunas de las principales variedades españolas de olivo (Picual, Hojiblanca, Arbequina, Empeltre y Cornicabra), corroborando que los contenidos de estos compuestos son dependientes de la variedad y del estadio de desarrollo del fruto (Albi et al., 2001). De las estudiadas, las variedades Picual y Hojiblanca exhiben los mayores contenidos de ácidos triterpénicos, mientras que la variedad Arbequina presenta los niveles más significativos de uvaol y eritrodiol.

Estos mismos autores han mostrado que el contenido total de triterpenoides pentacíclicos es más elevado en el fruto verde maduro, y disminuye a medida que progresa la maduración. En el periodo que transcurre entre el estadio verde maduro y el estadio negro, el contenido de triterpenoides del fruto declinó un 20%, con similares reducciones en los niveles de los ácidos maslínico y oleanólico. Este resultado es consistente con el trabajo de Stiti y colaboradores (2007), que sugiere que una vez que el fruto se introduce en la maduración, el 2,3-epóxido de escualeno es derivado preferentemente hacia la producción de esteroides, en detrimento de la biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos.

El balance maslínico/oleanólico en el fruto también se ha demostrado función del cultivar. Así, en aceitunas de las variedades Picual y Hojiblanca, esta proporción exhibió un valor de 2'5, aproximadamente, durante la maduración, mientras que en la variedad Arbequina, esta ratio se mantuvo en un valor de 4'0.

Diferentes estudios, con otras variedades de olivo, han aportado resultados a veces no concordantes. En aceitunas de la variedad Coratina, Bianchi y colaboradores (1992) demostraron que el ácido oleanólico era el triterpenoide mayoritario, y que la composición triterpénica de este fruto experimentaba cambios durante la maduración. Así, y aunque la hegemonía del ácido oleanólico permanecía inalterada, detectaron niveles traza de eritrodiol y uvaol en el estadio verde maduro, que desaparecieron en estadios más avanzados; y observaron niveles bajos de los ácidos maslínico, ursólico y betulínico en el

estadio negro maduro. En cambio, estos mismos autores determinaron que los frutos de los cultivares Cipressino, Dritta y Leccino contenían niveles similares de los ácidos oleanólico y maslínico, y que, al menos en la variedad Cipressino, el contenido de ácido oleanólico disminuía a lo largo de la maduración, mientras que el nivel de ácido maslínico aumentaba.

Más recientemente, Stiti et al. (2007) han analizado la composición de triterpenos del cultivar tunecino Chemlali, y han reportado que en los estadios más precoces del desarrollo del fruto, el ácido oleanólico es el compuesto mayoritario, seguido del ácido maslínico y de cantidades menores de uvaol y eritrodiol, pero esta situación cambia en el inicio de la maduración, y el ácido maslínico llega a ser el compuesto hegemónico.

2.4 Actividad biológica de los diferentes grupos de compuestos bioactivos

Durante muchos siglos, los extractos de la hoja o del fruto del olivo han sido asociados con la salud y la conservación. Ya los antiguos egipcios los utilizaban para momificar a sus faraones, y a mitad del siglo XIX eran utilizados como un remedio popular contra la fiebre y para prevenir, e incluso curar, la malaria. En los últimos años, se ha suscitado la supuesta toxicidad de algunos compuestos sintéticos utilizados por las industrias de aditivos alimentarios, de cosmética o farmacéutica, y ello ha generado un interés creciente en la obtención de compuestos biológicamente activos de origen natural. Entre los compuestos presentes en la aceituna, son objeto de especial atención en la actualidad aquellos que poseen actividad antioxidante, como el manitol, los derivados fenólicos, y los triterpenoides pentacíclicos.

Es conocida la asociación entre dietas ricas en antioxidantes y la reducción del riesgo de padecer enfermedades en cuyo desarrollo interviene el estrés oxidativo, como las patologías cardiovasculares y neurodegenerativas, la diabetes y algunos tipos de cáncer. Como consecuencia, se ha generalizado entre las recomendaciones nutricionales el consumo de alimentos y bebidas

ricos en antioxidantes, y es frecuente el diseño de alimentos funcionales con dicha actividad.

2.4.1 Compuestos fenólicos

La importancia de los compuestos fenólicos de la aceituna se debe no sólo a su participación en el sabor y el aroma del fruto y del aceite de oliva (Savarese et al., 2007), sino también a su potente actividad antioxidante, bien como captadores de radicales libres, bien como quelantes de metales. Este poder antioxidante se ha correlacionado con el número de grupos hidroxilo fenólicos. Los grupos fenólicos son capaces de aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, que detienen reacciones oxidativas en cadena que se producen en las células (Kehrer y Smith, 1994). Los derivados fenólicos, por ello, se configuran como interesantes agentes preservantes de la calidad de los alimentos, y compuestos bioactivos con efectos saludables sobre patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Su utilización como ingredientes de alimentos funcionales es una atractiva estrategia para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades.

Algunas investigaciones recientes han podido demostrar que los polifenoles podrían presentar también otros mecanismos de acción, relacionados con su capacidad para modular algunas rutas de señalización celular, la expresión de genes y, así el metabolismo celular (Tangney y Rasmussen, 2013). Así, limitaría el daño producido por las especies reactivas de oxígeno estimulando sistemas de defensa endógenos.

Estudios con cultivos celulares han mostrado que estos compuestos bioactivos tienen un efecto anticancerígeno, siendo capaces de detener el ciclo celular, reducir el crecimiento y la proliferación de células tumorales, e inducir la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) (Della Ragione et al., 2000) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a otro tipo de células no cancerosas como linfocitos aislados y células polimorfonucleares (Fabiani et al., 2002).

En el caso de la oleuropeína, diferentes estudios han evidenciado que aporta efectos beneficiosos para la salud humana por sus propiedades anti-aterogénica, anticancerígena, anti-inflamatoria y antimicrobiana (Gikas et al., 2007). Investigaciones recientes atribuyen a la oleuropeína y sus derivados otros efectos clínicos como la inhibición de la agregación plaquetaria, la reducción del nivel de lipoproteínas de baja densidad en sangre (LDL-c) o la vasodilatación de las arterias coronarias (Fernández-Bolaños et al., 2006). También se ha demostrado que la oleuropeína acompleja de forma no-covalente el péptido β -amiloide que interviene en la etiología de la enfermedad de Alzheimer (Bazoti et al., 2006).

El hidroxitirosol, el principal catabolito de la oleuropeína, está considerado como uno de los más potentes antioxidantes de origen natural, siendo más efectivo que las vitaminas C y E y que el 2,2-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT), y otros antioxidantes sintéticos autorizados para uso alimentario (Japón-Luján et al., 2007). El hidroxitirosol ha demostrado potencial para captar especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). El hidroxitirosol es, hasta el momento, el único compuesto fenólico que ha conseguido una alegación relacionada con la salud, dentro del listado de reivindicaciones recogidas en la Regulación EC1924/2006, con el respaldo del panel científico de la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA).

La evidencia científica acumulada indica que el hidroxitirosol presenta una buena biodisponibilidad. Su carácter anfifílico facilita su absorción intestinal y le permite ejercer un papel protector ante el daño oxidativo en compartimentos celulares hidrófilos y lipofílicos. Ha demostrado capacidad para inhibir de forma dosis-dependiente la oxidación de LDL, uno de los eventos desencadenantes de la aterosclerosis. Promueve la relajación del endotelio arterial y reprime poderosamente la agregación plaquetaria. Asimismo, se le reconoce un papel en el reforzamiento de la defensa endógena celular antioxidante, por su efecto sobre los niveles de glutatión.

Además de estos efectos, la oleuropeína y el hidroxitirosol ejercen otros efectos farmacológicos, como agentes hipoglucemiantes, hipolipemiantes e hipocolesterolémicos (Guinda et al., 2015).

El tirosol puede ejercer asimismo un efecto citoprotector frente al daño oxidativo. Aunque no es tan potente como otros antioxidantes presentes en la aceituna, su concentración y buena disponibilidad sugiere que puede tener un importante efecto saludable neto (Miró-Casas et al., 2003).

Por su parte, el ácido elenólico exhibe una poderosa actividad antiviral, que incluye aquellos responsables del herpes, la gripe, la poliomelitis, encefalomiocarditis o la enfermedad de Newcastle. Otros derivados fenólicos, como demetiloleuropeína, ligustrósido, verbascósido, apigenin-7-O-glucósido y luteolin-7-O-glucósido también parecen dotados de similares propiedades, aunque no han sido tan estudiadas. El verbascósido, un derivado osídico del ácido caféico, también tiene atribuida actividad antioxidante (Obied et al., 2008), neuroprotectora (Sheng et al., 2002) y gastroprotectora (Servili et al., 2007).

En 2006 fue identificado en el aceite de oliva virgen un derivado fenólico denominado oleocantal, que es el aglucón del dimetilligustrósido. A este compuesto se le atribuye una importante actividad anti-inflamatoria que se ha comparado con el ibuprofeno (Beauchamp et al., 2005). No obstante, hasta el momento existe poca información sobre su distribución y concentración en las distintas partes de la planta.

Las isoflavonas y los lignanos, tienen una estructura muy similar a la de estrógenos, por lo que se engloban dentro del grupo de los fitoestrógenos. Estos compuestos son metabolizados por las bacterias intestinales y dan lugar a sustancias, como la enterolactona, que tienen la propiedad de unirse a los receptores estrogénicos y mimetizar su acción. Así, se ha observado que los fitoestrógenos pueden disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y algunos cánceres por vías dependientes de hormonas.

2.4.2 Poliolos

El olivo, como otras plantas de la familia de las Oleáceas, es singular, entre otros aspectos, por su capacidad de biosíntesis de manitol y de oligosacáridos de la familia de la rafinosa como productos directos de la fotosíntesis (Flora y Madore, 1993; Stoop et al., 1996). El manitol es un aditivo alimentario autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de USA (FDA, siglas en inglés), por su actividad antioxidante, como secuestrador de radicales hidroxilo. Además, el manitol presenta otras propiedades que ofrecen ventajosas aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica, en la que es ampliamente utilizado como excipiente. El manitol posee un poder edulcorante equivalente al 70% del de la sacarosa, pero un contenido calórico de 1,6 cal/g, el 40% del valor de la sacarosa. Tiene poca fermentabilidad, lo que hace que no contribuya al desarrollo de caries dental, y que sea empleado en numerosas aplicaciones alimentarias como edulcorante en sustitución de la sacarosa (Francia et al., 2004). Además, El D-manitol tiene un índice glucémico muy bajo (sólo 2, frente a 65 de la sacarosa), una lenta absorción entérica y un metabolismo independiente de insulina, que lo hace apto para individuos diabéticos o que deban llevar una dieta hipocalórica.

