

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“Evaluación de la capacidad antioxidante, fenoles  
totales y nutricional durante la digestión *in vitro* de  
aceitunas *HidroSOStenibles*”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Enero - 2019**

Autor: Petronela Maria Suciú

Tutor/es: Francisco Miguel Burló Carbonell

Lucía Sánchez Rodríguez



## **Resumen**

El riego deficitario controlado (RDC) es un sistema de gestión de suministro de agua que consiste en emplear déficits hídricos en los estados fenológicos de una planta sin tener efectos negativos o consecuentes en el fruto.

En este trabajo se evaluó la influencia del déficit de agua en aceitunas procedentes de dos fincas, una de ellas Dos Hermanas (D0, D1, D2 y D3) y Coria del Río (C0, C1 y C2), antes y después del proceso de la simulación de digestión *in vitro* (fase oral, gástrica e intestinal), analizando para esto la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles totales, ácidos orgánicos y azúcares de la aceituna. El RDC hizo que aumentara la concentración de antioxidantes y fenoles, especialmente en las muestras que recibieron un estrés hídrico moderado más corto (D1).

A lo largo de la digestión *in vitro* de aceitunas HidroSostenibles, se extrae favorablemente una elevada concentración de capacidad antioxidante y de fenoles totales, especialmente en la fase intestinal (I1), y empleando el método ABTS.

El azúcar que se identificó con mayor concentración en ambas fincas fue la maltoheptaosa.

## **Abstract**

The Controlled deficit irrigation (RDC) is a water supply management system that consists of using water deficits in the phenological stages of a plant without having negative or consequent effects on the fruit.

In this project, the influence of water deficit on olives trees was evaluated in two farms: Dos Hermanas (D0, D1, D2 and D3) and Coria del Río (C0, C1 and C2), before and after the process of simulation of *in vitro* digestion (oral, gastric and intestinal phase), analyzing the antioxidant capacity, the content of total phenols, organic acids and sugars of the olive. The RDC increased the concentration of antioxidants and phenols, especially in the samples that received a shorter moderate water stress (D1).

Throughout the in vitro digestion of HydroSOSustainable olives, a high concentration of antioxidant capacity and total phenols is favorably extracted, especially in the intestinal phase (I1), and using the ABTS method. The sugar that was identified with higher level concentration in both farms was maltoheptaose.



*Gracias a Francisco Burló y Lucía por la confianza que han depositado en mí para realizar este trabajo.*

*A mis padres y a mi hermano Catalin.*



UNIVERSITAS  
Miguel Hernández

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	9
1.1. El cultivo del olivo .....	10
1.1.1 Origen .....	10
1.1.2 Descripción botánica .....	12
1.1.3 Producción mundial y exportación.....	14
1.2. Valor nutricional .....	17
1.3. Elaboración aceituna de mesa .....	19
1.4. Productos HidroSOstenibles .....	21
1.5. Métodos para medir capacidad antioxidante .....	22
1.5.1 Método ABTS .....	22
1.5.2. Método FRAP .....	22
1.5.3 Método DPPH .....	23
1.5.4 Método FOLIN-CIOCALTEAU .....	23
1.6. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) .....	24
1.7. Digestión <i>in vitro</i> .....	24
<b>2. Objetivos</b> .....	25
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	27
3.1. Material vegetal .....	28
3.2. Determinación de capacidad antioxidante y fenoles.....	29
3.2.1. Extracciones capacidad antioxidantes y fenoles totales.....	29
3.2.2. Método ABTS .....	30
3.2.3. Método FRAP .....	31
3.2.4. Método DPPH .....	33
3.2.5. Método Folin-Ciocalteau .....	34
3.3. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares .....	36
3.4. Digestión <i>in vitro</i> .....	37
3.5 Análisis estadístico .....	41
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	42
4.1. Evaluación capacidad antioxidante y fenoles .....	43

4.2. Evaluación de la capacidad antioxidante y fenoles durante la <i>digestión in vitro</i> .....	45
4.3. Azúcares .....	48
4.4. Ácidos orgánicos .....	52
<b>5. Conclusión</b> .....	<b>57</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>60</b>





## *1. INTRODUCCIÓN*



## 1.1. El cultivo del olivo

### 1.1.1 Origen

El cultivo del olivo tiene su origen en el Neolítico, en el cuarto milenio a. de C., proviene del Asia Menor y el Oriente Próximo. Posteriormente su cultivo se expande a través del Mar Mediterráneo, desde Oriente a Occidente. En España el cultivo del olivo se introduce en la época de la civilización fenicia (MAPAMA, 2017).

La aceituna u oliva es una drupa carnosa, de tamaño variable, con una sola semilla en el interior (**Figura 1**). Pertenece a la familia *Oleaceae*, es el fruto del olivo (*Olea europaea*), árbol del contexto mediterráneo, que llega de Asia Menor alrededor del siglo VI a.C., procedente de la variedad del olivo silvestre (*Olea chrysophylla lam*), más conocido por «acebuche» (*Olea europea oleaster*).



Figura 1. Aceituna variedad manzanilla (MAPAMA, 2017)

Según la zona geográfica, en España se cultivan diferentes variedades de aceitunas de mesa: Manzanilla, Gordal, Hojiblanca, Carrasqueña, Cacereña, Aloreña, Verdial, Lechín, Picual, etc., algunas de ellas

tienen doble aptitud, es decir, pueden destinar al consumo directo o bien a la producción de aceite.

Las variedades de aceitunas que con mayor frecuencia se destinan a la elaboración de «aceitunas de mesa» son las siguientes (FEN, 2017),(ASEMESA, 2017),(MAPAMA, 2017):

- 🌿 **Gordal**: las que tienen mayor tamaño y de un sabor fuerte.
- 🌿 **Manzanilla**: frutos de menor tamaño que la variedad Gordal, muy redondas, carnosas, de consistencia blanda, hueso pequeño y un sabor típico.
- 🌿 **Hojiblanca**: muy similares a la Manzanilla, pero de carne algo más dura y un color de verdoso a negro.

Atendiendo a su color, las aceitunas de mesa se clasifican en (ASEMESA, 2017), (FEN, 2017), (MAPAMA, 2017):

 Verdes. Se recolectan antes de que el fruto adopte el color dorado o rojizo propio del inicio de la maduración —ciclo denominado «envero»—. Estas aceitunas deben ser firmes, sanas y no tener otras manchas distintas de las de su pigmentación natural. Su color varía del verde al amarillo paja.

 De color cambiante. Obtenidas de frutos con color rosado, rosa vino o castaño. — Negras naturales. El fruto se recoge en plena madurez o poco antes. Pueden ser de color negro rojizo, negro violáceo, negro verdoso, o castaño oscuro.

 Negras oscurecidas por oxidación. Obtenidas de frutos totalmente maduros y que una vez que se tratan adquieren un color negro característico. Las principales presentaciones de las aceitunas son las siguientes (ASEMESA, 2017):

- Deshuesadas: son las aceitunas a las que se les ha quitado el hueso y conservan prácticamente su forma original.
- Rellenas: aceitunas deshuesadas que se proceden a rellenar con uno o más ingredientes como anchoas, pimienta, cebolla, etc.
- Saladas: aceitunas deshuesadas cortadas en gajos o lonjas, acompañadas o no de alcaparras y otros ingredientes de relleno.
- Alcaparrado: aceitunas deshuesadas o enteras, sin relleno o con, generalmente de pequeño tamaño y acompañadas de alcaparras.
- Tiradas: aceitunas que no van colocadas según un orden establecido, sino según se rellene el envase.
- Colocadas: aceitunas que se encajan en los envases, siguiendo un orden establecido, simétrico o adoptando formas geométricas (ASEMESA, 2017).

### 1.1.2 Descripción botánica

La familia oleaceae comprende 600 especies y 29 géneros, entre ellas, el olivo, *Olea europaea* L. Es habitual nombrar a los olivos cultivados *O. europaea* var. *Communis*, para distinguirlos de la variedad salvaje, el acebuche (*O. europaea* var. *Silvestris*) (MAPAMA, 2017).

**TRONCO Y RAMAS:** se trata de un árbol poco elevado, los ejemplares más altos cultivados no superan los 10 metros y puede llegar a alcanzar una edad de 500 años. El tronco es grueso y de un diámetro irregular, la corteza pardo-grisácea se agrieta y acanala característicamente con la edad, esto es debido a un peculiar sistema vascular que poseen y que conecta cada rama con un haz específico de raíces (**Figura 2**). Por lo tanto, la corteza será más gruesa en árboles de secano que en regadíos.

Las ramas son fuertes, presentan una corteza lisa, delgada y grisácea, espinosa en la variedad silvestre, y poseen la cualidad de desarrollar sus propias raíces, especialmente las ramas tomadas de las regiones inferiores del tronco.



**Figura 2.** Árbol olivo (tronco y ramas)

La forma en la que se distribuyen las ramas del árbol (erguidas, lloronas o abiertas), y también su capacidad de crecer en longitud y en grosor, son características específicas de cada variedad de olivos (MAPAMA, 2017).

**RAÍCES:** las formas de las raíces del olivo se distribuyen dependiendo fundamentalmente de la aireación que tiene el suelo. Los suelos aireados hacen que dichas raíces crezcan más perpendiculares al suelo, llegando a alcanzar más de 7 metros de profundidad.

Conforme va disminuyendo la aireación del suelo, va aumentando el ángulo entre las raíces y el tronco, formándose así una red muy amplia de raíces superficiales. Esto es lo más común de los cultivos, donde la mayoría de las raíces se encuentran a 1 metro o menos de profundidad.

Se puede decir que cada raíz principal del olivo está conectada con una rama en concreto, y por lo tanto una vez producida la eliminación de esa rama, lleva a la degeneración de su sistema radical y vascular (MAPAMA, 2017).

**HOJAS:** cuando el olivo está en edad joven, sus hojas son pequeñas y succulentas, de un color verde oscuro, estas aparecen enfrentadas en las ramas. Conforme el árbol va creciendo se produce un cambio en la hoja a tipo adulto, que es alargada y fusiforme.

La forma de la hoja es un carácter que se emplea para la diferenciación de las variedades, en función de la relación entre la longitud (L) y la anchura (A), se pueden diferenciar tres tipos de hoja (**Figura 3**) (MAPAMA, 2017):

ELÍPTICA ( $L/A < 4$ )  
( $L/A > 6$ )

ELÍPTICA-LANCEOLADA ( $4 < L/A < 6$ )

LANCEOLADA



Figura 3. Tipos de hojas de olivo (MAPAMA, 2017).

La hoja de un olivo tiene 5-6 cm de longitud y 1-1,5 cm de anchura. Las hojas por debajo de los 5 cm de longitud se consideran cortas, y si miden más de 7 cm,

largas. Con menos de 1 cm de anchura tenemos una hoja estrecha, y es ancha si mide más de 1,5 cm. El color del envés es de gris plata y del haz es de verde oscuro y brilla a causa de las ceras que segrega para evitar la desecación.

**FLORES:** las flores aparecen en el período de mayo-junio en forma de inflorescencias que nacen en las axilas de las hojas. Las flores son pequeñas y tetrámeras, con cuatro sépalos y cuatro pétalos de color blanco soldados por la base (**Figura 4**).



**Figura 4.** Flores de olivo

La longitud media de las inflorescencias oscila entre 25 – 35 mm, y el número medio de flores que aparecen en éstas está entre 18 y 25.

