



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ingeniería Agrícola - Programa de Magíster en Ingeniería Agrícola

## **Obtención de Extractos con Potencial Actividad Antioxidante a Partir de Madera de Poda de Olivo.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ingeniería Agrícola con  
Mención en Agroindustrias.

PAMELA ANDREA GONZÁLEZ FUENTES  
CHILLÁN-CHILE  
2015

Profesor Guía: Dr. Christian Folch Cano  
Dpto. de Agroindustrias, Facultad de Ingeniería Agrícola  
Universidad de Concepción

**“Obtención de Extractos con Potencial Actividad Antioxidante a Partir de Madera de Poda de Olivo”.**

Aprobada por la comisión:

Christian Folch Cano  
Dr. en Química  
Profesor de Química y Cs. Naturales

---

Profesor guía

Claudia Tramón Pregnam  
Dra. en Ingeniería Química  
Ingeniero Civil Químico

---

Evaluadora interna

Claudio Olea Azar  
Dr. en Ciencias mención Química  
Profesor de Estado en Química

---

Evaluador externo

Johannes De Brujin  
Dr. en Ingeniería Química  
Mg. en Biotecnología

---

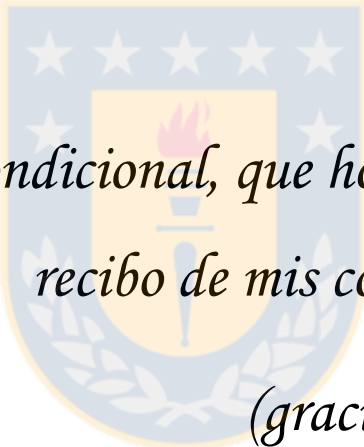
Evaluador interno

María Eugenia González  
Dra. en Ciencia de Los Alimentos

---

Directora de Programa  
de Magister en Ingeniería Agrícola

**DEDICATORIA.**



*Al amor incondicional, que hoy y todos los días,  
recibo de mis compañeros de viaje  
(graciaaaassssss !!!!!!!!)*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Christian Folch por aceptar ser mi profesor guía y permitir la ejecución de la presente investigación a través del proyecto FONDECYT no. 11140256.

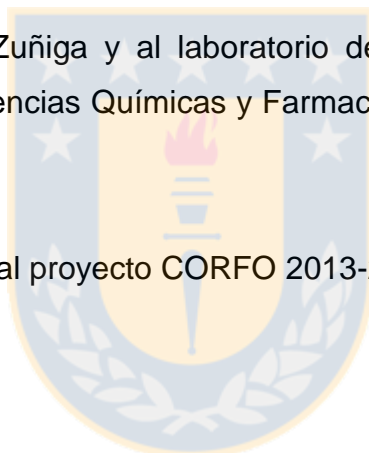
A CONICYT-Chile y a la Escuela de Postgrado de la Universidad de Concepción por las becas otorgadas para la obtención del grado de Magíster.

A la profesora Cristina Loyola y al laboratorio de Control de Calidad del departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad de Concepción.

A la Dra. María Carolina Zuñiga y al laboratorio de Antioxidantes y Radicales Libres de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

A la Dra. Claudia Tramón y al proyecto CORFO 2013-25416-Innova\_Producción.

A Arauco S.A.



## RESUMEN.

En Chile, durante el año 2014, se estima que fueron generadas 29600 ton de biomasa lignocelulósica provenientes de la poda del olivo. Estos subproductos, compuestos por hojas y madera, son tratados como residuos y eliminados en los terrenos de cultivo a través de incineración. La composición química de los árboles de olivo muestra la presencia de algunos compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes en ellos, principalmente oleuropeína e hidroxitirosol. Los compuestos fenólicos de hoja de olivo han probado tener efectos preventivos contra enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer (Rahmanain *et al.*, 2015; Altioik *et al.* 2008; Conde *et al.*, 2009).

Este trabajo se centra en la evaluación de la producción de un extracto desde la madera de poda de olivo (MPO) con antioxidantes naturales de alta calidad y su aplicación para evitar la oxidación de los aceites vegetales.

La extracción de antioxidantes desde MPO se optimizó a través del empleo de MPO fresca o seca, diferentes masas iniciales y diferentes tiempos de extracción.

Para la evaluación antioxidante de los extractos de MPO (eMPO), se llevaron a cabo los ensayos de apagamiento del radical DPPH y el ensayo de ORAC-FL. Además, se obtuvo el perfil fenólico del eMPO por HPLC-DAD y la composición de fenoles totales se cuantificó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

El eMPO seca de 4 horas de extracción mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y una mayor capacidad antioxidante que el extracto obtenido de MPO fresca. Ambos extractos mostraron los mismos perfiles de HPLC, pero el eMPO obtenido a partir de MPO seca mostró las mayores concentraciones de catequina y oleuropeína.

El eMPO optimizado mostró actividad contra la oxidación de lípidos de aceite de maravilla para calentamiento suave en microondas. En condiciones de alta temperatura y/o concentración, los resultados sugieren que puede presentar el efecto contrario.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>      |
| 1.1. Problemática.....  | 3             |
| 1.2. Justificación.....   | 4             |
| 1.2.1. Composición fenólica de los subproductos del olivo.....                        | 4             |
| 1.2.2. Métodos de extracción de compuestos fenólicos desde subproductos de olivo..... | 9             |
| 1.2.3. Propiedades benéficas de los extractos de olivo.....                           | 11            |
| 1.2.4. Extractos de olivo en alimentos.....   | 14            |
| 1.3. Hipótesis.....   | 18            |
| 1.4. Objetivos.....   | 18            |
| 1.4.1. General.....   | 18            |
| 1.4.2. Específicos. ....  | 18            |
| <b>2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>  | <b>19</b>     |
| 2.1. Antioxidantes.....   | 19            |
| 2.2. Mecanismos de reacción de los antioxidantes.....                                 | 21            |
| 2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos .....                                     | 22            |
| 2.4. Actividad antioxidante .....   | 23            |
| 2.5. Capacidad antioxidante .....   | 24            |
| 2.6. Inhibición de la oxidación lipídica.....   | 24            |
| 2.7. Caracterización de antioxidantes.....  | 25            |
| <b>3. MATERIALES.....</b>   | <b>29</b>     |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>4.</b> | <b>METODOLOGÍAS.....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1.      | Muestreo.....   | 32        |
| 4.2.      | Acondicionamiento.....  | 32        |
| 4.2.1.    | Separación.....   | 32        |
| 4.2.2.    | Molienda y tamizado.....  | 33        |
| 4.2.3.    | Secado.....   | 34        |
| 4.3.      | Extracción de antioxidantes.....  | 34        |
| 4.4.      | Contenido de fenoles totales.....   | 35        |
| 4.5.      | Evaluación de la actividad antioxidante.....                              | 36        |
| 4.5.1.    | Prueba de apagamiento de radicales DPPH.....                              | 36        |
| 4.6.      | Evaluación de la capacidad antioxidante.....                              | 37        |
| 4.6.1.    | Capacidad de absorción de radicales oxígeno – fluoresceína (ORAC-FL)..... | 37        |
| 4.7.      | Inhibición de oxidación lipídica.....                                     | 38        |
| 4.7.1.    | Evaluación en microondas.....   | 38        |
| 4.7.2.    | Evaluación en estufa de aire forzado.....                                 | 38        |
| 4.8.      | Caracterización de antioxidantes por HPLC.....                            | 39        |
| 4.9.      | Diseño estadístico.....   | 40        |
| <br>      |   |           |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>                                      | <b>42</b> |
| 5.1.      | Acondicionamiento.....  | 42        |
| 5.1.1.    | Separación.....   | 42        |
| 5.1.2.    | Secado.....   | 43        |
| 5.2.      | Resultados preliminares.....  | 43        |
| 5.3.      | Extracción de antioxidantes.....  | 45        |
| 5.4.      | Contenido de fenoles totales.....   | 53        |
| 5.5.      | Evaluación de la actividad antioxidante.....                              | 56        |
| 5.5.1.    | Prueba de apagamiento de radicales DPPH.....                              | 56        |
| 5.6.      | Evaluación de la capacidad antioxidante.....                              | 61        |
| 5.6.1.    | Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC-FL)..                   | 61        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.7.      | Análisis multivariado.....                     | 66        |
| 5.8.      | Inhibición de oxidación lipídica.....          | 68        |
| 5.8.1.    | Evaluación en microondas.....                  | 68        |
| 5.8.2.    | Evaluación en estufa de aire forzado.....      | 80        |
| 5.9.      | Caracterización de antioxidantes por HPLC..... | 83        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>                       | <b>89</b> |
| <b>7.</b> | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>         | <b>91</b> |





## ÍNDICE DE FIGURAS.

|           |   | <b>Página</b> |
|-----------|---|---------------|
| Figura 1  | Zonas edafoclimáticas aptas para el cultivo de olivos a nivel mundial (franja amarilla) y localización de las mayores plantaciones (puntos verdes)..... | 1             |
| Figura 2  | Superficie destinada al cultivo del olivo en Chile.....   | 2             |
| Figura 3  | Molécula de OL.....   | 8             |
| Figura 4  | Molécula de HT.....   | 8             |
| Figura 5  | Representación esquemática de las metodologías propuestas en este estudio.....  | 31            |
| Figura 6  | Zona de muestreo de olivos (izquierda), muestreo (derecha).....   | 32            |
| Figura 7  | Subproductos de poda de olivo (izquierda), hojas (medio) y MPO (derecha).....   | 33            |
| Figura 8  | MPO molida en el molino de martillos (izquierda) y MPO luego del tamizado (derecha).....  | 33            |
| Figura 9  | Extracciones de MPO (izquierda y centro). eMPO (derecha).....   | 35            |
| Figura 10 | Curva de calibración con ácido gálico.....  | 36            |
| Figura 11 | Curva de calibración de CT .....  | 39            |
| Figura 12 | Curva de calibración de OL. ....  | 40            |
| Figura 13 | Rendimientos de extracción como % m/m a partir de muestras frescas y secas de 3 g. ....   | 46            |
| Figura 14 | Rendimientos de extracción como % m/m a partir de muestras frescas y secas de 1 g. ....   | 47            |
| Figura 15 | Box-plot rendimientos de extracción a partir de muestras de MPO fresca y seca de 1 y 3 g.....   | 48            |
| Figura 16 | Rendimientos en extracciones de 2, 4 y 8 h a partir de 1 y 3 g de MPO fresca y seca.....  | 49            |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 17 | Rendimientos de extracción según empleo de MPO fresca o seca.....   | 50 |
| Figura 18 | Rendimientos de extracción según tiempo empleado.   | 51 |
| Figura 19 | Rendimientos de extracción según masa de muestra empleada.....  | 52 |
| Figura 20 | Contenido de compuestos fenólicos según empleo de MPO fresco o seca y tiempo de extracción.   | 54 |
| Figura 21 | Gráficas de apagamiento del radical DPPH de un eMPO fresca con 2 h de extracción.....   | 57 |
| Figura 22 | Valores IC <sub>50</sub> registrados para los eMPOs según tipo de muestra utilizada y tiempo de extracción.....                             | 58 |
| Figura 23 | Valores IC <sub>50</sub> (mg) de los eMPOs según estado de la materia prima.....  | 59 |
| Figura 24 | Valores IC <sub>50</sub> (mg) de los eMPOs según tiempo de extracción.....  | 60 |
| Figura 25 | Gráficas de apagamiento de fluorescencia en el ensayo ORAC, eMPO seca (azul) y fresca (verde) con 4 h de extracción, y blanco (rojo).....   | 62 |
| Figura 26 | Valores ORAC establecidos para los eMPOs.....   | 63 |
| Figura 27 | Valores ORAC de los eMPOs según estado de la materia prima. ....  | 64 |
| Figura 28 | Valores ORAC de los eMPOs según tiempo de extracción. ....  | 64 |
| Figura 29 | Correlación entre los valores de capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos presentados por los eMPOs.....               | 65 |
| Figura 30 | Gráficos de estrellas descriptores de las variables actividad antioxidante, capacidad antioxidante y contenido de fenoles en los eMPOs..... | 67 |
| Figura 31 | Efecto de la adición de 10, 50 y 100 $\mu$ L de eMPOs fresca y seca de 4 h en el IP de aceites.....   | 69 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 32 | IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 1 min de calentamiento en microondas. ....                                       | 71 |
| Figura 33 | IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 3 min de calentamiento en microondas.....  | 72 |
| Figura 34 | IPs normalizados de aceites con eMPOs luego de 5 min de calentamiento en microondas.....                                    | 73 |
| Figura 35 | IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 10 min de calentamiento en microondas.....                                       | 75 |
| Figura 36 | IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 15 min de calentamiento en microondas.....                                       | 76 |
| Figura 37 | IPs normalizados de aceites con eMPOs calentados en microondas (B= blancos, S= seca, F= fresca).....                        | 77 |
| Figura 38 | Efecto del calentamiento en microondas de algunos compuestos fenólicos del aceite de oliva. ....                            | 78 |
| Figura 39 | IP aceites con eMPOs (S = seca, B= blanco) calentados en estufa a $55 \pm 4^{\circ}\text{C}$ por 2, 4, 8 Y 16 h.            | 81 |
| Figura 40 | IP aceites con eMPO calentados en estufa a $55 \pm 4^{\circ}\text{C}$ por 2, 4, 8 Y 16 h.                                   | 82 |
| Figura 41 | Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 4 h de extracción.....   | 83 |
| Figura 42 | Cromatograma a 230 nm de eMPO fresca con 4 h de extracción.....   | 84 |
| Figura 43 | Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 2 h de extracción.....   | 86 |
| Figura 44 | Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 4 h de extracción. Posibles compuestos presentes en el extracto: 2, 3, 4, 5 y 7..... | 88 |

## ÍNDICE DE TABLAS.

|          |   | Página |
|----------|---|--------|
| Tabla 1  | Antecedentes de composición fenólica de extractos de hoja de olivo.....   | 6      |
| Tabla 2  | Antecedentes de composición fenólica de extractos de madera de olivo.....   | 7      |
| Tabla 3  | Resultados ensayo ABTS en hojas de olivo.....   | 12     |
| Tabla 4  | Descripción de procedimientos empleados en la caracterización de compuestos fenólicos en extractos de olivos..... | 27     |
| Tabla 5  | Extracciones.....   | 34     |
| Tabla 6  | Constitución del subproducto de MPO.....  | 42     |
| Tabla 7  | Humedad de las muestras de MPO según destino.....   | 43     |
| Tabla 8  | Rendimientos de extracción (% m/m) a partir de MPO fresca y seca en muestras de 3 g.....                          | 45     |
| Tabla 9  | Rendimientos de extracción como % m/m a partir de MPO fresca y seca en muestras de 1 g.....                       | 47     |
| Tabla 10 | Contenido de fenoles totales eMPOs seca y fresca de 1 g.....  | 53     |
| Tabla 11 | Valores IC <sub>50</sub> (mg) de los eMPOs.....   | 58     |
| Tabla 12 | Valores ORAC registrados para los eMPOs.....  | 62     |
| Tabla 13 | Efecto de la adición de 10, 50 y 100 µL de eMPOs fresca y seca de 4 h en el IP de aceites.....                    | 69     |
| Tabla 14 | IP e IP normalizado (IP/IP <sub>0</sub> ) de aceites con eMPOs tras 1 minuto de calentamiento en microondas.....  | 70     |
| Tabla 15 | IP e IP normalizado (IP/IP <sub>0</sub> ) de aceites con eMPOs tras 3 min de calentamiento en microondas.....     | 71     |
| Tabla 16 | IP e IP normalizado (IP/IP <sub>0</sub> ) de aceites con eMPOs  |        |

|          |  |    |
|----------|--|----|
|          | tras 5 min de calentamiento en microondas.....   | 73 |
| Tabla 17 | IP e IP normalizado (IP/IP <sub>0</sub> ) de aceites con eMPOs tras 10 min de calentamiento en microondas..... | 74 |
| Tabla 18 | IP e IP normalizado (IP/IP <sub>0</sub> ) de aceites con eMPOs tras 15 min de calentamiento en microondas..... | 75 |
| Tabla 19 | IPs de aceites con 10 y 100 μL de eMPOs tras calentamiento en estufa.....                                      | 80 |



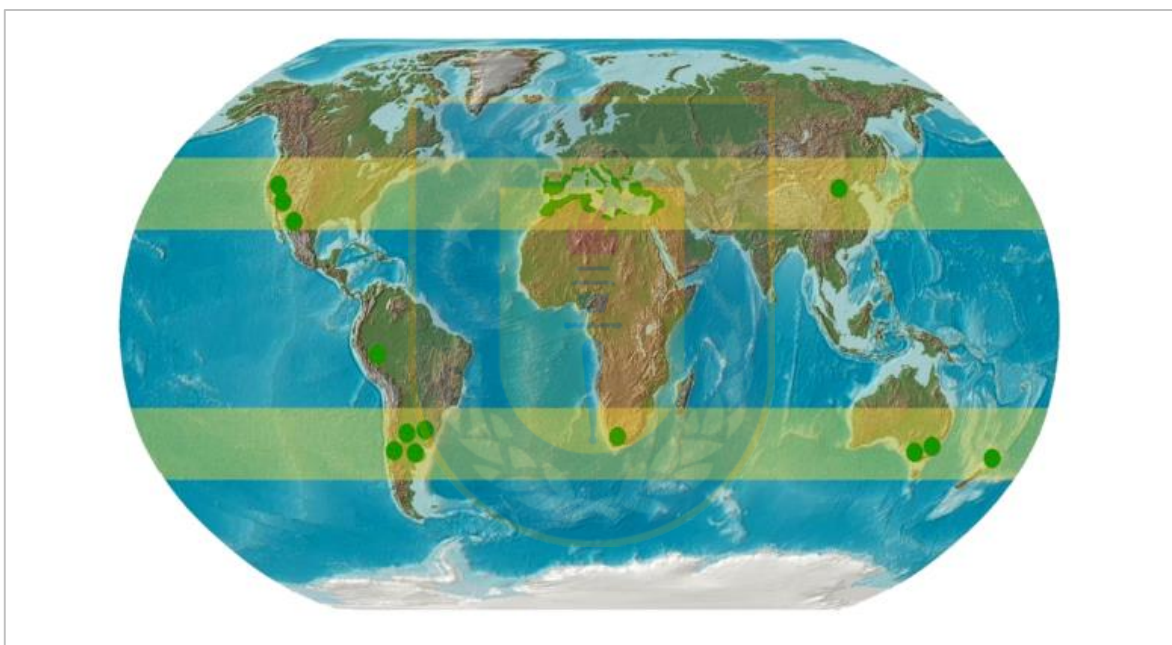
## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

|      |  |
|------|--|
| HT   | : Hidroxitirosol.                      |
| OL   | : Oleuropeína.                         |
| CT   | : Catequina.                           |
| MPO  | : Madera de poda de olivo.             |
| eMPO | : Extracto de madera de poda de olivo. |
| IP   | : Índice de peróxidos                  |
| EAG  | : Equivalentes de ácido gálico.        |
| TX   | : Trolox.                              |



## 1. INTRODUCCIÓN.

El olivo, *Olea europaea L.*, pertenece a la familia botánica Oleaceae, la cual comprende especies distribuidas por las regiones templadas del planeta (Figura 1). En el año 2010 la superficie destinada al cultivo de olivos a nivel mundial fue de más de nueve millones de hectáreas, localizándose las mayores plantaciones en los países de España (22%), Túnez (17,5%), Italia (12,7%), Grecia (8,9%) y Turquía (8,8%), representado el área dedicada en Chile a su cultivo un 0.14% (Cazanga *et al.*, 2013).

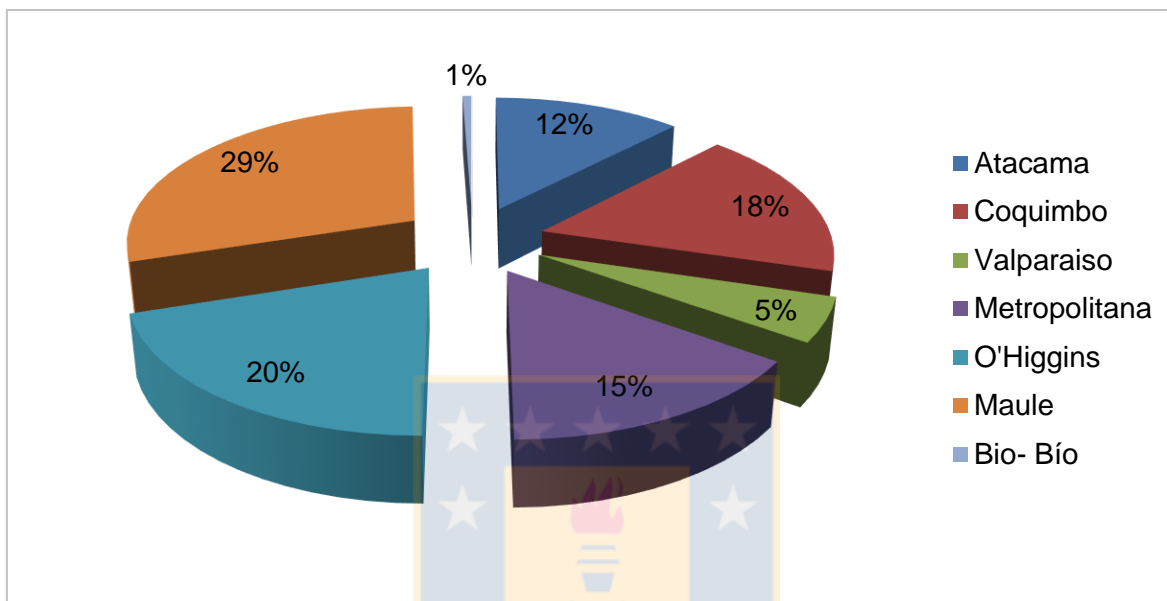


**Figura 1.** Zonas edafoclimáticas aptas para el cultivo de olivos a nivel mundial (franja amarilla) y localización de las mayores plantaciones (puntos verdes).

Fuente: Navarrete *et al.*, 2010.

El cultivo del olivo en Chile está distribuido de manera extensa abarcando desde climas desérticos como el de la región de Arica y Parinacota, hasta climas mediterráneos lluviosos como el de las regiones del Biobío y La Araucanía (Cazanga *et al.*, 2013).

De acuerdo al Catastro Frutícola realizado en Julio de 2014 la superficie nacional destinada a la producción de olivos es de 19736,7 hectáreas (Figura 2), concentradas en la región del Maule con un 29%, y en la región del Libertador Bernardo O'Higgins con un 20% (ODEPA y CIREN).



**Figura 2.** Superficie destinada al cultivo del olivo en Chile.

Las principales variedades de olivo presentes en Chile son arbequino, frantoio y picual, siendo las tres variedades de aptitud aceitera.

La variedad Arbequino representa cerca del 70 % de las variedades cultivadas en Chile. Genera un fruto de tamaño pequeño (1,4 a 1,7 g) cuya maduración ocurre desde la segunda quincena de abril a mayo. Su rendimiento en la producción de aceite va del 15 al 18 %, y comúnmente es usado como base en las mezclas de diferentes variedades ya que produce un aceite suave de frutado ligero.



Picual representa aproximadamente el 20 % de las variedades cultivadas en Chile. Produce un fruto mediano (3,0 a 3,5 g) por lo que es considerada de doble propósito, es decir, apropiada para su consumo como aceituna o como aceite. La maduración de los frutos va desde fines de mayo a primera quincena de junio. Su rendimiento en la producción de aceite va del 16 al 20 %.

La variedad Frantoio produce un fruto mediano (2,5 a 3,0 g). La maduración de sus frutos inicia desde la segunda quincena de mayo pudiendo llegar hasta fines de junio. Presenta un rendimiento en la producción de aceite que va del 18 al 22 % (Navarrete *et al.*, 2010).

### 1.1. Problemática.

La biomasa procedente de la poda del olivar resulta de la operación que se aplica a los árboles tras la recolección de los frutos para contribuir a mantener las copas perfectamente aireadas e iluminadas; la poda tiene además otra serie de beneficios como es alargar la vida del árbol, mantener equilibradas las funciones productiva y reproductiva, etc. (Sánchez *et al.*, 2002).

A nivel mundial se ha estimado que por cada hectárea de olivo en producción se generan tres toneladas de subproductos de poda al año (Conde *et al.*, 2009). Mientras que en Chile el Instituto Forestal (INFOR) estableció que por cada hectárea se originan 1,5 toneladas anuales. De acuerdo a esta última cifra, en nuestro país en el año 2014 se generaron 29600 toneladas de esta económica y renovable fuente de material lignocelulósico.

Los **subproductos** generados por la poda frecuentemente son tratados como desechos y eliminados en los terrenos de cultivo a través de incineración, aunque esta práctica conlleva una serie de inconvenientes tales como la propagación de plagas, mineralización del suelo, contaminación atmosférica, incremento de los riesgos de incendios, desprendimiento inútil de dióxido de carbono, etc.

Sólo en algunos pocos casos las ramas finas son aprovechadas incorporándolas al suelo tras su picado. Esta práctica se desarrolla con el doble objeto de elevar el nivel de materia orgánica del suelo y evitar las pérdidas de humedad del horizonte superficial. Sin embargo, cuenta con detractores debido a que dificulta la mecanización de otras labores y puede ocasionar problemas fitosanitarios debido a su lenta descomposición (Sánchez *et al.*, 2002).

## **1.2. Justificación.**

En países europeos, primordialmente en España, se han explorado usos alternativos a los subproductos generados por la poda del olivar. Algunos de ellos son: su fraccionamiento mediante hidrólisis para la generación de bioetanol (Manzanares *et al.*, 2011), obtención de productos de interés industrial como el xilitol (Martin *et al.*, 2010) y de gasificación (Sánchez *et al.*, 2002).

El empleo de los subproductos de poda del olivar en la generación de bioetanol implica la remoción de los compuestos fenólicos presentes en ellos, ya que estos presentan actividad antimicrobiana que inhibe los procesos fermentativos (que suelen ser los agentes principales para la generación del bioetanol), siendo considerados la fracción más conflictiva para el aprovechamiento de estos subproductos (Peralbo-Molina y Luque de Castro, 2013).

### **1.2.1. Composición fenólica de los subproductos del olivo.**

Las aceitunas contienen una serie de compuestos fenólicos con propiedades bioactivas entre los que destacan la oleuropeína (en adelante OL) y el hidroxitirosol (en adelante HT). Estos compuestos sobresalen porque están presentes sólo en frutos pertenecientes a la familia de las Oleaceae, mientras que los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y flavonoides (entre otros compuestos fenólicos) se encuentran en muchas otras frutas y verduras.

Diversos estudios sobre la composición química de las distintas partes del árbol de olivo reportan la presencia de compuestos fenólicos, principalmente OL y HT, no sólo en sus frutos sino también en sus hojas y madera (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006; Altiok *et al.*, 2008; Pérez-Bonilla *et al.*, 2011; Conde *et al.*, 2009; Bilgin y Şahin, 2013).

Las hojas (Tabla 1), que constituyen cerca del 10% en peso de los subproductos de poda del olivar (Rahmanian *et al.*, 2015; Bilgin y Şahin, 2013), presentan compuestos oleuropeósidos como la OL y el verbascosido, compuestos flavonoides como luteolina, luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetina-7-glucósido, diosmetina, rutina y catequina (CT). También presentan compuestos fenólicos simples como el tirosol, HT, vanilina, ácido vanílico y ácido cafeico. De todos los compuestos mencionados anteriormente, se ha evidenciado que el más abundante es la OL (Conde *et al.*, 2009; Altiok *et al.*, 2008; Pérez-Bonilla *et al.*, 2006).