El manitol también tiene uso terapéutico en lesiones craneoencefálicas, ya que es efectivo en la reducción de la presión intracraneal (Wakai et al., 2007). Al igual que otros polioles, el manitol ejerce un cierto efecto laxante, y de hecho se utiliza para este propósito en ciertos medicamentos, especialmente para niños. Produce, además, un efecto refrescante en la boca, siendo especialmente adecuado para la preparación de goma de mascar (chicle) o como ingrediente de distintas formulaciones farmacéuticas de tabletas masticables y polvos granulados. Asimismo, en la industria farmacéutica se usa por su actividad diurética, siendo utilizado en sueros y dietas de enfermos con cálculos renales, en dietas para diabéticos, como excipiente de medicamentos y en análisis.

2.4.3 Compuestos triterpénicos

El interés de la comunidad científica internacional por los triterpenoides pentacíclicos ha crecido exponencialmente en las dos últimas décadas, debido a la pléyade de interesantes propiedades farmacológicas que les otorgan efectos beneficiosos para la salud. Además de una actividad antioxidante, hay evidencias de un efecto antiviral (incluyendo anti HIV), antibacteriano, antifúngico, anticariogénico, antidiabético, antiinflamatorio, hepatoprotector, cardioprotector, gastroprotector, hipolipidémico y anti-aterosclerótico (López-Carreras et al., 2012). Además, interfieren en varias fases del desarrollo de distintos tipos de cáncer, inhibiendo la génesis y evolución del tumor e induciendo la apoptosis de las células tumorales, y también se ha apuntado que ejercen efectos beneficiosos sobre la esclerosis múltiple (Sánchez-Quesada et al., 2015).

Teodoro et al. (2008) publicaron que el ácido oleanólico mejora la respuesta tisular a la insulina y estimula la producción pancreática de esta hormona. Además, los ácidos oleanólico y maslínico pueden controlar los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumentar el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el metabolismo lipídico. Todos estos estudios demuestran la capacidad de los terpenos en la protección contra la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis.

Los triterpenos pentacíclicos también juegan un papel importante como agentes antitumorales. En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones sobre su acción anticancerígena frente a diversas células tumorales humanas. Múltiples estudios muestran que tanto el eritrodiol como el ácido maslínico tienen actividad antiproliferativa, inducen a la apoptosis celular y presentan baja toxicidad frente a células de carcinoma colorrectal HT-29 (Fernández-Bolaños et al., 2006).

El ácido maslínico es un ácido mucho menos distribuido en la naturaleza, habiendo sido detectado en una decena de plantas. Se conoce por su actividad como antihistamínico y antiinflamatorio, aunque su escasez hace que no se

haya estudiado extensamente. Aun así, también está asociado a muchos efectos beneficios para la salud, como la atenuación del estrés oxidativo intracelular o la inhibición de serina proteasa, enzima clave en la propagación del virus del VIH (Fernández-Bolaños et al., 2006; Sánchez-Quesada et al., 2015).

La actividad antitumoral del ácido maslínico se ha hecho notable en los últimos años, como lo demuestra el mayor número de estudios que aborda esta cuestión, en comparación con los de otros efectos biológicos. La gran mayoría de las referencias publicadas corresponden a experimentos in vitro que muestran el efecto antiproliferativo y/o proapoptótico del ácido maslínico, junto con posibles mecanismos de acción que implican diferentes vías de señalización. Sin embargo, la cantidad de ácido maslínico en fuentes comestibles naturales es baja y los datos sobre su farmacocinética son muy escasos. No obstante, sigue siendo un compuesto que ocasiona gran interés, por sus propiedades saludables (Lozano-Mena et al., 2014).

2.5 Valorización de la aceituna como alimento funcional

En lo que llevamos de siglo XXI, la obesidad ha alcanzado proporciones pandémicas, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. Las tasas de sobrepeso/obesidad han ido aumentando progresivamente en adultos, y, desgraciadamente, la situación ha empeorado por su penetración entre la población infantil y adolescente (WHO. 10 facts on obesity. Reviewed May 2014; <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>). En tándem con la obesidad, la prevalencia de un grupo de enfermedades metabólicas crónicas, como la Diabetes Mellitus tipo 2, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, o determinados tipos de cáncer, han crecido también significativamente. En nuestro país, la situación es especialmente preocupante. La Encuesta Nacional de Salud 2011-2012, la última publicada, muestra que el 54% de la población adulta y el 30% de los más jóvenes sufren sobrepeso u obesidad. Patologías asociadas con la obesidad y el síndrome metabólico en adultos, empiezan a ser diagnosticadas

en niños. Así, más del 60% de los jóvenes con sobrepeso tienen definido algún factor de riesgo cardiovascular adicional, como hipertensión, hiperlipidemia, o hiperinsulinemia; y más del 20% tienen dos o más.

La insulinoresistencia juega un papel protagonista en la etiología de todas estas enfermedades. Se trata de un proceso multifactorial en el que intervienen factores genéticos y adquiridos, que se establece cuando las cantidades de insulina producidas fisiológicamente pierden capacidad de regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como de modular la actividad mitogénica. El estrés oxidativo se ha propuesto como un evento primario que subyace en la génesis de la insulinoresistencia y las patologías asociadas al síndrome metabólico.

En este escenario, es altamente deseable la caracterización de compuestos de origen natural, eficaces y seguros, con capacidad antioxidante y efectos hipolipemiantes y sensibilizadores a la insulina, que puedan ser utilizados en estrategias preventivas y terapéuticas. Entre ellos destacan sobremanera los derivados fenólicos y los triterpenoides pentacíclicos, presentes en la aceituna (Rada et al. 2005).

La importancia de la alimentación funcional, la nutraceutica y la nutrigenómica han irrumpido notoriamente en las últimas décadas, y las investigaciones sobre la bioactividad, biodisponibilidad y toxicología de los componentes de los alimentos, su estabilidad e interacciones con otros ingredientes, es un tópico fundamental en la actividad de científicos y tecnólogos (Ghanbari et al., 2012). Diferentes ensayos clínicos bien diseñados y ejecutados, como el Estudio PREDIMED (www.predimed.es), están poniendo en valor la aceituna y el aceite de oliva, como importantes fuentes naturales de estos compuestos bioactivos que deben ser aprovechados por sus propiedades promotoras de la salud.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La alarmante expansión de la obesidad y el síndrome metabólico exige de los Sistemas Nacionales de Salud la introducción de medidas preventivas urgentes para retrasar o evitar su aparición, y aliviar el tremendo coste personal, social y económico que representan las enfermedades crónicas asociadas. En este sentido, el uso de alimentos funcionales y fármacos basados en compuestos bioactivos de origen natural es una alternativa atractiva.

Adicionalmente, y en paralelo con la constatación experimental de sus efectos saludables, se hace necesario avanzar en el desarrollo de procedimientos eficaces para el análisis y el control de estos componentes bioactivos alimentarios.

3.2 Objetivos

Obviamente, ya se han descrito distintos métodos para el estudio de los diferentes grupos de componentes de la aceituna. No obstante, con el presente Trabajo de Fin de Máster, se pretende:

- 1) Establecer un nuevo procedimiento para la extracción conjunta y el análisis de los compuestos bioactivos mayoritarios de este fruto: la oleuropeína y el hidroxitirosol, el manitol y los ácidos maslínico y oleanólico, que son demandados por las industrias alimentaria, farmacéutica y de cosméticos, todas ellas muy receptivas en la actualidad a los productos de origen natural.
- 2) Aplicar esta nueva sistemática en el análisis de frutos de dos de las más significativas variedades españolas de olivo: Picual y Arbequina.

Haciendo esto, se aportará una herramienta analítica reproducible, rápida y precisa, para el seguimiento y control de estos componentes en los diferentes procesos a los que se somete la aceituna, destinada tanto a su consumo de mesa como a la elaboración de aceite de oliva.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado muestras procedentes de dos variedades españolas de olivo (*Olea europaea* L.) "Arbequina" y "Picual", seleccionadas aleatoriamente de árboles adultos (> 10 años) de la *HACIENDA GUZMÁN* (La Rinconada, Sevilla; www.haciendaguzman.com).

Se tomó una muestra representativa de frutos sanos de diferentes árboles de cada cultivar en dos momentos de maduración distintos, correspondientes a las fases "verde madura" y "negra". Por aceitunas "verdes maduras" se entienden frutos que alcanzaron su tamaño definitivo y son fisiológicamente maduras (con semillas viables), con epidermis de color verde. Las aceitunas "maduras negras" corresponden a frutos en fases finales de maduración, cuya epidermis ha adquirido completamente un color negro-violáceo.

4.2 Disolventes y patrones

Todos los disolventes empleados (hexano, acetato de etilo, etanol de melaza 96° y etanol absoluto) fueron de calidad para HPLC y suministrados por Panreac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona, España). También se utilizó ácido fórmico, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), así como metanol y acetronitrilo, adquiridos a Cosela S.L. (Sevilla, España).

Como patrones analíticos se dispuso de ácido p-hidroxifenilacético (PHPA, pureza 97%; para el análisis de derivados fenólicos), sorbitol (S, pureza 96%; patrón para azúcares y polioles), y ácido betulínico (AB, pureza 90%; para el análisis de triterpenos). Todos los patrones fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).

Por otro lado, los estándares de hidroxitirosol, oleuropeína, verbascósido, luteolin-O-glucósido, apigenin-7-O-glucósido y aglicón de oleuropeína (pureza \geq 97%) fueron adquiridos a Extrasynthese (Genay Cedex, Francia). Por último, el ácido oleanólico (pureza \geq 97%) empleado en este estudio se obtuvo en el laboratorio del grupo AGR-130 a partir de hojas de olivo, de conformidad con el procedimiento descrito en la patente española ES2160553 (Albi et al., 2001).

4.3 Equipamiento de laboratorio

4.3.1 Homogeneizador

La homogenización de las aceitunas enteras se llevó a cabo en un equipo Sorvall OMNI MIXER Mod. 17106, (DuPont Instruments; Newton, CT, USA). Se trata de un potente homogeneizador, provisto de un conjunto de cuchillas y contenedores herméticos.

4.3.2 Equipo de filtración a vacío

La filtración de los diferentes extractos se realizó en un conjunto Büchner/Kitasato, utilizando Miracloth (Sigma-Aldrich Química; Madrid, España) y filtros circulares de papel para análisis cualitativo MACHEREY-NAGEL (Teknokroma; Barcelona, España) como material filtrante.

4.3.3 Rotavapor

Para la concentración de los extractos se utilizó un rotavapor, provisto de baño termostático, condensador refrigerado y bomba de vacío. El baño termostático se programó a 38-40 °C, para acelerar la evaporación del etanol del extracto sin alterar los componentes del mismo. Por otro lado, la recuperación del etanol destilado se consiguió a través de un condensador refrigerado por un criostato, que operaba a 5°C.