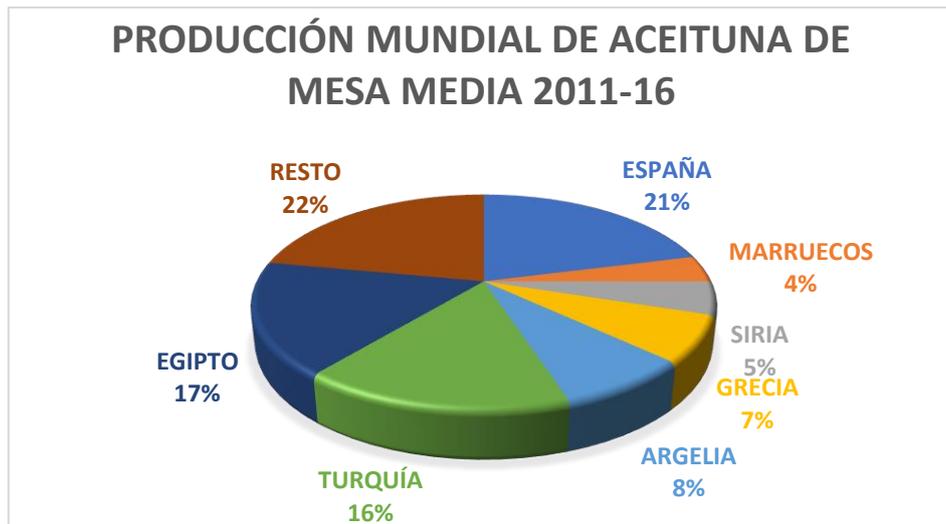
**FRUTO:** las aceitunas son drupas, es decir fruto con hueso, carnosas de 0,5-2 cm de longitud, en su interior encontramos una semilla protegida por un endocarpio endurecido. Al final de la maduración, que tiene lugar en otoño, el fruto es de color negro y la recogida tiene lugar en noviembre y diciembre.

Las características del fruto en las que nos debemos fijar son: el peso [ $<2g$  (bajo), 2-4g (medio), 4-6g (elevado)]; la forma del fruto (forma esférica), la forma de la base, la posición del diámetro transversal máximo y la presencia o ausencia de pezón y lenticelas (MAPAMA, 2017).

### **1.1.3 Producción mundial y exportación**

#### PRODUCCIÓN MUNDIAL

El primer país productor de aceituna de mesa del mundo es España, seguido a mucha distancia de países como Egipto, Turquía, Argelia, Grecia, Siria y Marruecos. La producción media mundial de las últimas cinco campañas asciende a 2.563.700 toneladas, de las cuales 529.140 se produjeron en España, es decir, el 21% del total (**Figura 5**) (ASEMESA, 2017).



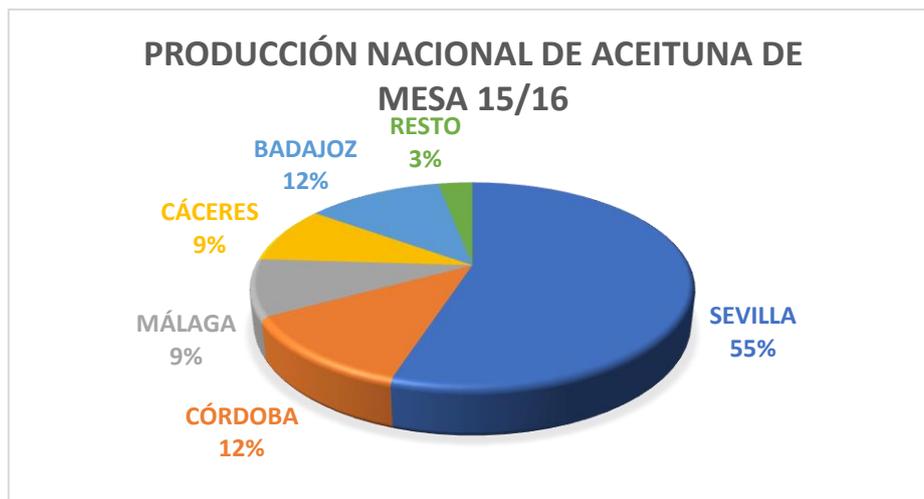
**Figura 5.** Producción mundial de aceituna de mesa (COI, 2017).

### PRODUCCIÓN NACIONAL

Según los datos de la Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA), en la campaña 2015/2016 la producción nacional de aceituna de mesa fue de 601.830 toneladas.

Las producciones en la comunidad de Andalucía alcanzaron un total de 463.947 toneladas, esto supone el 77% de la producción nacional, Sevilla con 333.531 t, y las provincias con mayor producción en este caso son Córdoba con 70.766 t y Málaga con 55.139 t.

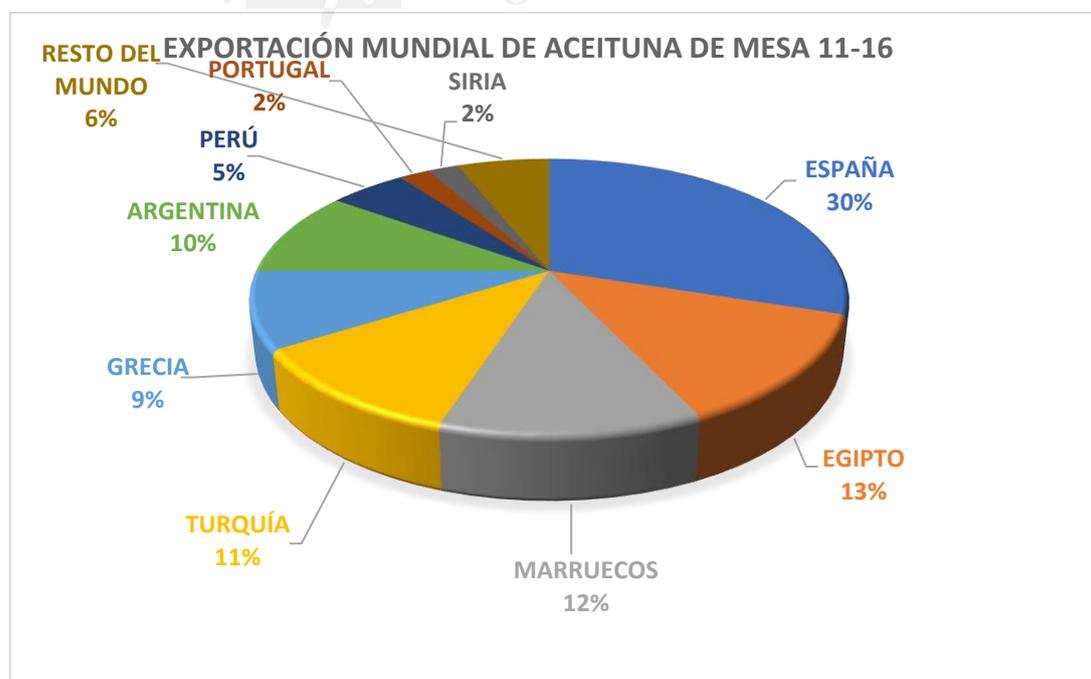
Las industrias ubicadas en Extremadura generaron 127.260 toneladas, lo que supone el 21% de la producción nacional, correspondiendo a la provincia de Badajoz 74.993 t y a Cáceres 52.267 t (**Figura 6**) (ASEMESA, 2017).



**Figura 6.** Producción nacional de aceituna de mesa (AICA, 2017).

### EXPORTACIONES MUNDIALES

La exportación media mundial según el COI (Consejo Oleícola Internacional), de las últimas 5 campañas, alcanzó las 644.300 toneladas (peso neto escurrido). El primer país exportador de aceituna de mesa es España (**Figura 7**) con 193.400 toneladas, seguido a gran distancia por Egipto, Marruecos, Turquía, Grecia, Argentina, Perú, Siria, Portugal, USA (ASEMESA, 2017).



**Figura 7.** Exportación mundial (COI, 2017).

## 1.2. Valor nutricional

Las aceitunas presentan un gran valor nutricional, este es mayor en las aceitunas negras que en las verdes por su mayor permanencia en el árbol. Se trata de frutos grasos, siendo el 70% de la grasa monoinsaturada. Por su parte, el contenido en fibra cubre casi el 5% de los objetivos nutricionales recomendados.

Respecto al contenido en minerales, destaca el aporte de sodio, por ser el ingrediente de la base de la salmuera. Los aportes de calcio son menores (2% de las IR/día) y hierro (5% de las IR/día para hombres y 3% para mujeres).

En cuanto a las vitaminas, las aceitunas aportan pequeñas cantidades de vitaminas hidrosolubles del grupo B (riboflavina y niacina) y de liposolubles como la vitamina E (capacidad antioxidante) **(Tabla 1)** (FEN, 2017).

Tabla 1. Composición nutricional de 100 g aceituna y por ración (10 unidades). Valores expresados en gramos para los componentes mayoritarios y en miligramos o microgramos para los minoritarios (FEN, 2017)

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (10u, 40g)
Energía (Kcal)	196	63
Proteínas (g)	0,8	0,3
Lípidos totales (g)	20	6,4
AG saturados (g)	2,81	0,90
AG monoinsaturados (g)	14	4,48
AG poliinsaturados (g)	2,23	0,71
$\omega$ -3 (g)	0,134	0,043
Linoleico ( $\omega$ -6) (g)	2,1	0,672
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0
Hidratos de carbono (g)	1	0,3
Fibra (g)	4,4	1,4

Agua (g)	73,8	23,6
Calcio (mg)	63	20,2
Hierro (mg)	1,5	0,5
Yodo (µg)	1	0,3
Magnesio (mg)	12	3,8
Zinc (mg)	--	--
Sodio (mg)	2250	720
Potasio (mg)	91	29,1
Fósforo (mg)	17	5,4
Selenio (µg)	0,9	0,3
Tiamina (mg)	0,03	0,01
Riboflavina (mg)	0,07	0,02
Equivalentes niacina (mg)	1	0,3
Vitamina B6 (mg)	0,02	0,01
Folatos (µg)	Trazas	Trazas
Vitamina A (µg)	22	7
Vitamina E (mg)	1,99	0,6

Tabla 1. Información nutricional de aceituna.

La composición de las aceitunas de mesa es diferente de otras verduras fermentadas debido a su alto contenido de compuestos fenólicos y ácidos grasos, principalmente ácido oleico (monoinsaturado), por lo que puede considerarse un alimento funcional (Collado, 2015).

La aceituna de mesa es un componente esencial en la Dieta Mediterránea, es el origen del aceite de oliva y forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico. Uno de los principales nutrientes existentes en la aceituna de mesa son los polifenoles y las provitaminas A y E, cuya función antioxidante colabora positivamente en la defensa de los procesos oxidativos (ASEMESA, 2017).

El Proyecto Probiolives apunta a que las aceitunas de mesa refuerzan potencialmente las defensas naturales del consumidor. Según las investigaciones realizadas, las aceitunas de mesa podrían constituir el principal producto vegetal fermentado probiótico del mercado en el futuro. Los últimos datos que tienen los investigadores del Proyecto Probiolives revelan que algunas de las bacterias lácticas generadas en la fermentación de la aceituna de mesa presentan mejores resultados que otras ya reconocidas como microorganismos probióticos y que se utilizan actualmente en diversos productos lácteos (ASEMESA, 2017).