La evaluación del rendimiento teórico de compuestos fenólicos en extractos de hojas de tres variedades distintas de olivos griegos (megaritiki, kalamon y koroneiki), obtenidos a través de procesos sucesivos de maceración con diferentes solventes, arrojó valores de 6094, 5579 y 6196 mg EAG/ kg de hoja seca respectivamente, relacionándose de manera positiva el contenido de compuestos fenólicos presente en los extractos con su actividad antioxidante (Kiritsakis *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Antecedentes de composición fenólica de extractos de hoja de olivo.

| <b>Autor</b>              | <b>Altiok <i>et al.</i><sup>a</sup></b> | <b>Rahmanian <i>et al.</i><sup>b</sup></b> | <b>Ahmad <i>et al.</i><sup>c</sup></b> | <b>Conde <i>et al.</i><sup>d</sup></b> |
|---------------------------|---|--|--|--|
| Informa:                  | % área del cromatograma                 | % en masa en hojas                         | Presencia                              | Presencia                              |
| HT                        | 2,27                                    | 1,5  | -                                      | ✓                                      |
| Tirosol                   | 1,85                                    | 0,7  | -                                      | ✓                                      |
| CT                        | 2,23                                    |  | -                                      | ✓                                      |
| Ácido cafeico             | 1,09                                    | -  | -                                      | ✓                                      |
| Ácido vanílico            | 3,08                                    | -  | -                                      | ✓                                      |
| Vanilina                  | 2,52                                    | -  | -                                      | ✓                                      |
| Rutina                    | 4,66                                    | -  | -                                      | ✓                                      |
| Luteolina-7-glucósido     | 1,92                                    | 1,4  | ✓ (8)                                  | ✓                                      |
| Verbascósido              | 6,10                                    | 1,1  | ✓ (10)                                 | ✓                                      |
| Apigenina-7-glucósido     | 2,30                                    | si   | ✓ (4)                                  | ✓                                      |
| Diosmetina-7-glucósido    | -                                       | -  | -                                      | ✓                                      |
| OL                        | 29,0                                    | 24,5                                       | ✓ (9)                                  | ✓                                      |
| Luteolina                 | 0,80                                    | -  | ✓ (3)                                  | ✓                                      |
| Diosmetina                | -                                       | -  | -                                      | ✓                                      |
| Cafeoil                   | -                                       | -  | ✓ (2)                                  | -                                      |
| Apigenina-6,8-diglucósido | -                                       | -  | ✓ (1)                                  | -                                      |
| Luteolina-7- rutinósido   | -                                       | -  | ✓ (5)                                  | -                                      |
| Apigenina rutinósido      | -                                       | -  | ✓ (6)                                  | -                                      |
| OL glucósido              | -                                       | -  | ✓ (7)                                  | -                                      |

a: Altiok *et al.*,(2008), Maceración con etanol acuoso al 70%.

b: Rahmanian *et al.*, (2015),Revisión.

c: Ahmad *et al* (2013), Maceración con etanol acuoso (números indican valores ascendentes según intensidad del peak en el cromatograma).

d: Conde *et al.*, (2009), Revisión.

La composición química de la madera de olivo ha sido estudiada, no obstante, los estudios se han centrado en partes robustas del árbol (12 cm de diámetro x 45 cm de largo, y 25 cm de diámetro x 70 cm de largo (Pérez-Bonilla *et al.*, 2006 y 2011, respectivamente)).

Los compuestos que se reportan en los extractos de madera de olivo se presentan en la Tabla 2, donde se han incorporado valores ascendentes según su abundancia en el cromatograma presentado por el autor. Según este reporte el compuesto que se encuentra en mayor cantidad es la OL, seguida por el ligustrósido y ciclooolivil.

**Tabla 2.** Antecedentes de composición fenólica de extractos de madera de olivo.

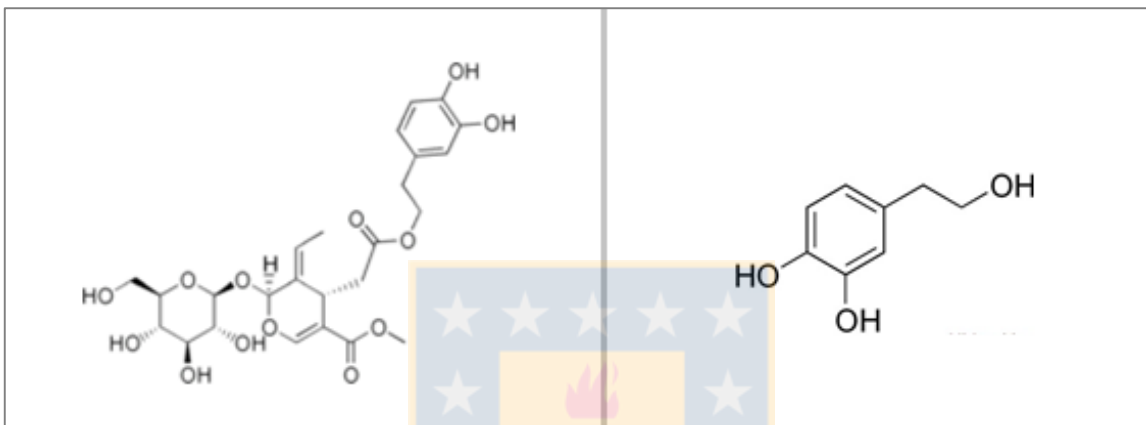
| <b>Autor</b><br>Informa: | <b>Pérez <i>et al.</i>, (2006)</b><br>Presencia* | <b>Conde <i>et al.</i>, (2009)</b><br>Presencia |
|--------------------------|--|---|
| HT                       | ✓ (2)  | ✓   |
| Tirosol                  | ✓ (1)  | ✓   |
| OL                       | ✓ (6)  | ✓   |
| Cyclooolivil             | ✓ (4)  | ✓   |
| Ácido 7-deoxyloganic     | ✓ (3)  | ✓   |
| Ligustrósido             | ✓ (5)  | ✓   |

\* Números indican valores ascendentes según intensidad del pico observada en el cromatograma,

El análisis cualitativo y cuantitativo de la composición del extracto de hoja de olivo revela que las hojas tienen el contenido más alto de compuestos fenólicos con respecto a las diferentes partes del árbol (Rahmanian *et al.*, 2015).

De acuerdo a los datos expuestos en los párrafos anteriores las hojas y madera de olivo presentan diferentes compuestos fenólicos, siendo común a ambos el tirosol, HT y OL. En ambas fracciones el compuesto que se encuentra en mayor proporción es la OL.

La OL (nombre IUPAC: ácido metil éster (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2-tetrahidropiranyl]oxy]-4H-pirano-3-carboxílico) es el componente fenólico más abundante en las hojas y madera de olivo; está formado por la unión de un ácido elenólico, el HT y una molécula de glucosa (Figura 3). También es el compuesto más abundante en la pulpa de las aceitunas verdes.



**Figura 3.** Molécula de OL.

**Figura 4.** Molécula de HT.

El principal producto de la degradación de la OL es el HT (4-(2-hidroxietil)-1,2-bencenodiol, Figura 4) que posee una serie de propiedades bioactivas tales como antiinflamatorio, hipolipemiante (ayuda a la regulación del colesterol sérico total), antiviral, antiesquémico y con propiedades cardio-protectoras y neuro-protectoras (Peralbo-Molina y Luque de Castro, 2013; Rahmanian *et al.*, 2015; Altiok *et al.*, 2008).

Varios estudios que se han centrado en su obtención desde fuentes naturales debido a que actualmente se sintetiza de manera muy difícil y costosa (Rahmanian *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Métodos de extracción de compuestos fenólicos desde subproductos de olivo.

Los compuestos bioactivos de plantas pueden ser extraídos a través de diversos métodos. Algunas técnicas clásicas son la extracción soxhlet, maceración e hidrodestilación. Mientras que algunas más recientes son la extracción de campo eléctrico pulsado, asistida por enzimas, apoyada por ondas microondas, con fluido súper-crítico y con líquido presurizado (Azmir *et al.*, 2013).

En un estudio en el que se comparó el empleo de maceración y tres técnicas no convencionales de extracción: con fluido supercrítico, asistida por microondas y líquido presurizado, se concluyó que trabajando con extracción con líquido presurizado se alcanza el mayor rendimiento. No obstante, los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos, y que mostraron mayores propiedades bioactivas, son los obtenidos empleando maceración y extracción asistida por microondas. Por lo que estas últimas técnicas parecen ser la mejor opción para la separación de OL y sus derivados, logrando obtener mayores recuperaciones a través de ellas (Taamalli *et al.*, 2012; Wijngaard *et al.*, 2012).

Usualmente, los compuestos bioactivos son recuperados mediante la técnica de extracción tradicional sólido-líquido utilizando solventes orgánicos en sistemas con temperatura y reflujo (Martins *et al.*, 2011). Esta técnica es ampliamente utilizada en procesos industriales de extracción para el aislamiento de analitos a partir de una matriz sólida, habiendo sido objeto de varias patentes para la separación de fenoles (en particular OL) a partir de hojas de olivo (Rahmanian *et al.*, 2015).

El extractor soxhlet ha sido ampliamente utilizado para la extracción de compuestos bioactivos desde variadas fuentes naturales, proporcionando extracciones rápidas y reproducibles, por lo que es empleado como modelo de comparación en el desarrollo de nuevos métodos. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas, como: posibles degradaciones de los compuestos de interés debido a un sobrecalentamiento local, limitaciones para la elección del solvente, empleo de gran cantidad del mismo, costos relativamente altos de adquisición y falta de versatilidad (Rahmanian *et al.*, 2015; Azmir *et al.*, 2013).

Por lo expuesto en los párrafos anteriores el método de extracción más sobresaliente a nivel industrial es la maceración. No obstante, es requerido un trabajo previo en extractor soxhlet para conocer realmente cuál es el contenido del analito y en base a este dato poder optimizar las variables del sistema hasta alcanzar un resultado igual o mejor.

Todas estas metodologías implican la co-extracción de compuestos no fenólicos, tales como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, por lo que se requiere de procesos de purificación posteriores (Ignat *et al.*, 2011). En este sentido la elección del solvente es la variable de mayor influencia en el resultado de las extracciones (Ahtiok *et al.*, 2008). Es por esto que el factor más importante a considerar es la polaridad del compuesto que se busca extraer, seguido por criterios de seguridad ambiental, toxicidad y posibilidades de escalamiento del proceso (Azmir *et al.*, 2013).

Al evaluar solventes de distinta polaridad (Pérez-Bonilla *et al.*, 2006) para la obtención de extractos a partir de hojas y madera de olivo se estableció que existe una clara relación entre el rendimiento y la polaridad, presentando mayores rendimientos los solventes con mayor polaridad.



El perfil fenólico de los extractos obtenidos tanto de hoja como de madera se ve afectado por una serie de factores agronómicos y técnicos, tales como la variedad (Ahtiok *et al.*, 2008), edad del árbol, proporción de madera, contenido de humedad, contaminación del suelo, condiciones climáticas, genética, prácticas agrícolas (Rahmanian *et al.*, 2015) y origen geográfico. Respecto a esto último Bilgin y Şahin (2013) evaluaron la influencia del lugar de origen del olivo en el contenido de polifenoles de hojas de olivo, estableciendo que este declina a medida que decrece la altitud del lugar de cultivo, lo que relacionaron con la menor exposición a la radiación UV de los arboles a menor altura.

El uso de temperaturas altas en el proceso de extracción conduce a una mayor velocidad del proceso, al mismo tiempo reduce el contenido fenólico del extracto (Ahtiok *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2013). Se plantea que esto se debe a que los compuestos fenólicos de olivares son muy sensibles al calor y a la luz, no tolerando temperaturas superiores a 60°C (Rahmanian *et al.*, 2015). Teniendo en consideración que la extracción de compuestos fenólicos se verá determinada por la combinación de tiempo y temperatura empleada, y la termosensibilidad de los compuestos fenólicos de olivares, se recomienda el empleo de temperaturas y/o tiempos de extracción moderados.

### 1.2.3. Propiedades benéficas de los extractos de olivo.

Ahtiok *et al.* (2008) trabajaron con hojas de olivo establecieron que existía una correlación lineal entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante dimensionada mediante el ensayo ABTS. Lo que sugiere que los compuestos fenólicos podrían ser el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante de los extractos (Martins *et al.*, 2011; Kiritsakis *et al.*, 2010).

Al evaluar la actividad antioxidante de extractos de madera y hojas obtenidos con solventes de diferentes polaridades, se evidenciaron como solventes más adecuados, el acetato de etilo para la madera y el etanol para las hojas, logrando porcentajes de inhibición del radical DPPH del 62,9% y 60,7%, respectivamente (Pérez-Bonilla *et al.*, 2006).

En el mismo estudio a partir del extracto de madera de olivo en acetato de etilo se aisló HT y OL. El HT aislado presentó una actividad antioxidante evaluada a través del ensayo de apagamiento del radical DPPH del 76,7% y la OL un 20,4%. La actividad alcanzada por el HT es muy superior a la mostrada por el ácido rosmarínico (58,3%) y el antioxidante sintético Butil hidroxitolueno (BHT, 13,6%).

A través del ensayo ABTS se han obtenido los valores de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC) para el extracto de hojas de olivo y varios fenoles presentes en él (Tabla 4). La diferencia existente entre el HT (1,57 mM) y la OL (0,88 mM) se ha atribuido al mayor peso molecular de la OL y a que su actividad captadora de radicales se debe principalmente al HT presente en su estructura (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

**Tabla 3.** Resultados ensayo ABTS en hojas de olivo (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

|                       | <b>mM</b> |
|-----------------------|-----------|
| Extracto de hoja      | 1,58      |
| HT                    | 1,57      |
| OL                    | 0,88      |
| Verbascósido          | 1,02      |
| Apigenina-7-glucósido | 0,42      |
| Luteolina-7-glucósido | 0,71      |

Hayes *et al.* (2011) determinaron la actividad y capacidad antioxidante de extractos de hoja de olivo a través del apagamiento de radicales DPPH y capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). En el primer ensayo obtuvo un IC<sub>50</sub> de 28,6 µg/mL y en el segundo un índice ORAC de 17,43 g Trolox/100 g hoja seca, encontrando una buena correlación entre los resultados obtenidos.

La capacidad antioxidante de los extractos de hoja de oliva se explica por dos fenómenos que incluyen la hidrólisis de la OL a HT, con el correspondiente aumento en la capacidad antioxidante del extracto, y el efecto sinérgico de los demás fenoles constituyentes. Estos últimos se ven influenciados principalmente por el número y la posición de los grupos hidroxilo libres en su estructura (Rahmanian *et al.*, 2015).

Los efectos antimicrobianos de los extractos de hoja de olivo han sido probados frente a varias bacterias y levaduras. La concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de hoja de olivo ha sido establecida para varios microorganismos, entre las que destacan: *Staphylococcus aureus* ATCC 27950 (MIC de 70 a 315 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (25 mg/ml), *Escherichia coli* (25 a 50 mg/mL), *Helicobacter pylori* (0,6 a 1,2 mg/mL), *Listeria monocytogenes* (25 mg/mL) y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (25 mg/mL), entre otras. Cabe destacar que el valor de MIC variará dependiendo del perfil polifenólico del extracto, y de los factores que inciden en él, como origen geográfico del árbol, variedad, metodología de extracción, etc, (Rahmanian *et al.*, 2015).

Además de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, farmacológicamente los extractos ricos en OL e HT han demostrado su capacidad para reducir los niveles de colesterol sérico total, triglicéridos y lipoproteína de baja densidad en seres humanos (Rahmanian *et al.*, 2015), llegando el HT a ser catalogado como un compuesto de alto valor agregado por la autoridad europea de seguridad alimentaria en el año 2011 por reducir el factor de riesgo de arterosclerosis y regular los niveles de colesterol HDL en la sangre (Peralbo-Molina y Luque de Castro, 2013).

La OL ha inhibido la proliferación de tumores de tiroides, de vejiga y de mamas en humanos y presenta un papel quimiopreventivo contra el cáncer de lengua. Además previene enfermedades cardíacas, mejora el metabolismo de los lípidos y presenta propiedades antivirales (Rahmanian *et al.*, 2015).

Algunos de los derivados de la OL también han sido estudiados, como el verbascosido que repara el daño oxidativo causado en el cerebro por el consumo de heroína, el apigenin-7-glucósido que lucha contra los daños causados por el Alzheimer y enfermedades al hígado, y el luteolin-7-glucósido que evita la arterosclerosis (Pérez-Bonilla *et al.*, 2006).

Los extractos de hoja de olivo han demostrado ser inhibidores del virus VIH-1 (Rahmanian *et al.*, 2015; Altiok *et al.*, 2008; Bilgin y Şahin, 2008). Un estudio encontró que la OL y el HT aislados a partir de un extracto de hoja de tiene actividad anti-VIH al bloquear la entrada del virus del VIH a las células huésped (Lee-Huang *et al.*, 2007).

#### 1.2.4. Extractos de olivo en alimentos.

Impulsados por todas las propiedades benéficas para la salud que presentarían los extractos de poda de olivo se han evaluado algunas aplicaciones o usos para aprovechar su potencialidad. El más significativo desarrollo es el alcanzado en España, donde los extractos de hoja de olivo se comercializan como nutracéuticos o incorporados en suplementos nutricionales o alimentos funcionales.

Se ha estudiado la adición de un 2 a 3% de extracto de hoja de olivo en carne de vacuno y de res envasada al vacío, logrando controlar la carga microbiana. No obstante, se producen pérdidas de atributos de color, contenido de humedad y variaciones de pH (Rahmanian *et al.*, 2015).

Al evaluar el enriquecimiento de aceitunas de mesa empleando extractos de hoja de olivo, con 539 mg OL /kg de extracto y 200 mg de HT /kg de extracto (obtenidos por maceración en agua por 24 h a temperatura ambiente), se logró un aumento del contenido de 457% en la OL y 109% en el HT. Sin embargo, la evaluación sensorial mostró un aumento en la amargura (Lalas *et al.*, 2011).

Otra aplicación se relaciona con el hecho que los aceites vegetales son propensos a sufrir procesos oxidativos que conducen a pérdidas de calidad y valor nutricional. Para intentar contrarrestar esto se ha evaluado la incorporación de extractos con propiedades antioxidantes en ellos. Así, la adición de extractos metanólicos acuosos (60%) de hojas de olivo de diferentes cultivares griegos (megaritikí, kalamon y koroneiki) a aceite comestible de soja inhibió significativamente la lipoxigenasa, responsable de la oxidación de los lípidos, lo que produjo mejoras en la estabilidad oxidativa del aceite (Kiritsakis *et al.*, 2010).

Malheiro *et al.* (2013) estudiaron la adición de extractos acuosos de hojas de olivo a aceite de soja como posibles estabilizadores oxidativos durante el calentamiento en microondas (0-15 min; 1000W). Observaron que estos extractos aumentaron la disponibilidad de la vitamina E, redujeron la formación de compuestos de oxidación y protegieron al aceite de la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados.

Taghvaei *et al.* (2014) incorporaron extractos de hoja de olivo encapsulado en goma arábica, maltodextrina y una mezcla de ambos, en aceite de soya (70 mg E fenoles /Kg). Luego de calentar por 20 días a 55 °C en una estufa de aire forzado, concluyó que la actividad de los extractos ofrece una protección comparable al BHT. Otros trabajos donde se reporta la inhibición de la oxidación lipídica a través de la adición de extracto de hoja de olivo son los reportados por Kiritsakis *et al.* (2010), Lee *et al.* (2009), Malheiro *et al.* (2013) y Rahmanian *et al.* (2015).

El enriquecimiento de aceite de oliva con una mezcla fenólica obtenida con 60% de extracto de torta de olivo (subproducto de la etapa de prensado para la obtención del aceite) y 40% de extracto de tomillo, mejora la composición fenólica y la estabilidad oxidativa del aceite evaluada a través del equipo Rancimet. Además plantearon que sensorialmente resultó la mejor proporción para evitar el amargor (Rubio *et al.*, 2012).

De acuerdo a lo expuesto en los párrafos anteriores podemos plantear que los antioxidantes naturales obtenidos del árbol de olivo, actúan como conservantes, que en las concentraciones adecuadas pueden ampliar la vida útil de los alimentos, evitando las pérdidas de su calidad sensorial y nutricional. Paralelamente, su obtención a partir de los subproductos de la poda del olivo sería una oportunidad rentable para la industria alimentaria.

El mercado mundial de polifenoles en el año 2012 alcanzaba los \$200 millones de dólares (Wijngaard *et al.*, 2012), el cual abastecía principalmente las industrias de nutracéuticos, farmacológica y alimenticia. En los años recientes se ha incrementado el interés en la obtención de antioxidantes desde fuentes naturales debido a la necesidad de sustituir los homólogos sintéticos empleados hasta hace poco tiempo, ya que muchos de ellos se han asociado al desarrollo de enfermedades degenerativas (Pérez-Bonilla *et al.*, 2011; Rahmanian *et al.*, 2015).

La evidencia indica la presencia de compuestos fenólicos en las hojas y madera del olivo, con lo cual postulamos que otras partes de este árbol, como las ramas, podrán presentar también un alto contenido de compuestos fenólicos. Las ramas que son el principal subproducto de poda de este árbol, sin embargo, aún no existe claridad de su composición fenólica ni de su potencial actividad antioxidante.

Lo expuesto anteriormente convierte a la madera de poda de olivo, comúnmente denominada rama, en una atractiva fuente para la obtención de *antioxidantes* naturales de alta calidad. Este extracto podría ser utilizado en aplicaciones directas o potenciar extractos provenientes de hoja de olivo para futuras aplicaciones.



### **1.3. Hipótesis.**

El extracto de madera de poda de olivo presentaría una buena actividad antioxidante, la cual puede potencialmente prevenir la oxidación de aceites de origen vegetal.

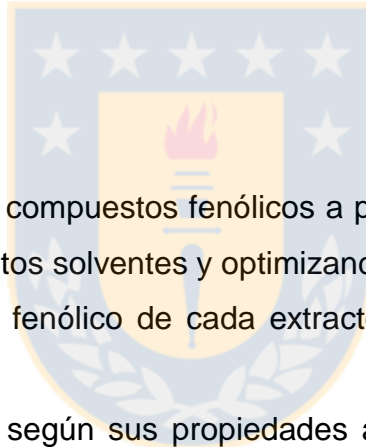
### **1.4. Objetivos.**

#### **1.4.1. General.**

Obtener un extracto con alta capacidad antioxidante a partir de madera de poda de olivo.

#### **1.4.2. Específicos.**

- Evaluar la extracción de compuestos fenólicos a partir de materia prima fresca y seca, empleando distintos solventes y optimizando el tiempo de extracción.
- Determinar el contenido fenólico de cada extracto además de su actividad y capacidad antioxidante.
- Seleccionar un extracto según sus propiedades antioxidantes, en base a los resultados previamente obtenidos.
- Valorar la capacidad de inhibición lipídica del extracto seleccionado en aceites vegetales.
- Caracterizar la composición fenólica del extracto seleccionado, por HPLC.





## 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

### 2.1. Antioxidantes.

Para los organismos aerobios la oxidación es esencial en la obtención de la energía necesaria para realizar procesos biológicos. Sin embargo, la producción descontrolada de radicales libres derivados del oxígeno, que se conocen como especies reactivas del oxígeno (ERO), puede ser dañina para las células y sus funciones causando lo que se conoce como estrés oxidativo (Ramírez, 2013). Este desbalance entre sustancias pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, puede deberse a un déficit de estas defensas debido a una baja en la cantidad de antioxidantes endógenos o exógenos (García, 2011).

El estrés oxidativo puede causar efectos de destrucción y muerte celular por oxidación de la membrana lipídica, proteínas, ADN y enzimas que intervienen en la respiración celular (Ramírez, 2013).

En este contexto, los radicales libres son átomos o grupos de átomos, como las ERO, que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha logrado sustraer un electrón (reducción), la molécula donadora que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose una reacción en cadena (Maldonado *et al.*, 2010).

Por otro lado, los antioxidantes son sustancias que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a la de un sustrato oxidable (como lípidos, proteínas y ADN) retardan o previenen la oxidación temprana del mismo, es decir, son las sustancias que contrarrestan a los radicales libres, impidiendo el daño oxidativo (Ndhlala *et al.*, 2010).

Cuando a nivel celular ocurre una superproducción de radicales libres, y los antioxidantes presentes de manera natural son sobrepasados, esta carencia puede ser suplida a través de nuevos antioxidantes exógenos que en su mayoría provienen de la alimentación (Ramírez, 2013). Estos compuestos están naturalmente presentes en pequeñas cantidades en plantas y alimentos (Martins *et al.*, 2011).

Las plantas producen dos grandes grupos de compuestos (Azmir *et al.*, 2013): los metabolitos primarios, que son las sustancias químicas destinadas a crecimiento y desarrollo (como carbohidratos, proteínas, etc.); y los secundarios, que son aquellos producidos como respuesta a los desafíos locales. Estos fitoquímicos también presentan una considerable importancia fisiológica y morfológica en las plantas pudiendo actuar como fitoalexinas (que proporcionar protección contra los patógenos y depredadores), atrayentes para polinizadores, contribuyentes en el color y agentes protectores contra la luz UV (Ignat *et al.*, 2011).

Algunos de los metabolitos secundarios producidos por las plantas tienen un efecto sobre los sistemas biológicos por lo que son considerados como bioactivos (Azmir *et al.*, 2013). Químicamente, corresponden a compuestos fenólicos derivados de las rutas metabólicas del shikimato y fenilpropanoides, caracterizados por un anillo aromático y uno o más grupos hidroxílicos, pudiendo variar desde una sencilla molécula fenólica a un complejo polímero de alto peso molecular (Ndhlala *et al.*, 2010; Ignat *et al.*, 2011).

La clasificación de los compuestos bioactivos en diferentes categorías es aún inconsistente y depende de la intensidad particular de la ordenación (Azmir *et al.*, 2013). Una manera de dividir los 8000 polifenoles identificados hasta ahora es de acuerdo con el número de anillos de fenol que contienen y los elementos estructurales que unen a estos anillos. Siguiendo estos lineamientos los principales grupos son: los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos.

Se han individualizado más de 4000 flavonoides que se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular, constituidos por quince átomos de carbono dispuestos en configuración C6-C3-C6. Son antioxidantes especialmente importantes debido a su alto potencial redox, que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno, extintores de oxígeno singlete y quelante de metales (Ignat *et al.*, 2011).

## 2.2. Mecanismos de reacción de los antioxidantes.

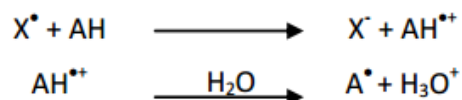
Los antioxidantes pueden inactivar a los radicales libres a través de dos vías principales: reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) o de transferencia de un electrón (SET). El resultado final de los dos tipos es el mismo, pero difieren en la cinética, Ambos tipos pueden ocurrir paralelamente, pero uno de ellos será predominante.

Una reacción HAT, en donde  $X^\bullet$  es el radical libre y AH el antioxidante, se muestra a continuación:



Este tipo de reacciones viene determinada por la entalpía de disociación del grupo donador de hidrógeno en la molécula antioxidante, dependiendo del pH y el solvente. Se caracterizan por ser muy rápidas (del orden de minutos o segundos) y en que el nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial (Ramírez, 2013; García, 2011).

En las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales (siendo nuevamente X• el radical libre y AH el antioxidante):



También son reacciones dependientes del pH, pero son lentas y pueden requerir largos tiempos para completarse, por ello los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de reducción del producto más que en la cinética. Son muy sensibles a la presencia de trazas de contaminantes y otros componentes (particularmente metales) que pueden convertirse en la causa de una alta variabilidad, pobre reproductibilidad y poca consistencia de los resultados (García, 2011; Ramírez, 2013).

Entre las pruebas HAT se incluyen el ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), TRAP (determinación de potencial antioxidante total),  $\beta$ -caroteno (bleaching  $\beta$ -caroteno) e inhibición de oxidación lipídica. Y entre los SET el ensayo de polifenoles totales o Folin-Ciocalteu, capacidad de apagamiento de radicales DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil) y ABTS/TEAC (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Ndhlala *et al.*, 2010; García, 2011; Ramírez, 2013).

### 2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos.

Numerosos métodos se han desarrollado para la cuantificación de compuestos fenólicos naturales. Estos ensayos se basan en diferentes principios y se utilizan para determinar grupos estructurales presentes. Actualmente, la espectroscopía es la principal técnica utilizada para la cuantificación, debido a su simplicidad y bajo costo (Ignat *et al.*, 2011).

Un método colorimétrico para la determinación del contenido de fenoles totales fue el desarrollado por Folin y Ciocalteau que se fundamenta en el carácter reductor del reactivo conocido con el mismo nombre, y que es una mezcla de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico que en un medio básico se reducen al oxidar los compuestos fenólicos originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) que son medidos en un espectrofotómetro a 725 nm. Este método no es selectivo de la naturaleza del antioxidante, ya que la reacción de color puede ocurrir con cualquier grupo hidroxilo fenólico oxidable (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

#### **2.4. Actividad antioxidante.**

La actividad antioxidante de un compuesto depende de sus propiedades redox, así como también de su capacidad como donador de átomos de hidrógeno y como captador de radicales; idealmente, todas esas propiedades deberían medirse en cada componente para valorar la actividad antioxidante total (Ramírez, 2013).