4.3.4 Sistema de extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (más conocida por su acrónimo en inglés, SPE) es una técnica preparativa utilizada para fraccionar una muestra compleja en diferentes grupos de componentes. El término extracción en fase sólida indica que la separación de componentes se realiza por adsorción/desorción de los analitos en una matriz sólida (fase estacionaria). La elución selectiva de los diferentes grupos de compuestos se consigue mediante la elección de una secuencia adecuada de disolventes (fase móvil).

En este trabajo, se han utilizado cartuchos Phenomenex® STRATA SDB-L (Phenomenex, Torrance, CA, USA), de 3 mL de lecho, para el fraccionamiento de los extractos etanólicos de aceituna.

La eficiencia separativa del sistema se incrementa mediante la aplicación de vacío. Concretamente, se ha utilizado un equipo Biotage Vacmaster IST Vacuum Manifold Filtration Cell (Biotage, Uppsala, Suecia) que permite la operación simultánea de 12 cartuchos SPE.

4.3.5 Cromatógrafo líquido HPLC-DAD

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un sistema cromatográfico líquido de alta eficacia (HPLC), equipado con un detector Photodiode Array (PDA) (Spectro Monitor 5000, Artisan Technology Group, IL, USA), una válvula de inyección manual Rheodyne (bucle de 20 μ l), y una columna LiChrospher 100RP-18 (250 mm longitud x 4.6 mm diámetro interno; tamaño de partícula 5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany).

4.3.6 Cromatógrafo líquido HPLC-IR

Para la determinación de los azúcares y polioles se usó un equipo HPLC Merck-Hitachi (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Alemania) equipado

con una válvula de inyección Rheodyne (bucle de 20 μ l), una columna de intercambio iónico Supelcogel Ca (30 cm longitud x 7.8 mm diámetro interno) (Sigma-Aldrich Química, España), y un detector de índice de refracción L-2490.

4.3.7 Cromatógrafo líquido HPLC-UV

El análisis cualitativo y cuantitativo de los triterpenoides pentacíclicos se desarrolló en un sistema cromatográfico líquido Merck-Hitachi (Hitachi alta Technologies Europe GmbH, Alemania) equipado con una válvula de inyección Rheodyne (bucle de 20 μ l); una columna C18 de fase reversa Waters Spherisorb ODS-2 (250 mm longitud x 4.6 mm diámetro interno; tamaño de partícula 5 μ m), termostalizada a 30 °C; y un detector UV/VIS L-4250.

4.3.8 Otros

Además de los aparatos principales ya mencionados, en este trabajo se han empleado los equipos que se detallan a continuación:

- a) Baño de ultrasonidos “Ultrasons-HD” con calefacción, JP Selecta S.A.
- b) Centrífuga de mesa, JP Selecta S.A.
- c) Balanza de precisión Mettler PE 360.
- d) Pequeño equipamiento de laboratorio, como jeringas Luer-Lock (5ml), micropipetas, membranas de ultrafiltración, filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), etc.

4.4 Procedimientos de extracción

Dos métodos diferentes se han utilizado para la extracción de los compuestos bioactivos presentes en la aceituna, en base al procedimiento seguido para la homogenización del material vegetal: en seco y en húmedo.

4.4.1 Método basado en la homogeneización en seco (Método 1)

En este primer procedimiento, un número suficiente de frutos, aleatoriamente elegidos, se trituraron en seco en un homogenizador OMNI MIXER durante unos tres minutos.

La pasta de aceituna resultante fue lavada dos veces sucesivas con hexano (en proporción 20 mL/g aceituna), a fin de proceder a la eliminación de la fracción lipídica de la misma. A continuación, se procedió a la extracción sólido-líquida de la pasta con etanol de melaza de 96° (30 mL/g aceituna), durante 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación constante. Pasado este tiempo, el extracto alcohólico bruto se obtuvo por filtración a través de un lecho de Miracloth + papel MACHEREY-NAGEL. En la Figura 7 se presenta un esquema de este procedimiento de extracción.



Figura 7. Esquema de preparación del extracto etanólico de la aceituna mediante el procedimiento en seco.

4.4.2 Método basado en la extracción en húmedo (Método 2)

En el segundo método, la homogenización de las aceitunas se realiza en húmedo con etanol. Los frutos fueron triturados en Sorvall OMNI MIXER, durante tres minutos, en presencia de etanol de melaza de 96° (15 mL/g aceituna). Después de esto, el homogenizado se transfiere a un vaso de precipitados y se somete a un tratamiento con ultrasonidos a temperatura ambiente durante 15 minutos, pasados los cuales se recuperó el extracto alcohólico mediante filtración, a través de un lecho de Miracloth + papel MACHEREY-NAGEL.

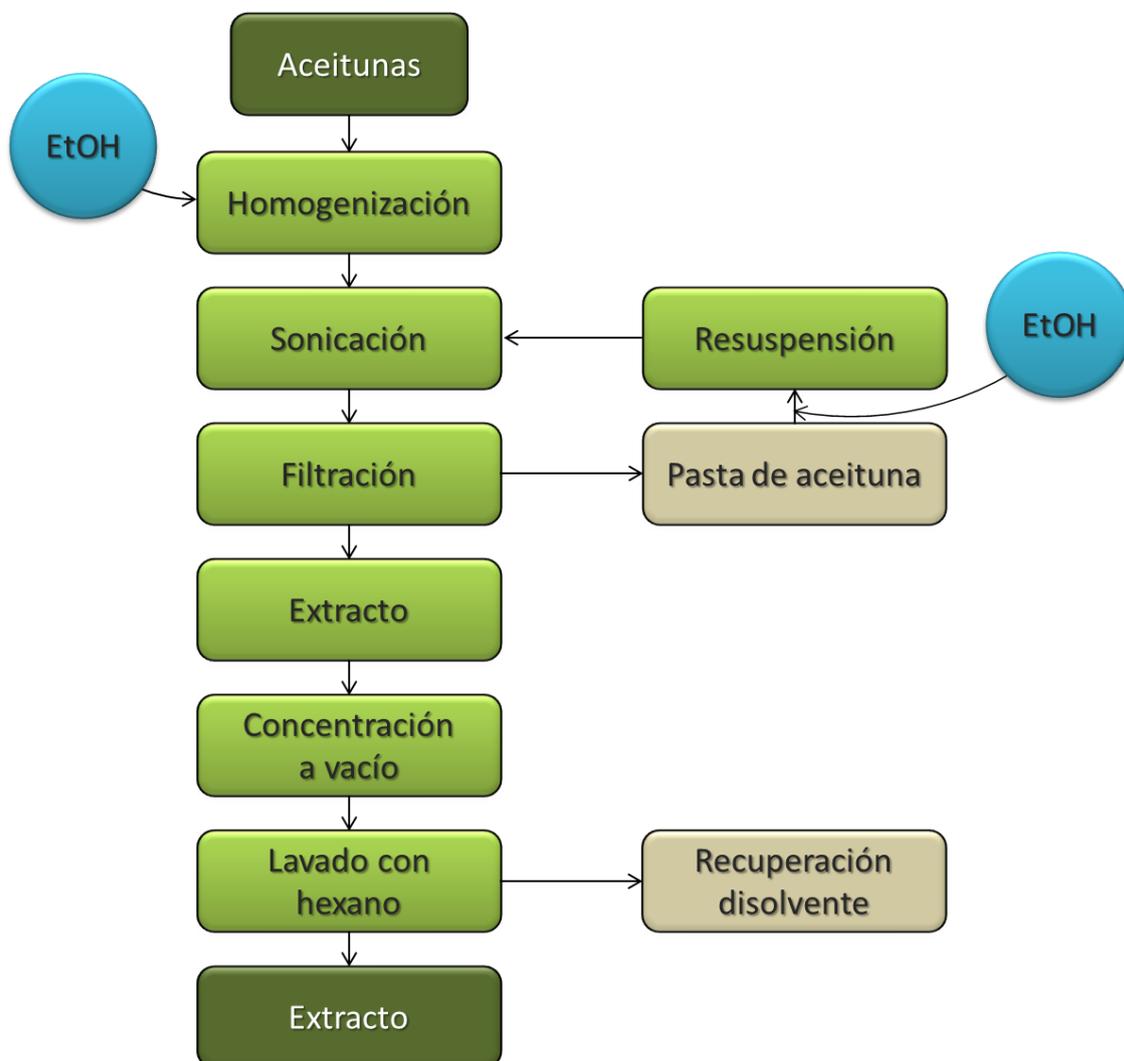


Figura 8. Esquema de preparación del extracto etanólico de la aceituna mediante el segundo método.

La pasta de aceituna remanente fue sometida a un segundo proceso de extracción con etanol de melaza (15 mL/g aceituna), y se repitieron los pasos anteriores de sonicación y filtración. Ambos extractos fueron reunidos, y la mezcla concentrada hasta una tercera parte de su volumen en rotavapor a 38-40 °C. Posteriormente, el extracto concentrado fue lavado dos veces consecutivas con hexano (2mL hexano/mL extracto), en embudo de decantación, para eliminar cualquier vestigio de aceite. En la Figura 8 se presenta un esquema de este procedimiento de extracción.

4.5 Fraccionamiento de los extractos. Recuperación de triterpenos pentacíclicos.

El fraccionamiento de los extractos etanólicos de aceituna se llevó a cabo mediante una adaptación del método descrito por Guinda et al. (2010) para la extracción de los compuestos bioactivos mayoritarios de la hoja de olivo. En la Figura 9 se muestra un organigrama del procedimiento de fraccionamiento de los triterpenoides pentacíclicos, los azúcares y polioles, y los derivados fenólicos.

A una alícuota (40 mL) de los extractos obtenidos se añadieron ácido betulíno, PHPA y sorbitol, como patrones internos para la determinación de terpenos, fenoles y azúcares/polioles, respectivamente. Esta mezcla fue llevada a sequedad bajo presión reducida a 40 °C en rotavapor, y el residuo obtenido resuspendido en agua Milli-Q (4 mL). Posteriormente, se sometió a tratamiento con ultrasonidos a 40 °C durante 10 minutos, para facilitar la resuspensión, y a continuación filtrado a través de un filtro Luer-Lock con membrana PTFE de tamaño de poro de 0'45 µm, para la obtención del extracto acuoso.

El residuo sólido retenido en la membrana de ultrafiltración fue tratado con 6 mL de etanol absoluto para la obtención de un extracto alcohólico portando los triterpenos pentacíclicos pertenecientes a la muestra de aceituna en estudio.