### **1.3. Elaboración aceituna de mesa**

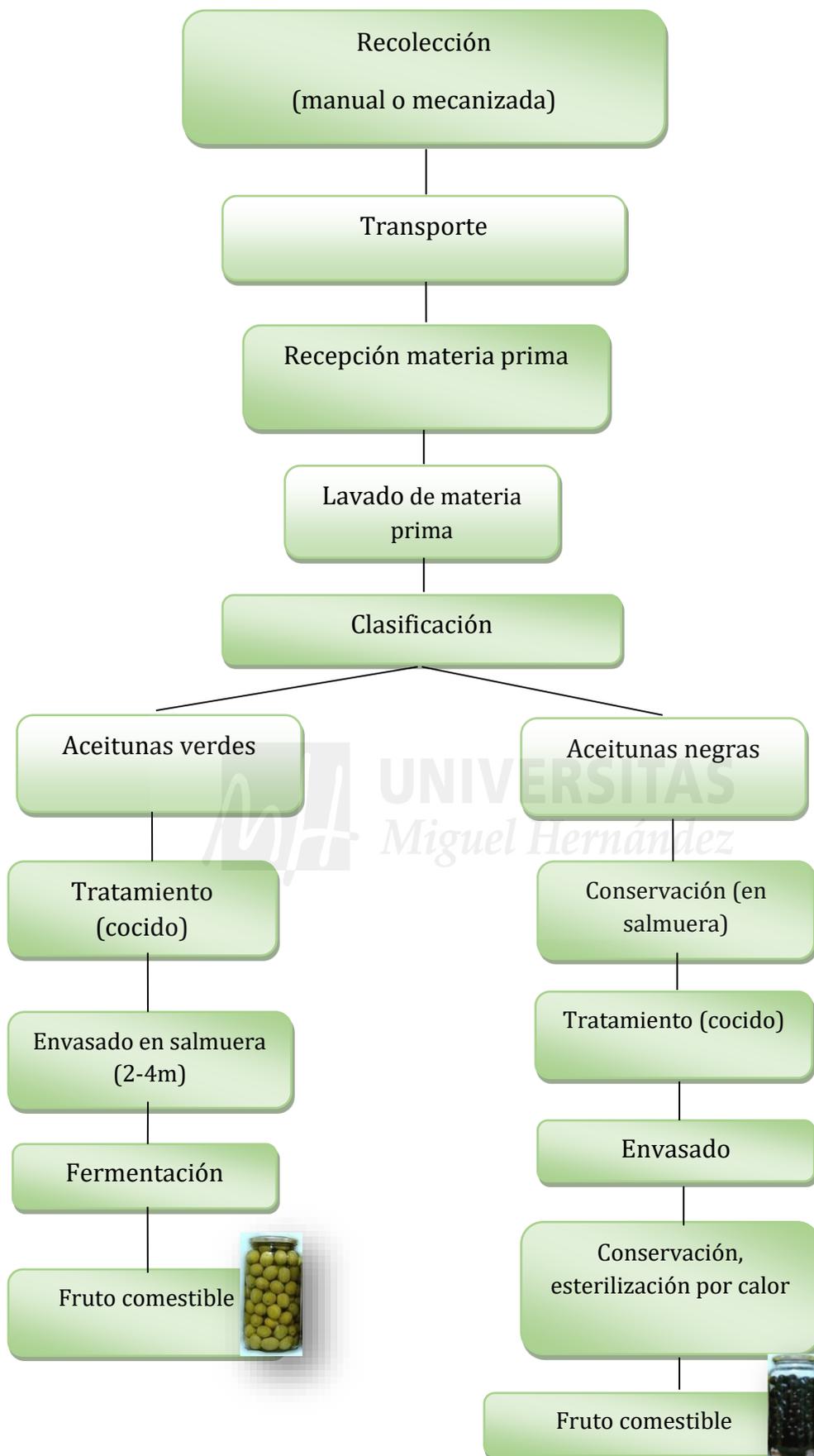
El proceso de recolección de la aceituna de mesa ocurre entre los meses de septiembre y octubre, ya que en estos meses del año el fruto alcanza un tamaño correcto. Hay dos tipos de métodos de recolección, manual (tradicional), este método es utilizado para evitar daños en el fruto, y mecanizado, que cada vez es el más utilizado (ASEMESA, 2017).

Como se puede observar anteriormente en el diagrama, existen dos procesos de elaboración, dependiendo de si la aceituna es verde o negra.

Una vez llegadas las aceitunas a la industria alimentaria, se les realiza un lavado con agua para eliminar restos de tierra, hojas, etc. Posteriormente se someten a un proceso de clasificación, es decir en aceitunas verdes y negras.

Las aceitunas verdes, se someten a un tratamiento de cocción para eliminar el sabor amargo que poseen. Este tratamiento también es útil para desarrollar las características organolépticas que tienen. Tras este tratamiento, se envasan en salmuera durante un periodo de dos a cuatro meses, dependiendo de la variedad de la aceituna. Durante este periodo, tiene lugar la fermentación, esta convierte el fruto en aceituna comestible.

El procesado de las aceitunas negras es diferente a las aceitunas verdes, ellas una vez que son seleccionadas por color, se procede a conservarlas en salmuera directamente. Posteriormente se someten a un tratamiento de cocción igual que las aceitunas verdes. Por último, se envasan y se conservan mediante esterilización por calor (ASEMESA, 2017).



## 1.4. Productos *HidroSOStenibles*

La producción mundial de alimentos depende en gran medida de la disponibilidad del agua. Por lo tanto, cada vez es más necesario mejorar la eficiencia de agua, mediante la aplicación de nuevas tecnologías agrícolas.

Una de las estrategias para mejorar la eficiencia de agua es el riego deficitario controlado, que implica la aplicación de condiciones de déficit de agua en períodos no críticos del cultivo para afectar mínimamente la producción y calidad del cultivo (Noguera-Artiaga *et al.*, 2016).

Las frutas y verduras que están cultivadas bajo riego deficitario controlado deben distinguirse de aquellos que recibieron riego no deficitario (Carbonell-Barrachina y otros 2015), por eso reciben el nombre de productos *hidroSOStenibles*. **(Ilustración 1).**



Ilustración 1. Logotipo para la diferenciación de productos hidroSOStenibles en países de habla hispana e inglesa (Noguera-Artiaga *et al.*, 2016).

Los productos *hidroSOStenibles*, no sólo se diferencian con los demás por el nombre, sino que también, debido al estrés hídrico que sufren, hacen que aumenten los metabolitos secundarios de la planta, esto quiere decir que tienen un mayor contenido en compuestos bioactivos y mayor intensidad de algunos atributos sensoriales, además cabe destacar que son respetuosos con el medio ambiente porque optimizan el uso del agua (Cano-Lamadrid *et al.*, 2015).

## 1.5. Métodos para medir capacidad antioxidante

Según algunos autores (Robles-Sanchez *et al.*, 2009), (Heo, Kim, Chung, & Kim, 2007), el uso de un solo método para medir la capacidad antioxidante en alimentos no es fiable, ya que el uso de varios métodos puede dar resultados finales diferentes.

A continuación, se van a describir los métodos más comunes para la determinación de la capacidad antioxidante en alimentos.

### 1.5.1. Método ABTS

El radical  $ABTS^+$  (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) (**Figura 8**), en presencia de metamioglobina y generan un radical intermedio llamado ferrilmioglobina que luego reacciona con ABTS para formar el catión radical  $ABTS^+$ .

Este radical es de un color verde-azulado, que se mide espectrofotométricamente a 734 nm (Re *et al.*, 1999).

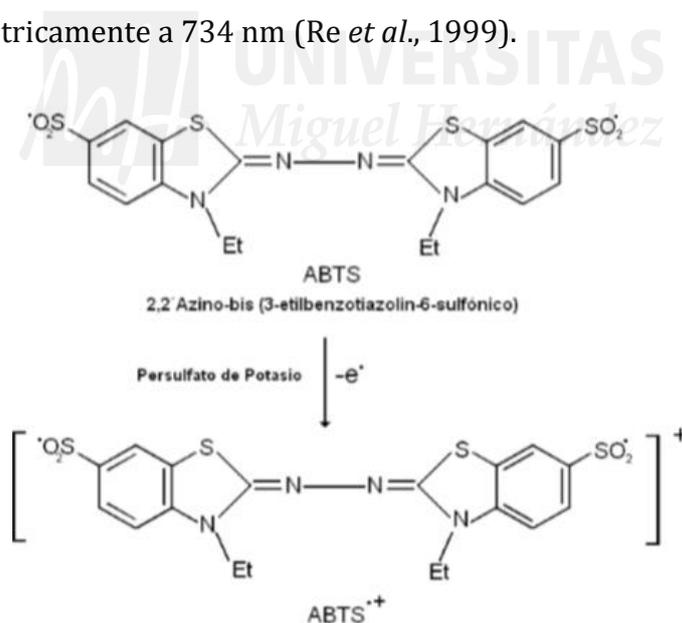


Figura 8. Reacción de ABTS con persulfato de potasio, para formar  $ABTS^+$  (Re, 1999).

### 1.5.2. Método FRAP

El ensayo FRAP, es un método espectrofotométrico que mide la reducción de un complejo, en este caso el TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) al complejo ferroso

$\text{Fe}^{2+}$ , en un medio ácido y en presencia de antioxidantes (**Figura 9**). Por lo tanto, cuanto más capacidad antioxidante presenta el alimento a estudiar, mayor se puede decir que es la reducción y por lo tanto habrá una concentración importante de  $\text{Fe}^{2+}$ . Este método se mide a una longitud de onda de 593nm (Benzie & Strain, 1996).

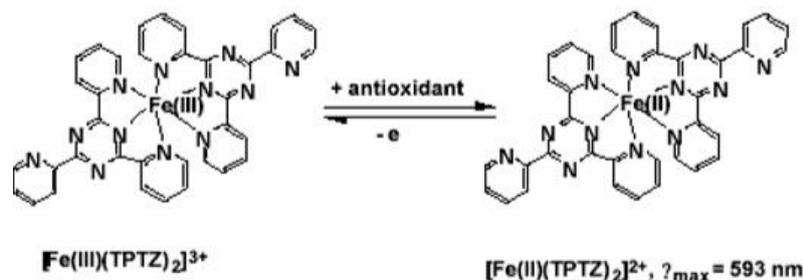


Figura 9. Reacción del complejo ferroso de la TPTZ férrica con un antioxidante (Benzie, 1996).

### 1.5.3. Método DPPH

El radical 2,2difetil-1-picrilhidrazil, conocido como DPPH, es encargado de medir la capacidad antioxidante mediante el uso del radical libre DPPH. Este radical es de un color violáceo que presenta un espectro de absorción a 515 nm, que en presencia de algún compuesto antioxidante desaparece convirtiéndose en un color amarillo pálido (**Figura 10**) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

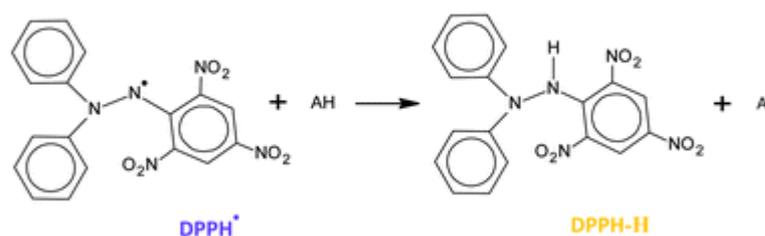


Figura 10. Reacción DPPH (Brand-Williams, 1995).

### 1.5.4. Método FOLIN-CIOCALTEAU

El método desarrollado por Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999), se utiliza para la determinación del contenido de fenoles

totales. Este método, es característico por su carácter reductor. El reactivo que se emplea en este método es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que proceden a reducirse al oxidar compuestos fenólicos y estos dan lugar a óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ), molibdeno wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005). En la reacción se produce un cambio de color de amarillo a azul, que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 760nm.

## **1.6. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)**

Diferentes técnicas analíticas han sido empleadas para la cuantificación de ácidos orgánicos en alimentos, pero, sin embargo, se puede decir que las técnicas cromatográficas son las más indicadas por su rapidez y simplicidad. La más utilizada es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que emplea una diversidad de fases estacionarias y de sistemas de detección, por lo tanto, esto permite obtener unos resultados rápidos y precisos (Mato, Suárez-Luque, & Huidobro, 2005).

La cromatografía HPLC es ideal para la separación de especies termolábiles o volátiles, pero también se pueden analizar más compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, polifenoles, etc.

## **1.7. Digestión *in vitro***

La digestión gastrointestinal simulada se emplea ampliamente en muchos campos de la ciencia de la nutrición y la alimentación. La digestión *in vitro* permite simular la fisiología que ocurre durante la digestión gástrica e intestinal de los alimentos. Se puede estudiar la bioaccesibilidad o digestibilidad de nutrientes y no nutrientes, por ejemplo, de lípidos, proteínas, hidratos de carbono, compuestos antioxidantes, etc (Minekus, 2014).