Este es el ensayo de actividad anti radicales más antiguo, siendo muy popular en el estudio de antioxidantes naturales por su sencillez, sensibilidad, proporcionar rapidez y facilidad de implementación (Ramírez, 2013).

En este método se sitúa el radical orgánico estable DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) en presencia de un antioxidante y se ve en qué grado es apagado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm (García, 2011), cuya decoloración varía desde el violeta intenso a amarillo pálido dependiendo de la concentración del antioxidante, que es evaluada fotométricamente (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

Los resultados se han reportado como  $IC_{50}$ , que es la cantidad de antioxidante necesario para reducir hasta el 50% la concentración inicial de DPPH (Ramírez, 2013).

Pérez-Bonilla *et al.* (2006) reportaron su empleo para la evaluación de la actividad de los extractos de madera y hojas de olivo, debido a que la oxidación de lípidos podría iniciar por el ataque de radicales libres.

## **2.5. Capacidad antioxidante.**

El método más ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante es el ORAC-FL (Folch-Cano *et al.*, 2010) el cual, a diferencia de otros mide directamente la capacidad antioxidante contra los radicales peróxido como una medida de la inhibición de la oxidación térmica de un sustrato fluorescente como la fluoresceína. Otro motivo por el que se dice que es más relevante que otros ensayos, es debido a que utiliza una fuente de radicales biológicamente relevante llamada AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro).

La fluoresceína se oxida tras la adición de radicales peróxido perdiendo fluorescencia (longitud de onda de excitación 493 nm, y de emisión 515 nm). De esta forma, la adición de una sustancia antioxidante retrasa su oxidación, pudiendo estimarse el poder antioxidante de la sustancia en base al retraso en la pérdida de fluorescencia respecto a la muestra control sin antioxidante. Este ensayo permite determinar la capacidad antioxidante tanto de muestras hidrofílicas como lipofílicas (Suarez, 2010; García, 2011).

## **2.6. Inhibición de la oxidación lipídica.**

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro químico de los alimentos. Su consecuencia organoléptica más importante es la aparición de olores y sabores desagradables, haciendo que el alimento sea inaceptable para el consumidor y reduciendo o limitando su vida útil. Además, puede reducir el valor nutritivo de los alimentos y algunos de los productos de oxidación son potencialmente tóxicos.

Para valorar el grado de oxidación de las grasas se han desarrollado una gran variedad de métodos. Entre los que destaca el índice de peróxidos (IP, en adelante), que corresponde a la cantidad de peróxidos en la muestra expresada como mili equivalentes de oxígeno activo por kg de aceite. Este ensayo es el recomendado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos para evaluar el estado de los aceites comestibles.

## **2.7. Caracterización de antioxidantes.**

Realizada la extracción, pero antes de la detección de los antioxidantes, se requiere concentrar y/o limpiar el extracto para lograr una mejor precisión en los análisis. La manera más simple y común es evaporar el agente de extracción al vacío a temperatura ambiente o moderada. El extracto seco o muy concentrado es rehidratado, con el disolvente apropiado para el siguiente paso (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

La separación de los compuestos fenólicos desde hojas de olivo se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC) y electroforesis capilar (CE), que han proporcionado una resolución adecuada (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

Los polifenoles generalmente se pueden purificar por adsorción-desorción mediante el uso de absorbentes de alta eficiencia. Otras técnicas cromatográficas, que ampliamente se han utilizado para la purificación y aislamiento de antocianinas, flavonoides, taninos condensados y ácidos fenólicos, son la cromatografía en papel (PC) y la cromatografía en capa fina (TLC) (Ignat *et al.*, 2011).

La CE es especialmente adecuada para la separación y cuantificación de compuestos de bajo a medio peso molecular, siendo las separaciones resultantes a menudo más rápidas y eficientes que las realizadas en HPLC (Ignat *et al.*, 2011).

La GC no ha sido ampliamente empleada para la separación de polifenoles debido a la necesidad de tratamientos previos para su empleo (Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

Entre los diferentes métodos disponibles para la individualización de los fenoles del olivo se ha preferido el empleo de HPLC. Las condiciones cromatográficas incluyen el uso de columna C18 de fase reversa; UV-Vis con detector de diodos, y un sistema disolvente binario que contiene agua (disolvente A) y un disolvente orgánico polar (disolvente B). Los compuestos separados se han identificado de diferentes maneras dependiendo de si existen compuestos de referencia, si estos están disponibles se valida mediante la comparación de los peaks del estándar y la muestra tratada (Ignat *et al.*, 2011; Luque de Castro y Japón-Lujan, 2006).

Algunos procedimientos de HPLC para la determinación de compuestos fenólicos en extractos de olivo se presentan en la Tabla 4.



**Tabla 4,** Descripción de procedimientos empleados en la caracterización de compuestos fenólicos en extractos de olivos,

| Fase estacionaria  | Fase móvil   | Flujo (mL/min) | Compuestos  | Longitud de onda (nm)        | Ref. |
|--|--|----------------|---|------------------------------|------|
| Lichrospher C18<br>(250 x 4,6mm, 5µm)  | A: ácido acético/agua (2,5:97,5).<br>B: acetonitrilo                       | 1              | HT,<br>Tyrosol,<br>Rutina,<br>Luteolina-7-glucósido,<br>Verbascósido,<br>Apigenina-7-glucósido,<br>OL,<br>Luteolina,<br>Ácido cafeico,<br>Ácido vanílico,<br>CT | 280                          | 1    |
| Lichrospher 100RP-18<br>(250 x 4mm, 5 µm)<br>Kromasil C18<br>(15 x 4,6 mm, 5 µm) | A: 6% ácido acético, 2mM de acetato de sodio, en agua.<br>B: Acetonitrilo. | 0,8-1,2        | OL,<br>Verbascósido,<br>Apigenina-7-glucósido y<br>Luteolina-7-glucósido  | 280,<br>330,<br>340 y<br>350 | 2    |
| Lichrospher 100RP-18<br>Merck<br>(250 x 4mm, 5µm)                                | A: 2,5 % ácido acético.<br>B: acetonitrilo                                 | 1              | Cafeoil,<br>Apigenina-6,8-diglucósido,<br>Verbascósido,<br>Luteolina-7- rutinósido,<br>Luteolina-7-glucósido,   | 240,<br>280 y<br>330         | 3    |

|   |   |   |  |     |   |
|---|---|---|--|-----|---|
|   |   |   | OL glucósido,<br>Rutinósido apigenina,<br>Apigenina-7-glucósido,<br>OL,<br>Luteolina |     |   |
| C18<br>(150 x 4,6 mm, 5µm)                          | A: acetonitrilo:agua (20:80).<br>B: 0,1% ácido acético. | 1 | OL   | 280 | 4 |
| Columna Spherisorb<br>ODS-2<br>(250 x 4,6 mm, 5 µm) | A: agua: ácido acético<br>(99,8:0,2).<br>B: metanol     | 1 | HT,<br>Tirosol,<br>Cicoolivil,<br>Ácido 7-deoxylogánico,<br>OL y<br>Ligustrósido,    | 230 | 5 |

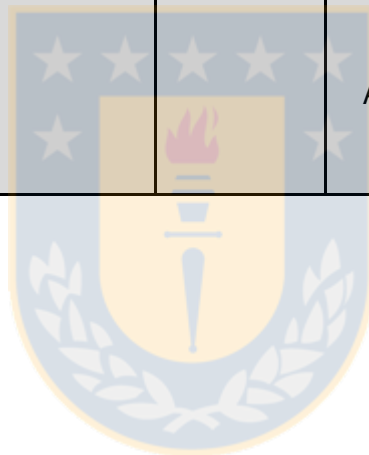
(1) Altiok *et al.*, 2008.

(2) Japón-Luján y Luque de Castro, 2006.

(3) Ahmad *et al.*, 2013.

(4) Al-Rimawi, 2013.

(5) Pérez-Bonilla *et al.*, 2006.



### 3. MATERIALES.

Los materiales y reactivos utilizados en la presente investigación se listan a continuación:

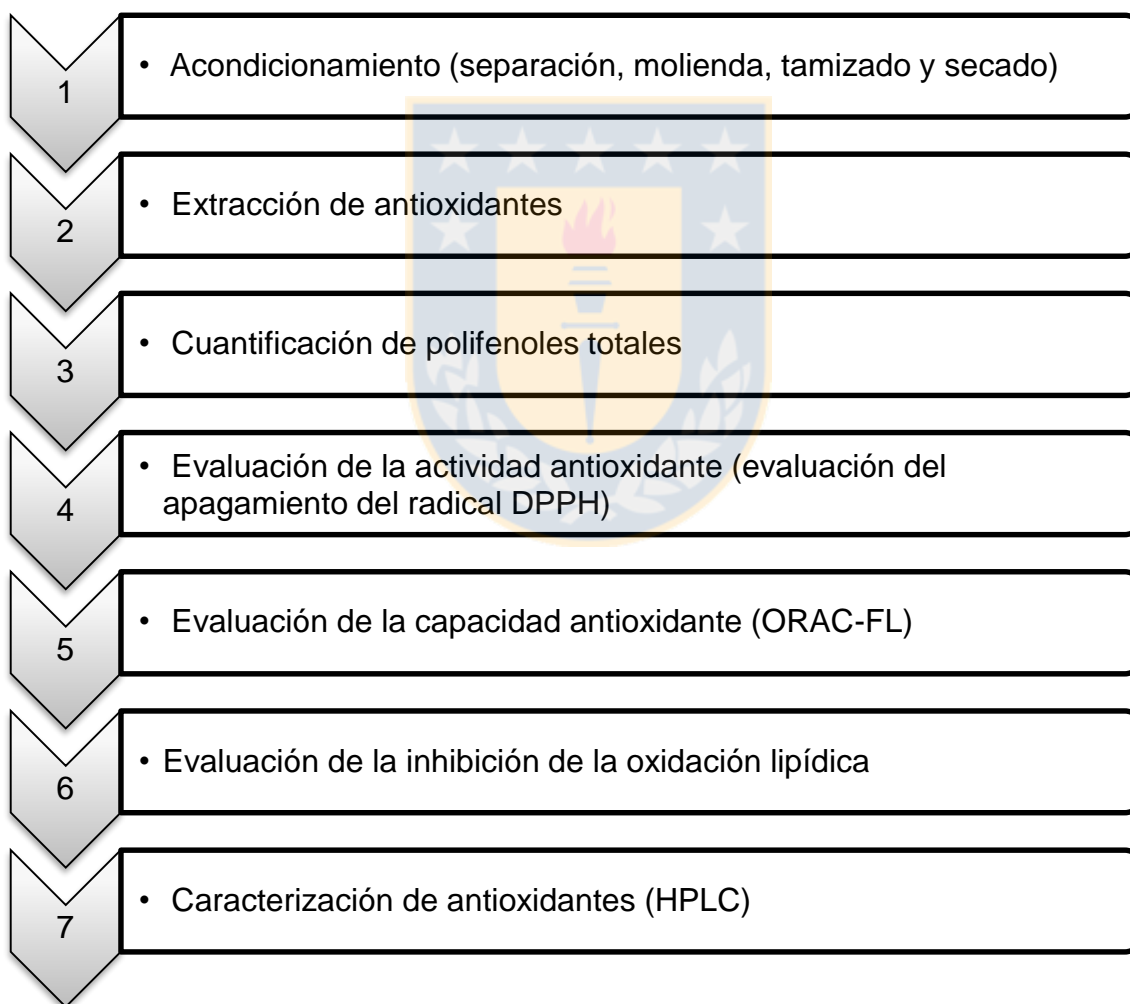
- Etanol PA (Merck).
- Dedales de celulosa de 22 mm de diámetro x 80 mm de largo (Whatman).
- Papel filtro cualitativo para análisis (Whatman).
- Microplaca de 8 x 12 celdas (Nunc).
- Reactivo Folin-Ciocalteu: 3,4-dioxo-3,4-dihidronaftalen-1-sulfonato de sodio (Merck),
- Trioxocarbonato (VI) de sodio (Merck).
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma Aldrich).
- Fluoresceína: 2- (3-oxo-6-oxido-3H-xanten-9-il) benzoato de disodio (Fluka)
- Fosfato trisódico (Merck).
- AAPH: 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride (Sigma Aldrich),
- Trolox: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Merck).
- Ácido acético glacial (Merck).
- Cloroformo (Merck).
- Yoduro de potasio (Merck).
- Almidón:(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hidroximetil)-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5,6-trihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-oxano-3,4,5-trio (Merck).
- Tiosulfato de sodio (Merck).
- Acetonitrilo (Merck).
- Agua para HPLC (Merck).

- Ácido tetraoxofosfórico (V) al 82 % (Merck).
- Filtro jeringa poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Merck).
- OL: ácido metil éster (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2tetrahidropiranyl]oxy]-4H-pirano-3-carboxílico) (Sigma Aldrich).
- HT: 2- (3,4-dihidroxifenil) etanol, 3,4-dihidroxi alcohol fenetil (Seprox Biotech).
- CT: (2R, 3S) -2- (3,4-dihidroxifenil) -3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol (Sigma Aldrich).
- Acido gálico: Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Sigma Aldrich).



#### 4. METODOLOGÍAS.

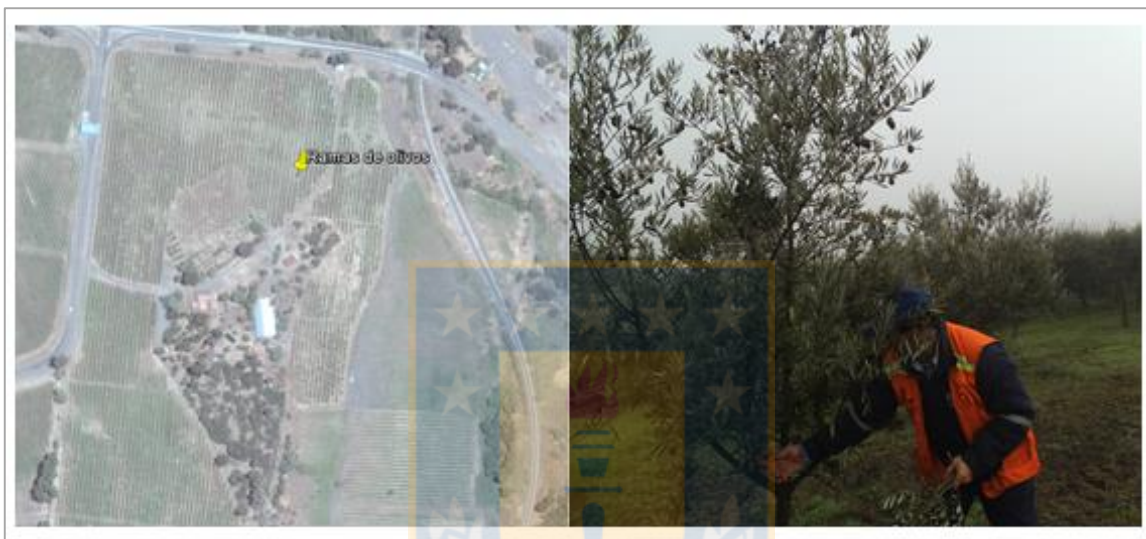
Con la finalidad de aceptar o rechazar la hipótesis propuesta se planteó la metodología que se resume en la Figura 5. Según esta, el presente estudio se dividió en siete etapas principales: acondicionamiento (1), extracción de antioxidantes (2), cuantificación de compuestos fenólicos (3), evaluación de la actividad antioxidante (4), evaluación de la capacidad antioxidante (5), evaluación de la inhibición de la oxidación lipídica (6) y caracterización de antioxidantes (7), Cada una de estas etapas se describe en el presente capítulo.



**Figura 5.** Representación esquemática de las metodologías propuestas en este estudio.

#### 4.1. Muestreo.

Los subproductos de poda de olivo de la variedad Arbequino fueron recolectados el día 9 de Junio de 2015, 15 días después de la cosecha de los frutos, desde el fundo de olivos de la planta celulosa Arauco, coordenadas UTM 726602E 5940650N DATUM WGS84 huso 18 (Figura 6).



**Figura 6.** Zona de muestreo de olivos (izquierda), muestreo (derecha)

Para el muestreo se tomó un ramon por hilera, a diferentes alturas de las hileras y árboles.

#### 4.2. Acondicionamiento.

##### 4.2.1. Separación.

Los subproductos de poda de olivo fueron separados en hojas, ramas y troncos, Diferenciándose las ramas como aquellas con un diámetro inferior a 5 cm y considerándolas de ahora en adelante como madera de poda de olivo (MPO).



**Figura 7.** Subproductos de poda de olivo (izquierda), hojas (medio) y MPO (derecha).

#### 4.2.2. Molienda y tamizado.

La MPO se sometió a una molienda seca en un molino de martillos Burrows (gould century motors) y tamizadas en un tamiz ASTM E-11 maschenweite 0,5 mm.



**Figura 8.** MPO molida en el molino de martillos (izquierda) y MPO luego del tamizado (derecha).

La muestra retenida en el tamiz se molió por segunda vez en una picadora de cuchillas Sindelen 1,2,3 Silhouette hasta alcanzar un tamaño inferior a la apertura del tamiz.

#### 4.2.3. Secado.

Parte del material molido fue secado en una estufa de aire forzado Memmert modelo 400 en fracciones de un  $1 \pm 0,5$  g (balanza electrónica Sudelab FA21004N,  $d = 0,1$ , máx, = 210 g) a  $40 \pm 4^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar masa constante.

La fracción restante se almacenó en bolsas plásticas herméticas en oscuridad y a temperatura de refrigeración ( $3$  a  $10^{\circ}\text{C}$ ) hasta su empleo.

#### 4.3. Extracción de antioxidantes.

La materia prima acondicionada se sometió a una serie de extracciones sólido-líquido en continuo empleando un extractor Soxhlet en condiciones de oscuridad (Figura 9). Las variables optimizadas se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Extracciones.

| <b>Variable</b>              | <b>Mediciones</b> |
|------------------------------|-------------------|
| Estado inicial de la materia | fresca y seca     |
| Tiempo de extracción         | 2, 4 y 8 h        |
| Masa de extracción           | 1 y 3 g           |

Para cada extracción se emplearon 180 mL de etanol, dedales de celulosa y papel filtro.

Los extractos obtenidos se aforaron a 200 mL de solvente y posteriormente fueron concentrados 20 veces en una estufa de aire forzado (Memmert modelo 400) a  $45 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de concentrado vario dependiendo de la muestra, fluctuando entre las 4 y 7 h.





**Figura 9.** Extracciones de MPO (izquierda y centro), eMPO (derecha).

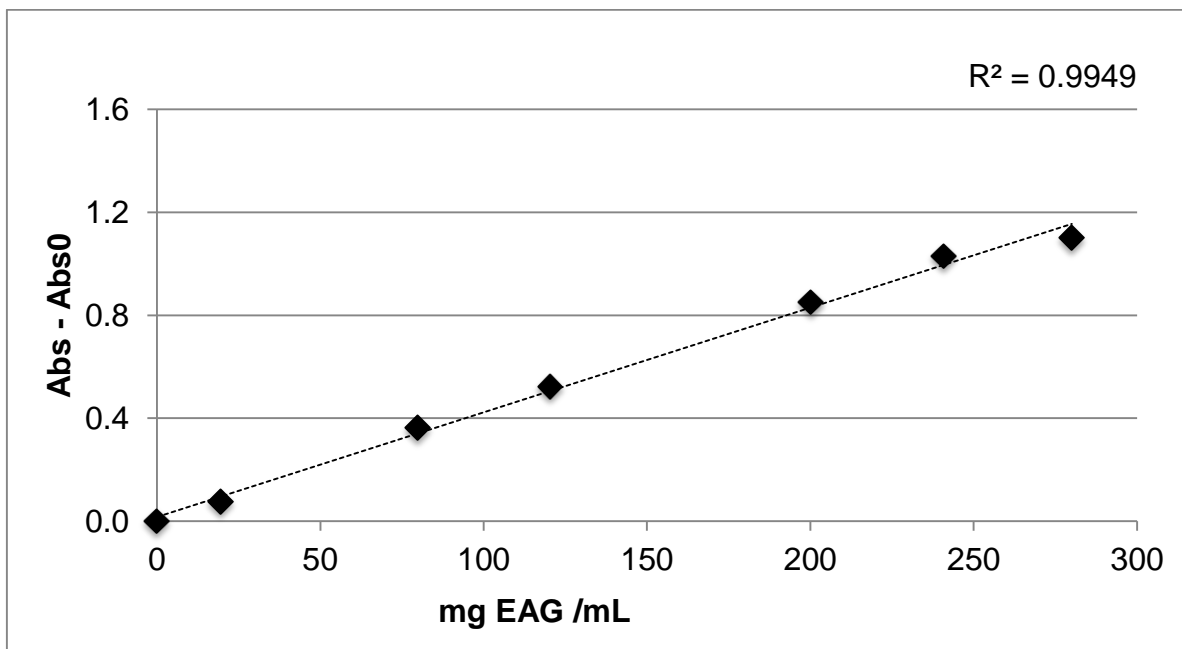
El almacenamiento de los extractos fue en oscuridad y a temperatura de refrigeración. Previo a su uso fueron sonicados por 10 min.

Para determinar el rendimiento de cada extracción se realizó el ensayo de sólidos totales empleando una estufa de aire forzado Memmert modelo 400 a 80 °C, cuantificándose como la cantidad de extracto obtenido por cada 100 g de madera de poda.

Una vez evaluados los rendimientos logrados en cada extracción se seleccionó a las muestras más idóneas para continuar con ellas la investigación.

#### **4.4. Contenido de fenoles totales.**

En una microplaca se colocaron 200  $\mu$ L de reactivo del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces), 15  $\mu$ L de muestra, 40  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (w/v) y 45  $\mu$ L de agua destilada.



**Figura 10.** Curva de calibración con ácido gálico.

La placa fue llevada al lector de multiplaca Bio-TeK Synergy HT donde fue incubada por 30 min a 37° C, para posteriormente registrar la absorbancia a 725 nm, proceso que fue controlado por el software Gen 5 (Singleton *et al.*, 1999).

En cada placa se midió además un blanco y una curva de calibración con ácido gálico en concentraciones crecientes (Figura 10).

#### **4.5. Evaluación de la actividad antioxidante.**

##### **4.5.1. Prueba de apagamiento de radicales de DPPH.**

En primer lugar se realizó un barrido espectral de absorbancia a una solución de radical estable DPPH con concentración cercana a 1,0 Mm, equivalente a una unidad de absorbancia, encontrándose la máxima absorbancia a 517 nm.

Cinco alícuotas de cada muestra (desde 20 µL a 60 µL) fueron agregadas a 3 mL de la solución DPPH, registrándose la disminución de las absorbancias de cada solución de DPPH después de una incubación en oscuridad durante 15 minutos (Bendary et al., 2013). El porcentaje de apagamiento del radical libre fue calculado como:

$$\% \text{ Apagamiento DPPH} = \frac{A_{DPPH} - A_m}{A_{DPPH}} \times 100$$

Donde:  $A_{DPPH}$  : absorbancia de la solución DPPH.

$A_{muestra}$  : absorbancia de las muestras de eMPO.

Los porcentajes de apagamiento fueron graficados en función de la masa de extracto agregada en cada ensayo y mediante regresión lineal se obtuvo el valor  $IC_{50}$ .

#### **4.6. Evaluación de la capacidad antioxidante.**

##### 4.6.1. Capacidad de absorción de radicales oxígeno – fluoresceína (ORAC-FL).

La reacción se llevó a cabo en solución tampón de fosfato de sodio, 75 mM (pH 7,4), 25 µL de muestra y 200 de µL fluoresceína. La mezcla se pre-incubó por 15 min a 37 °C. Luego se adicionó 25 µL de AAPH 18 mM (Folch-Cano *et al.*, 2010).

El análisis ORAC-FL se llevó a cabo registrando la fluorescencia cada 1 minuto a una longitud de onda de emisión 420 nm hasta su apagamiento. Las lecturas se realizaron en un lector de multiplaca BioTeK Synergy HT, controladas por el software Gen5®.

Se midió además en cada ensayo un blanco y una curva de calibración utilizando Trolox ( $R^2 = 0,9703$ ). La capacidad de absorción de radicales se expresó como equivalentes de mol de Trolox en 100 g de extracto.

El área bajo la curva del decaimiento de la fluorescencia (ABC) se calculó integrando desde  $F_0$  (fluorescencia inicial leída a 0 min) a  $F$  (fluorescencia leída en el tiempo). El ABC neta de cada muestra se calculó restando el ABC correspondiente y la del blanco, El procesamiento de datos se realizó a través del software Matlab®.

#### **4.7. Inhibición de oxidación lipídica.**

##### **4.7.1. Evaluación en microondas.**

Se mezclaron 10 mL de aceite 100% de maravilla Natura con 10, 50 y 100  $\mu$ L de los extractos con 4 horas de extracción a partir de MPO fresca y seca. La mezcla se llevó a un microondas a potencia máxima (1200 W) por 1, 3, 5, 10 y 15 min (Malheiro *et al.*, 2013), evaluándose el IP del aceite según la norma AOAC 1997 (Cuniff, 1997).

Para el IP se mezclaron  $4 \pm 0,01$  g de aceite (con el extracto) con 30 mL de una solución preparada con ácido acético y cloroformo (3:2 v/v) y 500  $\mu$ L de yoduro de potasio saturado. Luego de agitar suavemente durante 1 min se agregarán 30 mL de agua destilada y 500  $\mu$ L de almidón. La reacción fue valorada con tiosulfato de sodio 0,01 N. El IP se expresó como mili equivalentes de oxígeno en 1 kg de aceite.

##### **4.7.2. Evaluación en estufa de aire forzado.**

Se mezclaron 10 mL de aceite 100% de maravilla Natura con 10 y 100  $\mu$ L de los extractos con 4 horas de extracción a partir de MPO seca. La mezcla se mantuvo en una estufa de aire forzado Memmert modelo 400 a una temperatura de  $55 \pm 4$  °C, evaluándose el IP del aceite según la norma AOAC 1997 (Cuniff, 1997) a las 2, 4, 8, 16, 24 y 72 h.

#### 4.8. Caracterización de antioxidantes por HPLC.

La identificación de compuestos en los extractos de MPO se realizó a través del HPLC Perkin Elmer Flexar equipado con un detector UV-vis con arreglo de diodos y operado a temperatura ambiente, con una columna RP 18 Chromolith® (100 x 4,6 mm) HighResolution. Las lecturas se realizaron a 230, 280 y 340 nm, controladas por el software Chromera®.

El volumen de inyección fue de 200 µL de muestra y el flujo de inyección de 1 mL/min. La corrida completa tuvo una duración de 55 min. Las fases móviles fueron A: acetonitrilo y B: ácido ortofosfórico al 5%.

El gradiente utilizado fue durante los primeros 15 min desde 2 a 12% de A (y 88 % de B). Luego a los 25 min alcanzó un 17 % de A (y 83 % de B). Después alcanzó un 58 % de A (y 42 % de B) a los 45 min. Y finalmente llegó a un 70 % de A (y 30 % de B) a los 50 min.