4.6 Fraccionamiento de los extractos. Recuperación de azúcares y compuestos fenólicos.

El extracto acuoso, conteniendo los fenoles y azúcares/polioles, se fraccionó mediante extracción en fase sólida empleando una columna STRATA SDB-L. La columna SPE fue acoplada a la celda de filtración VacMaster, y posteriormente acondicionada mediante el paso de 20 mL de metanol, seguido de secado a vacío moderado y del paso de 20 mL de agua Mili-Q.

A continuación, 1 mL de extracto acuoso fue cargado en la columna. Una primera fracción, conteniendo azúcares y polioles, se eluyó con 4 mL de agua Mili-Q (*extracto acuoso portando azúcares y polioles*). Posteriormente se pasaron otros 2 mL de agua Mili-Q, y se procedió a un secado de la columna bajo vacío moderado. Por último, se obtuvo una segunda fracción conteniendo los compuestos fenólicos por elución con 6 mL de metanol (*extracto metanólico de fenoles*).

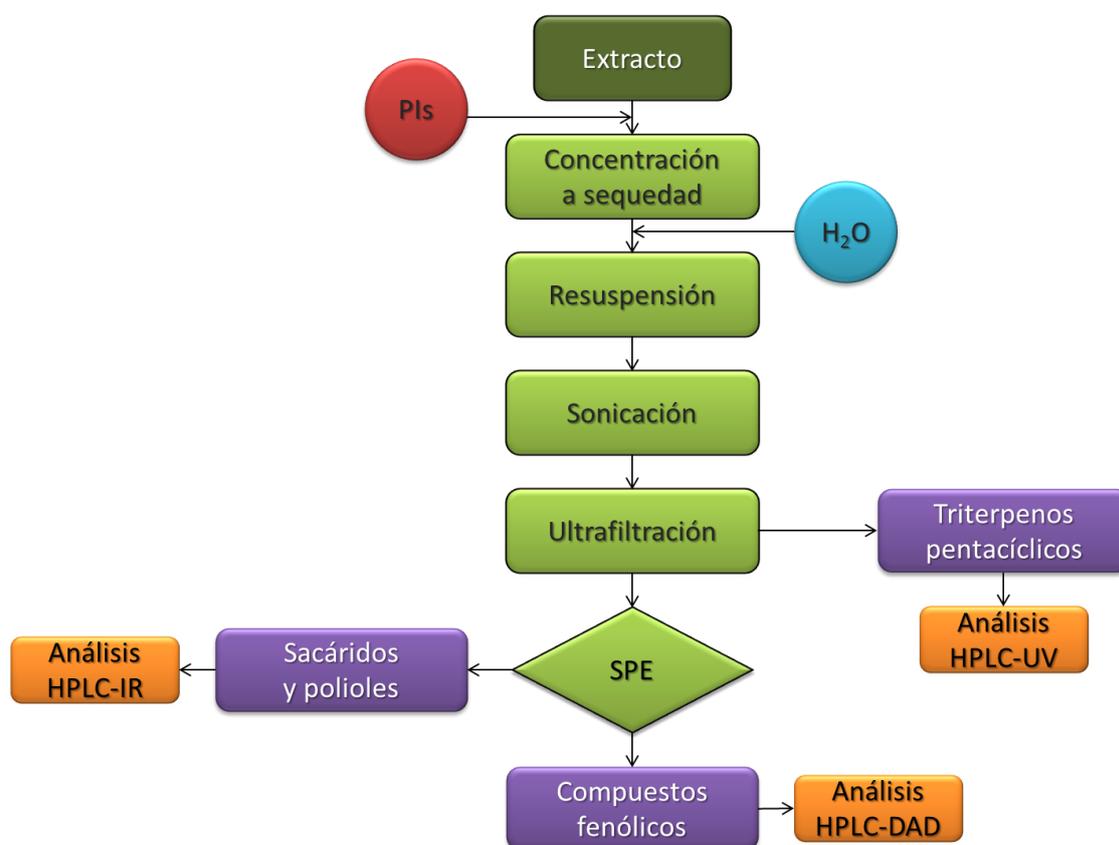


Figura 9. Organigrama del fraccionamiento de los grupos de biocompuestos mayoritarios en extractos etanólicos de aceituna.

4.7 Análisis de las distintas fracciones por HPLC

4.7.1 Determinación de triterpénicos pentacíclicos por HPLC UV

Para la determinación de los compuestos triterpénicos en el extracto etanólico obtenido por ultrafiltración se utilizó un sistema HPLC-UV. Una alícuota de 20 μL del extracto fue inyectada en la columna cromatográfica termostalizada a 30 $^{\circ}\text{C}$, y fue resuelta de forma isocrática, utilizando como fase móvil la mezcla ACN/ H_2O (85:15, v/v; 0'5% de ácido fórmico), a un flujo constante de 0'8 ml/min. Para la detección de los componentes que eluían de la columna se utilizó un detector de UV-VIS, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 203 nm. La cuantificación de los distintos compuestos se realizó en base a su factor de respuesta en relación con el ácido betulínico, incorporado como patrón interno.

4.7.2 Determinación de azúcares y polioles mediante HPLC-IR

El análisis de azúcares y polioles en la fracción acuosa obtenida por SPE fue llevado a cabo por HPLC, empleando una columna cromatográfica de intercambio iónico Supercogel Ca termostalizada a 85 $^{\circ}\text{C}$, y agua Mili-Q como fase móvil, a un flujo de 0'5 ml/min. La detección de los compuestos que eluyen de la columna se realizó mediante medida del índice de refracción, y la cuantificación se llevó a cabo en base a los factores de respuesta de los distintos compuestos en relación a la respuesta del sorbitol, utilizado como patrón interno.

4.7.3 Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-PDA

El análisis de los compuestos fenólicos presentes en la fracción metanólica obtenida por SPE fue desarrollado en un sistema cromatográfico HPLC equipado con una columna C18 de fase reversa y un detector PDA. El análisis fue llevado a cabo mediante un programa de elución en gradiente, utilizando

una mezcla de dos eluyentes compuestos, agua Mili-Q (0'1% de ácido fórmico) (eluyente A) y metanol:ACN (50:50 v/v en 0'1% de ácido fórmico) (eluyente B), a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. Se ejecutó el siguiente programa de elución:

- 1) durante los primeros 25 minutos se empleó una relación de eluyentes de 95:5 (A:B, respectivamente).
- 2) del minuto 25 al 35 se pasó a una relación 70:30, siguiendo un gradiente lineal.
- 3) a los 35 minutos la proporción de eluyentes se modificó de forma discreta a 65:35.
- 4) a los 40 minutos, esta relación cambió a 60:40.
- 5) en el minuto 50, se pasó a una proporción 30:70.
- 6) en el minuto 55 se convierte a 0:100.
- 7) finalmente, en el minuto 70 se vuelve a la proporción inicial de eluyentes 95:5.

El detector PDA se configuró para realizar medidas simultáneas de absorbancia a las longitudes de onda de 280 y 335 nm, y la cuantificación de los distintos compuestos fenólicos se realizó en base a sus factores de respuesta, en relación con la exhibida por el PHPA añadido como patrón interno.

4.8 Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como valores medios \pm desviaciones estándares (SD) de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes, llevados a cabo por triplicado. La comparación de las medias se realiza mediante el test de Student, considerando que las diferencias son estadísticamente significativas para una $p > 0.05$. Se ha utilizado el software SigmaStat 3.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el desarrollo de este Trabajo de Fin de Máster, se establece un nuevo protocolo de extracción y análisis para los compuestos bioactivos mayoritarios de la aceituna. La aceituna es un fruto rico en oleuropeína y sus metabolitos, en manitol, y en ácidos maslínico y oleanólico, todos ellos compuestos bioactivos naturales demandados por las industrias alimentaria, farmacéutica y de cosméticos.

5.1 Extracción e identificación de los compuestos bioactivos de la aceituna

Los protocolos que hemos desarrollado para la extracción conjunta de compuestos fenólicos, triterpenoides pentacíclicos y manitol, están basados en la utilización de etanol de melaza del 96%. Se ha optado por este disolvente no tóxico, amigable con el medioambiente, a la vez que relativamente barato, por ser un buen agente extractante para todos los compuestos diana, y ser selectivo, además, para el manitol frente a otros azúcares presentes en la aceituna.

En la literatura científica es frecuente encontrar métodos de extracción de los componentes de *Olea europaea* que hacen uso de metanol, pero el creciente interés en el aprovechamiento del potencial terapéutico de estos compuestos bioactivos en humanos está impulsando la investigación de nuevos métodos basados en extractantes inocuos, seguros y eficaces.

Así pues, usando etanol de melaza del 96%, se han desarrollado dos métodos de extracción, que se diferencian en las formas de homogenización del material vegetal y de transferencia sólido/líquido de los compuestos de interés, así como en el momento de la etapa de eliminación de la fracción lipídica.

El análisis de los componentes bioactivos presentes en el extracto alcohólico de aceituna, se ha llevado a cabo mediante cromatografía HPLC. La

identificación de los distintos compuestos se ha efectuado por co-cromatografía con los compuestos standards, mientras que la cuantificación se ha realizado en base a sus factores de respuesta con respecto a los correspondientes patrones internos. Las diferentes sustancias seleccionadas como patrones internos (ácido betulínico para los triterpenos, sorbitol para los glúcidos y PHPA para los derivados fenólicos) lo fueron por no ser componentes de los extractos etanólicos de aceituna, por eluir de la columna bien separados del resto de analitos, y por ofrecer una respuesta molar en el detector del mismo orden que los compuestos objeto de análisis. Las condiciones cromatográficas adoptadas son modificaciones de protocolos ya establecidos en el laboratorio del Grupo AGR-130 (Guinda et al., 2010; 2015), y en todos los casos han ofrecido cromatogramas con picos estrechos y simétricos.

La Figura 10 muestra unos cromatogramas típicos HPLC-UV de triterpenos pentacíclicos de aceitunas. El triterpeno claramente mayoritario es el ácido maslínico (70-71% del total en Picual y el 77-78% en Arbequina), con contenidos próximos a 1.5 mg/g en ambas variedades. El ácido oleanólico también está presente en concentraciones significativas, que oscilan alrededor de 0.5 mg/g.