El objetivo principal del presente trabajo fin de grado trata del estudio de los cambios que sufren las aceitunas hidroSOSTenibles a lo largo de una simulación de la digestión humana. Para ello, se realiza una simulación de la digestión oral, gástrica e intestinal y se analiza la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles totales, los ácidos orgánicos y los azúcares para cada una de las fases.

Para evaluar la capacidad antioxidante, se han empleado los siguientes métodos:

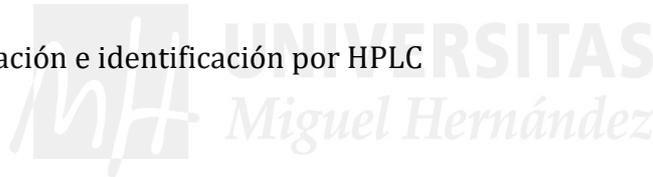
- ❖ Método ABTS
- ❖ Método FRAP
- ❖ Método DPPH

Por otro lado, para determinar el contenido total de fenoles se ha llevado a cabo el siguiente método:

- ❖ Método FOLIN-CIOCALTEAU

Determinación del contenido en azúcares y ácidos orgánicos:

- ❖ Cuantificación e identificación por HPLC





**3. MATERIALES Y MÉTODOS**  
UNIVERSITAS  
Miguel Hernández

### 3.1. Material vegetal

Para el presente trabajo fin de grado, se han utilizado aceitunas de la variedad “Manzanilla” (**Figura 12**), cultivadas bajo riego deficitario controlado (RDC), provenientes de dos fincas diferentes, una finca se encuentra en Coria del Río y la otra en Dos Hermanas, ambas se encuentran en la provincia de Sevilla.

Para la realización de los análisis, las aceitunas se han distribuido en grupos, para las dos fincas.



Figura 12. Aceituna de mesa, variedad manzanilla

Para la finca Dos Hermanas se diferencian cuatro grupos: control (D0), tratamiento 1 (D1), tratamiento 2 (D2) y tratamiento 3 (D3) (**Tabla 2**). En esta finca el riego deficitario se aplicó durante la fase de endurecimiento del hueso (fase II). En todos los grupos se encuentran dos repeticiones, para conseguir un resultado más fiable. Cada una de las muestras, se divide en subgrupos dependiendo de la fase de digestión, es decir, oral, gástrica e intestinal, ambas con dos repeticiones en cada fase excluyendo la fase oral.

Por otro lado, en la finca Coria del Río tenemos tres grupos que se dividen en control (C0), tratamiento 1 (C1) y tratamiento 2 (C2) (**Tabla 2**). En esta finca el riego deficitario se aplicó durante la fase III, es decir, en la fase de acumulación de aceite y maduración de la aceituna antes de la cosecha. Se realizaron las mismas repeticiones que para las muestras de la finca de Dos hermanas.

El protocolo de riego deficitario controlado se derivó de la metodología propuesta por (Moriana, 2012), de acuerdo con la integral de estrés

$$S_{SWP} = \left| \sum (\overline{SWP} - c)_n \right|.$$

Siendo  $\overline{SWP}$  el promedio del potencial hídrico del tallo para cualquier intervalo,  $c$  es el valor del potencial máximo de agua madre y  $n$  es el número de días en el intervalo.

Aceitunas HidroSOSTenibles finca Dos Hermanas (estrés en fase resistente)	<b>D0:</b> estado hídrico óptimo. Se mantiene en -1,2 MPa antes del endurecimiento del hueso y en -1,4 MPa a partir de ese momento.
	<b>D1:</b> Riego deficitario moderado mantenido. Igual que el control pero en el endurecimiento del hueso se mantiene a -2 M,yPa y se rehidratan al final del endurecimiento del hueso, antes de la cosecha.
	<b>D2:</b> Riego deficitario severo corto recuperado a mitad del endurecimiento del hueso (igual que T0 pero el umbral se mantuvo a -3MPa durante la mitad del periodo de endurecimiento del hueso).
	<b>D3:</b> Riego deficitario severo recuperado a finales del endurecimiento del hueso. -3 MPa en el endurecimiento del hueso y rehidratación antes de la cosecha.
Aceitunas HidroSOS finca Coria del Río (estrés en fase sensible)	<b>C0:</b> Estado hídrico óptimo. Se mantiene en -1,2 MPa antes del endurecimiento del hueso y en -1,4 MPa a partir de ese momento.
	<b>C1:</b> Riego deficitario moderado (-2 a -2,5 MPa) dos semanas antes de la cosecha (dos primeras semanas de septiembre) (sin rehidratación).
	<b>C2:</b> Riego deficitario moderado (tiempo largo) (-2 a -2,5 MPa) cuatro semanas antes de cosecha (dos últimas semanas de agosto y dos primeras de septiembre) sin rehidratación.

Tabla 2. Esquema tratamiento aceitunas procedentes de dos fincas.

## 3.2. Determinación de capacidad antioxidante y fenoles

### 3.2.1. Extracciones capacidad antioxidante y fenoles totales

Para llevar a cabo la medición de la capacidad antioxidante y fenoles totales, el disolvente que se empleó fue una mezcla de metanol:agua:ácido clorhídrico (80:20:1 %)

Las aceitunas se rallaron con un rallador y posteriormente se tomó 1 g de muestra y se colocó en un tubo criogénico que posteriormente se disuelve con 10 o 3 mL de disolvente. Tras esto los tubos se ponen en el ultrasonidos (**Figura 13**), durante 15 minutos a 20°C y se dejan a 4°C durante 16 horas. Tras pasar esta fase, se vuelven a poner nuevamente en el ultrasonidos por 15 minutos y posteriormente en la centrífuga a 15.000 rpm / 10 min.



Figura 13. Ultrasonidos.

El sobrenadante se recoge y se utiliza para determinar la capacidad antioxidante, azúcares y ácidos orgánicos.

### 3.2.2. Método ABTS

El método ABTS, se llevó a cabo según el método descrito por Re *et al.* (1999), pero sufriendo algún cambio. Se preparó el reactivo ABTS con una concentración de 7mM (10 mL), se le añade 1 mL de persulfato de potasio (2,45 Mm) y se deja reaccionar por unas 16 horas en oscuridad a 20 °C, para que tenga lugar la formación del ABTS<sup>+</sup>. Tras este tiempo, la solución ABTS se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 a una longitud de onda de 734 nm.

Para realizar la recta patrón, se utilizó Trolox a partir de una concentración de 10 mM, de la siguiente manera:

1. Se preparan 5 tubos de ensayo, cada uno numerado.
2. Se añade a cada tubo la siguiente cantidad de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL, y 1,5 mL y se completa hasta un volumen de 5mL con etanol.
3. Se utilizan cubetas de una capacidad de 1,5 mL, y se llenan en el siguiente orden, primero se añade 10 µL de Trolox y a continuación 990 µL de la solución ABTS.
4. Se deja reaccionar en la oscuridad durante un tiempo de 6 minutos y se mide absorbancia a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro (**Figura 14**).
5. Los resultados que obtenemos, se les restan la absorbancia del reactivo ABTS y así poder realizar la recta patrón (**Figura 15**), para después poder averiguar la concentración de las muestras.



Figura 14. Espectrofotómetro.

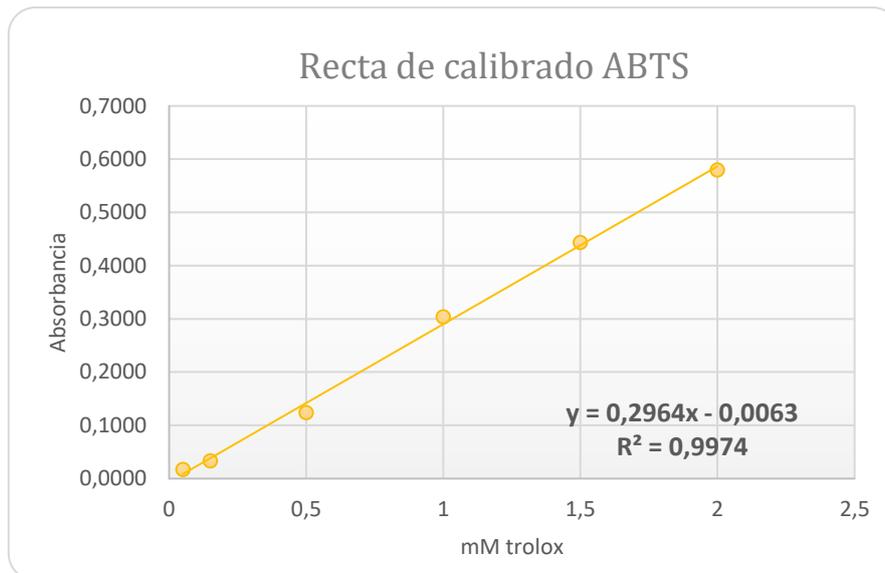


Figura 15. Recta de calibrado ABTS.

Después de realizar la recta de calibrado, procedemos a medir la capacidad antioxidante de las muestras. Para medir esta capacidad, se empleó el mismo extractante utilizado en la recta patrón. Se hicieron varias diluciones, dependiendo del tipo de digestión que se procedía a medir. En cada cubeta se añaden: 10  $\mu$ L de muestra + 990  $\mu$ L de la solución de ABTS con 15 segundos de diferencia.

Posteriormente se deja en la oscuridad durante 6 minutos para que tenga lugar la reacción y se procede a medir la absorbancia a 734nm. A los resultados se les resta la absorbancia inicial del reactivo para así poder obtener el cálculo para averiguar la concentración de antioxidantes esto en función de la recta de calibrado.

### 3.2.3. Método FRAP

El método ABTS, se llevó a cabo según el método descrito por (Benzie & Strain, 1996), pero sufriendo alguna modificación. Se prepara la solución buffer de la siguiente manera:

- Solución buffer a pH = 3,6 con: 1,55 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  + 0,9 mL HCl y se lleva hasta 1 L.
- HCl 40 mM.

- Reactivo TPTZ 10 mM con HCl 40 mM. (para 10 mL se utiliza 31,23 mg de TPTZ con 10 mL de HCl 40 mM).
- Se prepara 54,06 mg de FeCl<sub>3</sub> en 10 mL de agua ultrapura.

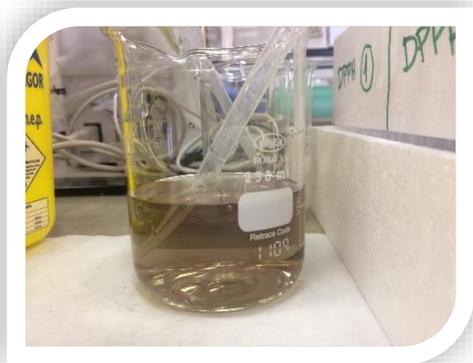


Figura 16. Reactivo FRAP.

Los reactivos se preparan en relación 1:1:10 (TPTZ: FeCl<sub>3</sub>: Buffer).

El reactivo FRAP queda de un color café clarito (**Figura 16**).

La recta de calibrado se realizó de la siguiente manera:

1. Se preparan 5 tubos de ensayo cada uno de ellos numerados.
2. Se añade a cada tubo la siguiente cantidad de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL y 1,5 mL y se completaron hasta un volumen de 5 mL con etanol.
3. Posteriormente se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad que se procedieron a rellenar en el siguiente orden → 10 µL trolox + 990 µL solución FRAP .
4. Se dejaron reaccionar en oscuridad durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 593 nm. La lectura de absorbancia debe ser entre 0,2 y 0,8.
5. Posteriormente se efectuó la recta de calibrado (**Figura 17**), para poder obtener la ecuación de la recta y así hallar las concentraciones de las muestras.