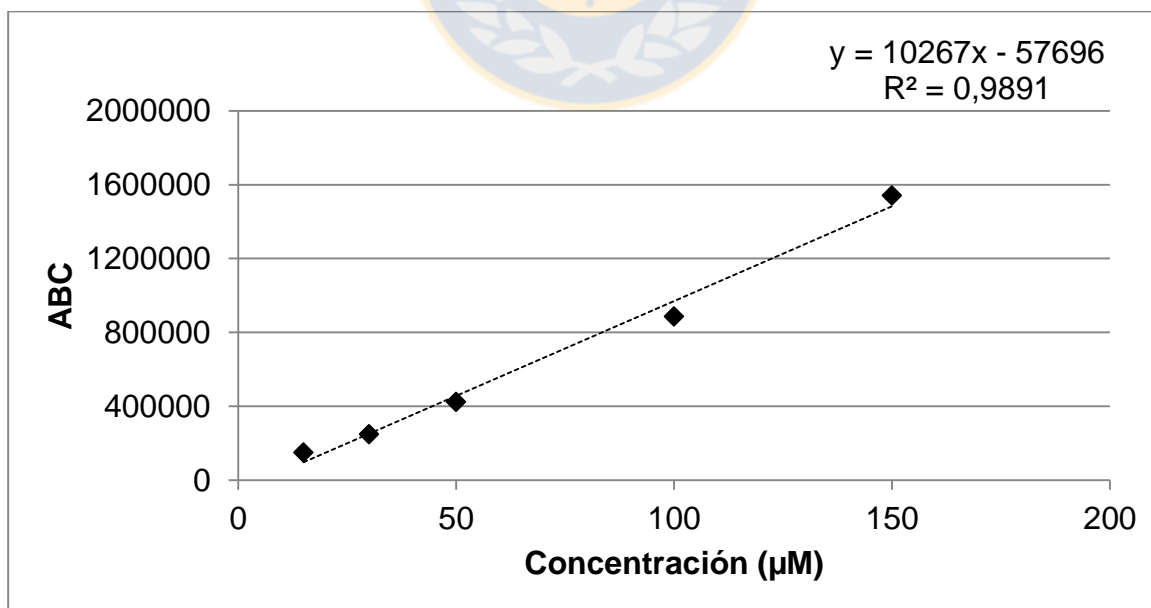
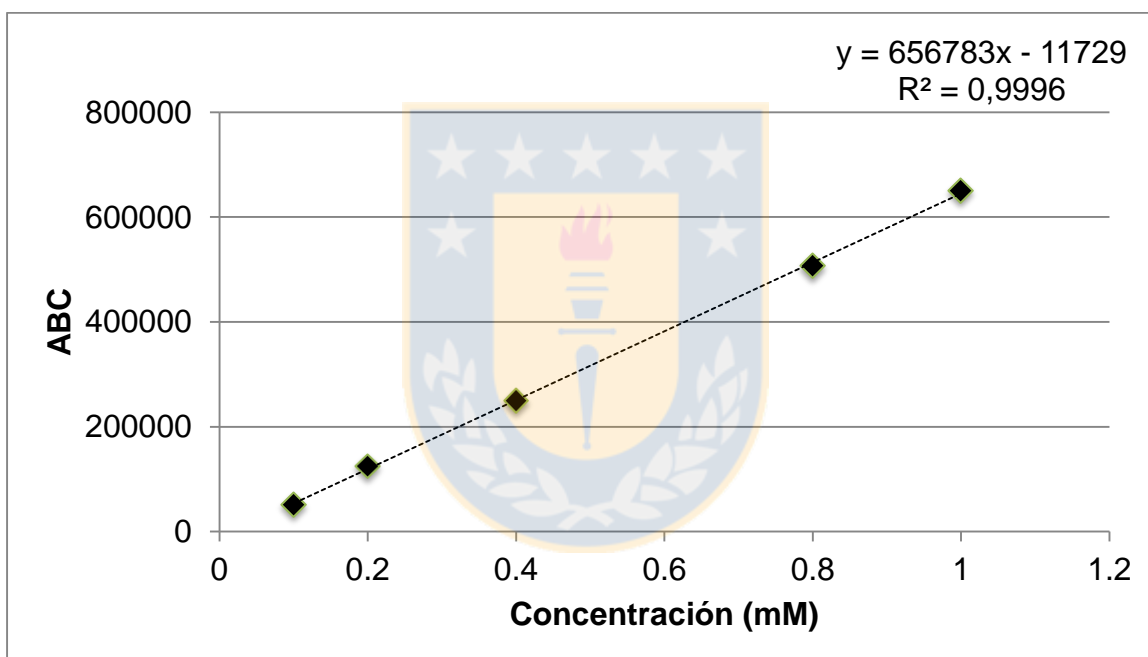


Figura 11. Curva de calibración de CT.

Las muestras estudiadas fueron: extracto de MPO seca de 4 h de extracción, concentrado 20 veces, extracto de MPO fresca de 4 h de extracción, concentrado 20 veces, y extracto de MPO seca, concentrado 80 veces.

Los estándares utilizados fueron OL con una pureza  $\geq 98\%$ , HT con una pureza  $\geq 99\%$  y CT con una pureza  $\geq 98\%$ . OL. Por comparación de sus respectivos tiempos de retención se identificaron en los eMPO. Además, obtuvieron con ellos las curvas de calibración para la CT (Figura 11) y OL (Figura 12). Mientras que para el HT no fue necesaria la construcción de su curva.



**Figura 12.** Curva de calibración de OL.

#### 4.9. Diseño estadístico.

Para esta investigación se aplicó un diseño en bloques completamente aleatorios. Las muestras fueron tomadas totalmente al azar y todos los ensayos se realizaron en triplicado.

Para la interpretación de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza con  $p = 0,05$ , y cuando se encontraron diferencias se empleó el test de comparación de medias de Tukey.

Una vez obtenidos y analizados los resultados de compuestos fenólicos totales, apagamiento del radical DPPH y ORAC-FL, se realizó con ellos un análisis descriptivo multivariado para ayudar a la selección del extracto con mejores propiedades.

El análisis estadístico se realizó a través del software Infoestat.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Producto de la ejecución de cada una de las etapas descritas en el capítulo precedente se recogieron los resultados que se exponen y discuten a continuación.

### 5.1. Acondicionamiento.

#### 5.1.1. Separación.

Los subproductos de poda de olivo fueron separados en hojas, ramas y troncos, diferenciándose las ramas como aquellas con un diámetro inferior a 5 cm y nombrándolas como madera de poda de olivo (MPO).

**Tabla 6.** Constitución del subproducto de MPO.

| Subproducto | Masa (g) | %  |
|-------------|----------|----|
| Ramas       | 924,3    | 39 |
| Hojas       | 1,215,2  | 56 |
| Madera      | 108,5    | 5  |

La MPO representó el 39 % en masa seca de los subproductos de poda de olivo (Tabla 6). Varios autores señalan que los subproductos de poda de olivo están constituidos por un 10 % de hojas (Malheiro *et al.*, 2013; Bilgin y Şahin, 2013), Estos reportes corresponden a investigaciones realizados en distintas partes del mundo, principalmente Europa, por lo cual, el crecimiento y manejo del árbol de olivo es distinto al que se practica en nuestro país, lo que podría explicar la diferencia existente entre el valor reportado y el que se ha obtenido en este estudio.



### 5.1.2. Secado.

Los resultados de los ensayos de humedad se agruparon según el destino que tuvo la muestra (Tabla 7), siendo el porcentaje de humedad promedio de la MPO de 14,82 %.

**Tabla 7.** Humedad de las muestras de MPO según destino.

| <b>Destino de la muestra</b> | <b>% Humedad</b> | <b>D.E.</b> |
|------------------------------|------------------|-------------|
| Extracciones de 3 g          | 15,73            | 0,98        |
| Extracciones de 1 g          | 13,91            | 0,48        |

Las muestras destinadas a las extracciones de 3 g presentaban una humedad un poco mayor que las muestras destinadas a extracciones de 1 g. Es importante destacar que esta diferencia es sólo inicial y luego del acondicionamiento las muestras se encontraban en las mismas condiciones.

### 5.2. Resultados preliminares.

Se desarrolló un análisis previo de extracción de compuestos fenólicos empleando una batería de solventes con polaridad creciente: hexano (índice de polaridad 0,0), diclorometano (índice de polaridad 3,4), acetato de etilo (índice de polaridad 4,3), etanol (índice de polaridad 5,2) y metanol (índice de polaridad 6.6).

Las extracciones se realizaron utilizando extractores soxhlet por 4 h a la temperatura de ebullición de cada solvente. La evaluación de estos primeros extractos se hizo a través del rendimiento (% masa/masa), el contenido de compuestos fenólicos y el porcentaje de apagamiento del radical DPPH.

Los menores rendimientos se lograron empleando hexano ( $0,88 \pm 0,20$  %) y acetato de etilo ( $2,73 \pm 1,73$  %), no existiendo diferencias significativas entre ambos rendimientos.

Los mayores rendimientos fueron alcanzados empleando etanol, que alcanzó el  $13,55 \pm 5,03$  %, y metanol ( $13,37 \pm 4,05$  %), no existiendo diferencias significativas en el rendimiento empleando cualquiera de estos dos solventes.

Los menores contenidos de compuestos fenólicos se encontraron en los extractos de MPO en diclorometano ( $0,55 \pm 0,41$  g EAG/100 g MPO), hexano ( $1,04 \pm 0,22$  g EAG/100 g MPO) y acetato de etilo ( $1,09 \pm 0,3$  g EAG/100 g MPO), no existiendo diferencias significativas entre el contenido de compuestos fenólicos alcanzados al emplear cualquiera de estos tres solventes.

Contenidos de compuestos fenólicos significativamente más altos se lograron empleando metanol ( $5,49 \pm 1,35$  g EAG/100 g MPO) y etanol ( $6,78 \pm 0,5$  g EAG/100 g MPO). Los que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Las menores actividades antioxidantes, reflejadas en menores porcentajes de apagamiento del radical DPPH se presentaron en extractos de MPO obtenidos a partir de hexano ( $20,69 \pm 3,53$  %) y diclorometano ( $25,46 \pm 13,43$  %), sin existir diferencias estadísticas significativas entre ellos

Los mayores porcentajes de apagamiento se obtuvieron en extractos de MPO obtenidos a partir de etanol ( $86,08 \pm 5,72$  %) y metanol ( $81,25 \pm 2,07$  %), no existiendo diferencias significativas entre el uso de etanol o metanol.

Los resultados registrados muestran que los solventes con los valores más altos de polaridad son los que presentan los mayores rendimientos de extracción, mayores contenidos de compuestos fenólicos y mejor actividad antioxidante (metanol y etanol, respectivamente).

Los datos expuestos evidenciaron un alto grado de afinidad entre los compuestos antioxidantes presentes en la madera de poda de olivo y el etanol. Considerando además que este es un solvente amigable con el medio ambiente y de bajo costo, es que fue seleccionado como el solvente idóneo para este estudio.

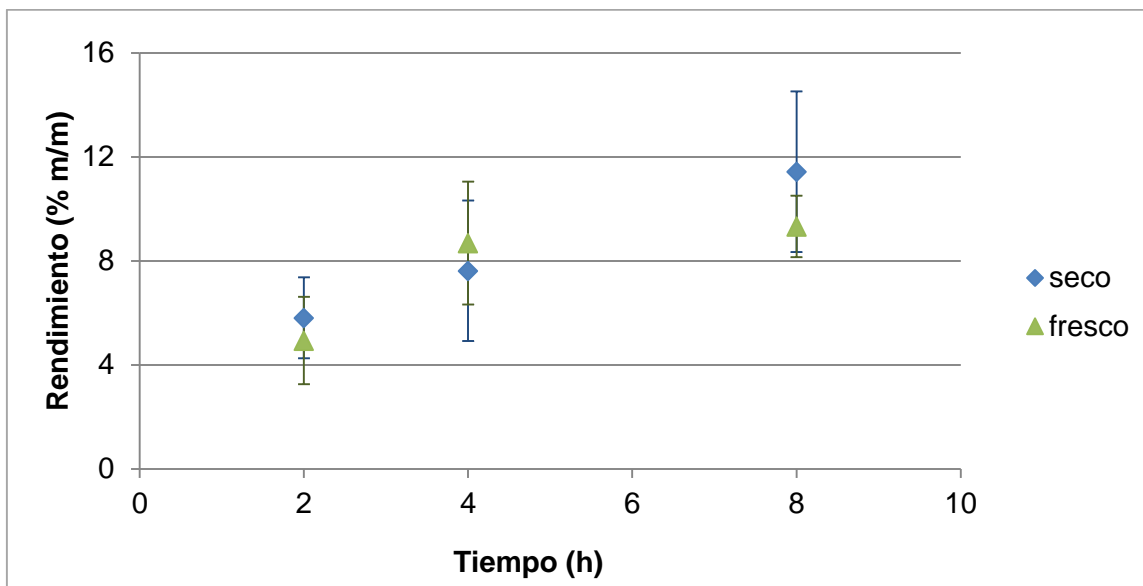
### 5.3. Extracción de antioxidantes.

Una vez acondicionada la materia prima, se realizaron extracciones utilizando muestras de 3 g de MPO fresca y seca en los tres tiempos de extracción evaluados (2, 4 y 8 h), obteniéndose los rendimientos (como porcentaje de masa) que se presentan en la Tabla 8, junto con los valores máximos (Máx.), mínimos (Mín.) y desviación estándar (D.E.).

**Tabla 8.** Rendimientos de extracción (% m/m) a partir de MPO fresca y seca en muestras de 3 g.

| Materia prima | Tiempo (h) | Rendimiento (% m/m) | D.E. | Mín  | Máx   |
|---------------|------------|---------------------|------|------|-------|
| Fresca        | 2          | 6,17                | 2,09 | 4,29 | 8,42  |
| Fresca        | 4          | 10,84               | 2,95 | 7,95 | 13,84 |
| Fresca        | 8          | 11,63               | 1,48 | 9,92 | 12,51 |
| Seca          | 2          | 5,82                | 2,70 | 3,11 | 8,51  |
| Seca          | 4          | 6,05                | 3,09 | 2,91 | 9,09  |
| Seca          | 8          | 11,44               | 1,55 | 9,87 | 12,97 |

Los rendimientos de extracción alcanzados a partir de muestras de 3 g de MPO seca presentaron una correlación lineal positiva con el tiempo de extracción, con un  $R^2 = 0,9998$  (Figura 13). Los rendimientos logrados a partir de MPO fresca muestran la misma tendencia, pero en menor magnitud ( $R^2 = 0,7012$ ).



**Figura 13.** Rendimientos de extracción como % m/m a partir de muestras frescas y secas de 3 g.

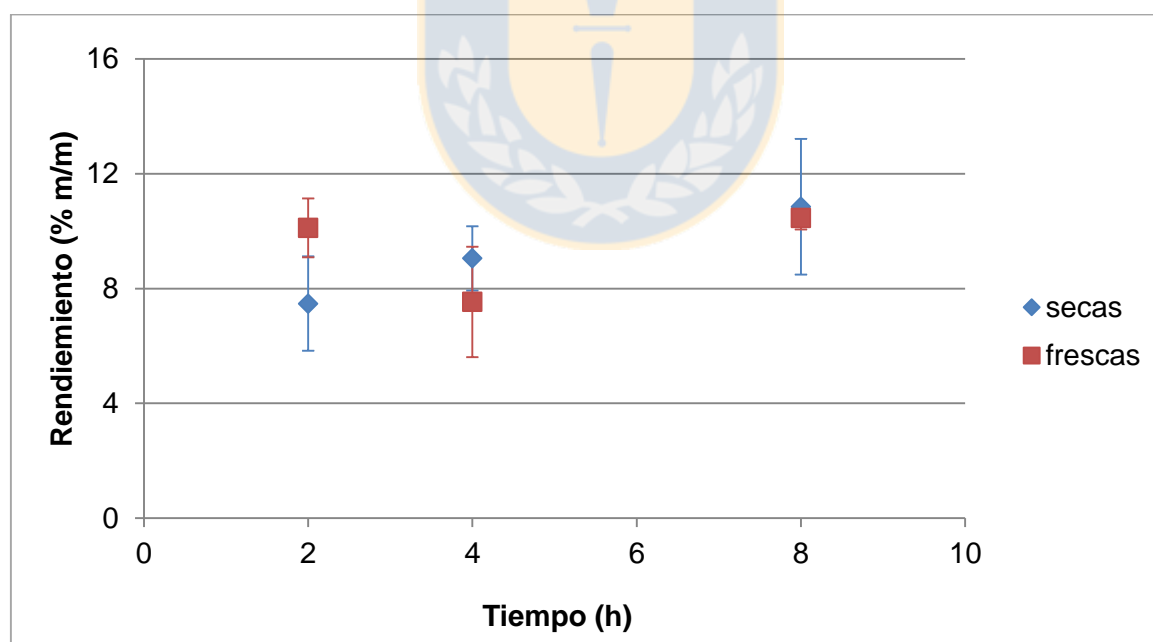
Los rendimientos alcanzados con 3 g de muestra de MPO presentaron una alta variabilidad, lo que impide evaluar las diferencias entre los diversos factores evaluados. Considerando que las demás variables (tiempo, estado de la materia prima, tamaño de partícula, temperatura de trabajo y equipo extractor) se encuentran controladas durante la ejecución de los ensayos, se planteó que lo único que podía estar alterando las extracciones era la cantidad de solvente empleado, el cual podía estar siendo saturado con la cantidad de soluto.

Con la finalidad de evaluar esta hipótesis se realizaron nuevas extracciones empleando 1 g de MPO fresca y seca (Tabla 9).

**Tabla 9.** Rendimientos de extracción como % m/m a partir de MPO fresca y seca en muestras de 1 g.

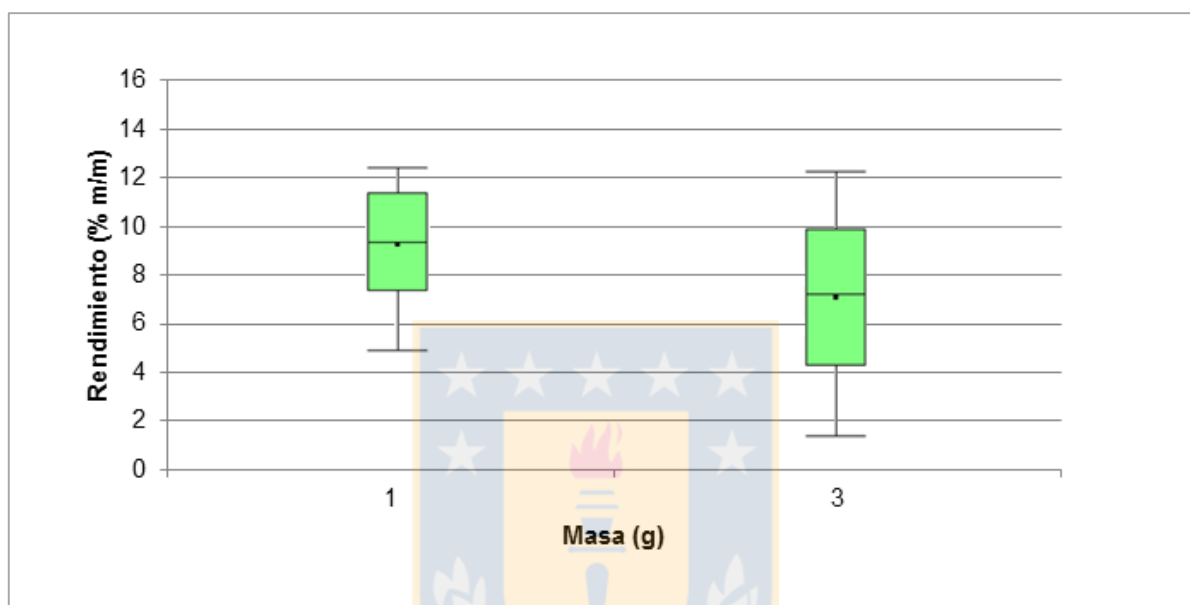
| Materia prima | Tiempo (h) | Rendimiento (% m/m) | D.E. | Mín   | Máx   |
|---------------|------------|---------------------|------|-------|-------|
| Fresca        | 2          | 11,80               | 1,19 | 10,94 | 13,16 |
| Fresca        | 4          | 8,79                | 2,24 | 7,12  | 11,33 |
| Fresca        | 8          | 12,20               | 0,47 | 11,69 | 12,62 |
| Seca          | 2          | 7,48                | 1,64 | 5,74  | 9,01  |
| Seca          | 4          | 9,05                | 1,12 | 7,98  | 10,22 |
| Seca          | 8          | 10,85               | 2,36 | 8,21  | 13,33 |

Los rendimientos alcanzados empleando muestras secas de 1 g de MPO (Figura 14) presentaron una relación lineal positiva con el tiempo de extracción ( $R^2 = 0,977$ ), al igual que en el caso de trabajar con 3 g de muestra, mientras que las muestras frescas presentan un comportamiento no lineal.



**Figura 14.** Rendimientos de extracción como % m/m a partir de muestras frescas y secas de 1 g.

La comparación de los rendimientos logrados empleando masas de 1 y 3 g (Figura 15) claramente muestra una mayor dispersión en los rendimientos logrados empleando 3 g de muestra, mientras que los máximos reportados para ambas masas son bastante similares, lo cual ratificaría que al trabajar con 3 g la extracción de compuestos fenólicos no es completa.

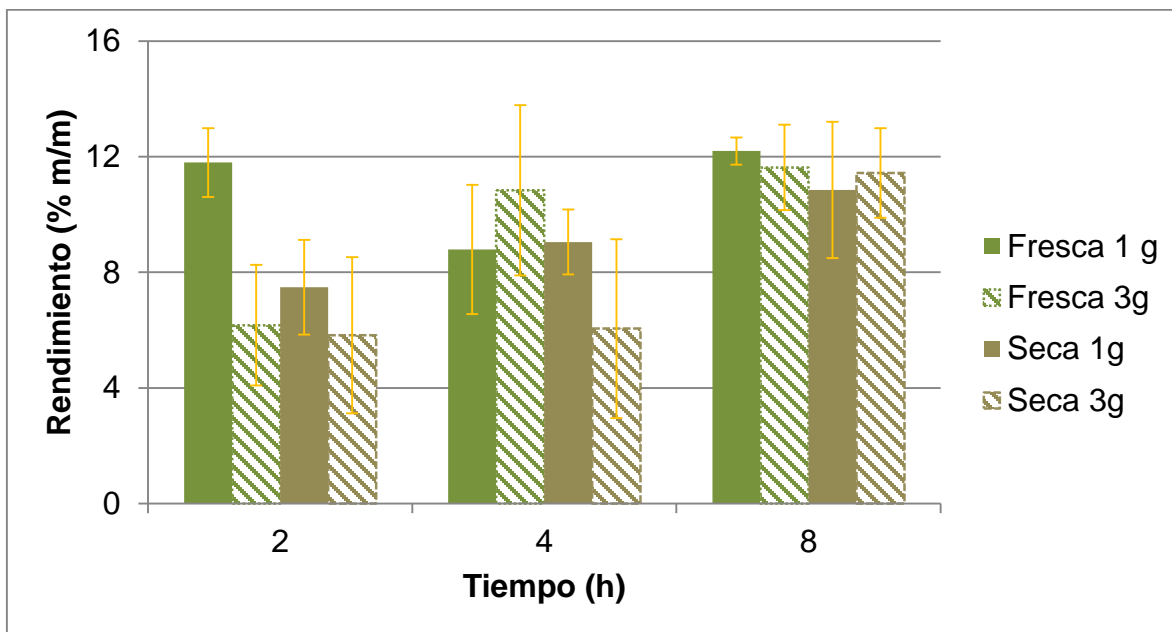


**Figura 15.** Box-plot rendimientos de extracción a partir de muestras de MPO fresca y seca de 1 y 3 g.

De todas las extracciones realizadas (Figura 16) los mayores rendimientos se alcanzaron con los eMPO fresca de 1 g de 2 y 8 h.

Los menores rendimientos se lograron empleando 3 g de materia seca en 4 y 8 h de extracción.

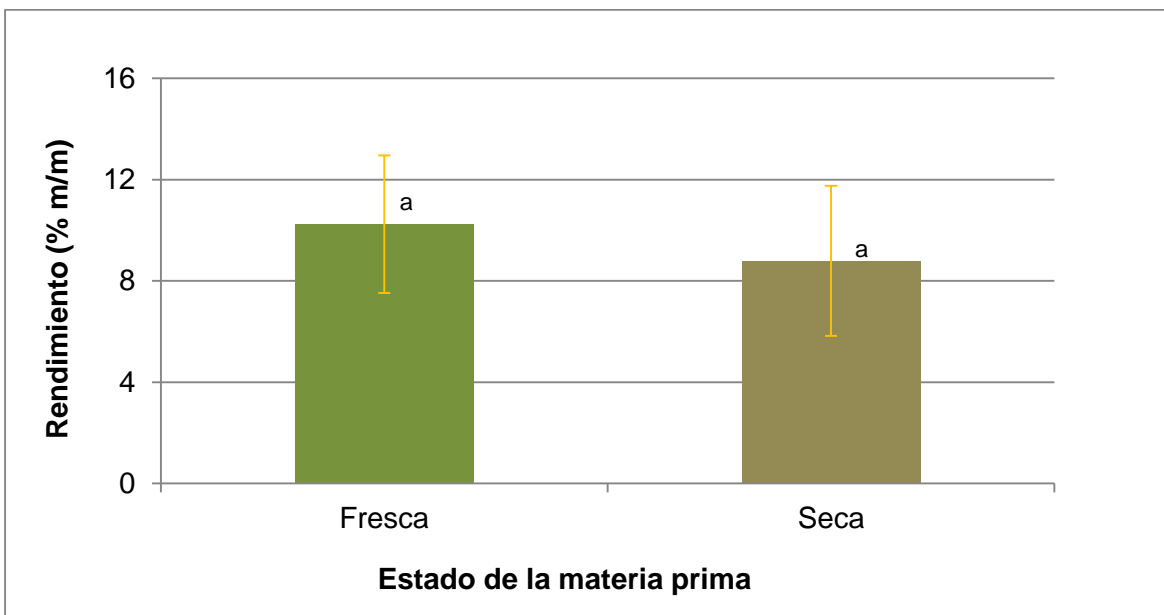
Al evaluar el efecto conjunto de los factores: masa de muestra utilizada, tiempo de extracción y estado de la materia prima (Figura 16) se obtuvo que los tres factores actuando juntos sí influyen en el rendimiento de extracción.



**Figura 16.** Rendimientos en extracciones de 2, 4 y 8 h a partir de 1 y 3 g de MPO fresca y seca.

En el presente estudio también se analizó el efecto de cada factor (masa de muestra utilizada, tiempo de extracción y estado de la materia prima) por separado para así facilitar la elección de las muestras con que se realizaron las sucesivas etapas del estudio.

Al analizar de manera univariada el empleo de MPO fresca o seca se obtuvo que el rendimiento medio de las extracciones en fresco fue de  $10,24 \pm 2,72$  %, mientras con MPO seca se alcanzó una media de  $8,79 \pm 2,96$  % (Figura 17), no existiendo diferencias significativas en el rendimiento al emplear MPO fresca o seca.

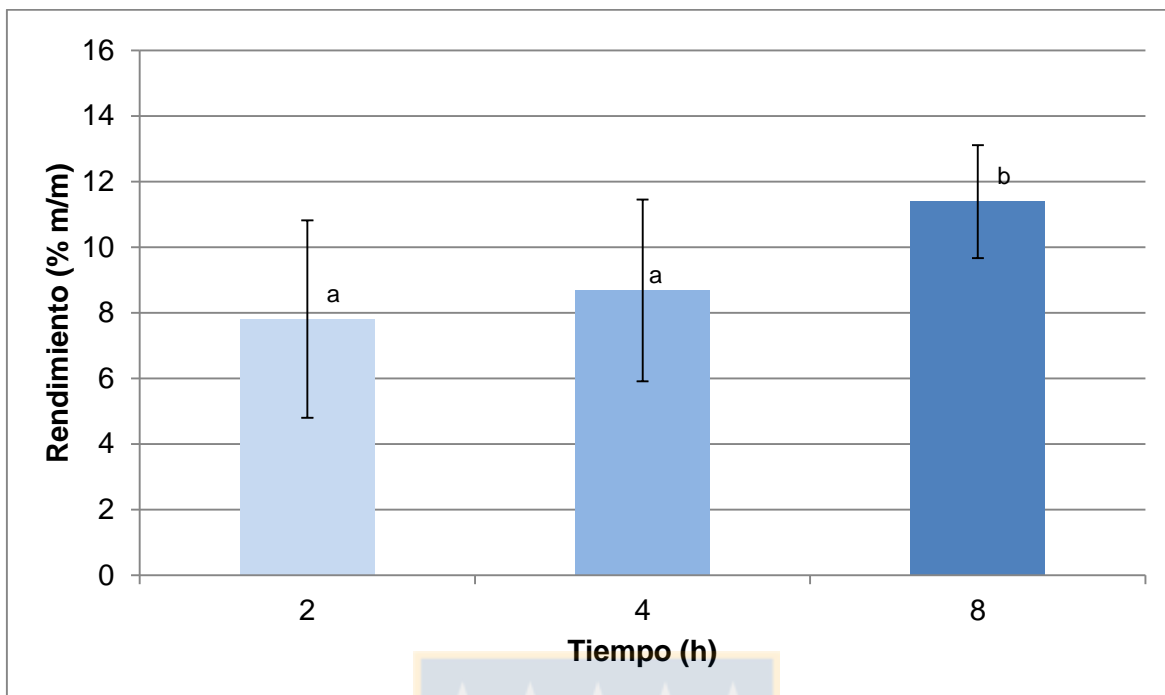


**Figura 17**, Rendimientos de extracción según empleo de MPO fresca o seca, (rendimientos con una letra distinta son significativamente diferente con  $p > 0,05$ ).