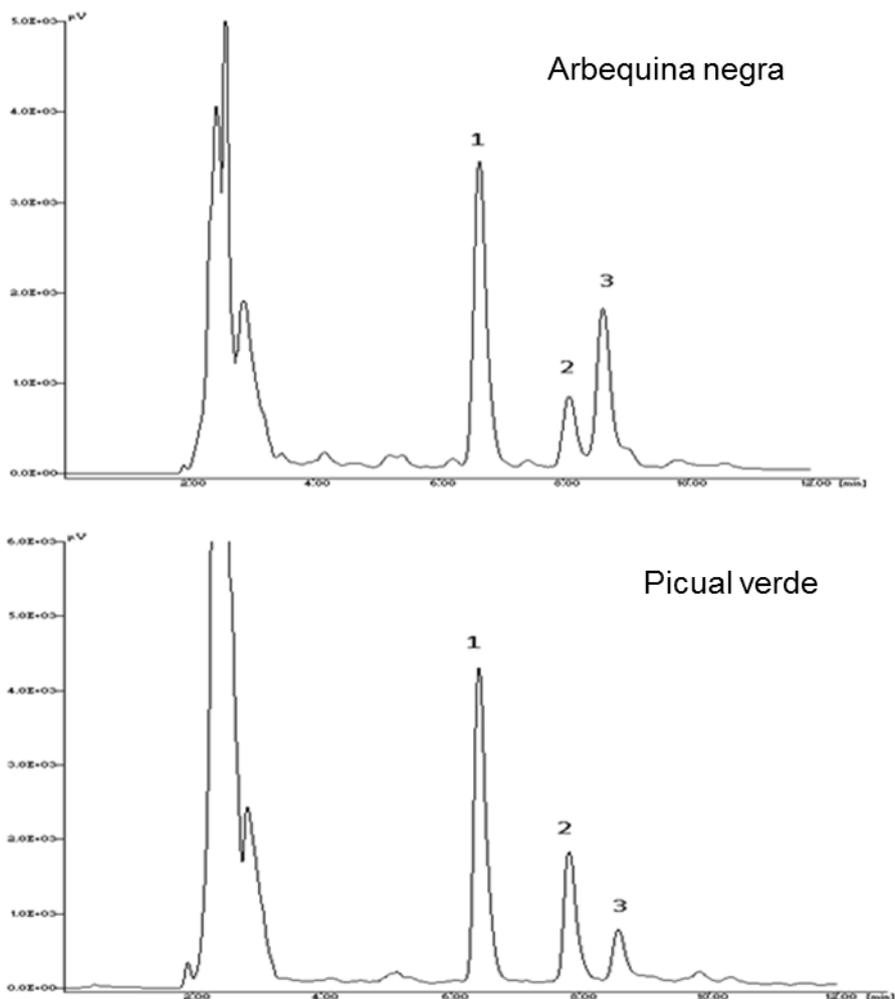


Figura 10. Ejemplos de cromatogramas HPLC-UV típicos de compuestos triterpénicos en extractos etanólicos de aceitunas, de las variedades Arbequina (a) y Picual (b), obtenidos siguiendo el método de extracción en seco. 1. Ácido maslínico. 2. IS, ácido betulínico. 3. Ácido oleanólico.

La Figura 11 muestra cromatogramas HPLC-IR correspondientes a los sacáridos y polioles de extractos etanólicos de aceitunas. Puede observarse, que la glucosa es el sacárido mayoritario en este fruto, representando entre un 70 y un 90% del total de los glúcidos presentes en el extracto. Asimismo, es importante la presencia de fructosa y manitol.

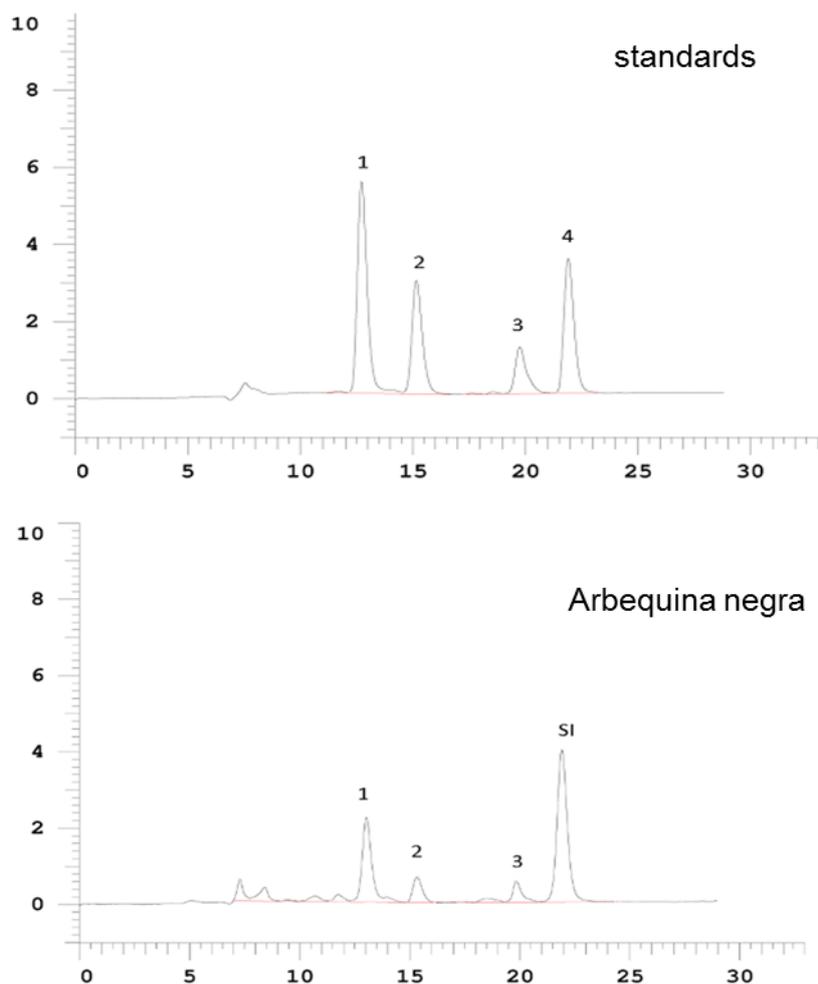


Figura 11. Ejemplos de cromatogramas HPLC-IR correspondientes (a): estándares 1. Glucosa. 2. Fructosa. 3. Manitol. 4. IS, D-sorbitol; y (b) los azúcares procedentes de extractos etanólicos de aceitunas de las variedad Arbequina obtenidos mediante extracción en seco.

Finalmente, unos cromatogramas representativos del análisis HPLC-DAD de los compuestos fenólicos del extracto etanólico, se muestra en la Figura 12. Se comprueba la importancia de la oleuropeína y sus metabolitos, como compuestos mayoritarios.

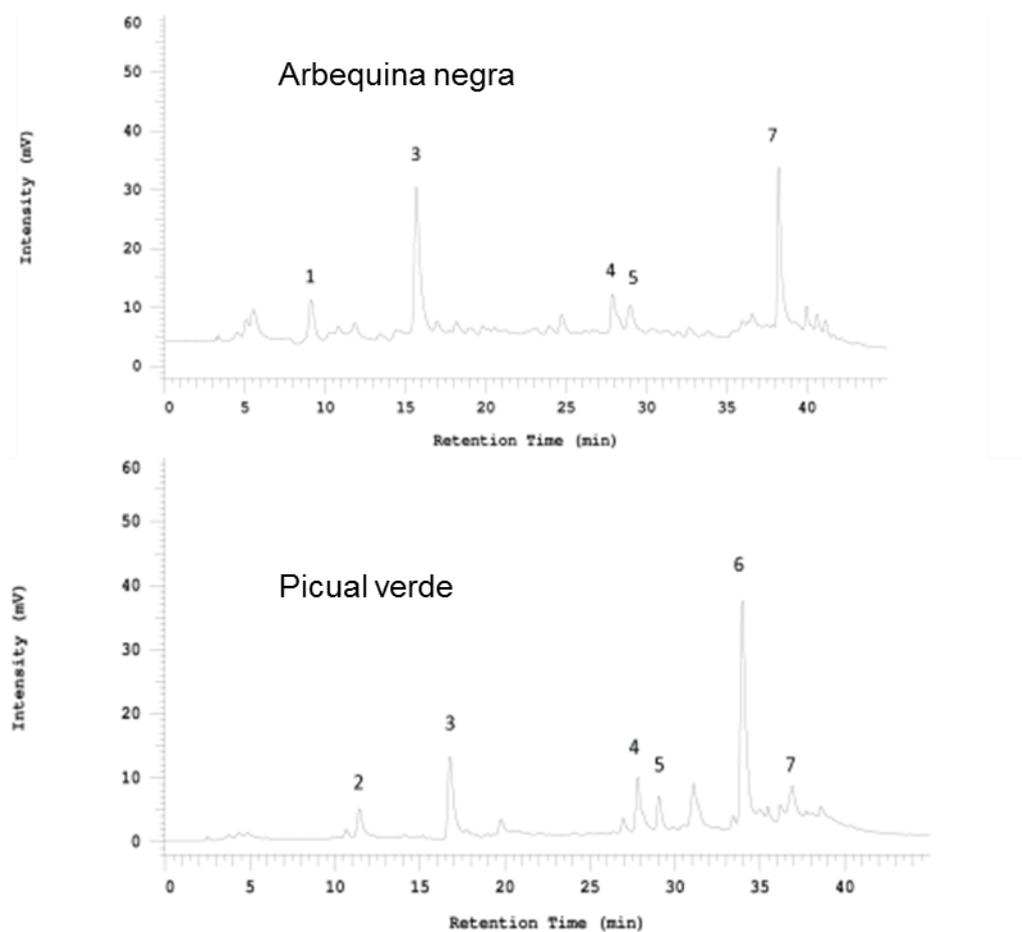


Figura 12. Ejemplos de cromatogramas HPLC-DAD típicos de compuestos fenólicos en extractos de aceitunas, variedad Arbequina (a) y Picual (b). Los extractos etanólicos se obtuvieron siguiendo el método de extracción en seco. 1. Hidroxitirosol. 2. Tirosol. 3. IS, PHPA. 4. Luteín-7-O-glucósido. 5. Verbascósido. 6. Oleuropeína. 7. Aglucón de la oleuropeína.

5.2 Aplicación de los procedimientos a frutos de las variedades Picual y Arbequina

Ambos procedimientos han sido aplicados en la extracción y análisis de los compuestos bioactivos mayoritarios de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. Los frutos del primer cultivar se recolectaron en estadio de maduración verde maduro, mientras que las drupas de la variedad Arbequina se encontraban en una etapa más avanzada de maduración con su epidermis de color negro-violáceo.

Los glúcidos son los componentes bioactivos cuantitativamente más importantes de los extractos de aceituna (50-60 mg/g peso seco de fruto) (Tabla 2). Dentro de este grupo, la glucosa es el sacárido mayoritario, representando entre un 70 y un 90% del total. Asimismo, es importante la presencia de fructosa y manitol. Esto no es sorprendente, ya que la fructosa y el manitol, junto con la glucosa, representan los principales azúcares de transporte en el olivo y contribuyen significativamente a la regulación homeostática de la presión osmótica celular. Esta especie vegetal está aclimatada a soportar déficits hídricos prolongados, y la acumulación de estos solutos orgánicos solubles podría ser uno de los mecanismos básicos del ajuste osmótico citoplasmático.