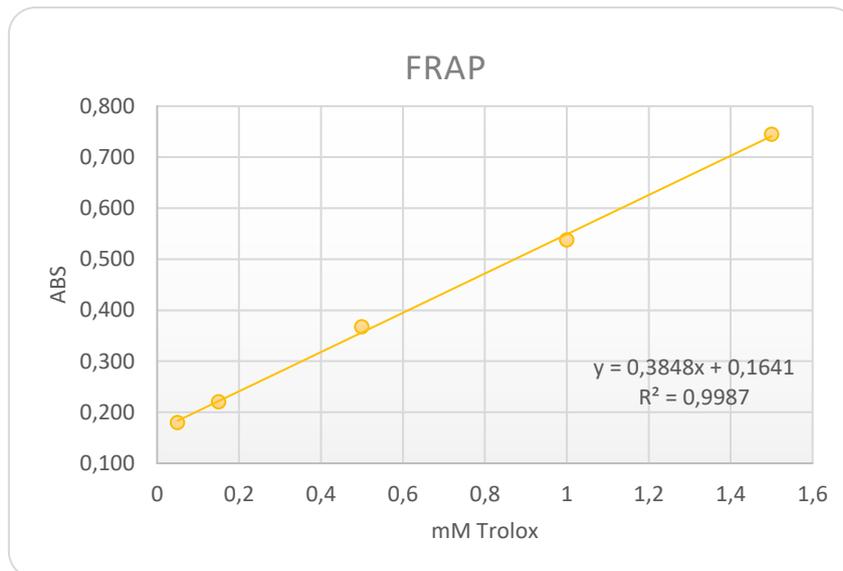


Figura 17. Recta de calibrado FRAP.

Tras realizar la recta de calibrado, se midió la capacidad antioxidante de las muestras de la siguiente forma:

- Se llenaron cubetas similares a la recta patrón, en cada cubeta se añadió  $\rightarrow$  10  $\mu$ L de muestra + 990  $\mu$ L de la solución de FRAP con 15 segundos de diferencia.

Se dejaron 10 minutos en oscuridad para que tenga lugar la reacción y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Tras obtener los resultados, se calcularon las concentraciones de los antioxidantes con la recta de calibrado.

### 3.2.4. Método DPPH

El método DPPH, se llevó a cabo según el método descrito por (Brand-Williams *et al.*, 1995), sufriendo alguna modificación. El reactivo DPPH que se preparó fue con metanol y se midió a una longitud de onda espectrofotométrica a 515 nm. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se prepara el DPPH 100mM con metanol.
2. Se deja reaccionar por un tiempo de 30 minutos en la oscuridad.

3. Posteriormente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm, dicha absorbancia tiene que ser menor a 1.
4. En cada cubeta se añaden → 10 μL de muestra + 40 μL de metanol + 950 μL de la solución de DPPH con 15 segundos de diferencia.
5. Tras 10 minutos de reacción procedemos a medir la absorbancia.

La curva patrón se realizó con Trolox a partir de una concentración de 10 mM, el procedimiento es el mismo que el anterior para las muestras. En cada cubeta se añadió una cantidad diferente de Trolox 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5ml, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con metanol. Tras el paso anterior se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 515 nm.

Posteriormente se realizó una representación gráfica (**Figura 18**), para así poder obtener la ecuación de la recta y poder conocer la concentración de las muestras.

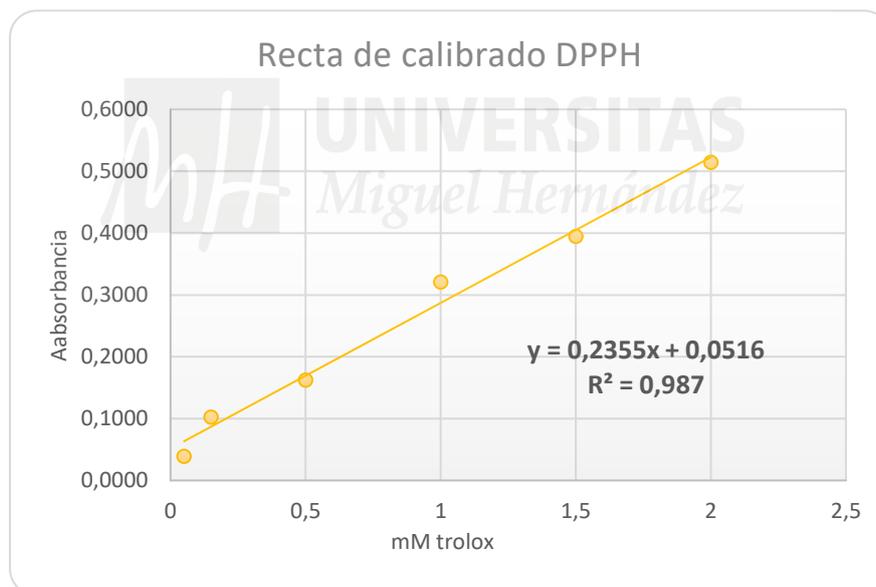


Figura 18. Recta de calibrado DPPH.

### 3.2.5. Método FOLIN-CIOCALTEAU

Los reactivos que se emplearon para llevar a cabo el método Folin-Ciocalteu son metanol, HCl, reactivo Folin y Carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Y por otro lado los extractantes que se utilizaron fueron: 80 % metanol, 20 % agua, 1 % HCl.

Para proceder a medir los fenoles totales de las muestras, se realiza una dilución y posteriormente se miden los resultados. Se efectúa de la siguiente manera:

1. La muestra se diluye con 10 mL del extractante (líquida 5 mL; sólida 0,5 g).
2. Se pone al ultrasonido por 15 minutos a 20°C y se deja a 4°C por 16 horas.
3. Tras pasar este tiempo (16 horas), se introduce otra vez al ultrasonido por 15 minutos y posteriormente a la centrifuga a 15000 rpm por 10 minutos.
4. 0,1 mL de muestra se mezcla con 0,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu **(Figura 19)** y 2 mL agua.
5. Se deja en reposo en oscuridad durante 3 minutos.
6. Se le adiciona 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %.
7. Se deja incubar a una temperatura ambiente durante un tiempo de una hora.
8. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro de UV visible.

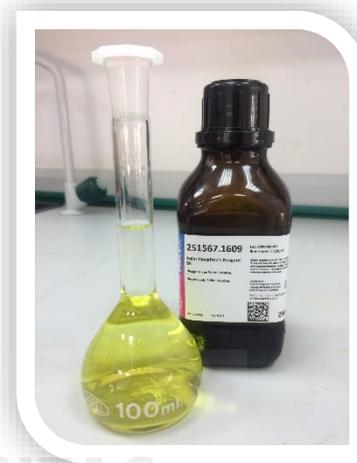


Figura 19. Reactivo Folin-Ciocalteu.

La recta de calibrado se prepara con ácido gálico a partir de 1mM, su preparación es igual que si fuera una muestra más, pero utilizando el ácido indicado anteriormente. Las concentraciones que se utilizan son las siguientes:

Ác. Gálico (µL)	Agua (µL)
0	500
25	475
50	450
75	425
100	400
125	375

Tras realizar todos los pasos que se explican anteriormente, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se realizó una representación gráfica (**Figura 20**) para así poder obtener la ecuación de la recta y poder conocer la concentración de las muestras.

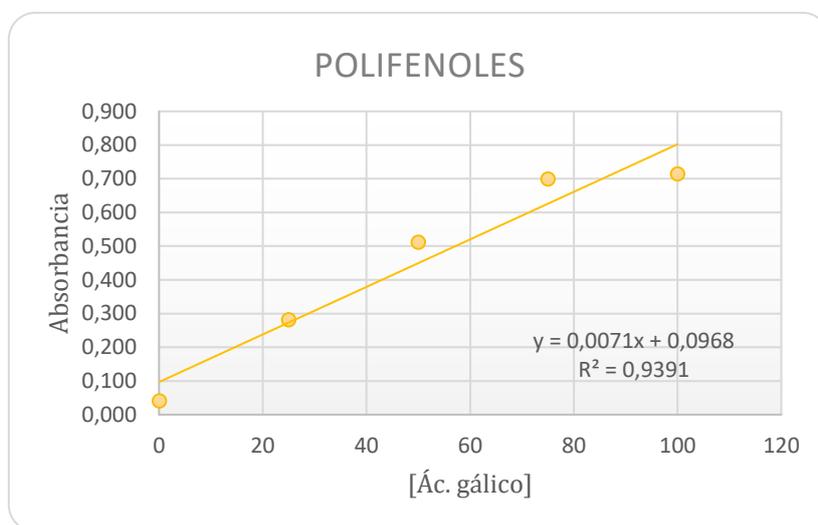


Figura 20. Recta de calibrado Folin-Ciocalteau.

### 3.3. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares

Los ácidos orgánicos y azúcares se determinaron por cromatografía de alta resolución HPLC (high-performance liquid chromatograph) (**Figura 21**). Con una columna Supelcogel TM C-610H column 30 cm x 7.8 mm, y una precolumna Supelguard 5 cm x 4.6 mm; Supelco, Bellefonte, PA).

Se usaron patrones de ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, tartárico, málico, shikimico y fumarico), así como también azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), todos ellos fueron obtenidos de la empresa SIGMA (St. Louis, MO).

Los reactivos que se emplearon fueron tampón fosfato con pH 7,8 y ácido fosfórico al 0,1 %.



Figura 21. HPLC Hewlett Packard HP 1100.

El procedimiento para analizarlo fue el siguiente:

1. Si la muestra es líquida se puede emplear 5 mL y si es sólida se puede utilizar 0,5 o 1,0 gramos. Esta muestra se diluye en 5 mL de diluyente, es decir, tampón fosfato + ácido fosfórico (0,1%).
2. Una vez que la muestra está diluida, esta se pasa por el ultraturrax y se centrifuga a 1500 rpm por tiempo de 10 minutos.
3. Posteriormente se pasan por unos filtros de 45 micras y se colocan en los viales para HPLC para su posterior medición.

Las curvas de calibrado que se realizaron para los diferentes ácidos orgánicos y azúcares fueron con concentraciones entre 1 y 10 g/ L.

### **3.4. Digestión in vitro**

El ensayo de digestión *in vitro*, se llevó a cabo según (Minekus *et al.*, 2014).

Las fases de la digestión que se han empleado en este trabajo se pueden observar en la **(Figura 11)**, indicando en cada una de las fases los compuestos utilizados para su simulación.

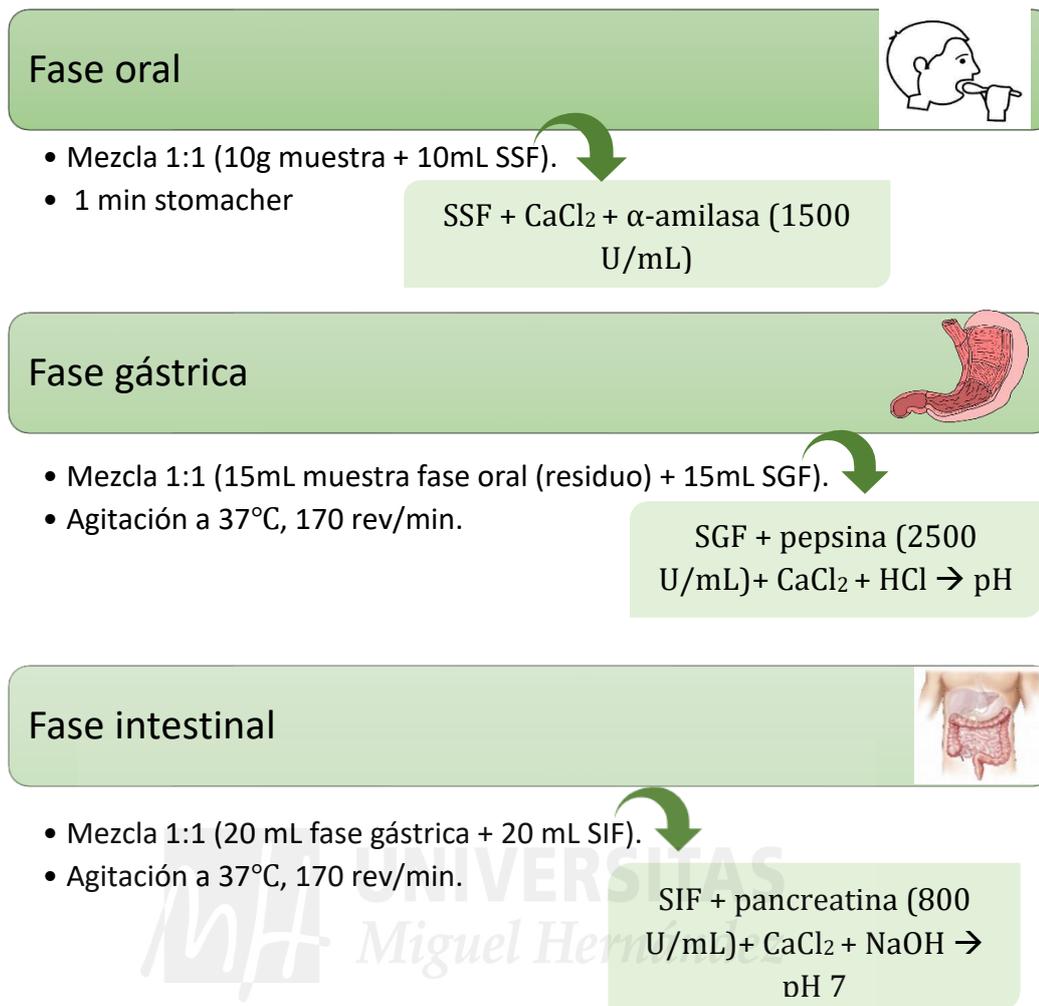


Figura 11. Simulación fases digestión. **(U)** actividad enzimática específica.