Al analizar el efecto del tiempo de extracción (Figura 18) se obtuvo que no existían diferencias significativas en los rendimientos logrados empleando 2 h ( $7,81 \pm 3,01$  %) y 4 h ( $8,68 \pm 2,77$  %), pero estos si son significativamente menores a los logrados empleando un tiempo de extracción de 8 h ( $11,39 \pm 1,72$  %).

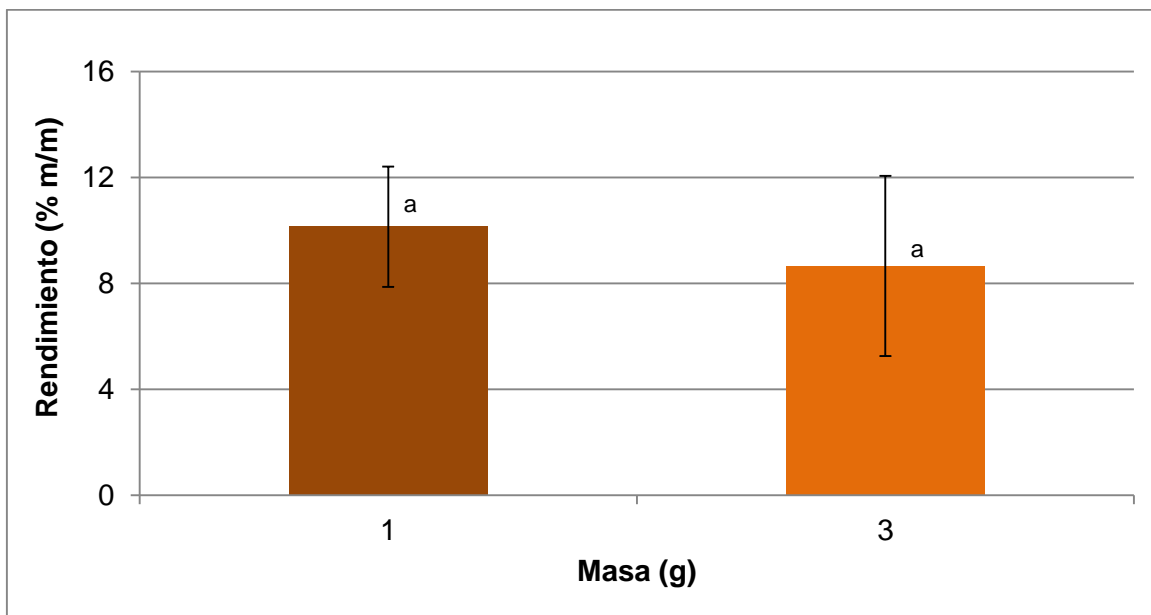
Como era de esperarse al trabajar con rendimientos como porcentaje de masa los valores más altos se lograron empleando el mayor tiempo de extracción, debido a que al permanecer el soluto en contacto con el solvente por más tiempo, se logra una mejor solubilización del soluto aumentando la eficiencia de la extracción. No obstante, cabe destacar que un mayor porcentaje en masa no necesariamente debe corresponder a un mayor contenido de compuestos fenólicos.





**Figura 18.** Rendimientos de extracción según tiempo empleado (*rendimientos con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$* ).

Al evaluar el efecto del empleo de masas iniciales de 1 o 3 g se tuvo que no existieron diferencias significativas en el rendimiento de las extracciones (Figura 19), alcanzando rendimientos medios de  $10,14 \pm 2,27$  % y  $8,66 \pm 3,40$  %, respectivamente. Estos resultados corroboran que al trabajar con 3 g no se está logrando una extracción total de los compuestos fenólicos, lo que se atribuye a una saturación del solvente.



**Figura 19.** Rendimientos de extracción según masa de muestra empleada (rendimientos con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$ ).

Pérez-Bonilla y colaboradores (2006) al trabajar con madera de olivo y etanol acuoso para la extracción de compuestos fenólicos alcanzó un rendimiento del 14,5 %, valor cercano al máximo rendimiento logrado en el presente estudio.

En base a los resultados expuestos se decidió continuar la investigación sólo con las muestras de 1 g, ya que al trabajar con 3 g la extracción era igual o menos eficiente. Por otra parte, considerando la sensibilidad que presentan los compuestos fenólicos a las altas temperaturas se consideró apropiado mantener para las siguientes evaluaciones los tres tiempos de extracción y la materia prima fresca y seca, para así asegurarse de no seleccionar muestras que hubiesen sufrido pérdidas de compuestos fenólicos.

#### 5.4. Contenido de fenoles totales.

Los resultados de la cuantificación de polifenoles totales se presentan en la Tabla 10 como masa equivalente de ácido gálico ( $m_{EAG}$ ) por cada 100 g de eMPO.

**Tabla 10.** Contenido de fenoles totales eMPOs seca y fresca de 1 g.

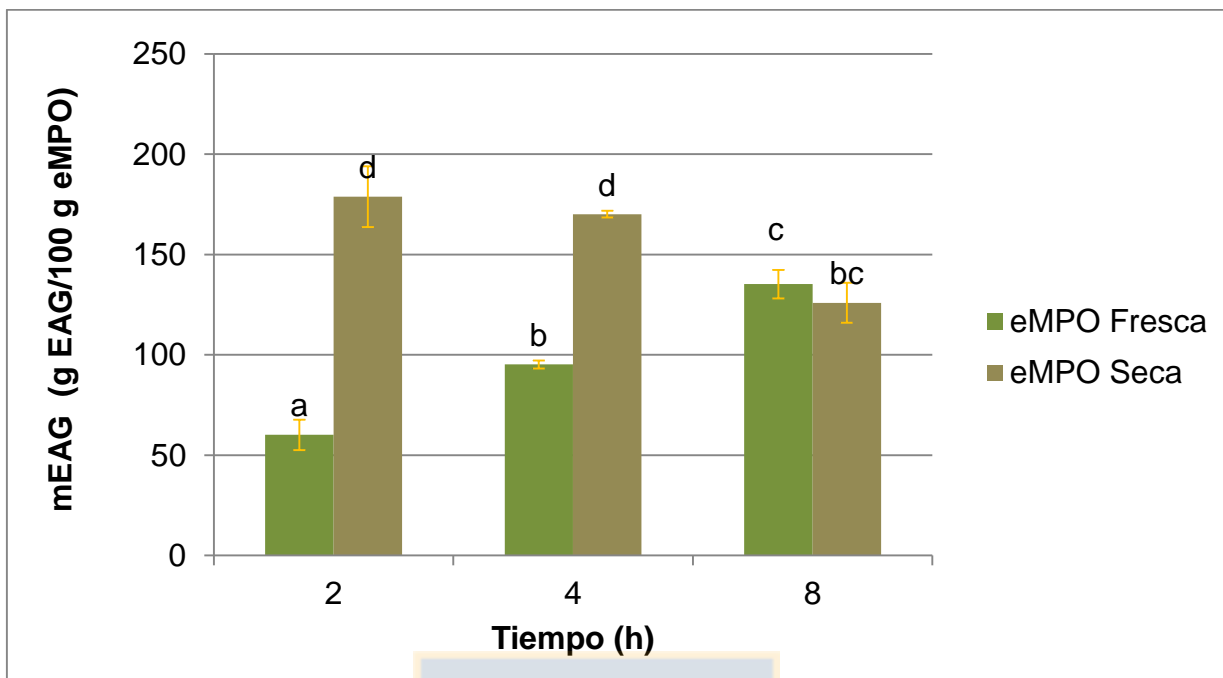
| Materia prima | Tiempo (h) | $m_{EAG}$ ( mg /100 g eMPO) | D,E,  | Mín   | Máx   | * |
|---------------|------------|-----------------------------|-------|-------|-------|---|
| Fresca        | 2          | 60,15                       | 7,57  | 54,8  | 65,5  | a |
| Fresca        | 4          | 95,20                       | 1,98  | 93,8  | 96,6  | b |
| Fresca        | 8          | 135,25                      | 7,14  | 130,2 | 140,3 | b |
| Seca          | 2          | 178,80                      | 15,13 | 168,1 | 189,5 | c |
| Seca          | 4          | 170,10                      | 1,7   | 168,9 | 171,3 | c |
| Seca          | 8          | 125,97                      | 9,94  | 114,5 | 132,2 | b |

*\*Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).*

Los factores tiempo de extracción y estado de la materia prima afectaron de manera conjunta significativamente el contenido de polifenoles presente en los extractos.

El menor contenido individual de polifenoles ( $54,8 \pm 7,57$  mg/100 g eMPO) y el menor promedio ( $60,15 \pm 7,57$  mg/100 g de eMPO) se presentaron en extractos de MPO fresca con 2 h, siendo significativamente menor al de todas las demás muestras evaluadas.

El más alto contenido individual ( $189,5 \pm 15,13$  mg EAG/100 g extracto) se alcanzó a partir del eMPO seca de 2 h. Contenidos de compuestos fenólicos promedios significativamente mayores a todos los demás eMPO se registraron para los eMPO obtenidos a partir de MPO seca de 2 h ( $178,80 \pm 15,13$  mg/100 g eMPO) y seca de 4 h ( $170,10 \pm 1,7$  mg/100 g eMPO).



**Figura 20.** Contenido de compuestos fenólicos según empleo de MPO fresco o seca y tiempo de extracción (*contenidos de compuestos fenólicos con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$* ).

Los eMPO obtenidos a partir de MPO fresca de 4 h y seca de 8 h, presentaron contenidos de compuestos fenólicos similares.

A las 8 h de extracción el contenido de compuestos fenólicos alcanzado por los eMPO obtenidos a partir de MPO seca y fresca son similares.

El contenido de compuestos fenolicos en los eMPO fresca (Figura 20) muestra una correlación positiva con respecto al tiempo de extracción utilizado ( $R^2 = 0,9772$ ), mientras que los extractos obtenidos a partir de MPO seca presentan una correlación negativa a medida que aumenta el tiempo ( $R^2 = 0,9682$ ).

El descenso del contenido de polifenoles en la medida que aumenta el tiempo de extracción puede atribuirse a que a medida que el tiempo aumenta pueden producirse degradaciones de los compuestos fenólicos por la exposición más prolongada al calor.

El empleo de MPO fresca y seca afectó de manera significativa el contenido de compuestos fenólicos de los eMPO. De esta forma, los eMPO obtenidos a partir de MPO seca presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos ( $153,67 \pm 27,49$  mg EAG/100 mg eMPO) que los extractos obtenidos a partir de MPO frescos ( $96,87 \pm 33,94$  mg EAG/100 mg eMPO).

Que el contenido de compuestos fenólicos sea mayor en los eMPO obtenidos a partir de MPO seca, indica que la remoción del agua desde la materia prima previo a la extracción hace más eficiente la obtención de compuestos fenólicos.

Xie *et al.* (2015) empleando ultrasonido en hojas de olivo alcanzó un contenido de 24,52 g EAG/100g extracto.

Kiritsakis *et al.* (2010) evaluaron el contenido de polifenoles presentes en extractos de hojas de tres variedades distintas de olivos griegos, obteniendo una media de 0,6 g EAG/100g de hoja seca.

Los reportes de Xie *et al.* (2015) y Kiritsakis *et al.* (2010) presentaron mayores contenidos de compuestos fenólicos para extractos de hojas de olivo que los reportados en el presente estudio para extractos de MPO.

Bouallagui *et al.* (2011) midieron el contenido de compuestos fenólicos en extractos de hoja de olivo secas, obteniendo un valor de 155,5 mg EAG/100 g de hoja, el cual es cercano a los alcanzados en el presente estudio.

Las diferencias observadas entre los contenido de compuestos fenólicos reportados en literatura y los alcanzados en el presente estudio, sin olvidar el hecho de que son reportes correspondientes a hojas de olivo y en esta investigación se trabajo con MPO, pueden ser atribuidas a una serie de factores ambientales, agronómicos y de extracción (como se señaló en el marco teórico). Esto debido a que los compuestos fenólicos constituyen un grupo de metabolitos secundarios secretados por las plantas como fitoalexinas, de manera que individuos de una misma especie que crecen en diferentes medios presentan variaciones en la síntesis de estos compuestos.

El ensayo de polifenoles totales no es selectivo de la naturaleza del antioxidante, ya que la reacción puede ocurrir con cualquier grupo hidroxilo fenólico oxidable, por lo que sus resultados pueden estar sobredimensionados. Aún así este ensayo entrega una buena aproximación del contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos.

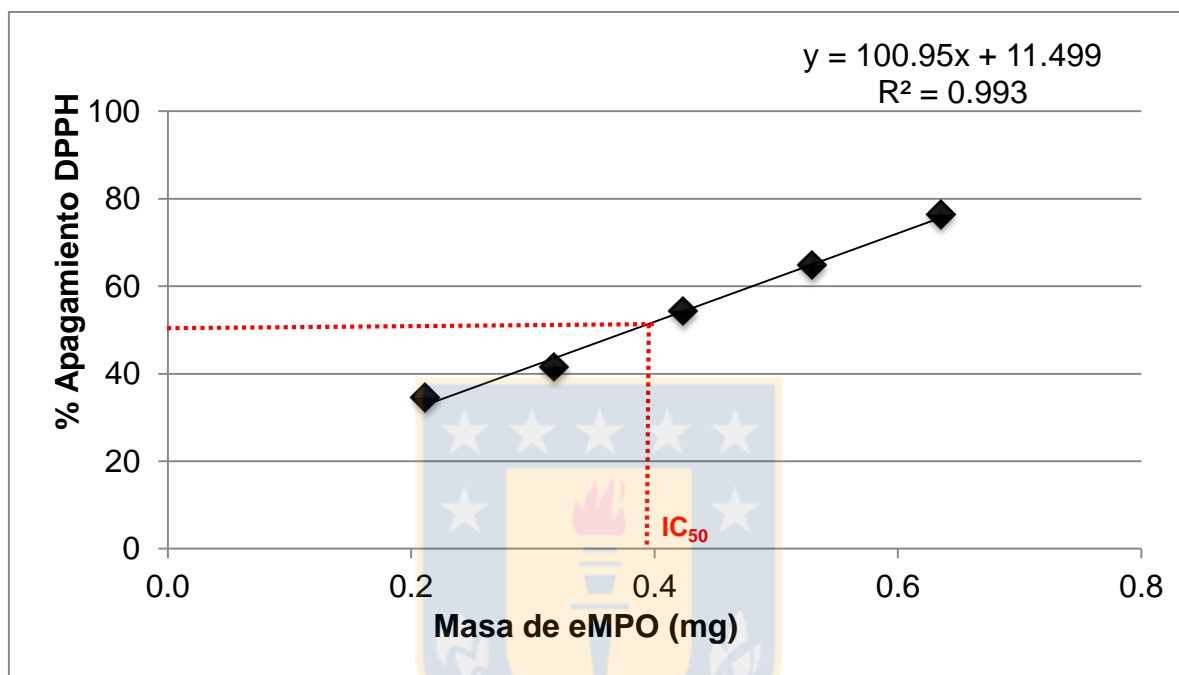
De acuerdo a los resultados expuestos los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos son los obtenidos a partir de MPO seca con 2 h ( $178,80 \pm 15,13$  mg/100 g eMPO) y 4 h de extracción ( $170,10 \pm 1,7$  mg/100 g eMPO).

## **5.5. Evaluación de la actividad antioxidante.**

### **5.5.1. Prueba de apagamiento de radicales de DPPH.**

Los porcentajes de apagamiento del radical DPPH registrados para la masa de extracto agregada en cada alícuota (20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ L) de muestra fueron graficados como muestra la Figura 21.

Todos los extractos de MPO presentaron actividad antioxidante. La interacción del radical DPPH con los extractos presentó una correlación lineal positiva en todos los casos, lo que indica que a mayor cantidad de extracto agregado se logra un mayor porcentaje de apagamiento del radical DPPH.



**Figura 21.** Gráfica de apagamiento del radical DPPH de un eMPO fresca con 2 h de extracción.

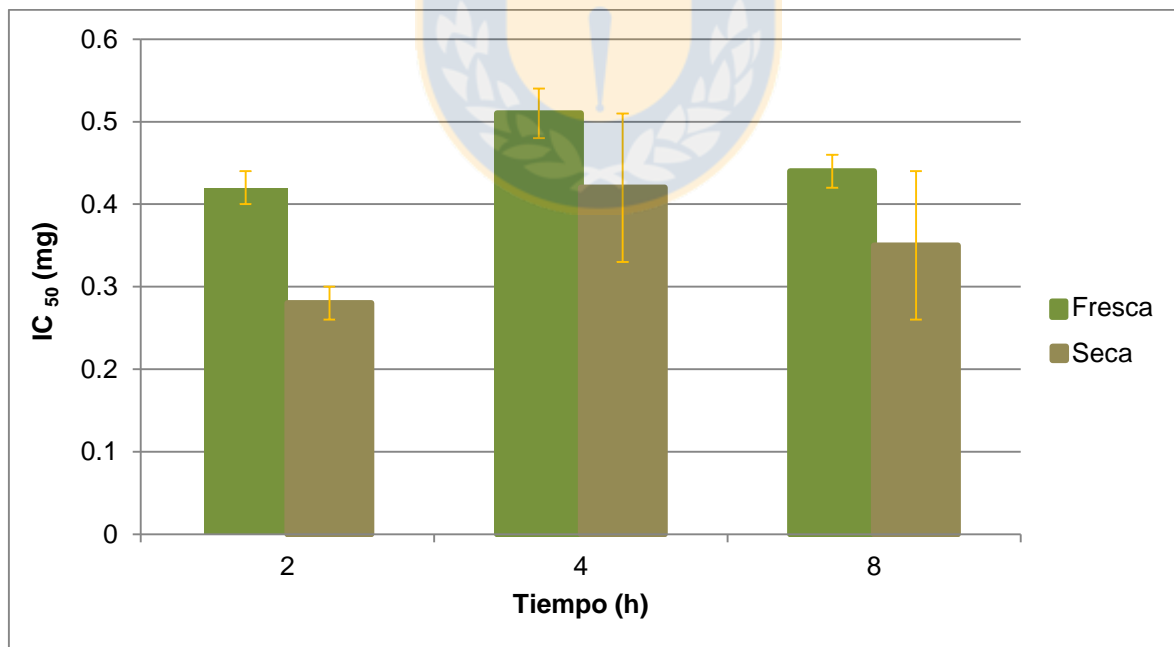
Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para cada extracto se resumen en la Tabla 11. El extracto que presentó mejor actividad frente al radical DPPH, es decir, aquel del que se requiere una menor concentración para lograr el 50% del apagamiento del radical DPPH, fue el extracto de MPO seca con 2 h de extracción ( $0,28 \pm 0,02$  mg), seguida por las actividades mostradas por los extractos de MPO seca de 2 y 8 h.

**Tabla 11.** Valores IC<sub>50</sub> (mg) de los eMPOs.

| Materia Prima | Tiempo (h) | IC <sub>50</sub> (mg eMPO) | D.E. | Mín. | Máx. |
|---------------|------------|----------------------------|------|------|------|
| Fresca        | 2          | 0,42                       | 0,02 | 0,40 | 0,43 |
| Fresca        | 4          | 0,51                       | 0,03 | 0,48 | 0,53 |
| Fresca        | 8          | 0,44                       | 0,02 | 0,42 | 0,45 |
| Seca          | 2          | 0,28                       | 0,02 | 0,27 | 0,29 |
| Seca          | 4          | 0,42                       | 0,09 | 0,36 | 0,48 |
| Seca          | 8          | 0,35                       | 0,09 | 0,25 | 0,42 |

La más baja actividad fue lograda por el eMPO fresca de 4 h ( $0,51 \pm 0,03$  mg), y que fue 1,8 veces menor a la presentada por el eMPO seca de 2 h. El segundo extracto con menor actividad fue el fresco de 8 h ( $0,44 \pm 0,02$  mg).

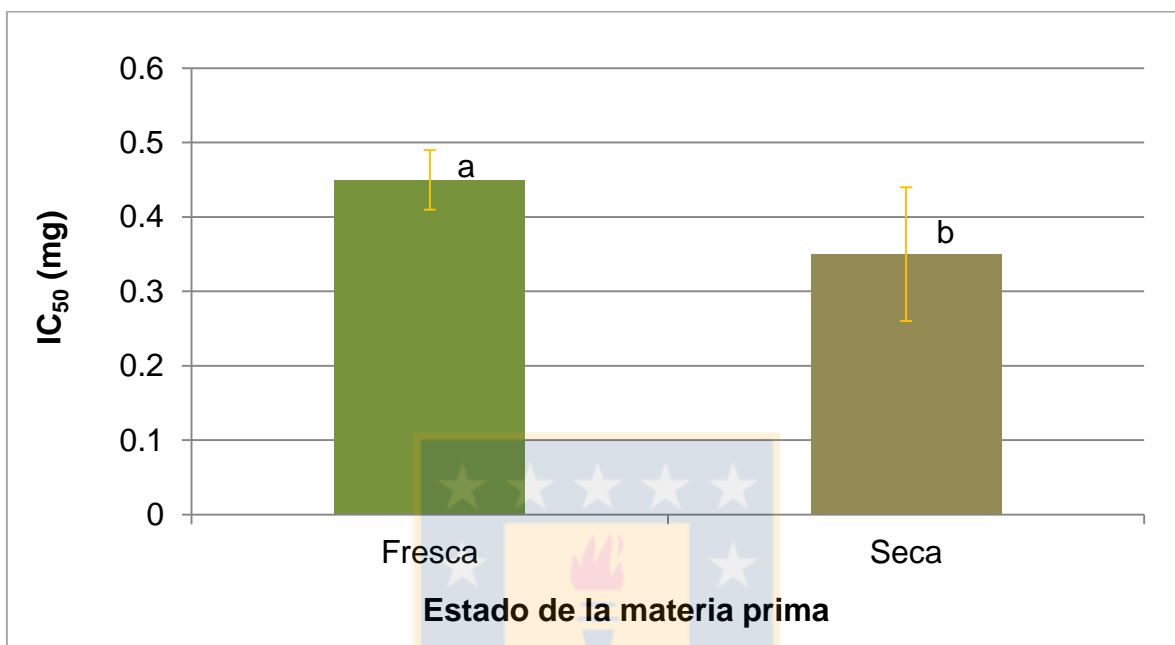
Los factores tiempo de extracción y estado de la MPO empleada no afectaron de manera conjunta la actividad antioxidante presentada por los extractos (Figura 22).



**Figura 22.** Valores IC<sub>50</sub> registrados para los eMPOs según tipo de muestra utilizada y tiempo de extracción.

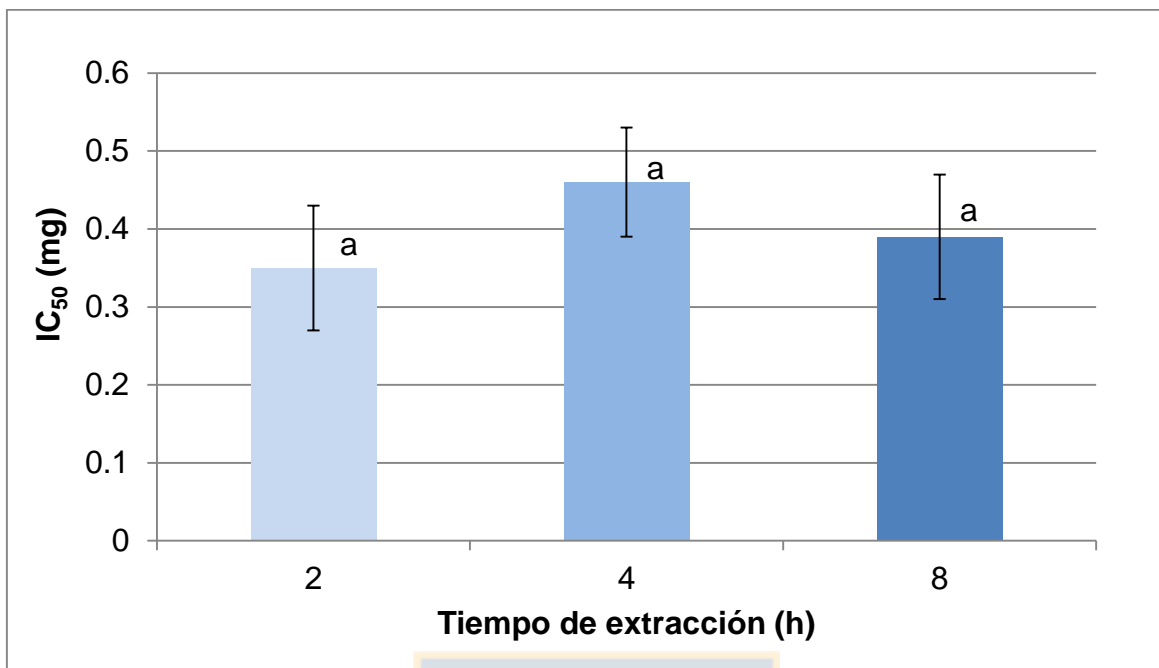


El análisis individual del uso de MPO fresca o seca afecta de manera significativa la actividad antioxidante de los extractos (Figura 23), presentando valores de  $IC_{50}$  significativamente más bajos los extractos obtenidos a partir de MPO seca.



**Figura 23.** Valores  $IC_{50}$  (mg) de los eMPOs según estado de la materia prima. (medias con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$ ).

El tiempo de extracción no afecto de manera significativa la actividad antioxidante de los extractos de MPO (Figura 24).



**Figura 24.** Valores IC<sub>50</sub> (mg) de los eMPOs según tiempo de extracción.  
*(medias con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$ ).*

La actividad antioxidante registrada por los eMPOs, representada a través de los valores de IC<sub>50</sub>, no presentó correlación con los contenidos de fenoles totales de cada extracto.

Hayes y colaboradores (2011) determinaron la actividad antioxidante de extractos de hoja de olivo a través del apagamiento de radicales DPPH registrando un IC<sub>50</sub> de 28,6 µg/mL. Valor bastante más bajo al extracto con mejor actividad registrado en el presente trabajo y que alcanzó los 93,3 µg/mL,

Conde y colaboradores (2009) evaluaron la extracción de antioxidantes a partir de licores obtenidos de explosión de vapor a residuos de poda de olivo, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> de 0,41 y 0,57 mg/mL. Estos valores son mayores a los alcanzados en el presente estudio (0,093 mg/mL).

Los compuestos fenólicos presentes en extracto de hoja de olivo (principalmente flavonoides) han mostrado propiedades antioxidantes debido a su potencial redox, que les permite actuar en diversas formas, tales como donantes de hidrógeno, agentes reductores y quelantes de iones metálicos.

El efecto antioxidante de los extractos de hoja de olivo puede ser debido a su capacidad donadora de hidrógeno, formando radicales libres estables, evitando la oxidación y propagación adicional (Xie *et al.*, 2015).

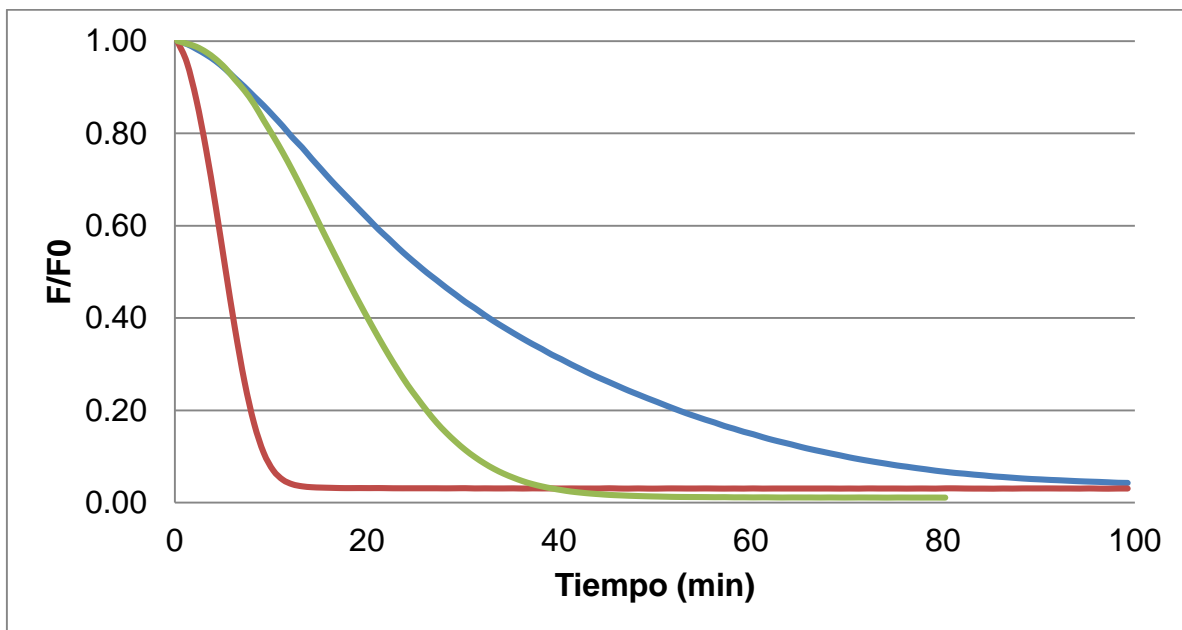
Además, las mezclas de diferentes compuestos fenólicos en los extractos de hoja de olivo presentan mayores actividades antioxidantes que los compuestos individuales debido a la sinergia que se produce entre ellos (Ramos *et al.*, 2013).