Tabla. 2 Contenido de azúcares y polioles en aceitunas de las variedades Arbequina y Picual

		mg/g DW*	
		Método 1	Método 2
Arbequina	Fructosa	8.30 ± 0.58 ^a	7.62 ± 0.80 ^a
	Glucosa	35.08 ± 1.40 ^a	32.15 ± 3.54 ^b
	Manitol	7.89 ± 0.55 ^a	7.54 ± 0.75 ^a
Picual	Fructosa	1.21 ± 0.13 ^a	0.94 ± 0.14 ^b
	Glucosa	53.77 ± 2.15 ^a	50.90 ± 6.05 ^a
	Manitol	5.25 ± 0.42 ^a	5.06 ± 0.56 ^a

*Los resultados están referidos a peso seco del fruto y se expresan como media ± SD de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Diferentes letras dentro de una misma fila indica diferencias significativas a $p = 0.05$.

En este trabajo, hemos determinado que los contenidos de glucosa en los frutos de la variedad Picual son un 53-58% más elevados que en frutos de la variedad Arbequina. Por el contrario, este último cultivar exhibe unos contenidos de fructosa y manitol más importantes que las aceitunas Picual, 8 y 1'5 veces superior, respectivamente. Se ha apuntado que, en general, la concentración de azúcares disminuye a lo largo de la ontogenia de la aceituna, con menor ritmo en las últimas fases de la maduración (Guillén et al., 1992). En consecuencia, nuestros resultados corroborarían esta tendencia.

El segundo grupo en importancia cuantitativa son los compuestos fenólicos. Las tablas 3 y 4 recogen los contenidos de los distintos derivados fenólicos presentes en los extractos. En la aceituna Picual verde madura, la oleuropeína (20-28 mg/g fruto seco) es el compuesto claramente mayoritario, representando un 70-80% del total de fenoles. También resultan importantes los niveles de verbascósido y de lutein-7-O-glucósido, no detectándose en estos extractos la presencia de hidroxitirosol.

En la Aceituna Arbequina negra, por su parte, es el aglucón de la oleuropeína el compuesto que se presenta en mayor concentración, comprendiendo un 70-77% del total de derivados fenólicos. Paralelamente, los niveles de oleuropeína son muy bajos (0.7-0.9 mg/g peso seco de fruto). El hidroxitirosol, otro metabolito de la oleuropeína, sí pudo ser detectado, con niveles próximos a 0.10 mg/g fruto seco.

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos en aceitunas de la variedad Arbequina en estadio negro maduro

Compuesto	Media \pm SD (mg/g)*	
	Método 1	Método 2
Hidroxitirosol	0.10 \pm 0.02 ^a	0.06 \pm 0.03 ^b
Tirosol	0.40 \pm 0.05 ^a	0.25 \pm 0.07 ^b
Verbascósido	1.01 \pm 0.13 ^a	0.86 \pm 0.26 ^a
luteín-7-O-glucósido	1.32 \pm 0.11 ^a	1.16 \pm 0.31 ^a
Oleuropeína	0.28 \pm 0.01 ^a	0.41 \pm 0.12 ^b
aglucón-oleuropeina	7.66 \pm 0.38 ^a	8.96 \pm 2.51 ^a
Total fenoles	10.76 \pm 0.53 ^a	11.71 \pm 3.08 ^a

*Los resultados están referidos a peso seco del fruto y se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Diferentes letras dentro de una misma fila indica diferencias significativas a $p = 0.05$.

Estos resultados son consistentes con los aportados por otros autores que describen que los contenidos máximos de oleuropeína en el fruto se alcanzan coincidiendo más o menos con su madurez fisiológica (epidermis verde y

semilla germinativa). A medida que el fruto progresa en la maduración estos niveles descienden rápidamente (Amiot et al., 1989; Ranalli et al., 2009), tendiendo a cero cuando el fruto es completamente negro (Bianco et al., 1993). En cuanto al verbascósido, se ha indicado que alcanza su máximo nivel después que la oleuropeína, y que desciende conforme avanza la maduración. Se ha sugerido una relación metabólica entre oleuropeína y verbascósido durante la maduración, en base a una degradación parcial del primer compuesto que podría ser responsable de la formación del segundo.

Tabla 4. Contenido de compuestos fenólicos en aceitunas de la variedad Picual en estadio verde maduro.

Compuesto	Media \pm SD (mg/g)*	
	Método 1	Método 2
Hidroxitirosol	n.d.	n.d.
Tirosol	0.82 \pm 0.10 ^a	0.95 \pm 0.26 ^a
Verbascósido	7.35 \pm 0.51 ^a	2.12 \pm 0.68 ^b
luteín-7-O-glucósido	4.37 \pm 0.35 ^a	1.05 \pm 0.29 ^b
Oleuropeína	27.90 \pm 1.39 ^a	21.04 \pm 4.78 ^b
aglucon-oleuropeína	0.68 \pm 0.10 ^a	0.86 \pm 0.28 ^a
Total fenoles	41.12 \pm 2.06 ^a	24.02 \pm 5.36 ^b

*Los resultados están referidos a peso seco del fruto y se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Diferentes letras dentro de una misma fila indica diferencias significativas a $p = 0.05$.

Gómez-Rico et al. (2008) compararon los compuestos fenólicos de los frutos de distintas variedades de aceituna, entre ellas Arbequina y Picual, en tres estadios de maduración diferentes (verde, envero y negra), y reportaron que el contenido de hidroxitirosol aumentaba a medida que avanzaba la maduración. Este incremento sería resultado de la degradación enzimática de la oleuropeína por β -glucosidasa.

El tercer grupo de compuestos de interés en los extractos etanólicos de aceituna es el constituido por los triterpenoides pentacíclicos. La Tabla 5

muestra que en los frutos de ambos cultivares el contenido total de triterpenos es del orden de 2 mg/g peso seco de fruto. El ácido maslínico es, de forma clara, el componente mayoritario (71-78% del total), acompañado exclusivamente por ácido oleanólico (22-30%). Estos datos corroboran resultados previos del Grupo AGR-130, quienes mostraron que en la aceituna madura, al contrario que en la hoja del olivo, no se detectan niveles de eritrodiol, precursor biosintético de los ácidos oleanólico y maslínico, ni tampoco de uvaol ni de ácido ursólico (Guinda et al., 2010).

Este mismo equipo científico también ha publicado que el contenido total de triterpenoides pentacíclicos es más elevado en el fruto verde maduro, y disminuye a medida que progresa la maduración. En el presente trabajo, hemos detectado que los niveles de triterpenoides son en la aceituna Arbequina negra un 5-8% inferiores que en la aceituna Picual verde madura.

Tabla 5. Contenido de triterpenoides pentacíclicos en aceitunas de las variedades Picual y Arbequina en estadios verde y negro maduros, respectivamente.

		mg/g DW*	
		Método 1	Método 2
Arbequina	ác. maslínico	1.50 ± 1.28 ^a	1.45 ± 0.28 ^a
	ác. oleanólico	0.44 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.10 ^a
Picual	ác. maslínico	1.47 ± 0.12 ^a	1.39 ± 0.28 ^a
	ác. oleanólico	0.62 ± 0.06 ^a	0.57 ± 0.14 ^a

*Los resultados están referidos a peso seco del fruto y se expresan como media ± SD de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Diferentes letras dentro de una misma fila indica diferencias significativas a p = 0.05.

Por otro lado, se ha reportado que el balance maslínico/oleanólico en el fruto es función del cultivar. Guinda y colaboradores (2010) apuntaron que en frutos maduros de las variedades Picual y Hojiblanca, esta proporción tiende a un valor de 2'5, mientras que en aquellos de la variedad Arbequina, esta ratio

tiende a 4'0. Efectivamente, en este trabajo, los resultados muestran que el balance maslínico/oleanólico en frutos de la variedad Picual rinde un valor 2'37, mientras que en aceitunas del cultivar Arbequina esta relación asciende a 3'5-3'7.

Nuestros datos también son consistentes con los aportados por Bianchi y colaboradores (1992), quienes demostraron que en el fruto de la variedad Cipressino, el contenido de ácido oleanólico disminuía a lo largo de la maduración, mientras que el nivel de ácido maslínico aumentaba. Más recientemente, Stiti et al. (2007) han analizado la composición de triterpenos del cultivar tunecino Chemlali, y han reportado que en los estadios más precoces del desarrollo del fruto, el ácido oleanólico es el compuesto mayoritario, pero esta situación cambia en el inicio de la maduración, y el ácido maslínico llega a ser el compuesto hegemónico.

5.3 Eficiencia en la recuperación de los compuestos bioactivos por ambos métodos

La estimación de la tasa de recuperación de estos compuestos bioactivos se llevó a cabo mediante la ejecución de una serie de experimentos independientes en los que a los frutos se le añadieron cantidades conocidas de estándares de los compuestos cuantitativamente más importantes de cada grupo: ácido maslínico, glucosa y oleuropeína. Para cada uno de ellos se ensayaron dos concentraciones dentro del rango determinado experimentalmente en los análisis anteriores. En estos ensayos se emplearon únicamente aceitunas de la variedad Picual.

La Tabla 6 muestra que en el Método 1 las recuperaciones de los tres biocompuestos de referencia oscilaron entre el 94'5 y el 96'2%, con una RSD entre el 4'4 y el 6'9%. Por su parte, La Tabla 7 pone de manifiesto que el método 2 tiene una tasa de recuperación similar para el triterpeno y el azúcar (entre el 94 y el 95%), aunque significativamente menor para el secoiridoide (76%). Con respecto a la eficiencia de la extracción, se demuestra que la ratio

masa de fruto/volumen de extractante (g/mL) fue apropiada, al asegurar recuperaciones del 95% y superiores.

Tabla 6. Eficiencia del Método 1 en la recuperación de los constituyentes bioactivos de la aceituna.

	concentración inicial (mg/g)	estándar añadido (mg/g)	cantidad medida (mg/g) ^a	recuperación (%) ^b
ác. maslínico	1.5	2.1	3.21	95.8 (6.6)
		0.5	1.80	94.5 (6.9)
glucosa	53.8	40.5	93.75	95.4 (4.4)
		10.1	63.85	94.7 (4.7)
oleuropeina	27.9	20.0	47.30	96.2 (5.1)
		5.1	33.02	95.3 (5.4)

Tabla 7. Eficiencia del Método 2 en la recuperación de los constituyentes bioactivos de la aceituna.

	concentración inicial (mg/g)	estándar añadido (mg/g)	cantidad medida (mg/g) ^a	recuperación (%) ^b
ác. maslínico	1.4	2.1	3.28	94,5 (18,5)
		0.5	1.80	94,1 (17,8)
glucosa	50.9	40.5	86.65	95,4 (10,5)
		10.1	57.91	94,7 (11,4)
oleuropeina	21.0	20.0	31.10	76,2 (19,5)
		5.1	19.72	75,8 (20,2)

Los análisis de los extractos obtenidos con *frutos sembrados* mostraron una relación lineal entre las áreas de los picos y las concentraciones de los compuestos, en el rango ensayado. Una señal tres veces más alta que el ruido se consideró como el límite de detección (LD). Los LDs de los triterpenos, azúcares y fenoles fueron de 1'9, 2'5 y 2'1 mg/mL, respectivamente.