En primer lugar, se realizó la simulación de la fase oral, es decir, la masticación utilizando una simulación de los jugos salivares (SSF). En esta fase se procedió de la siguiente manera:

- I. Se cogen 10 g de muestra y se introduce en bolsa de stomacher y posteriormente se añade 10 mL de SSF final.  
Los 10 mL SSP final contiene → 8,95 mL de SSF, 50 µL de CaCl<sub>2</sub> y 1 mL α-amilasa. Estos compuestos, se añaden en el orden indicado.
- II. Se introduce en el Stomacher durante 1 minuto.

- III. Se introduce la disolución en botes de cristal (**Figura 30**), y se mantienen 5 minutos a una temperatura de 37°C.
- IV. Por último, se cogen 5 mL de muestra tras la fase oral, se centrifuga en frío y guardamos el sobrenadante y residuo a -20°C.

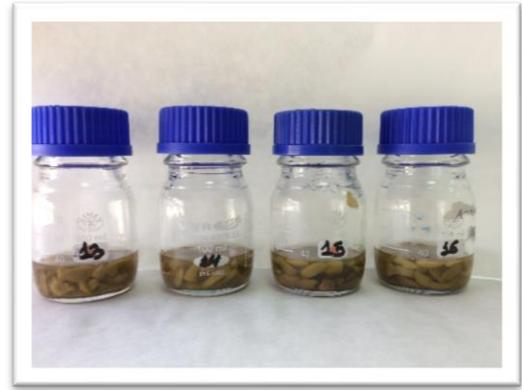


Figura 30. Disolución fase oral en bote de cristal.

En segundo lugar, procedemos a realizar la fase gástrica, que se preparó utilizando una simulación de los jugos gástricos (SGF). Se realizó de la siguiente manera:

- I. Se cogen 15 mL del residuo que queda de la fase oral y se le añade 15 mL de SGF, que está compuesto por 12,2425 mL SGF + 2,4 mL de pepsina (2500 U/mL) (**Figura 31**) + 7,5  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> + 0,3 mL de HCl para ajustar el pH a 3, que se midió para comprobarlo con un pH-metro (**Figura 32**).
- II. Después, se someten los botes de cristal a agitación a 170 rev/min en un baño maría a una temperatura de 37°C (**Figura 33**).
- III. Por último, se coge muestra tras una hora de fase gástrica en el baño maría, y también se coge una muestra tras las dos horas de la fase gástrica.



Figura 31. Enzima pepsina

- IV. Se centrifuga en frío y se guarda el sobrenadante y el residuo a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

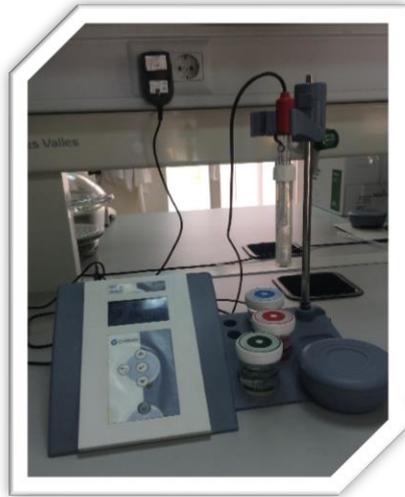


Figura 32. pH-metro.



Figura 33. Baño maría y centrifuga.

Por último, se realizó la fase intestinal, que para ello se utilizó una simulación de los jugos intestinales (SIF). La simulación de la fase intestinal se realizó de la siguiente manera:

- I. Se cogen 20 mL del residuo de la fase gástrica y se le añade 20 mL de SIF.
- II. Los 20 mL SIF contiene  $\rightarrow$  12,31 mL SIF + 5 mL pancreatina (**Figura 34**) + 2,5 mL sales biliares (**Figura 34**) +  $40\ \mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  + 0,15 mL de NaOH para ajusta el pH a 7.
- III. Los botes de cristal con la solución se someten en un baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  y a 170 rev/min.
- IV. Tras haber pasado una hora de la fase intestinal se coge una muestra, y tras pasar dos horas también se procede a coger otra muestra.
- V. Por último, se centrifuga en frío y se guarda el sobrenadante y el residuo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Figura 34. Pancreatina y sales biliares.

Una vez que se realiza todas las fases de la digestión, se centrifugan las muestras y se llevan a cabo los métodos de capacidad antioxidante (ABTS, FRAP, DPPH) explicados anteriormente en el trabajo, también se llevó a cabo la determinación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu), y por último se analizó también la cantidad de ácidos orgánicos (phytico, oxálico, cítrico, ascórbico, butírico) y azúcares (maltoheptaose, manitol, glycerol) que quedan en cada una de las fases de la digestión. Cada uno de los ensayos hechos se realizaron por duplicado para cada muestra.

### **3.5. Análisis estadístico**

Los resultados de los análisis que se han analizado se han procesado mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de rangos múltiples, para así comprobar si las diferencias de los resultados son significativas o no. Fue definida una diferencia significativa como  $p < 0,05$ . El software que se utilizó fue StatGraphicsPlus versión 3.1.



#### ***4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



#### 4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante y fenoles

Existen varios métodos para evaluar la actividad antioxidante de los alimentos. Tanta variedad de métodos, es debido a que ninguno de ellos es capaz de determinar exactamente la capacidad antioxidante total de un producto, por lo tanto el valor medio depende de la metodología empleada (Cao, Alessio, & Cutler, 1993).

Los ensayos ABTS, FRAP Y DPPH, miden la capacidad antioxidante en el proceso de reducción, es decir cuando cambia de color. Pero sin embargo hay diferencias entre ellos, por ejemplo, el ensayo ABTS es capaz de medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo es capaz de medir compuestos lipofílicos (Kuskoski *et al.*, 2005). Por este motivo se emplearon los tres métodos para medir la actividad antioxidante de la aceituna de mesa variedad manzanilla.

La **Tabla 3** muestra la capacidad antioxidante (ABTS, FRAP, DPPH) y los polifenoles totales (FOLIN) que se determinaron inicialmente para las aceitunas de ambas fincas.

	ABTS	DPPH	FRAP	FOLIN
	mmol Trolox/kg			g GAE/kg
<b>Dos Hermanas</b>				
<b>ANOVA</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>
<b>D0</b>	6,61	12,09	15,44	61,73
<b>D1</b>	7,48	13,05	16,01	64,56
<b>D2</b>	7,07	12,48	14,85	59,05
<b>D3</b>	7,19	11,16	15,54	54,67
<b>Coria del Río</b>				
<b>ANOVA</b>	<b>NS</b>	<b>*</b>	<b>**</b>	<b>**</b>
<b>C0</b>	8,74	7,31 c	19,1 a	54,6 c
<b>C1</b>	9,41	9,65 a	17,8 b	59,0 a
<b>C2</b>	9,34	8,62 b	19,3 a	58,3 b

Tabla 3. Capacidad antioxidante inicial (ABTS, DPPH y FRAP) y fenoles totales (FOLIN) para ambas fincas, previo a la digestión in vitro.

NS: no hay diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ; \*, \*\* y \*\*\* diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ,  $0,01$  y  $0,001$  respectivamente; valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes según el test de rangos múltiples de Tukey.

En la **Tabla 3**, se pueden observar las aceitunas de mesa procedentes de la finca Dos hermanas, en las cuales, en todos los métodos antioxidantes, como también en el contenido total de polifenoles, se produjo un aumento en sus concentraciones, aunque este no es estadísticamente significativo. En la muestra que se observó un mayor contenido es en la D1 (muestra que en la fase II, corresponde al endurecimiento del hueso, recibe un riego deficitario controlado a -2 MPa), es decir, la muestra que tiene un mayor contenido de antioxidantes y fenoles es la que recibe un tratamiento de riego moderado. En el caso de la D3, esta es la que presentó una concentración más baja en todos los análisis realizados. Esta muestra fue la que recibió un riego deficitario más severo.

En las aceitunas de mesa procedentes de la finca Coria del Río, se pudo observar un aumento de capacidad antioxidante y fenoles totales en todos los métodos empleados. Donde se notó un mayor contenido de antioxidantes y fenoles fue en la muestra C1, que sufrió un RDC de -2 a -2,5 MPa dos semanas antes de la cosecha sin aplicar rehidratación. Por otro lado, en la muestra C2 se puede observar una leve disminución del contenido de capacidad antioxidante y fenoles. Esto puede ocurrir por el tratamiento de C2, ya que está sometido a un RDC durante más tiempo, es decir durante cuatro semanas antes de la cosecha y sin rehidratación.

El aumento de antioxidantes y fenoles más significativo se produjo en las aceitunas que reciben un tratamiento de riego moderado más corto.

Si procedemos a comparar los resultados de ambas fincas, se podría concluir que la aplicación de un estrés moderado en lugar de severo ha resultado ser el que aumenta la concentración de los fenoles y antioxidantes en ambas fincas, aunque en la finca de Coria del Río (estrés aplicado durante la fase III de crecimiento de la aceituna), es donde se encontraron unos resultados más significativos.

Algunos autores como Boskou (2015), sostienen que el contenido total de fenoles disminuye dependiendo de la etapa de la maduración de las aceitunas frescas y el tipo de fermentación utilizado.

## 4.2. Evaluación de la capacidad antioxidante y fenoles durante la digestión *in vitro*

La **Tabla 4** muestra la capacidad antioxidante (ABTS, FRAP, DPPH) y los polifenoles totales (FOLIN) que se determinaron en las aceitunas de mesa de la finca Dos hermanas, durante la simulación de la digestión *in vitro*.