De acuerdo a estos antecedentes, fenómenos similares se podrían estar produciendo en los eMPOs obtenidos, y explicarían los resultados expuestos, en donde los extractos con mejor actividad antioxidante son los obtenidos a partir de MPO seca con 2 h de extracción ( $IC_{50} = 0,28 \pm 0,02$  mg).

## **5.6. Evaluación de la capacidad antioxidante.**

### **5.6.1. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC-FL).**

Todos los extractos de MPO presentaron una capacidad antioxidante protectora sobre la fluorescencia en comparación con los blancos. En la Figura 25 se aprecia que la protección prestada por los extractos de MPO seca fue más prolongada en el tiempo que la prestada por los extractos de MPO fresca, con una diferencia de hasta 40 minutos. Esta diferencia se vio reflejada en mayores ABC y, posteriormente, en mayores valores de capacidad antioxidante de los extractos secos que frescos.



**Figura 25.** Gráficas de apagamiento de fluorescencia en el ensayo ORAC, eMPO seca (azul) y fresca (verde) con 4 h de extracción, y blanco (rojo).

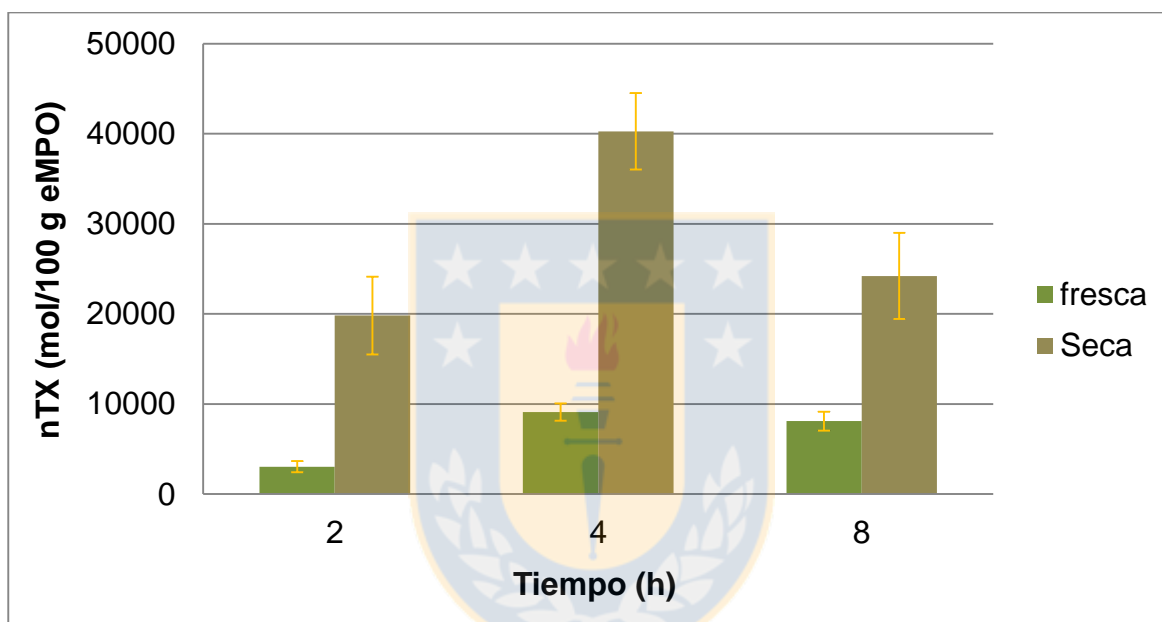
Mediante el cálculo de las ABC de fluorescencia se establecieron los valores de capacidad antioxidante como  $n_{TX}$  (mol /100 g de eMPO) que se resumen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Valores ORAC registrados para los eMPOs.

| Materia prima | Tiempo (h) | $n_{TX}$ (mol /100 g eMPO) | D.E.    | Mín.     | Máx.     |
|---------------|------------|----------------------------|---------|----------|----------|
| Fresca        | 2          | 3032,72                    | 619,36  | 2594,77  | 3470,68  |
| Fresca        | 4          | 9106,53                    | 971,00  | 8419,93  | 9793,13  |
| Fresca        | 8          | 8094,95                    | 1048,03 | 7353,88  | 8836,02  |
| Seca          | 2          | 19830,37                   | 4318,26 | 16776,9  | 22883,84 |
| Seca          | 4          | 40274,73                   | 4253,16 | 37267,29 | 43282,17 |
| Seca          | 8          | 24218,9                    | 4784,32 | 18806,43 | 27883,57 |

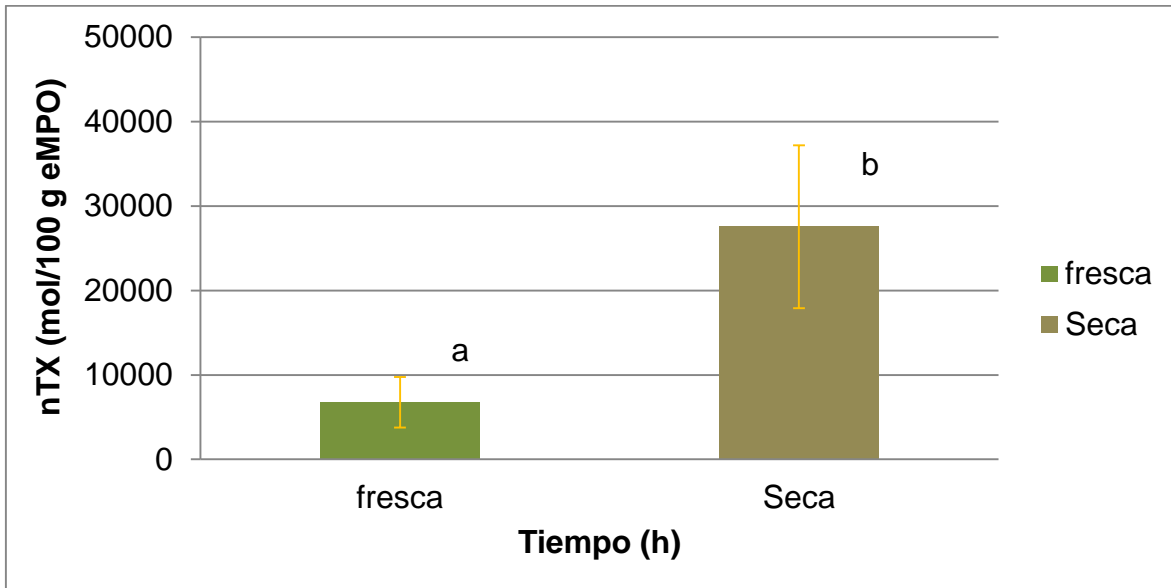
El mayor valor individual ( $43282,17 \pm 4253,16$  mol de Trolox /100 g de extracto) y mayor promedio ( $40274,73 \pm 4253,16$  mol de Trolox /100 g de extracto) se obtuvieron en extractos de 4 horas a partir de MPO seca.

El menor valor individual ( $2594,77 \pm 6,1936$  mol Trolox /100 g eMPO) y el menor promedio ( $3032,72 \pm 619,36$  mol Trolox /100 g eMPO) se alcanzó en el extracto obtenido a partir de MPO fresca con 2 h de extracción.



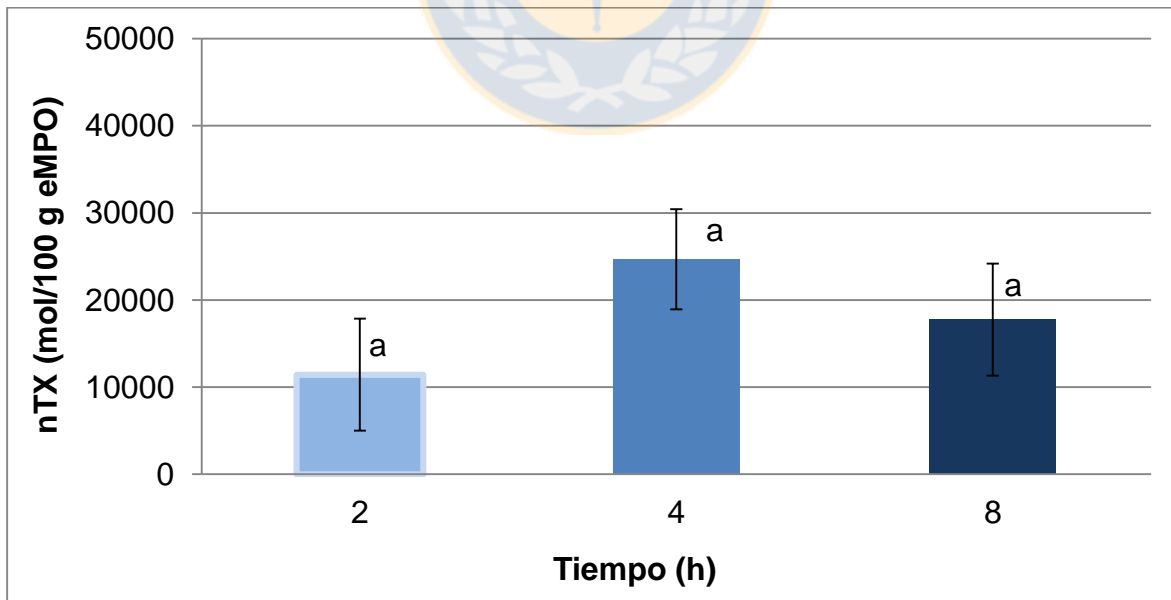
**Figura 26.** Valores ORAC establecidos para los eMPOs.

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos por los eMPOs fresca fueron significativamente más bajas a los obtenidos desde MPO seca (Figura 27).



**Figura 27.** Valores ORAC de los eMPOs según estado de la materia prima (*índices ORAC con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$* ).

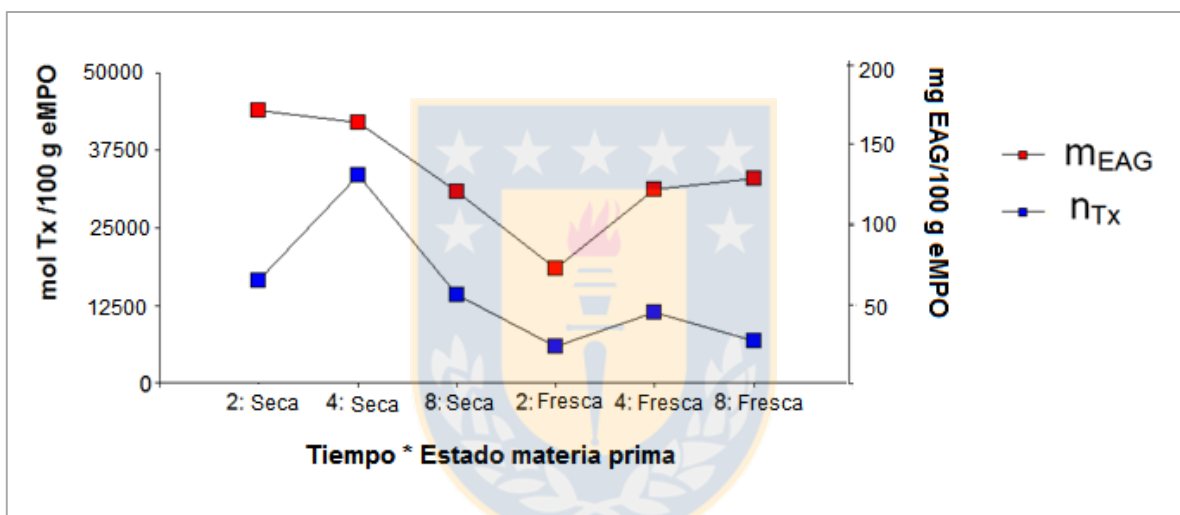
El tiempo de extracción no presentó un efecto significativo en el valor de capacidad antioxidante de los eMPOs (Figura 28).



**Figura 28,** Valores ORAC de los eMPOs según tiempo de extracción (*Índices ORAC con una letra distinta son significativamente diferentes con  $p > 0,05$* ).

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos por los eMPOs muestran una alta correlación con los contenidos de polifenoles totales que ellos presentaron.

La Figura 29 presenta la  $m_{EAG}$  y los  $n_{Tx}$  para cada extracto. En ella se aprecia que ambas variables presentan un comportamiento similar. Es así como los valores máximos y mínimos alcanzados para ambas variables corresponden a los mismos eMPOs: seca de 4h y fresca de 2 h, respectivamente. De lo anterior se desprende la buena correlación obtenida entre los valores de capacidad antioxidante de los eMPOs y su contenido de compuestos fenólicos totales.



**Figura 29.** Correlación entre los valores de capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos presentado por los eMPOs.

Los únicos extractos que no presentan la misma tendencia, son los de tiempos de extracción extremos correspondientes a los eMPOs fresca de 8 h y seca de 2h.

No se encontraron correlaciones entre la actividad antioxidante, evaluada a través del ensayo de apagamiento del radical estable DPPH, y la capacidad antioxidante de los extractos.

Hayes y colaboradores (2011) determinaron la actividad y capacidad antioxidante de extractos de hojas de olivo a través del apagamiento de radicales DPPH y capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), En el primer ensayo obtuvo un IC<sub>50</sub> de 28,6 µg/mL y en el segundo un índice ORAC de 17,43 g Trolox/100 g hoja seca, encontrando una buena correlación entre los resultados obtenidos.

El valor de capacidad antioxidante reportado por Hayes es considerablemente más bajo a los reportados en la presente investigación (mínimo de 7700 g Trolox/100 g MPO),

De acuerdo a los resultados expuestos los extractos con mejor capacidad antioxidante son los obtenidos a partir de MPO seca con 4 h de extracción (402,75 ± 42,53 mol de Trolox /100 g de extracto) destacando en el grupo de los extractos secos.

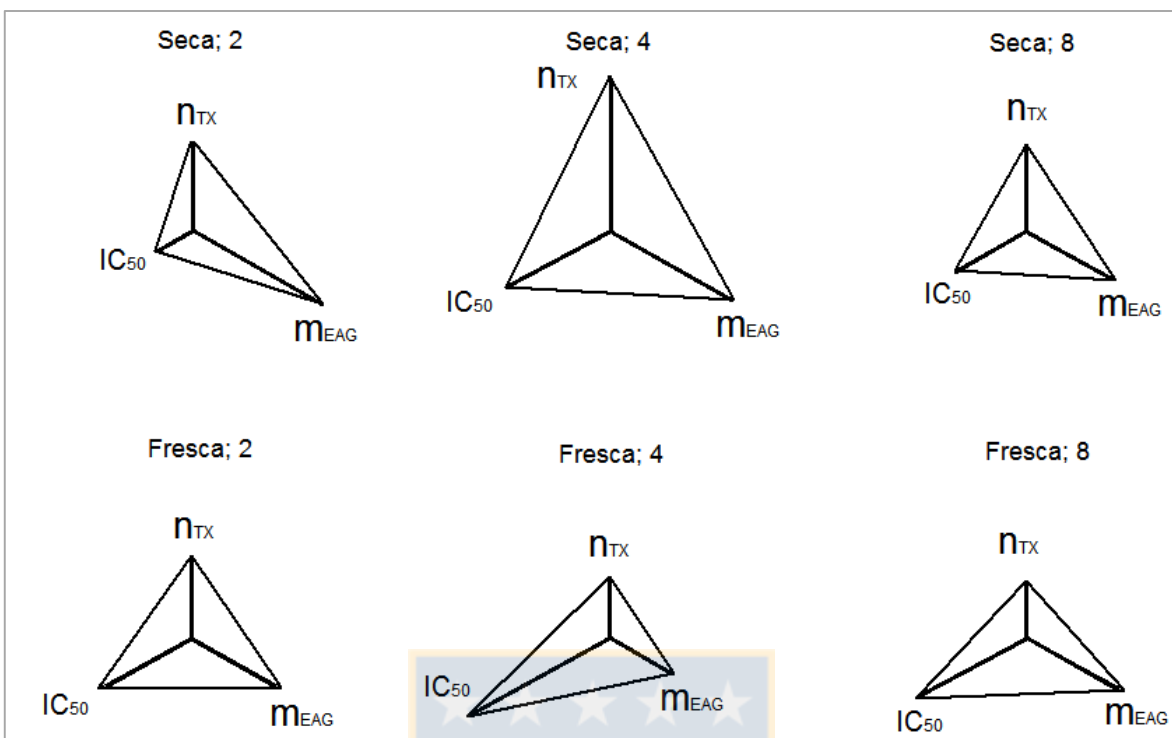
### **5.7. Análisis multivariado.**

Para la descripción de los datos multivariados se utilizaron gráficos de estrellas. En los cuales, cada observación es representada por un estrella, que está construida desde un punto central con “p” ejes, donde cada eje representa una de las variables en estudio. De manera que la longitud del eje respectivo representa el valor de la variable asociada a esa observación.

Para comparar entre estrellas se debe considerar el tamaño global dado por la magnitud de cada uno de sus ejes.

Al comparar los distintos extractos con respecto al tamaño de estrella (Figura 30) se observaron similitudes entre los eMPOs seca de 2 h y fresca de 4 h, sin embargo existe una marcada diferencia en la contribución de IC<sub>50</sub>, donde el extracto de MPO seca de 4 h presentó este eje con menor magnitud, lo que indica una mayor actividad antioxidante.





**Figura 30.** Gráficos de estrellas descriptores de las variables actividad antioxidante, capacidad antioxidante y contenido de fenoles en los eMPOs.

En el mismo extracto, el eje correspondiente  $m_{EAG}$  presentó una mayor magnitud, indicando una mayor cantidad de compuestos fenólicos. Por el contrario, el extracto fresco de 4 h, a pesar de tener tamaño similar presentó una baja actividad antioxidante frente al radical DPPH (mayor magnitud eje  $IC_{50}$ ) y un menor contenido de compuestos fenólicos (menor magnitud de  $m_{EAG}$ ).

Del párrafo anterior podemos concluir que aquellos extractos con mayor actividad antioxidante deben presentar mayor tamaño, menor contribución de  $IC_{50}$  y mayores contribuciones de  $m_{EAG}$  y  $n_{TX}$ .

Los extractos seco de 8 h y fresco de 2 h presentaron una forma simétrica, evidenciando una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante ( $m_{EAG}$  y  $n_{TX}$  respectivamente). En este sentido la contribución de  $IC_{50}$ , a pesar de ser comparable, no reviste un factor diferenciador, pues en la mayoría de los extractos se encontró un índice similar.

La estrella del extracto seco de 4 h destacó dentro del grupo, ya que dado su mayor tamaño y simetría, presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos y la mayor capacidad antioxidante. Comparativamente, el eje  $IC_{50}$  fue el de menor magnitud, correspondiendo al comportamiento que se espera para un extracto con buena actividad antioxidante.

En base a los resultados expuestos se señaló al extracto de MPO seca de 4 h como el mejor extracto, debido a que es el que presenta el comportamiento más cercano a lo que se espera de un antioxidante ideal, es decir, presentó una alta contribución de  $m_{EAG}$ , alta contribución de  $n_{TX}$  y una menor contribución del índice  $IC_{50}$ .

También se señaló al extracto fresco de 4 h como el que presenta menos propiedades antioxidantes, debido a que presentó una muy baja contribución de  $m_{EAG}$  y  $n_{TX}$ , al mismo tiempo que su índice  $IC_{50}$  presentó una gran contribución.

## **5.8. Inhibición de oxidación lipídica.**

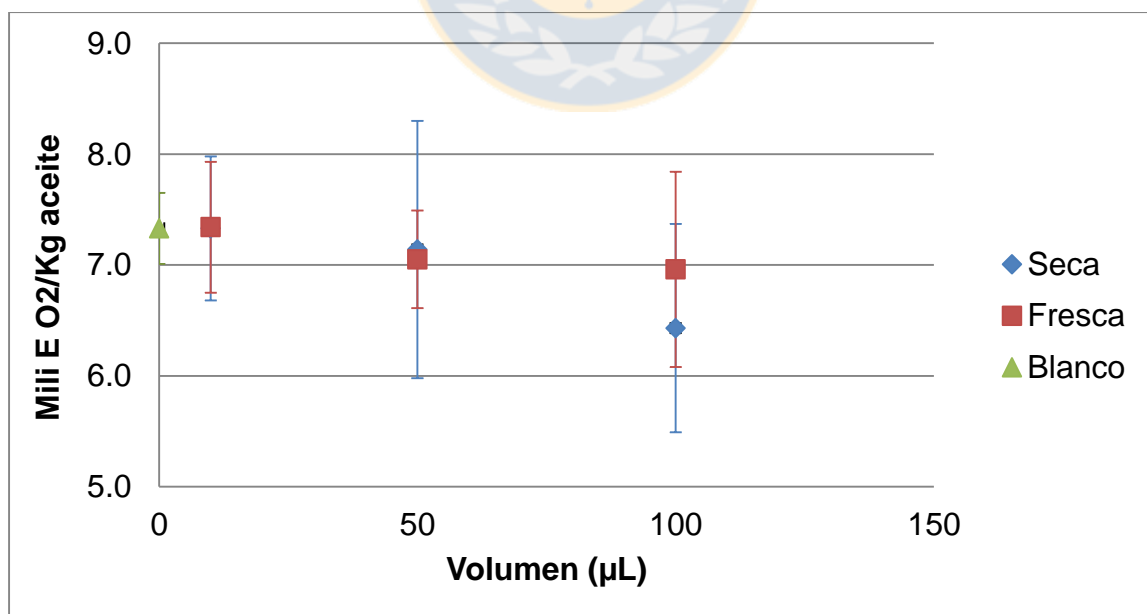
### **5.8.1. Evaluación en microondas.**

De la evaluación del efecto en el IP de tres volúmenes distintos de los eMPOs fresca y seca de 4 h (10, 50 y 100  $\mu$ L) en aceite 100% de maravilla se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Efecto de la adición de 10, 50 y 100  $\mu\text{L}$  de eMPOs fresca y seca de 4 h en el IP de aceites.

| Muestra | Volumen ( $\mu\text{L}$ ) | IP (mEq $\text{O}_2/\text{Kg}$ aceite) | D,E, | CV    |
|---------|---------------------------|--|------|-------|
| Blanco  | 0                         | 7,33                                   | 0,32 | 4,34  |
| Fresca  | 10                        | 7,34                                   | 0,59 | 8,09  |
| Fresca  | 50                        | 7,05                                   | 0,44 | 6,22  |
| Fresca  | 100                       | 6,96                                   | 0,88 | 12,69 |
| Seca    | 10                        | 7,33                                   | 0,65 | 8,88  |
| Seca    | 50                        | 7,14                                   | 1,16 | 16,24 |
| Seca    | 100                       | 6,43                                   | 0,94 | 14,61 |

La adición de cualquiera de las tres concentraciones de los extractos de MPO secos y frescos de 4h en el aceite no mostró efecto significativo en el IP de las muestras de aceite (Figura 31). No obstante, los valores registrados mostraron una leve tendencia a reducir el contenido de miliequivalentes de oxígeno a medida que aumentó la concentración de extracto seco ( $R^2 = 0,9349$ ) o fresco ( $R^2 = 0,8764$ ) agregado.



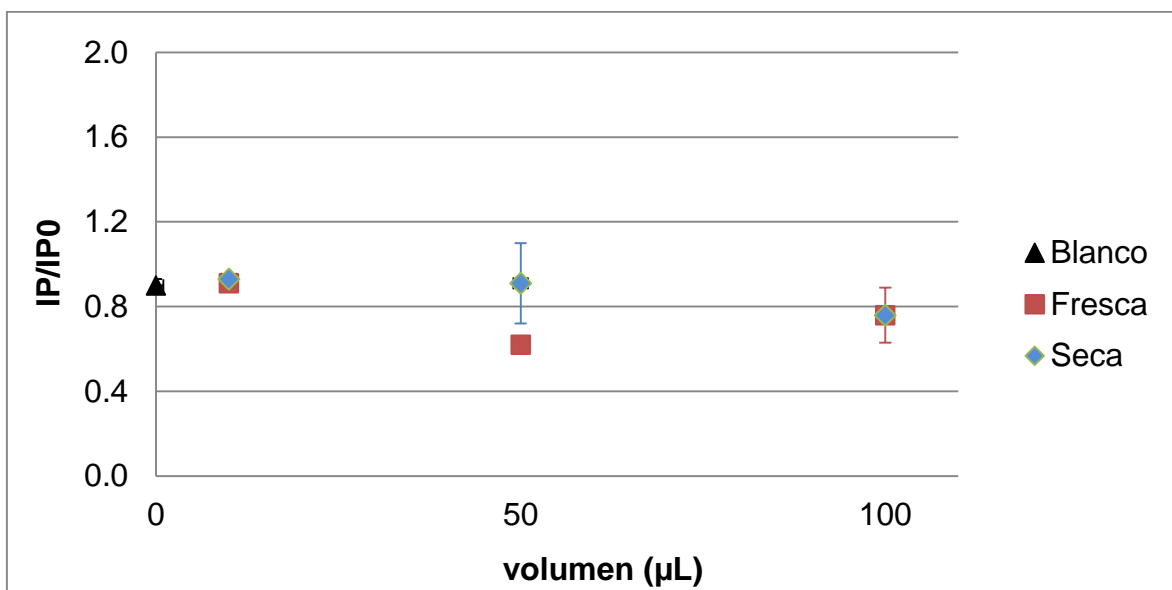
**Figura 31.** Efecto de la adición de 10, 50 y 100  $\mu\text{L}$  de eMPOs fresca y seca de 4 h en el IP de aceites.

Tras un minuto de calentamiento los aceites con extractos de MPO presentaron IP menores a los blancos (Tabla 14). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre las tres concentraciones de extracto añadidas, ni entre los blancos y las muestras.

**Tabla 14.** IP e IP normalizado (IP/IP<sub>0</sub>) de aceites con eMPOs tras 1 minuto de calentamiento en microondas.

| Muestra | Volumen (µL) | IP (mEq O <sub>2</sub> /Kg aceite) | D.E. | IP/IP <sub>0</sub> | D.E. | CV    |
|---------|--------------|------------------------------------|------|--------------------|------|-------|
| Blanco  | 0            | 6,6                                | 0,14 | 0,90               | 0,03 | 3,14  |
| Fresca  | 10           | 6,7                                | 0,85 | 0,91               | 0,04 | 4,66  |
| Fresca  | 50           | 4,4                                | 0,64 | 0,62               | 0,04 | 6,84  |
| Fresca  | 100          | 5,2                                | 0,28 | 0,76               | 0,13 | 17,79 |
| Seca    | 10           | 6,8                                | 0,57 | 0,93               | 0,01 | 0,76  |
| Seca    | 50           | 6,4                                | 0,28 | 0,91               | 0,19 | 21,1  |
| Seca    | 100          | 4,9                                | 0,42 | 0,76               | 0,04 | 5,58  |

Los aceites a los que se les adicionó extracto de MPO seco mostraron una correlación lineal negativa con el contenido de mili equivalentes de oxígeno en los aceites, con  $R^2 = 0,8813$  (Figura 32). Nótese que esta correlación perdió linealidad con respecto a las muestras sin calentamiento (que presentaron un  $R^2 = 0,9349$ ). Los aceites a los que se les adicionó eMPO fresco de 4 h ya no presentan la mencionada tendencia.