6 CONCLUSIONES

1. El presente Trabajo de Fin de Máster describe dos nuevos procedimientos, reproducibles, rápidos y precisos para la extracción y el análisis de los compuestos bioactivos más importantes de la aceituna: oleuropeína y sus metabolitos, manitol, y los ácidos maslínico y oleanólico.
2. Si bien ambos métodos se caracterizan por unos porcentajes de recuperación muy elevados, aquel que incluye la homogenización del fruto en seco y el posterior tratamiento de la pasta de aceituna con etanol de melaza ha rendido extractos con los más altos contenidos de los diferentes compuestos diana.
3. Adicionalmente, las técnicas cromatográficas HPLC utilizadas en el análisis de los diferentes grupos de compuestos han demostrado su adecuación y sencillez.

Consideramos por todo ello que estos métodos son una herramienta útil para el control de los niveles de estos componentes naturales a lo largo de la ontogenia del fruto, así como en aquellos procesos que soporta la aceituna con vistas a su consumo de mesa o la elaboración de aceite de oliva virgen.

Son procedimientos pertinentes, además, por el protagonismo adquirido por la aceituna como alimento funcional, consecuencia de la presencia en su composición de estas moléculas bioactivas con probados efectos saludables frente al estrés oxidativo y la inflamación.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. ALBI, T., GUINDA, Á., LANZÓN, A. Procedimiento de obtención y determinación de ácidos terpénicos de la hoja del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites*. **2001**, 52 (5), 275-278.
2. ALLOUCHE, Y., BELTRÁN, G., GAFORIO, J. J., UCEDA, M., MESA, M.D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48, 2885-2890.
3. ALPER, H., GARCÍA, J.L., JANG, E.J. New heterogeneous catalysis for the synthesis of polyols. *Journal of Applied Polymer Science*. **2002**, 86, 1553-1557.
4. AMIOT, M.J., FLEURIET, A., MACHEIX, J.J. Accumulation of Oleuropein Derivatives During Olive Maturation. *Phytochemistry*, **1989**, 28, 67-69.
5. ANGEROSA, F., SERVILI, M., SELVAGGINI, R., TATICCHI, A., ESPOSTO, S., MONTEDORO, G.F. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography*. **2004**, 1054, 17-31.
6. BAZOTI, F.N., BERGQUIST, J., MARKIDES, K., TSARBOPOULOS, A. Noncovalent Interaction between Amyloid- β -Peptide and Oleuropein Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society Mass Spectrometry*. **2006**, 17, 568-575.
7. BEAUCHAMP, G., KEAST, R., MOREL, D., LIN, J., PIKA, J., HAN, Q. et al. Ibuprofen-like activity in extra virgin olive oil. *Nature*. **2005**, 437, 45-46.
8. BENITO, M., LASA, J.M., GRACIA, P., ORIA, R., ABENOZA, M., SÁNCHEZ-GIMENO, A.C. Evolution of phenols and pigments in extra virgin olive oil from irrigated super-intensive orchard. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2012**, 114 (5), 558-567.
9. BIANCHI, G., POZZI, N., VLAHOV, G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry*. **1994**, 37, 205-207.

10. BIANCHI, G., VLAHOV, G., ANGLONI, C., MURELLI, C. Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry*. **1993**, 32, 49-52.
11. BIANCHI, G., MURELLI, C., VLAHOV, G. Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*. **1992**, 31 (10), 3503-3506.
12. BIANCO, A., LO SCALZO, R., SCARPATI, M.L. Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone. *Phytochemistry*. **1993**, 32, 455-457.
13. BRENES, M., GARCÍA, A., RIOS, J.J., GARCÍA, P., GARRIDO, A. Use of 1- acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science & Technology*. **2002**, 37, 615-623.
14. BRIANTE, R., PATUMI, M., LIMONGELLI, S., FEBBRAIO, F., VACCARO, C., DI SALLE, A., LA CARA, F., NUCCI, R. Changes in Phenolic and Enzymatic Activities Content during Fruit Ripening in Two Italian Cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*. **2002**, 162, 791-798.
15. BUCELLI, P., COSTANTINI, E. A. C., BARBETTI, R., FRANCHINI, E. Soil water availability in rainfed cultivation affects more than cultivar some nutraceutical components and the sensory profile of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59 (15), 8304-8313.
16. CATALDI, T.R.I., MARGIOTTA, G., IASI, L., DI CHIO, B., XILOYANNIS, C., BUFO, S.A. Determination of sugar compounds in olive plant extracts by Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Chemistry*. **2000**, 72, 16.
17. CAYUELA, M.L., BERNAL, M.P., ROIG, A. Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science & Utilization*. **2004**, 12, 130-136.
18. CHAZAU-GILLING, S. The Civilization of the Olive Tree and Cereals. *Olivae*. **1994**, 53, 14-22.

19. CIMATO, A., MODI, G., MATTEI, A., NICCOLAI, M., ALESSANDRI, S. La caratterizzazione de'll olio tipico Toscano. Il anno di ricerca. *Croevott.* **1991**, 1-156.
20. CRIADO, M.N., MORELLÓ, J.R., MOTILVA, M.J., ROMERO, M.P. Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* **2004**, 81 (7), 633-640.
21. CUNHA, S.; FERREIRA ISABEL, M.P.L.V.O.; FERNANDES, J.O.; FARIA, M.A.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P.P. Determination of lactic, acetic, succinic and citric acids in table olive by HPLC/UV. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* **2001**, 24, 1029-1038.
22. DABBOU, S., RJIBA, I., ECHBILI, A., GAZZAH, N., MECHRI, B., HAMMAMI, M. Effect of controlled crossing on the triglyceride and fatty acid composition of virgin olive oils. *Chemistry and Biodiversity.* **2010**, 7 (7), 1801-1813.
23. DELLA RAGIONE, F.D., CUCCILLA, V., BORRIELLO, A., PIETRA, V.D., PONTONI, G. et al. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **2000**, 278(3), 733-9.
24. ESTI, M., CINQUANTA, L., LANOTTE, E. Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **1998**, 46, 32-35.
25. FABIANI, R., DE BARTOLOMEO, A., ROSIGNOLI, P., SERVILI, M., MONTEDORO, G.F., MOROZZI, G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention.* **2002**; 11(4), 351-8.
26. FERNÁNDEZ-NAVARRO, M., PERAGÓN, J., ESTEBAN, F.J., AMORES, V., DE LA HIGUERA, M., LUPIÁÑEZ, J.A. Maslinic acid: A component of olive oil on growth and protein-turnover rates. *Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson, editors, Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Oxford: Academic Press.* **2010**, 1415-1421.

27. FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., RODRÍGUEZ, G., RODRÍGUEZ, R., GUILLÉN, R., JIMÉNEZ, A. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites*. **2006**, 57 (1), 95-106.
28. FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., RODRÍGUEZ, R., GUILLÉN, R., JIMÉNEZ, A., HEREDIA, A. Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum*. **1995**, 93, 651-658.
29. FLORA, L., MADORE, M. Stachyose and manitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta*. **1993**, Vol. 189, 484-490.
30. FRANCIA, C., LISSERA, G., BATTELLINO, L.J. Efecto de polialcoholes sobre la formación de película adquirida y de placa bacteriana bajo condiciones in situ. *Medicina Oral*. **2004**, 6(2), 47-53.
31. FOGHER, C., BUSCONI, M., SEBASTIANI, L., BRACCI, T. Olive Genomics. *Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson, editors, Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Oxford: Academic Press. **2010**, 17.
32. GHANBARI, R., ANWAR, F., ALKHARFY, K.M., GILANI, A.H., SAARI, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. **2012**, 13, 3291-3340.
33. GIKAS, E., BAZOTI, N., TSARBOPOULOS, A. Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europaea*. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. **2007**, 821, 125-132.
34. GÓMEZ DEL CAMPO, M., BARRANCO, D. Situación del olivar en España y el seguro agrario. **2009**. Recuperado 13 octubre 2016, de http://aplicaciones.magrama.es/documentos_pwe/seminarios/olivar_upm.pdf
35. GÓMEZ-RICO, A., FREGAPANE, G., SALVADOR, M.D. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*. **2008**, 41 (4), 433-440.

36. GÓMEZ-RICO, A., SALVADOR, M.D., MORIANA, A., PÉREZ, D., OLMEDILLA, N., RIBAS, F., FREGAPANE, G. Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. Olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*. **2007**, 100 (2), 568-578.
37. GUILLÉN, R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., HEREDIA, A. Evolución de componentes de aceituna (variedad Hojiblanca) durante la maduración. *Grasas y Aceites*. **1993**, 44 (3), 201-203.
38. GUINDA, A., CASTELLANO, J.M., SANTOS-LOZANO, J.M., DELGADO-HERVÁS, T., GUTIÉRREZ-ADÁNEZ, P., RADA, M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *BWT-Food Science and Technology*. **2015**, 1-8.
39. GUINDA, A., RADA, M., DELGADO, T., GUTIÉRREZ-ADÁNEZ, P., CASTELLANO, J.M. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 9685-9691.
40. HUMPHREY, A.J., BEALE, M.H. Terpenes, in Crozier A, Ashihara H and Clifford MN (Eds). *Plant secondary Metabolites and the Human Diet*, Oxford, Blackwell. **2006**, 208-302.
41. ISSAOUI, M., FLAMINI, G., BRAHMI, F., DABBOU, S., HASSINE, K. B., TAAMALI, A., CHEHAB, H., ELLOUZ, M., ZARROUK, M., HAMMAMI, M. Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry*. **2010**, 119 (1), 220-225.
42. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE DE CASTRO, M.D. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 4584-4588.
43. KEHRER, J.P., SMITH, C.V. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In: *Natural antioxidants*. Frej, B., ed. San Diego, Academic Press. **1994**, pp 25-62.
44. LIMIROLI, R., CONSONNI, R., OTTOLINA, G., MARSILIO, V., BIANCHI, G., ZETTA, L. H and C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **1995**, 1, 1519-1523.