		ABTS	DPPH	FRAP	FOLIN
		mmol Trolox/kg			g GAE/kg
<b>Dos Hermanas</b>					
ANOVA		**	NS	**	***
<b>D0</b>	0	1,515 b	1,532	2,786 b	62,49 d
	G1	2,559 b	1,892	4,060 a	112,8 b
	G2	2,453 b	1,642	3,296 b	89,30 c
	I1	4,608 a	2,113	3,979 a	142,4 a
	I2	4,489 a	1,676	3,299 b	116,4 b
ANOVA		***	NS	NS	***
<b>D1</b>	0	2,188 d	1,999	2,730	61,86 e
	G1	3,564 c	2,084	3,311	121,7 c
	G2	2,944 cd	2,168	4,021	93,53 d
	I1	5,812 a	2,425	3,751	155,5 a
	I2	4,890 b	2,000	2,403	135,4 b
ANOVA		**	NS	NS	**
<b>D2</b>	0	1,510 c	1,519	3,207	62,77 c
	G1	3,615 abc	1,587	4,149	101,4 ab
	G2	2,542 bc	1,317	5,600	86,87 bc
	I1	5,028 a	1,622	3,316	134,2 a
	I2	4,472 ab	1,246	2,773	117,5 ab
ANOVA		**	NS	NS	***
<b>D3</b>	0	1,667 c	2,078	3,663	68,33 d
	G1	3,699 bc	1,442	4,117	129,9 b
	G2	2,663 c	1,626	4,395	102,1 c
	I1	5,908 a	0,680	3,394	150,2 a
	I2	5,754 ab	1,262	3,127	126,1 b

Tabla 4. Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) y fenoles totales (FOLIN) en cada una de las fases de la digestión en la finca Dos Hermanas

NS: no hay diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ; \*, \*\* y \*\*\* diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ,  $0,01$  y  $0,001$  respectivamente; valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes según el test de rangos múltiples de Tukey.

O: fase oral; G1: fase gástrica 1 hora; G2: fase gástrica 2 horas; I1; fase intestinal 1 hora; I2: fase intestinal 2 horas

En el método ABTS, se observó un notable aumento de extracción en las cuatro muestras al ir pasando las fases de la digestión, pero donde más se extrajo fue en la fase intestinal de la muestra D1 y D3.

En los ensayos FRAP y DPPH, se pudo observar una evolución constante, ya que no se apreciaron cambios significativos entre los resultados obtenidos y se mantuvieron unos valores muy similares entre ellos.

Donde más extracción se noto del contenido de fenoles, fue en la fase intestinal de la muestra D1 y D3.

Según Bouayed (2011), este aumento de fenoles en la fase intestinal, puede ser consecuencia de la desprotonación de los restos de hidroxilo que quedan presentes en los anillos procedente del paso de medio ácido a medio alcalino.

La **Tabla 5**, muestra la capacidad antioxidante (ABTS, FRAP, DPPH) y los polifenoles totales (FOLIN) que se determinaron en las aceitunas de mesa de la finca Coria del Río, durante la simulación de la digestión *in vitro*.



		ABTS	DPPH	FRAP	FOLIN
		mmol Trolox/kg			g GAE/kg
Coria del río					
ANOVA		*	NS	*	***
<b>C0</b>	0	1,806 d	1,735	3,901 ab	74,81 b
	G1	4,057 b	1,731	6,734 a	131,6 a
	G2	3,037 c	1,677	4,150 ab	97,81 b
	I1	5,114 ab	2,278	3,760 ab	141,6 a
	I2	6,605 a	1,336	3,046 b	139,1 a
ANOVA		**	NS	*	***
<b>C1</b>	0	1,597 c	1,766	4,432 ab	69,62 c
	G1	4,179 b	2,422	5,35 a	138,1 a
	G2	3,650 b	1,778	4,877 ab	104,6 b
	I1	7,089 a	1,634	3,862 b	163,0 a
	I2	3,828 b	1,011	3,777 b	150,4 a
ANOVA		*	NS	*	*
<b>C2</b>	0	3,693 c	1,622	3,639 b	92,76 e
	G1	5,782 b	1,661	7,725 a	165,5 b
	G2	3,486 c	1,268	4,432 b	121,3 d
	I1	7,290 a	1,188	3,959 b	180,7 a
	I2	6,159 ab	1,213	3,731 b	150,4 c

Tabla 5. Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) y fenoles totales (FOLIN) en cada una de las fases de la digestión en la finca Coria del Río

NS: no hay diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ; \*, \*\* y \*\*\* diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ,  $0,01$  y  $0,001$  respectivamente; valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes según el test de rangos múltiples de Tukey.

O: fase oral; G1: fase gástrica 1 hora; G2: fase gástrica 2 horas; I1; fase intestinal 1 hora; I2: fase intestinal 2 horas

En el método ABTS, se puede ver un progresivo aumento durante las fases que trascurren en la digestión, destacando las muestras C1 y C2 que se caracterizan por una mayor extracción de capacidad antioxidante, estando C2 por encima de C1.

En el método DPPH, se produjo una evolución constante de la extracción, los resultados se mantuvieron iguales entre las muestras de las aceitunas y también entre las fases de la digestión.

Por otro lado, en el método FRAP, se notó una absorción de capacidad antioxidante mayor en la digestión gástrica.

En el contenido de fenoles totales, se notó un notable aumento de extracción en cantidad, pero destacando la fase de la digestión intestinal, que es donde se observó una mayor absorción, especialmente en la muestra C2.

Comparando los datos entre las dos fincas, se pudo ver, que ambas tienen la misma tendencia, es decir de aumentar progresivamente en los métodos ABTS y los fenoles totales. Por otro lado, DPPH se mantuvo estable en ambas fincas.

En las dos fincas se destacó que el valor mayoritario que se extrajo de capacidad antioxidante (en este caso refiriéndonos al método ABTS) y fenoles totales se dio en la fase intestinal de la digestión, siendo las muestras de la finca Dos Hermanas con mayor extracción (D1 Y D3). Por otro lado, en el caso de Coria del Río la muestra mayoritaria fue C2, esto puede ser consecuencia del RDC (-2 a -2,5 MPa) empleado en la fase de la acumulación de aceite y la maduración de la aceituna antes de la cosecha.

Según Boskou (2015), los contenidos de algunos fenoles disminuyen debido al pH del medio en el que se encuentran. Por lo tanto, se podría decir que en este estudio ocurrió una disminución debido al  $\text{pH} = 3$  (ácido), que se apreció en la fase gástrica.

### 4.3. Azúcares

La **Tabla 6**, muestra los resultados de azúcares que se determinaron inicialmente para las aceitunas de ambas fincas.

En ambas fincas se identificaron el glicerol, maltoheptaosa y manitol. Por otro lado, se pudo notar un mayor valor de maltoheptaosa y glicerol en la finca Dos Hermanas, en la que el riego deficitario controlado, se aplica en la fase II, es decir en el endurecimiento del hueso, pero en estos resultados también pudieron influir factores biológicos como el clima, suelo, etc.

<b>Maltoheptaosa    Manitol    Glicerol</b>			
<b>g/kg de pulpa</b>			
<b>Dos Hermanas</b>			
<b>ANOVA</b>	NS	NS	NS
<b>D0</b>	2,30	3,15	1,23
<b>D1</b>	2,10	2,52	0,91
<b>D2</b>	2,14	2,58	0,89
<b>D3</b>	2,10	2,55	0,90
<b>Coria del Río</b>			
<b>ANOVA</b>	NS	NS	NS
<b>C0</b>	0,407	0,504	0,155
<b>C1</b>	0,419	0,505	0,157
<b>C2</b>	0,404	0,481	0,155

Tabla 6. Azúcares iniciales para ambas fincas, previo a la digestión in vitro.

NS: no hay diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ;

Cabe destacar que el valor más alto de maltoheptaosa, comparando entre las dos fincas, se encontró en la muestra D0 procedente de la finca Dos Hermanas, la que ha estado sometida a un estado hídrico óptimo, sin RDC y se mantiene a -1,2 MPa antes del endurecimiento del hueso y a -1,4 MPa partir de ese momento. El cambio que se vio en los valores es muy pequeño. Los valores de glicerol también son mayores en la finca Dos Hermanas.

En ambas fincas, el azúcar con mayor valor de concentración que está presente es el manitol.

Autores como Cano-Lamadrid (2017), identificaron azúcares como el manitol y el glicerol, en aceitunas con riego deficitario controlado.

La ausencia de azúcares reductores era de esperar, porque son los principales sustratos de la fermentación láctica, el único proceso láctico que ocurre de forma espontánea (Cano-Lamadrid, 2017).

La **Figura 35**, muestra los azúcares identificados en cada una de las muestras procedente de la finca Dos Hermanas, durante el proceso de la digestión.

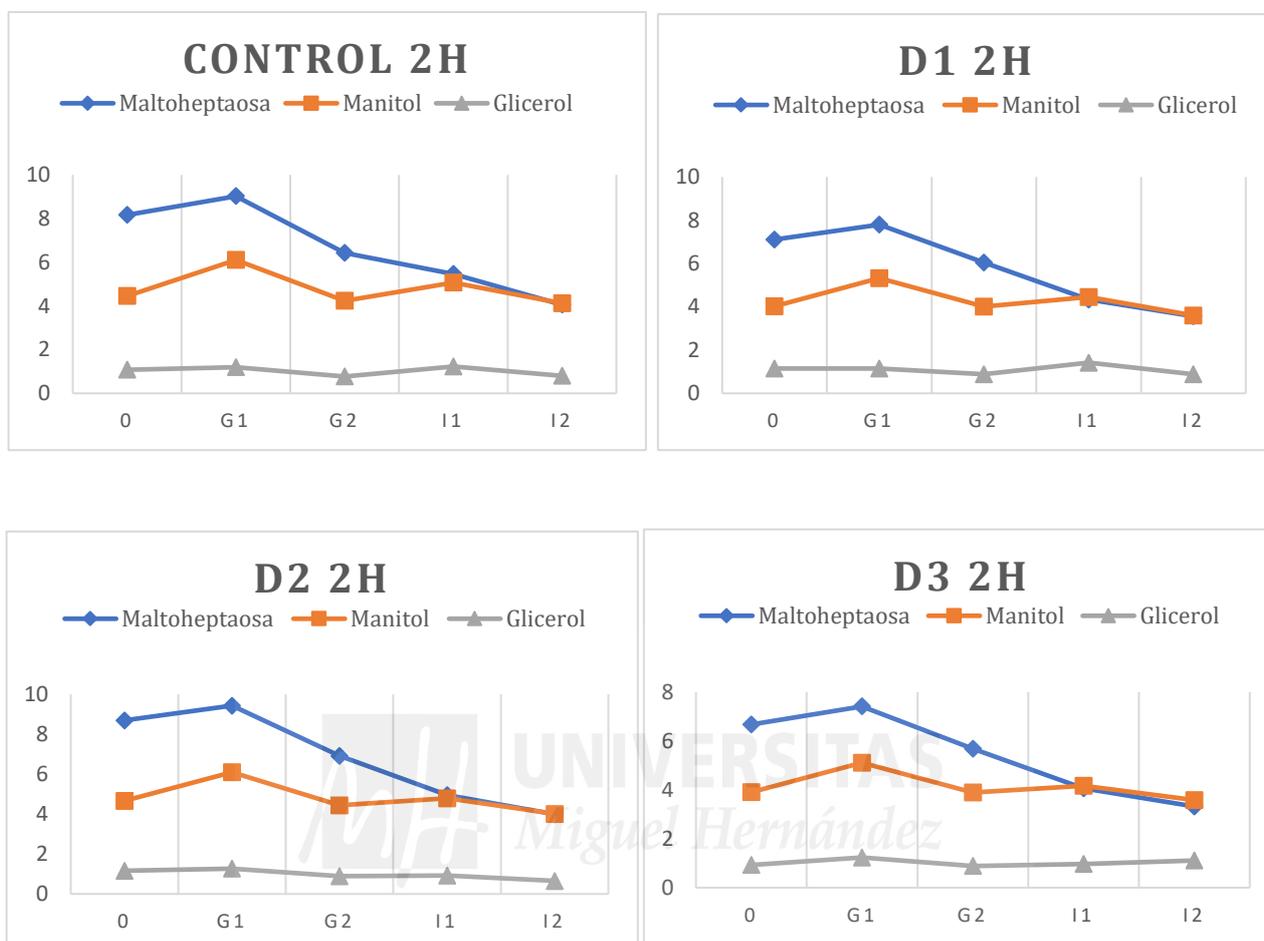


Figura 35. Azúcares expresados en mg/100g de pulpa de aceituna (Finca dos Hermanas) a lo largo del proceso de digestión.