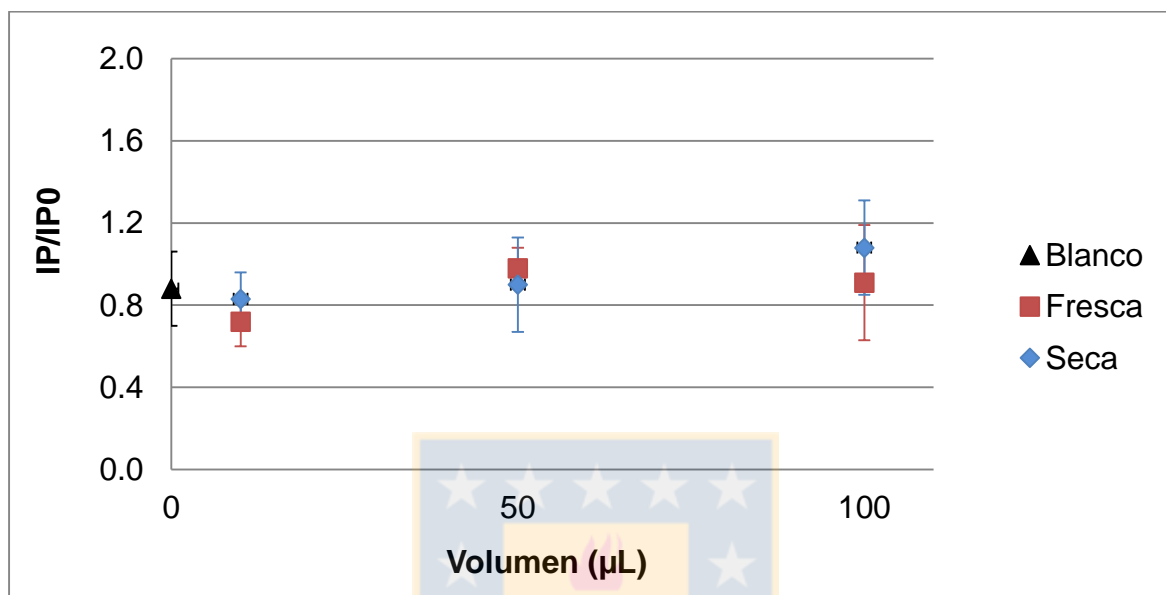
**Figura 32.** IP normalizados de aceites con eMPOs tras 1 min de calentamiento en microondas.

Luego de 3 minutos de calentamiento los aceites con extractos de MPO presentaron IP levemente mayores a los blancos (Tabla 15), sin mostrar diferencias significativas en el IP entre las concentraciones evaluadas, ni entre las muestras.

**Tabla 15.** IP e IP normalizado (IP/IP<sub>0</sub>) de aceites con eMPOs tras 3 min de calentamiento en microondas.

| Muestra | Volumen (µL) | IP (mEq O <sub>2</sub> /Kg aceite) | D.E. | IP/IP <sub>0</sub> | D.E. |
|---------|--------------|------------------------------------|------|--------------------|------|
| Blanco  | 0            | 6,44                               | 1,06 | 0,88               | 0,18 |
| Fresca  | 10           | 5,27                               | 0,44 | 0,72               | 0,12 |
| Fresca  | 50           | 6,96                               | 1,14 | 0,98               | 0,1  |
| Fresca  | 100          | 6,17                               | 1,12 | 0,91               | 0,28 |
| Seca    | 10           | 6,04                               | 0,37 | 0,83               | 0,13 |
| Seca    | 50           | 6,23                               | 0,65 | 0,9                | 0,23 |
| Seca    | 100          | 6,83                               | 0,45 | 1,08               | 0,23 |

Los aceites a los que se les adicionó extracto de MPO seco mostraron una correlación lineal positiva entre el contenido de mili equivalentes de oxígeno y el volumen de extracto agregado, con  $R^2 = 0,9613$  (Figura 33).



**Figura 33.** IP normalizados de aceites con eMPOs tras 3 min de calentamiento en microondas.

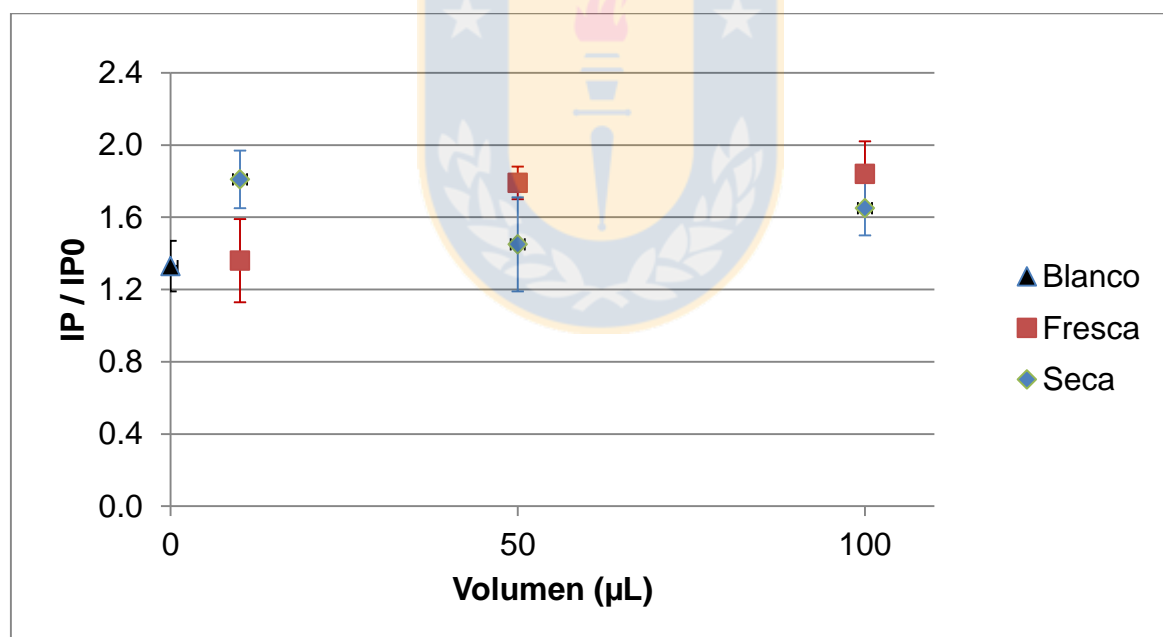
De manera que los aceites con mayores volúmenes de extractos presentaron mayores IP, lo que sugeriría un comportamiento pro-oxidante del extracto. Los aceites a los que se les adicionó extracto de MPO fresco de 4h siguen la misma tendencia que los secos, pero sin alcanzar la linealidad.

Transcurridos 5 minutos de calentamiento (Tabla 16) casi todos los aceites a los que se les adicionaron extractos de MPO presentaron un IP mayor a los blancos. No obstante, no se registraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de extracto añadidas, ni entre las muestras.

**Tabla 16.** IP e IP normalizado (IP/IP<sub>0</sub>) de aceites con eMPOs tras 5 min de calentamiento en microondas.

| Muestra | Volumen (μL) | IP (mEq O <sub>2</sub> /Kg aceite) | D.E. | IP/IP <sub>0</sub> | D.E. |
|---------|--------------|------------------------------------|------|--------------------|------|
| Blanco  | 0            | 9,71                               | 0,63 | 1,33               | 0,14 |
| Fresca  | 10           | 10,07                              | 2,52 | 1,36               | 0,23 |
| Fresca  | 50           | 12,64                              | 0,15 | 1,79               | 0,09 |
| Fresca  | 100          | 12,93                              | 2,88 | 1,84               | 0,18 |
| Seca    | 10           | 13,26                              | 0,04 | 1,81               | 0,16 |
| Seca    | 50           | 10,19                              | 0,18 | 1,45               | 0,26 |
| Seca    | 100          | 10,66                              | 2,5  | 1,65               | 0,15 |

Tanto los aceites con extracto de MPO seco como fresco no presentan correlaciones con la concentración de extracto añadido (Figura 34).



**Figura 34.** IPs normalizados de aceites con eMPOs luego de 5 min de calentamiento en microondas.

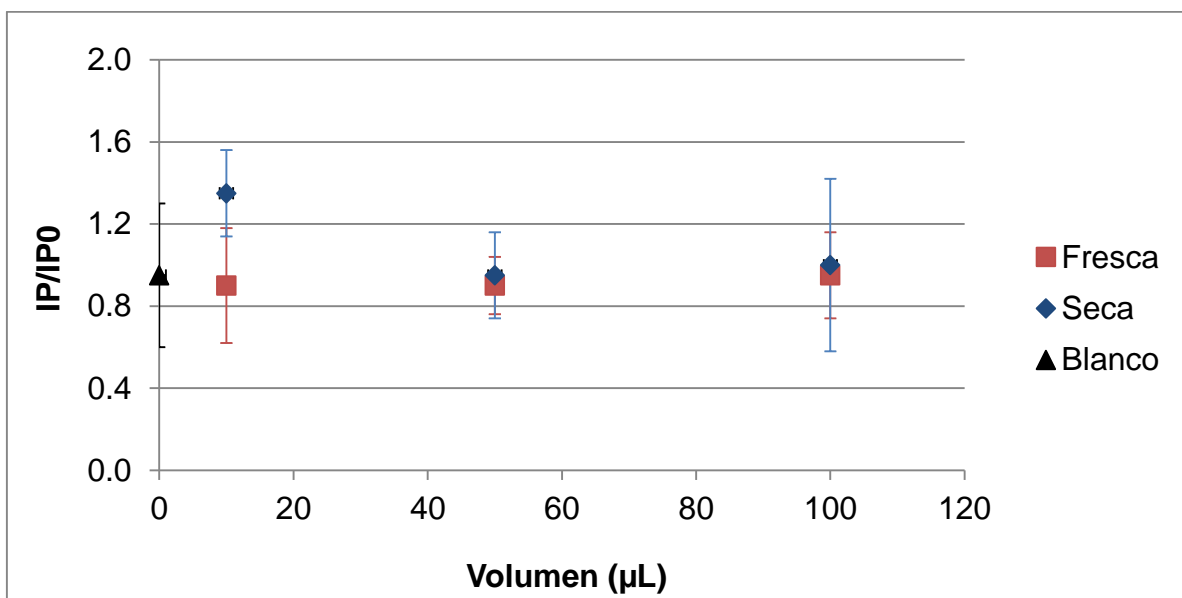
Los aceites con extractos de MPO sometidos a 10 minutos de calentamiento presentaron IPs mayores o iguales que los blancos (Tabla 17). Sin encontrarse diferencias significativas entre las tres concentraciones evaluadas, ni entre las muestras.

**Tabla 17.** IP e IP normalizado (IP/IP<sub>0</sub>) de aceites con eMPOs tras 10 min de calentamiento en microondas.

| Muestra | Volumen (µL) | IP mEq O <sub>2</sub> /Kg aceite) | D.E. | IP/IP <sub>0</sub> | D.E. |
|---------|--------------|-----------------------------------|------|--------------------|------|
| Blanco  | 0            | 6,71                              | 2,06 | 0,95               | 0,35 |
| Fresca  | 10           | 6,75                              | 2,79 | 0,90               | 0,28 |
| Fresca  | 50           | 6,23                              | 0,98 | 0,90               | 0,14 |
| Fresca  | 100          | 6,44                              | 1,02 | 0,95               | 0,21 |
| Seca    | 10           | 10,09                             | 2,31 | 1,35               | 0,21 |
| Seca    | 50           | 6,85                              | 0,47 | 0,95               | 0,21 |
| Seca    | 100          | 6,16                              | 1,95 | 1,00               | 0,42 |

El comportamiento de los aceites con extractos de MPO seca (Figura 35) no presenta relación con las concentraciones de extracto agregadas, mientras que los aceites con extracto de MPO fresca muestran una correlación lineal positiva, con  $R^2 = 0,8033$ .





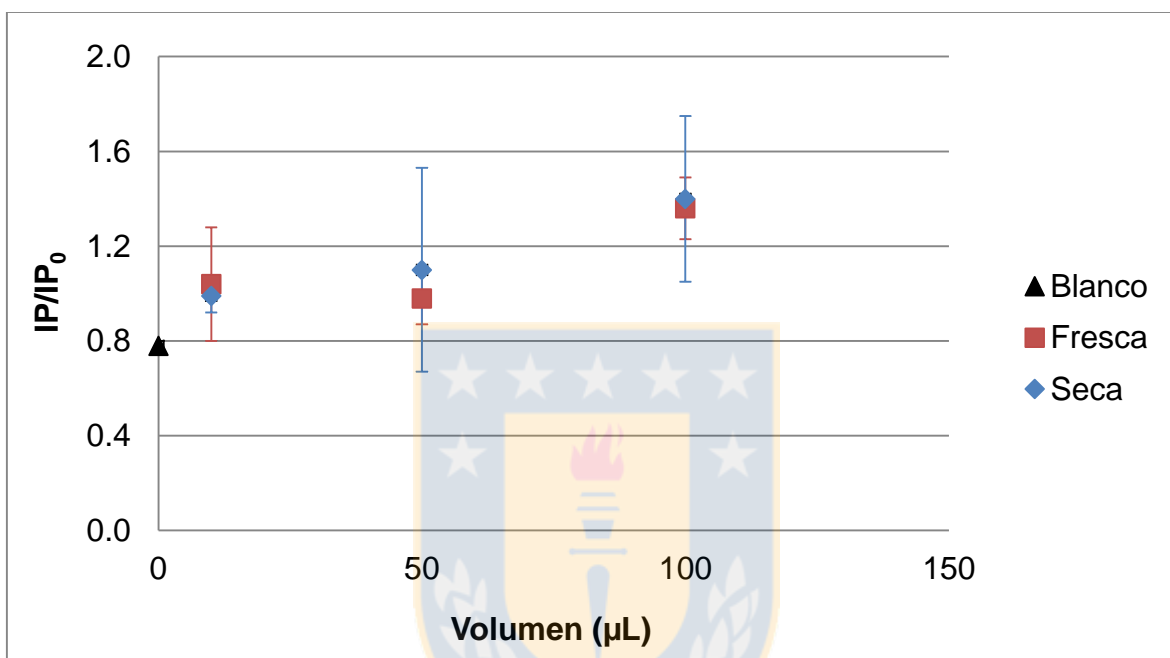
**Figura 35.** IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 10 min de calentamiento en microondas.

Transcurridos 15 minutos de calentamiento (Tabla 18) todos los aceites a los que se les adicionaron extractos de MPO presentaron IPs mayores a los blancos. Sin encontrarse diferencias significativas entre las muestras, pero siendo el valor del blanco significativamente menor al de los aceite con 100 µL de extracto.

**Tabla 18.** IP e IP normalizado (IP/IP<sub>0</sub>) de aceites con eMPOs tras 15 min de calentamiento en microondas.

| Muestra | Volumen (µL) | IP (mEq O <sub>2</sub> /Kg aceite) | D.E. | IP/IP <sub>0</sub> | D.E. |
|---------|--------------|------------------------------------|------|--------------------|------|
| Blanco  | 0            | 5,66                               | 0,11 | 0,78               | 0,02 |
| Fresca  | 10           | 7,56                               | 1,16 | 1,04               | 0,24 |
| Fresca  | 50           | 6,93                               | 0,29 | 0,98               | 0,11 |
| Fresca  | 100          | 9,42                               | 0,33 | 1,36               | 0,13 |
| Seca    | 10           | 7,25                               | 0,15 | 0,99               | 0,07 |
| Seca    | 50           | 7,63                               | 1,83 | 1,10               | 0,43 |
| Seca    | 100          | 8,85                               | 0,95 | 1,40               | 0,35 |

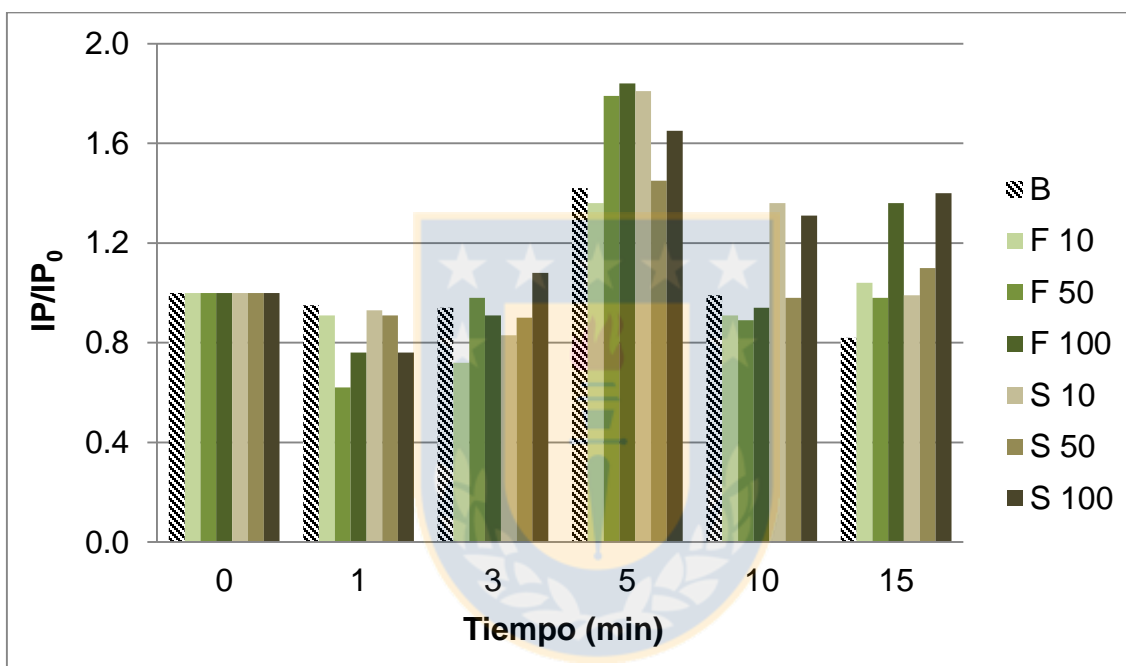
Tanto los aceites con extractos de MPO seca como fresca presentaron correlaciones lineales positivas con la concentración de extracto agregada (Figura 36). Siendo más marcada en los extractos secos con un  $R^2 = 0,9615$  que en los extractos frescos con  $R^2 = 0,6747$ . Estos resultados volverían a sugerir un comportamiento pro-oxidante del aceite.



**Figura 36.** IPs normalizados de aceites con eMPOs tras 15 min de calentamiento en microondas.

La oxidación lipídica es el fenómeno más común de oxidación que ocurre a través de la reacción del oxígeno con ácidos grasos insaturados. Los antioxidantes primarios previenen la oxidación por donación de sus hidrógenos a radicales libres formados durante las etapas iniciales de la auto-oxidación.

El valor de peróxidos es un indicador de la oxidación primaria del aceite, donde los peróxidos son los principales compuestos formados (Taghvaei *et al.*, 2014, Malheiro *et al.*, 2013). Por lo que su valor cambia a lo largo del proceso oxidativo, alcanzando un máximo, debido a la formación inicial de hidroxiperoxidos, para luego disminuir debido a la volatilización de estos compuestos a medida que la tasa de conversión en productos secundarios (aldehídos, cetonas) aumenta (Malheiro *et al.*, 2011).

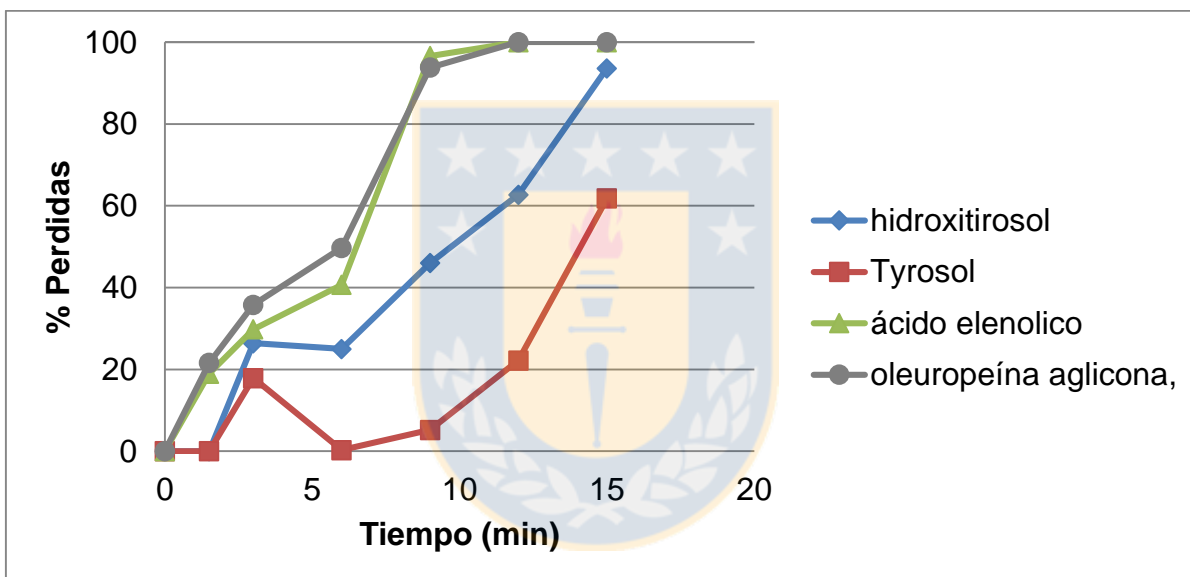


**Figura 37.** IPs normalizados de aceites con eMPOs calentados en microondas (B= blancos, S= seca, F= fresca).

Al apreciar el comportamiento de los IPs durante los 15 minutos de calentamiento en microondas (Figura 37) se aprecia un comportamiento similar al descrito en el párrafo anterior, en el cual, en el primer minuto de calentamiento se ve una disminución del IP, que luego comienza a aumentar a los 3 minutos, para alcanzar su valor máximo a los 5 minutos y luego desciende a los 10 y permanece casi constante a los 15 minutos.

El perfil fenólico del aceite de oliva ha mostrado que sus componentes presentan una alta termo-sensibilidad, Cerretani *et al.*, (2009) compararon el calentamiento en microondas de varios tipos de aceite de oliva por 15 minutos a potencia media (720 W), encontrando pérdidas del 40 % de los compuestos fenólicos a los 6 minutos y pérdidas totales a los 15 minutos.

Los mismos autores hicieron el seguimiento del comportamiento de los principales compuestos fenólicos del aceite durante el calentamiento, encontrando que se perdía el 25 % del HT a los 3 minutos (Figura 38).



**Figura 38.** Efecto del calentamiento en microondas de algunos compuestos fenólicos del aceite de oliva (adaptado de Cerretani *et al.*, 2009).

Los resultados presentados por Cerratini *et al.* (2009) evidencian el efecto de la temperatura en los principales compuestos fenólicos encontrados en aceites de oliva, que son los mismos que se encuentran al realizar extracciones de partes del árbol de olivo.

Considerando que en el ensayo realizado en el presente estudio se utilizó una potencia de calentamiento por microondas mayor a la utilizada por Cerratini *et al.* (2009) (1200 y 720 W, respectivamente), se infiere que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de MPO, obtenido en este estudio, son susceptibles a las temperaturas utilizadas en el ensayo de inhibición de la oxidación lipídica, perdiendo efectividad en estas condiciones.

Los resultados muestran que al minuto y medio de calentamiento, se produjo la pérdida parcial o total del efecto inhibitorio. Entonces, de lo anterior podemos concluir que el efecto protector del extracto sólo se apreciaría durante primer minuto de calentamiento, en el cual los aceites con 100  $\mu$ L de extractos de MPO muestran un contenido de mili equivalentes de oxígeno más bajo que el blanco. Sin embargo, es llamativo el hecho de que al reducirse la tasa de formación de peróxidos, lo que supone un aumento en la formación de compuestos secundarios de oxidación, en algunos casos los extractos de MPO parecen adquirir un comportamiento pro-oxidante.

Malheiro *et al.* (2012) evaluaron el calentamiento en microondas por 10 minutos de aceite de oliva con adición de extractos de té verde. Previo al calentamiento del extracto se produjo un leve aumento en el valor de peróxidos. Cuando las muestras fueron calentadas por 3 min una mayor formación de peróxidos se observó en los blancos en las muestras con extracto como inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos del aceite. Para mayores tiempos de exposición se observó un comportamiento opuesto, donde las muestras con extractos presentaron valores mayores a los blancos.

De lo expuesto en el párrafo anterior podemos deducir que durante el proceso de reducción de la tasa de formación de peróxidos y producto del aumento de la temperatura, se podrían formar compuestos secundarios. Esto podría explicar el hecho de que los extractos de MPO fomentarían la generación de peróxidos, adquiriendo aparentemente un comportamiento pro-oxidante. Por lo que para este tiempo los dos extractos actúan como inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos del aceite. Para mayores tiempos de exposición se observó un comportamiento opuesto, donde las muestras con extractos presentaron valores mayores a los blancos.

#### 5.8.2. Evaluación en estufa de aire forzado.

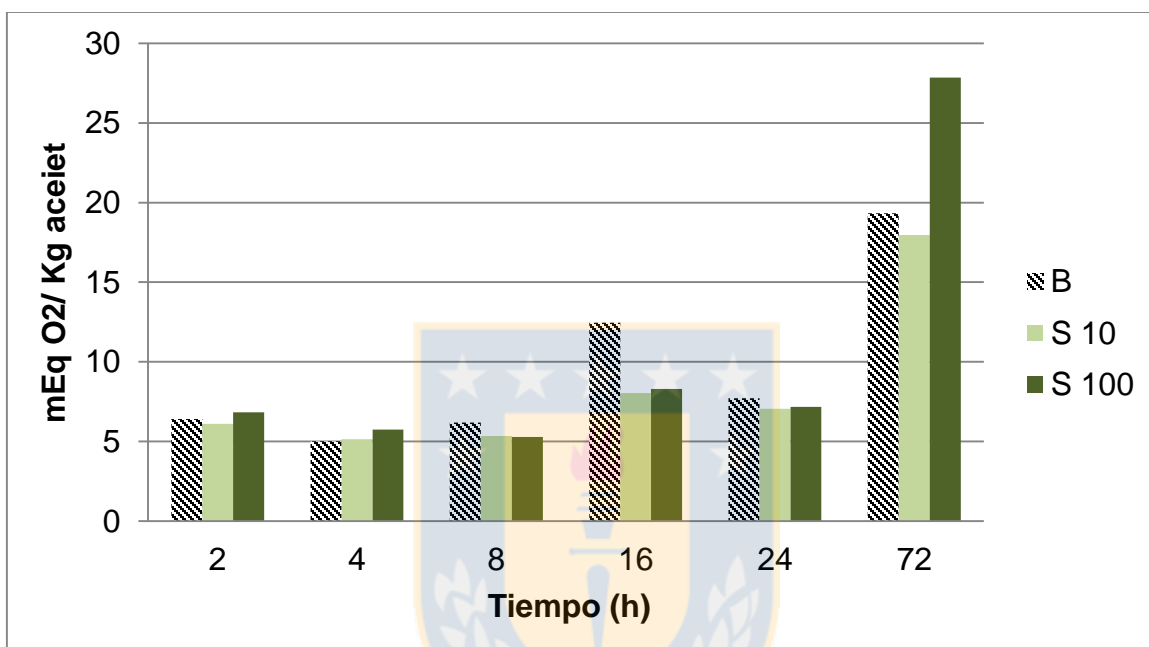
Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla 19.

**Tabla 19.** IPs de aceites con 10 y 100  $\mu\text{L}$  de eMPOs tras calentamiento en estufa.

| Muestra | Concentración ( $\mu\text{L}$ ) | Tiempo (h) | IP (m Eq $\text{O}_2$ / kg aceite) | D.E. |
|---------|---------------------------------|------------|------------------------------------|------|
| B       | 0                               | 0          | 5,75                               | 1,36 |
| B       | 0                               | 2          | 6,41                               | 0,09 |
| B       | 0                               | 4          | 5,00                               | 0,84 |
| B       | 0                               | 8          | 6,19                               | 0,33 |
| B       | 0                               | 16         | 12,45                              | 1,68 |
| B       | 0                               | 24         | 7,71                               | 0,27 |
| B       | 0                               | 72         | 19,32                              | 0,96 |
| S       | 10                              | 2          | 6,11                               | 0,53 |
| S       | 10                              | 4          | 5,15                               | 0,26 |
| S       | 10                              | 8          | 5,35                               | 0,33 |
| S       | 10                              | 16         | 8,03                               | 2,14 |
| S       | 10                              | 24         | 7,06                               | 0,08 |
| S       | 10                              | 72         | 17,97                              | 0,35 |
| S       | 100                             | 2          | 6,84                               | 0,42 |
| S       | 100                             | 4          | 5,75                               | 0,81 |
| S       | 100                             | 8          | 5,28                               | 0,17 |
| S       | 100                             | 16         | 8,30                               | 0,55 |
| S       | 100                             | 24         | 7,17                               | 0,06 |
| S       | 100                             | 72         | 27,84                              | 1,07 |

A las 2 h y 4 h de calentamiento los aceites con extractos presentaron un IP similares a los presentados por los blancos (Figura 39).