45. LÓPEZ CARRERAS, N., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. **2012**. 32(3), 81-91.
46. LOZANO-MENA, G., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, M., JUAN, E., PLANAS, J.M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives: a promising nutraceutical? *Molecules*. **2014**. 19, 11538-11559.
47. MAFRA, I., LANZA, B., REIS, A., MARSILIO, V., CAMPESTRE, C., DE ANGELIS, M., COIMBRA, M.A. Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiologia Plantarum*. **2001**, 111, 439-447.
48. MARSILIO, V., CAMPESTRE, C., LANZA, B., DE ANGELIS, M. Sugar and polyol composition of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry*. **2001**, 72, 485-490.
49. MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J., ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*. **2000**, 50 (1), 5-18.
50. MIRÓ-CASAS, E., COVAS, M., FITÓ, M., FARRÉ-ALBADALEJO, M., MARRUGAT, J., DE LA TORRE, R. *Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans*. *European journal of clinical nutrition*. **2003**. 57 (1), 186-190.
51. MORELLÓ, R., ROMERO, M., MOTILVA, M. Effect of the Maturation of the Olive Fruit on the Phenolic Fraction of Drupes and Oils From Arbequina, Farga, and Morrut Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 6002-6009.
52. MORELLÓ, J.R., MOTILVA, M.J., RAMO, T., ROMERO, M.P. Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. *Food Chemistry*. **2003**, 81 (4), 547-553.
53. MONTAÑO, A., SÁNCHEZ, A.H., LÓPEZ-LÓPEZ, A., DE CASTRO, A., REJANO, L. Chemical Composition of Fermented Green Olives: Acidity, Salt, Moisture, Fat, Protein, Ash, Fiber, Sugar, and Polyphenol. *Victor R.*

Preedy and Ronald Ross Watson, editors, Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Oxford: Academic Press. 2010, 291-292.

54. MONTECORO, G., SERVILI, M., BALDIOLI, M., SELVAGGINI, R., MINIATI, E., MACCHIONI, A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1993**, 41 (11), 2228-2234.
55. MOUSA, Y.M., GERASOPOULOS, D., METZIDAKIS, I., KIRITSAKIS, A. Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1996**, 71 (3), 345-350.
56. OBIED, H.K., PRENZLER, P.D., ROBARDS, K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chemistry*. **2008**, 111, 171-178.
57. ORTEGA-GARCÍA, F., PERAGÓN, J. Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57 (21), 10331- 10340.
58. PALESE, A.M., NUZZO, V., FAVATI, F., PIETRAFESA, A., CELANO, G., XILOYANNIS, C. Effects of water deficit on the vegetative response, yield and oil quality of olive trees (*Olea europaea* L., cv Coratina) grown under intensive cultivation. *Scientia Horticulturae*. **2010**, 125 (3), 222-229.
59. PENG, W., DING, F., JIANG, Y.T., PENG, Y.K. Bioavailability and activity of natural food additive triterpenoids as influenced by protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62, 2271-2283.
60. PÉREZ-CAMINO, M.C., CERT, A. Quantitative determination of hydroxyl pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47, 1558-1562.
61. POITR, K., KADKIN, O., OSAJDA, K., BARBER, T.A. Polyester Polyols: Synthesis and Characterization of Diethylene Glycol Terephthalate Oligomers. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. **2003**. 41, 1114-1123.

62. RADA, P., AVENA, N.M., HOEBEL, B.G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience*. **2005**, 134, 737-744.
63. RANALLI, A., MARCHEGIANI, D., CONTENUTO, S., GIRARDI, F., NICOLOSI, M.P., BRULLO, M.D. Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2009**, 111, 678-687.
64. RIPA, V., DE ROSE, F., CARAVITA, M. A., PARISE, M. R., PERRI, E., ROSATI, A., PANDOLFI, S., PAOLETTI, A., PANNELLI, G., PADULA, G., GIORDANI, E., BELLINI, E., BUCCOLIERO, A., MENNONE, C. Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*. **2008**, 22 (2), 95-103.
65. REYES, F.J., CENTELLES, J.J., LUPIÁÑEZ, J.A., CASCANTE, M. (2 α , 3 β)-2,3- Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Letters*. **2006**, 580, 6302-6310.
66. ROMERO, M.P., TOVAR, M.J., RAMO, T., MOTILVA, M.J. Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "Les Garrigues". *Journal of the American Oil Chemist's Society*. **2003**, 80 (5), 423-430.
67. RYAN, D., ROBARDS, K., PRENZLER, P., JARDINE, D., HERLT, T., ANTOLOVICH, M. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 855, 529-537.
68. SÁNCHEZ-QUESADA, C., LÓPEZ-BIEDMA, A., GAFORIO, J.J. Oleanolic acid, a compound present in grapes and olives, protects against genotoxicity in human mammary epithelial cells. *Molecules*. **2015**. 20, 13670-13688.

69. SAVARESE, M., DE MARCO, E., SACCHI, R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. *Pisciottana*) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2007**, 105, 761-770
70. SCHIWECK, H., BÄR, A., VOGEL, R., SCHWARZ, E., KUNZ, M., DUSAUTOIS, C., CLEMENT, A., LEFRANC, C., LÜSSEM, B., MOSER, M., PETERS, S. Sugar Alcohols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
71. SERVILI, M., TATICCHI, A., ESPOSTO, S., URBANI, S., SELVAGGINI, R., MONTEDORO, G.F. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 7028-7035.
72. SHENG, G.Q., ZHANG, J.R., PU, X.P., MA, J., LI, C.L. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*. **2002**, 451, 119-124.
73. SOLER-RIVAS, C., EPSIN, J.C., WICHERS, H.J. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80, 1013-1023.
74. STITI, N., TRIKI, S., HARTMANN, M. Formation of triterpenoids throughout *olea europaea*. **2007**. *Fruit Ontogeny*.
75. STOOPE J., WILLIAMSON J., PHARR D. Mannitol metabolism: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*. **1996**, 1, 139-144.
76. TALHAOUI, N., GÓMEZ-CARAVACA, A.M., LEÓN, L., DE LA ROSA, R., FERNÁNDEZ- GUTIÉRREZ, A., SEGURA-CARRETERO, A. Pattern of variation of fruit traits and phenol content in olive fruits from six different cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015**, 63, 10466-10476.
77. TANGNEY, C.C., RASMUSSEN, H.E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*. **2013**, 15 (5), 324.

78. TEORODO, T., ZHANG, L., ALEXANDER, T., YUE, J., VRANIC, M., VOLCHIK, A. Oleonic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Letters*. **2008**, 582, 1375-1380.
79. TURA, D., FAILLA, O., PEDÒ, S., GIGLIOTTI, C., BASSI, D., SERRAIOCCO, A. Effects of seasonal weather variability on olive oil composition in northern Italy. *Acta Horticulturae*. **2008**, 791, 769-776.
80. VÁZQUEZ-RONCERO, A., JANER, M.L. Ácidos triterpénicos del olivo (Triterpenoid acids of the olive tree). *Grasas y Aceites*. **1969**, 20, 133-138.
81. VINHA, A.F., FERRERES, F., SILVA, B.M., VALENTÃO, P., GONÇALVES, A., PEREIRA, J.A., OLIVEIRA, M.B., SEABRA, R.M., ANDRADE, P.B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*. **2005**, 89, 561-568.
82. WANG, W., TAI, F., HU, X. Current Initiatives in Proteomics of the Olive Tree. *Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson, editors, Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Oxford: Academic Press*. **2010**, 25.
83. WAKAI, K., DATE, C., FUKUI, M., TAMAKOSHI, K., WATANABE, Y., HAYAKAWA, N., KOJIMA, M., KAWADO, M., SUZUKI, K., HASHIMOTO, S., TOKUDOME, S., OZASA, K., SUZUKI, S., TOYOSHIMA, H., ITO, Y., TAMAKOSHI, A. Dietary fiber and risk of colorectal cancer in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **2007**, 16, 668-675.

8 ANEXO

8.1 Análisis de los compuestos triperpénicos por Cromatografía Gaseosa

La identificación y cuantificación de triterpenos se llevó a cabo paralelamente mediante el método previamente establecido en el laboratorio AGR-130 (Guinda et al. 2010). Se inyectó un microlitro del extracto etanólico bruto sililado en un GC Agilent 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), equipado con una columna Crossbond capilar Rtx-65TG (30 m 0,25 mm ID, espesor de película de 0,1 mm) recubierto con 35%-dimetil-65% diphenyl polysiloxano fase estacionaria (Restek, Co, Bellefonte, PA) y un detector FID. Se utilizó hidrógeno como gas portador (presión en la cabeza de columna 140 kPa). La temperatura del horno se estableció y mantuvo a 260 °C durante el análisis. Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron isotérmicamente a 300 °C. Las muestras se analizaron por duplicado.

En la Figura 13 se muestra un ejemplo del cromatograma obtenido por cromatografía de gases resultado del análisis de los ácidos triperpénicos en el extracto etanólico bruto. La comparación del contenido en terpenos del extracto completo con el contenido recuperado por el método propuesto no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$; datos no mostrados).

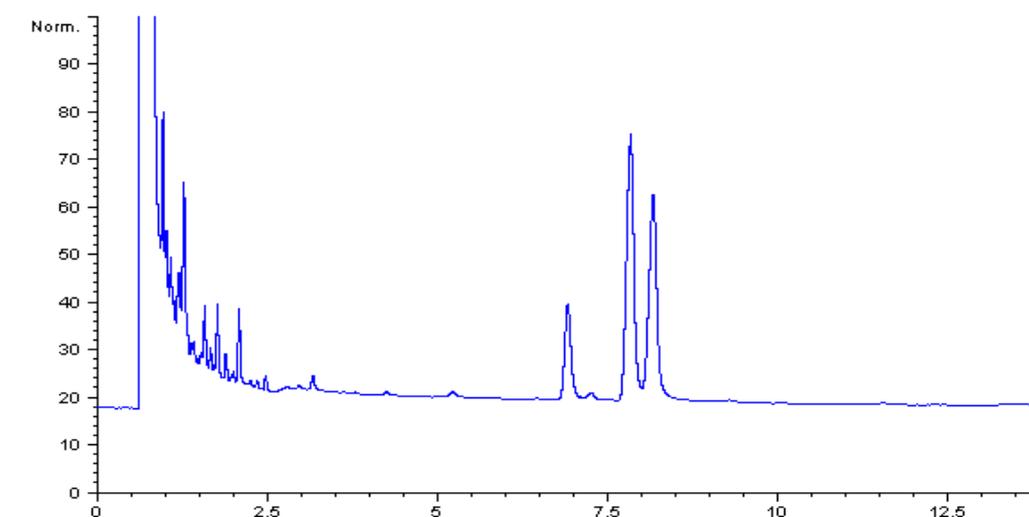


Figura 13. Gas cromatograma del extracto de las aceitunas CV Picual. Compuestos por orden de elución: ácido oleanólico; ácido ursólico (partrón interno) y ácido maslínico [RT= 6.8min; 7.7min y 8.2min, respectivamente].