Transcurridas 8 h de calentamiento los aceites con extractos de MPO presentaron IPs menores a los aceites blancos.

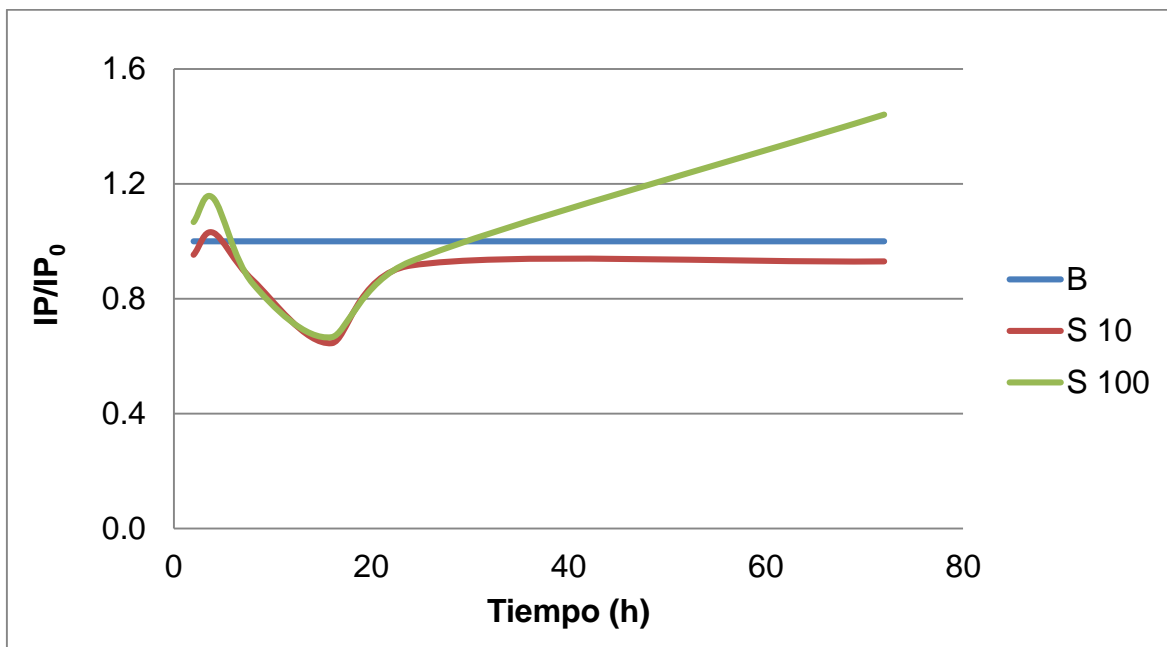


**Figura 39.** IPs aceites con eMPOs (S = seca, B= blanco) calentados en estufa a  $55 \pm 4^{\circ}\text{C}$  por 2, 4, 8 y 16 h.

A las 16 h de calentamiento se puede apreciar el efecto del extracto de MPO a través de un menor IP en los aceites con extracto que los aceites blanco. No existiendo diferencias en el empleo de 10 o 100 µL.

A las 24 horas de calentamiento los aceites con extractos de MPO presentaron IPs similares a los aceites blancos.

Alcanzadas las 72 horas de calentamiento los aceites con 100 µL de extracto de MPO presentaron IPs mayores a los aceites con 10 µL de extracto y a los aceites blancos.



**Figura 40.** IPs aceites con eMPO en estufa a  $55 \pm 4^\circ\text{C}$  por 2, 4, 8 y 16 h.

En forma general (Figura 40) se tiene que los aceites con eMPO presentan inicialmente un leve aumento del IP, seguido de un marcado descenso cercano a las 20 h, el cual se atribuye al efecto antioxidante del extracto. Pasadas las 20 h el eMPO adquiriría un efecto pro-oxidante el cual claramente influye en el IP proporcionalmente con la concentración de extracto añadida.

Los resultados expuestos muestran que los extractos de MPO en estas condiciones que incluyen el uso de altas temperaturas presentan una buena protección contra la oxidación lipídica de aceite de maravilla en las etapas primarias de esta, adquiriendo un comportamiento pro-oxidante en las etapas más avanzadas de la oxidación.

En base a estos resultados se plantea el empleo de los eMPO en aceites destinados a la elaboración de alimentos que no requieran el empleo de condiciones tan drásticas, como por ejemplo su incorporación en ensaladas, mayonesas, salsas y pastas untables.

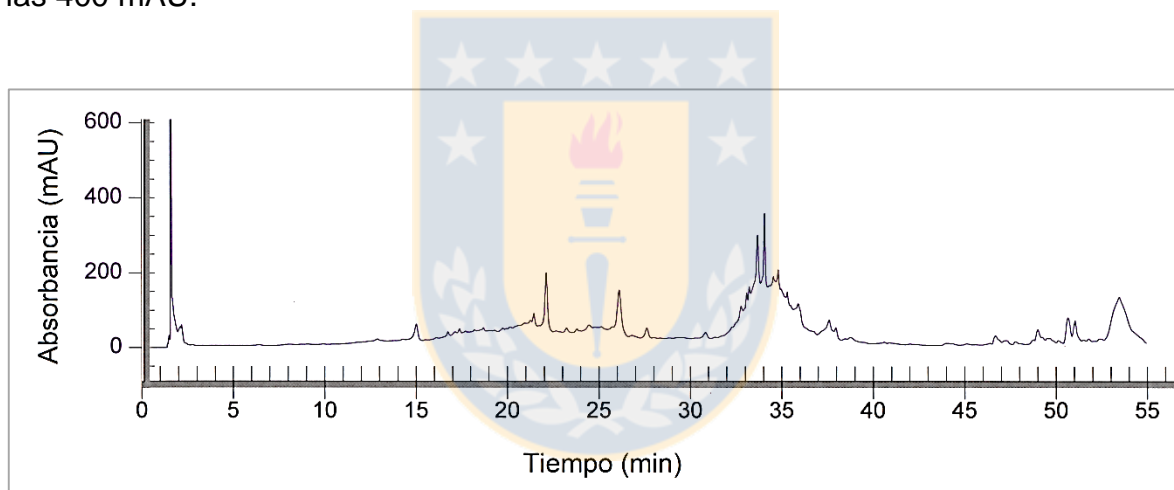


Considerando que el almacenamiento normal de los aceites no incluye su exposición a altas temperaturas se sugiere realizar un seguimiento a temperatura ambiente por un periodo prolongado de tiempo.

### 5.9. Caracterización de antioxidantes por HPLC.

Los perfiles registrados por todos los extractos de MPO evaluados presentan un patrón muy similar.

En el cromatograma de la muestra de MPO seca con 4 h de extracción (Figura 41) se pueden distinguir claramente 10 peaks. La intensidad del mayor de ellos bordea las 400 mAU.



**Figura 41**, Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 4 h de extracción,

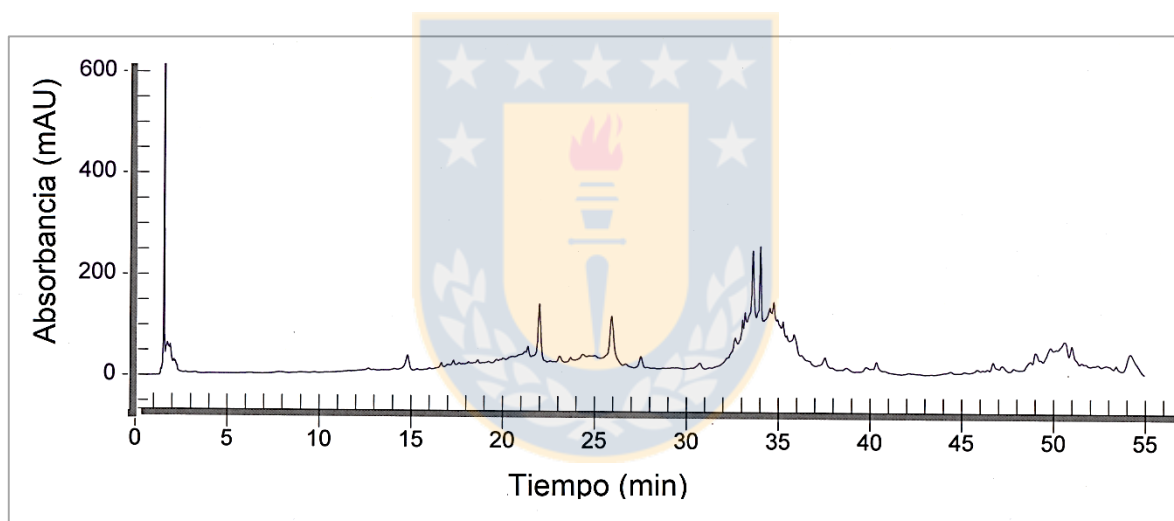
Al inyectar los estándares se tuvo que el HT presentó un tiempo de retención de 6,15 min, la CT de 15,28 min y la OL de 30,49 min.

En base a los tiempos de retención de los estándares se dilucidó que la muestra de extracto de MPO seca con 4 horas de extracción (Figura 41) presentaba CT y OL. El HT no pudo ser detectado por esta metodología.

La ausencia de HT en los extractos de MPO puede deberse a que este es un compuesto más termolábil que los demás, o bien, a que el proceso de extracción utilizado es más eficiente con los compuestos que presentan menor polaridad.

El área bajo la curva correspondiente a CT correspondió a 1,88 % del área total de cromatograma, mientras que el área correspondiente a OL representó el 0,88 % del cromatograma.

En el cromatograma de la muestra de MPO fresca con 4 h de extracción (Figura 42) se pueden distinguir claramente los mismos 10 peaks que en la muestra seca, no obstante, la intensidad del mayor de ellos alcanza solo 200 mAU.



**Figura 42.** Cromatograma a 230 nm de eMPO fresca con 4 h de extracción.

Al igual que en el extracto de MPO seca el extracto de MPO fresca presentó CT y OL. La CT correspondió al 2,46 % del área total del cromatograma. La OL representó el 1,28 % del cromatograma. Para ambos compuestos el área bajo la curva registrada es menor a la registrada en el extracto de MPO seca, no obstante representan un porcentaje mayor del área total del cromatograma.

La mayor área total del cromatograma de MPO seca podría sugerir que este extracto presenta un mayor contenido de compuestos que el de MPO fresca.

Empleando las curvas de calibración obtenidas con los estándares se encontró que el extracto de MPO seco de 4 h presentó 1,00 g de CT /100 g eMPO, mientras que el fresco alcanzó los 0,48 g de CT /100 g eMPO. De esta forma el extracto de MPO seco presentó 2 veces más CT que el extracto fresco.

Siguiendo la misma tendencia que en el caso de la CT, el contenido de OL en el extracto de MPO seca fue de 12,59 g de OL /100 g eMPO, mientras que el del extracto de MPO fresca presentó 6,39 g de OL /100 g eMPO. De forma que el extracto seco presentó 2 veces más OL que el extracto fresco.

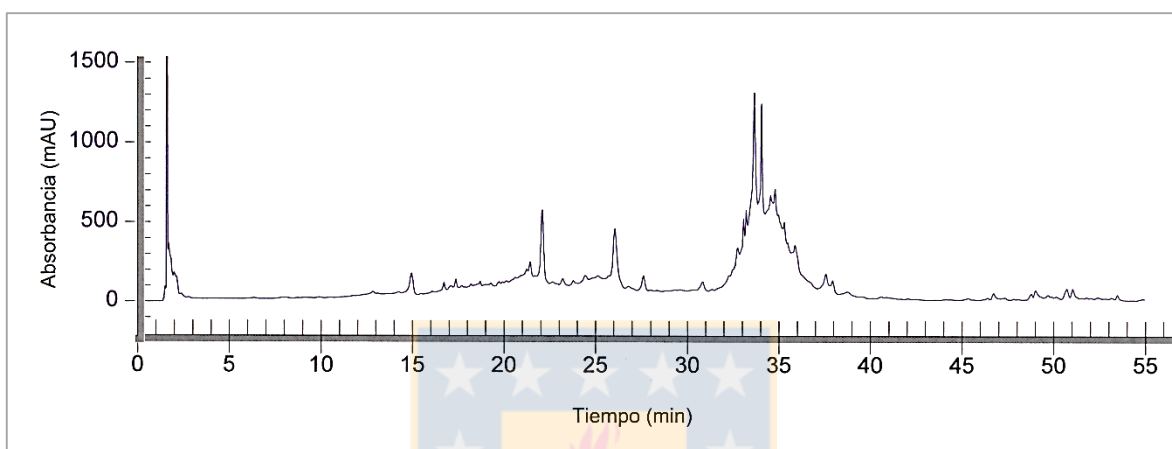
En los extractos de MPO fresca y seca evaluados se encontró una concentración mayor de OL que de CT.

Los resultados de los ensayos de cuantificación de polifenoles, evaluación de la actividad antioxidante y evaluación de la capacidad antioxidante se condicen con los resultados obtenidos en la caracterización de los extractos de MPO fresca y seca. De esta manera, el extracto de MPO seca con 4 h de extracción presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos, mayor valor ORAC, menor IC<sub>50</sub> y mayores concentraciones de OL y CT que la muestra fresca.

Ramos y *et al.* (2013) evaluaron la extracción de antioxidantes a partir de residuos de la producción de aceite de olivo, encontrando un contenido de fenoles totales que relacionó a través de HPLC con la presencia de un mayor número de compuestos fenólicos en el extracto.

El cromatograma de la Figura 43 corresponde a eMPO seca de 2 h de extracción concentrada 4 veces más que la muestra seca de 4 h, el cual presentó los mismos peaks que esta última (Figura 41).

Como se mencionó anteriormente, la intensidad de los peaks del extracto de MPO seca de 4 h de extracción alcanzaron los 400 mAU, mientras que el extracto de MPO seca de 2 h cuatro veces más concentrado alcanzó los 1200 mAU. De esta forma, los peaks del extracto 4 veces más concentrado fueron tres veces más intensos.



**Figura 43.** Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 2 h de extracción.

Al igual que la muestra de MPO seca y fresca, la muestra de 2 h 4 veces más concentrada, presentó CT y OL, pero no presentó HT.

Un 2,17 % del área total del cromatograma del extracto de MPO seca de 2 h correspondió a CT. En comparación con la muestra seca de 6 h el porcentaje del área del extracto 4 veces más concentrado fue 1,12 veces mayor. Mientras que su concentración fue de 3,90 g CT /100 g eMPO, que es 3,9 veces mayor a la del extracto menos concentrado.

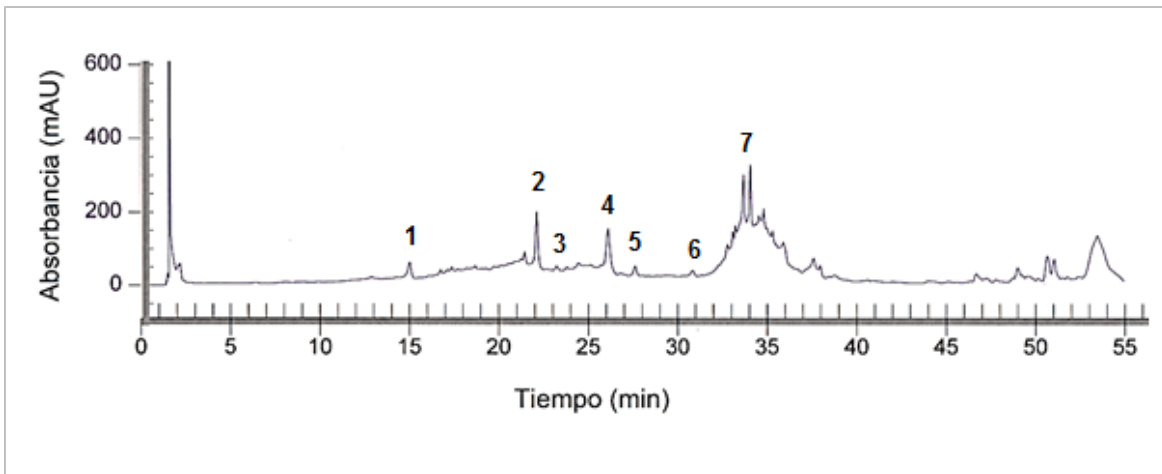
El porcentaje del área del cromatograma correspondiente a OL fue un 0,96 %, En comparación con la muestra seca de 6 h el porcentaje del área de OL fue 1,09 veces mayor. La concentración de OL en el extracto fue de 49.45 g OL /100 g eMPO, que fue 3.9 veces mayor al del extracto sin concentrar.

Pérez-Bonilla *et al.* (2006) caracterizaron a través de HPLC un extracto de madera de olivo en acetato de etilo, reportando la presencia de seis compuestos principales: HT (9,67 min), tyrosol (13,32), cicoolivil (18,63), ácido 7deoxyloganic (24,11), OL (27,46) y ligustrósido (30,01 min). Cabe destacar que el cromatograma de Pérez-Bonilla presenta un pico a los 15 minutos que no fue identificado y que podría corresponder a CT.

Estudios sobre la composición de extractos de hojas de olivo (Altiok *et al.*, 2008; Benavente-García *et al.*, 2000) coinciden en reportar la presencia de los compuestos: HT, tirosol, CT, ácido cafeico, ácido vanilínico, vanilina, rutina, luteonina 7- glucosido, verbascocido, apigenin 7- glucosido, diosmetin 7- glucosido, OL y luteonina.

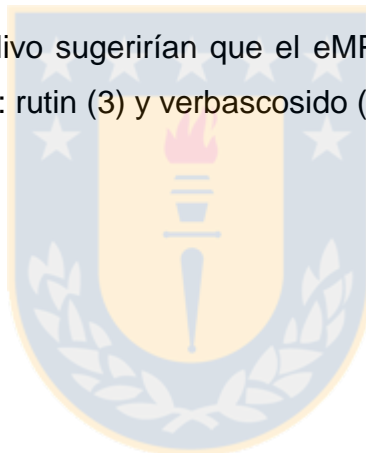
En el presente estudio se caracterizaron eMPO, de los cuales se podría esperar una composición similar a la presentada por la madera y las hojas, ya que los metabolitos secundarios fluyen de manera natural desde madera a las hojas, pasando a través de las ramas (que constituyen la MPO). Los perfiles fenólicos obtenidos son muy similares a los de los autores mencionados, se encuentran coincidencias en el orden de aparición de los compuestos caracterizados, tales como HT y OL. Debido a lo anterior podemos deducir que entre los compuestos no caracterizados en este estudio, se pueden encontrar los propuestos por estos autores.

El cromatograma de MPO presentado por Perez-Bonilla *et al.* (2006) sugeriría que el eMPO (Figura 44) podría también presentar los compuestos: cicoolivil (2), ácido 7-desoxylogánico (4) y ligustrósido (7).



**Figura 44.** Cromatograma a 230 nm de eMPO seca con 4 h de extracción. Posibles compuestos presentes en el extracto: 2, 3, 4, 5 y 7.

Los reportes de hojas de olivo sugerirían que el eMPO podría también presentar (Figura 44) los compuestos: rutin (3) y verbascosido (4).



## 6. CONCLUSIONES.

La obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de MPO es posible.

El proceso de extracción más eficiente en un extractor soxhlet considera el empleo de 1 g de MPO seca a 40° C y molida hasta un tamaño menor a 5 µm, 180 mL etanol, y 4 horas de extracción en oscuridad a temperatura media.

El empleo de MPO de olivo fresca permite alcanzar rendimientos de extracción (% m/m) similares a los logrados con MPO seca. Sin embargo, los extractos de MPO seca presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos, y una actividad y capacidad antioxidante significativamente mayor a la presentada por los extractos de MPO fresca.

El contenido de compuestos fenólicos en los extractos de MPO presentó una buena correlación con los valores de capacidad antioxidante obtenidos por el ensayo ORAC-FL.

Los eMPOs presentaron actividad contra la oxidación lipídica de aceite 100% de maravilla, evaluada a través del IP, hasta los 3 min de calentamiento en microondas a 1200 W. En condiciones de oxidación más forzadas podrían presentar el efecto contrario.

Los extractos de MPO fresca y seca presentaron los mismos perfiles de composición al ser caracterizados por HPLC. En ambos se encontró la presencia de catequina y oleuropeína.

Los extractos de MPO no presentaron hidroxitirosol, lo que fue atribuido a un proceso de extracción más apropiado para compuestos con menor polaridad.

El extracto de MPO seca presentó una concentración de catequina y oleuropeína 2 veces mayor a las presentadas en el eMPO fresca, lo cual explicaría en parte su mayor actividad antioxidante.





## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ahmad, M., J. Cánovas, E. Barrajon-Catalán, V. Micol, J. Cárcel, y García-Pérez J. (2013). *Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 17(1), 120-129.

Altioik, E., D. Baycin, O. Bayraktar y Ulku S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology, 2008, 62(2), 342-348.

Azmir, J., I. Zaidul, M. Rahaman, K. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. Jhurul, K. Gafloor, N. Norulaini y Omar A. (2013). *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. Journal of Food Engineering, 117 (4), 426-436.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (2000). *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves*. Food Chemistry, 68(4), 457-462.

Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. Annals of Agricultural Sciences, 58(2), 173-181.

Bilgin, M., y Şahin, S. (2013). *Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (Olea europaea) leaves*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 44(1), 8-12.

Cazanga, R., C. Leiva., E. Von Bennewitz, X. Quiñones, C.Fredes, J. Hernández, P. Norambuena, F. Varas y M. Retamal. (2013). *Antecedentes técnicos y económicos para la producción de olivo en la región del Maule*. Informe técnico n° 173. Ciren. Santiago, Chile.

Cerretani, L., Bendini, A., Rodriguez-Estrada, M. T., Vittadini, E., y Chiavaro, E. (2009). *Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds*. Food Chemistry, 115(4), 1381-1388.

Conde, E., C. Cara, A. Moure, E. Ruiz, E. Castro y Dominguez H. (2009). *Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning*. Food Chemistry, 114(3), 806-812.

Cuniff, P. (1997). Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.

Damechki, M., S. Sotiropoulou y Tsimidou M. (2001). *Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils*. Grasas y Aceites, 52(3-4), 207-213.

Folch-Cano, C., Jullian, C., Speisky, H., y Olea-Azar, C. (2010). *Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with  $\beta$ -cyclodextrins by ORAC assays*. Food Research International, 43(8), 2039-2044.

García R. A. E. (2011). *Evaluación in vitro/in vivo de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (Solanum phureja)*. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas. Bogotá.

Hayes, J., P. Allen, N. Brunton, M. O'grady, y Kerry J. (2011). *Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (Olea europaea L.), lutein, sesamol and ellagic acid*. Food Chemistry, 126(3), 948-955.

Ignat, I., I. Volf, y Popa V. (2011). *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chemistry, 126(4), 1821-1835.

- Ivanovic, J., S.Dimitrijevic-Brankovic, D. Misic, M.Ristic, y Zizovic I. (2013). *Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds*. Journal of Functiona Foods. 5(1), 416-423.
- Kiritsakis, K., M. Kontominas, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Moustakas y Kiritsakis A. (2010). *Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 87(4), 369-376.
- Lalas, S., V. Athanasiadis, O. Gortzi, M. Bounitsi, I. Giovanoudis, J Tsaknis, y Bogiatzis F. (2011). *Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves*. Food Chemistry, 127(4), 1521-1525.
- Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., ... y Kim, Y. C. (2009). *Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities*. Bioresource Technology, 100(23), 6107-6113.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., ... y Huang, P. L. (2007). *Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 354(4), 872-878.
- Luque de Castro, M., y Japon-Lujan R. (2006). *State of the art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives*. Trends in Analytical Chemistry, 25(5), 501-510.
- Maldonado, O., E. Nahúm, y Bernabé M. (2010). *Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas*. Rev. Med. UV, 10(2), 32-39.
- Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E., y Pereira, J. A. (2011). *Microwave heating: a time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation?*. INTECH-Open Access Publisher ISBN 978-953-307-522-8, p. 597-614.

Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). *Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating?*. Food Research International, 48(1), 148-154.

Malheiro, R., N. Rodrigues, G. Manzke, A. Bento, J. Pereira y S. Casal (2013). *The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating*. Industrial Crops and Products, 44, 37- 43.

Manzanares, P., M. Negro, J. Oliva, F. Saéz, I. Ballesteros, M. Ballesteros, C. Cara, E. Castro, y Ruiz E. (2011). *Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 86(6), 881-887.

Martín, J., S. Villasclaras, y Rodríguez V. (2010). *Producción de bioetanol a partir del residuo de la poda del olivo*. Fundación ECA Bureau Veritas.

Martins, S., S. Mussatto, G. Martinez-Avila, J. Montañez-Saenz, C.Aguilarb y Texeira J. (2011). *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review*. Biotechnology Advances, 29(3), 365-373.

Navarrete, J., Rivas R., Jorquera R., Aguilar C., Astorga A. y Guerra E. 2010. "Aceite de Oliva, Informe Centro de Competitividad del Maule". Talca, Chile. Rescatado de: [http://www.centrodecompetitividaddelmaule.cl/files/aceite\\_oliva.pdf](http://www.centrodecompetitividaddelmaule.cl/files/aceite_oliva.pdf)

Ndhlala, A., M.Moyo, y Van Staden J. (2010). *Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?*. Molecules, 15(10), 6905-6930.

ODEPA (Chile) y Ciren (Chile). 2014. *Catastro frutícola: principales resultados región del Maule/Julio 2014*. Informe técnico. Santiago, Chile.

Peralbo-Molina, Á., y Luque de Castro M. D. (2013). *Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry*. Trends in Food Science &Technology, 32(1), 16-24.

Pérez-Bonilla, M., S. Salido, T. van Beek, P. Waard, P. Linares, A. Sanchez y Altarejos J. (2011). *Isolation of antioxidant secoroids from olive wood (olea europaea L.) guided by on line HPLC-DAD-radical scavenging detection*, Food Chemistry, 124(1), 36-41.

Pérez-Bonilla, M., S. Salido, T. van Beek, P. Linares, J. Altarejos, M. Nogueras y Sanchez A. (2006). *Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (Olea europaea) wood*. Journal of Chromatography, 1112(1), 311-318.

Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., & Zhang, Y. L. (2015). *Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (Olea europaea L.) extracts and their structure–activity relationships*. Journal of Functional Foods, 16, 460-471.

Rahmanian, N., S. Jafaric y Ahmed T. (2015). *Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves*. Trends in Food Science & Technology, 42(2), 150-172.

Ramirez, A., J. del P. (2013). *Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea*. Memoria de título, Doctor en Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada. Departamento de Nutrición y Bromatología.

Ramos, P., Santos, S. A., Guerra, Â. R., Guerreiro, O., Felício, L., Jerónimo, E., ... y Duarte, M. (2013). *Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products*. Industrial Crops and Products, 46, 359-368.

Rubió, L., M. Motilva, A. Macià, T. Ramo y Romero M. (2012). *Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(12), 3105-3112.

Sánchez, S., A. Moya, M. Moya, I. Romero y Torrero R. (2002.). *Aprovechamiento del Residuo de Poda de Olivar Mediante Conversión Termoquímica*. Ingeniería Química, p.194-202.

Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Suarez R. M. (2010). *Obtención de extractos fenólicos a partir de subproductos de la oliva y aplicación en el desarrollo de un aceite de oliva enriquecido*. Memoria de título, Doctor. Universidad de Lleida. Departamento de Tecnología de los Alimentos.

Taamalli, A., D. Arráez-Román, E. Barrajón-Catalán, V. Ruiz-Torres, A. Pérez-Sánchez, M. Herrero, E. Ibañez, V. Micol, M. Zarrouk, A. Segura, Carretero y Fernández-Gutiérrez A. (2012). *Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells*. *Food and chemical Toxicology*, 50(6), 1817-1825.

Taghvaei, M., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., Nikoo, A. M., Rahmanian, N., Hajitabar, J., y Meshginfar, N. (2014). *The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil*. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 124-130

Wijngaard, H., M. Hossain, D. rai, y Brunton N. (2012). *Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin*. *Food Research International*, 46(2), 505-513.