La (**Figura 35**) destaca que todos los azúcares presentes en las muestras de la finca Dos Hermanas, presentan la misma tendencia en todas las fases de la digestión. La maltose y el manitol están más concentrados en la fase de la digestión gástrica.

Por otra parte, se vio que el glicerol se mantiene estable en todas las muestras y en las procedentes fases de la digestión, por lo tanto, no hay diferencias.

El azúcar presente en todas las muestras, que se extrajo en mayor contenido fue la maltose, pero donde se notó una mayor extracción fue en la muestra D0 y D2. La muestra D0 no sufre RDC y la muestra D2 sí está sometida a un RDC de

-3MPa en la fase del endurecimiento del hueso (fase II) y un tiempo más corto que en la D1. Por tanto, puede decirse que el RDC no influye en la obtención de resultados, ya que los datos de la muestra control (D0) es muy similar a la muestra que sufre un periodo corto de RDC (D2).

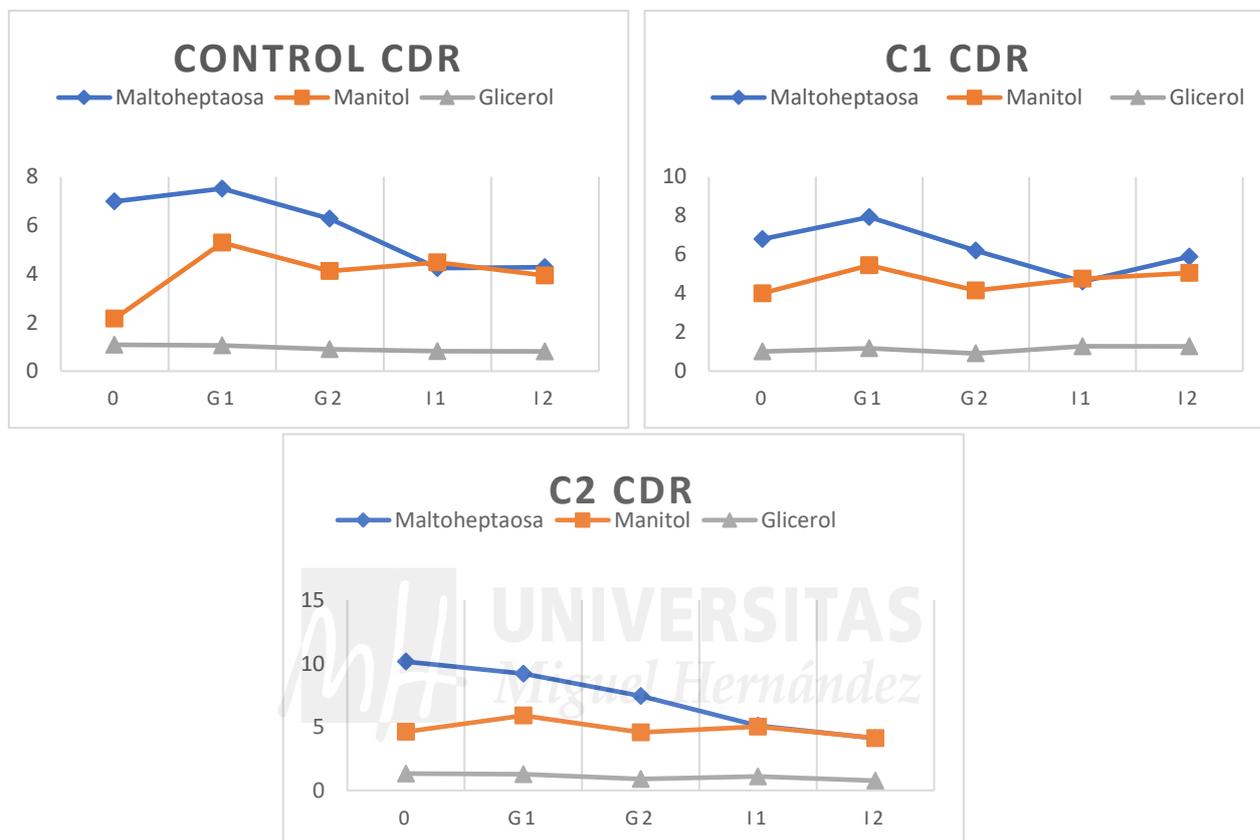


Figura 36. Azúcares expresados en mg/100g de pulpa de aceituna (Coria del Río) a lo largo del proceso de digestión.

La **Figura 36**, muestra los datos obtenidos de los azúcares que se identifican en las muestras y como es su evolución durante la digestión.

Como se puede ver, el azúcar mayoritario presente que se extrajo fue la maltoheptaosa, como en la finca Dos Hermanas. También cabe destacar que el contenido de glicerol es similar a la finca Dos Hermanas, se mantiene constante en todas las muestras, y en todas las fases de digestión.

La maltoheptaosa y el manitol tienden a aumentar su extracción durante la fase gástrica, y tras pasar una hora de la fase gástrica esta asimilación disminuye su valor.

Donde mayor cambio se pudo notar fue en la muestra C2, que se extrajo menor cantidad de azúcares. Esta muestra sufrió RDC en la fase de la acumulación del aceite y maduración de la aceituna cuatro semanas antes de la cosecha.

Autores como Tekaya, (2018) y Nergiz (2009), identificaron en aceitunas crudas azúcares como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos azúcares están naturalmente presentes en aceitunas frescas.

Si se procede a someter aceitunas crudas a tratamientos con déficit de riego, el perfil de azúcares cambia, apareciendo la maltoheptaosa, manitol y glicerol (Cortés-Delgado, 2016), (López-López, 2009).

#### 4.4. Ácidos orgánicos

La **Tabla 7**, muestra los resultados de ácidos orgánicos, que se determinaron inicialmente para las aceitunas de ambas fincas.

	<b>Fítico</b>	<b>Láctico</b>	<b>Acético</b>
	<b>g/kg de pulpa</b>		
<b>Dos Hermanas</b>			
<b>ANOVA</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>
D0	7,53	1,64	0,53
D1	6,44	1,57	0,63
D2	6,82	1,61	0,66
D3	6,73	1,59	0,64
<b>Coria del Río</b>			
<b>ANOVA</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>
C0	1,27	0,30	0,19
C1	1,29	0,30	0,11
C2	1,32	0,30	0,16

Tabla 7. Resultados ácidos orgánicos iniciales para ambas fincas, previo a la digestión in vitro, expresados en mg/ 100 g o g/kg de pulpa de aceituna.

NS: no hay diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ ;

Los ácidos que se identificaron fueron: ácido fítico, láctico y acético. Estos ácidos están presentes en la aceituna, debido al proceso de fermentación que tiene lugar. Para realizar dicha fermentación, se utiliza agua con sal, y por lo tanto los

azúcares presentes en las aceitunas, por la acción de las bacterias ácido-lácticas fermentan y se transforman en CO<sub>2</sub>, ácido láctico y otros ácidos orgánicos (Hurtado, 2012).

Los ácidos que se identificaron tras el proceso de digestión fueron: ácido fítico, butírico, oxálico y cítrico para ambas fincas (**Figura 37 y Figura 38**). Se vio una diferencia de ácidos presentes en las aceitunas iniciales, tras el RDC y la digestión. Cabe decir que, desde nuestro conocimiento, esta es la primera vez que este tipo de análisis se ha analizado en conjunto, es decir, RDC y digestión, por lo que los resultados obtenidos no se pueden comparar con estudios previos.

Hay algunos ácidos que forman parte de la degradación o síntesis de otros compuestos como por ejemplo el ácido cítrico, que forma parte de la acumulación de aceite en las aceitunas durante el ciclo de Krebs (Nergiz, 2009).

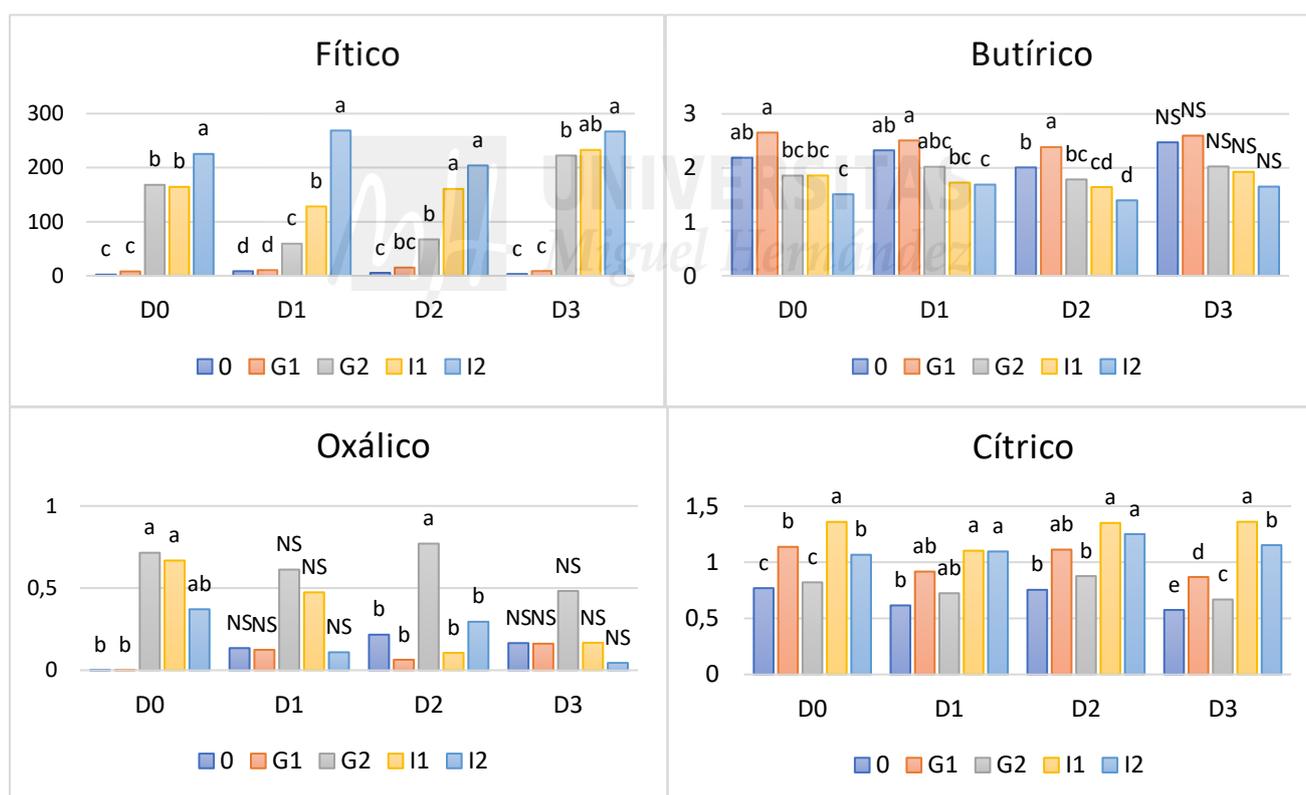


Figura 37. Ácidos orgánicos expresados en mg/100g de pulpa de aceituna (Dos Hermanas) a lo largo del proceso de digestión.

En las aceitunas de la finca Dos Hermanas (**Figura 37**), denotamos que, en todos los ácidos presentes, menos en el fítico, se produce un aumento en la asimilación concentración de todas las muestras, especialmente ocurre en la fase

gástrica. Por otro lado, en la fase intestinal fue donde más se presencia notamos de ácido fítico y ácido cítrico.

El ácido fítico evoluciona notablemente hacia arriba en la gráfica, en todas las muestras y tras el paso de todas las fases de la digestión.

En los ácidos butírico y oxálico ocurre al revés, existe mayor presencia en la fase gástrica.

Se puede notar que la cantidad de ácido fítico inicial es mucho menor que la que tenemos en las muestras con RDC tras la digestión, por lo tanto, se concluye que es beneficioso utilizar este tipo de control hídrico.



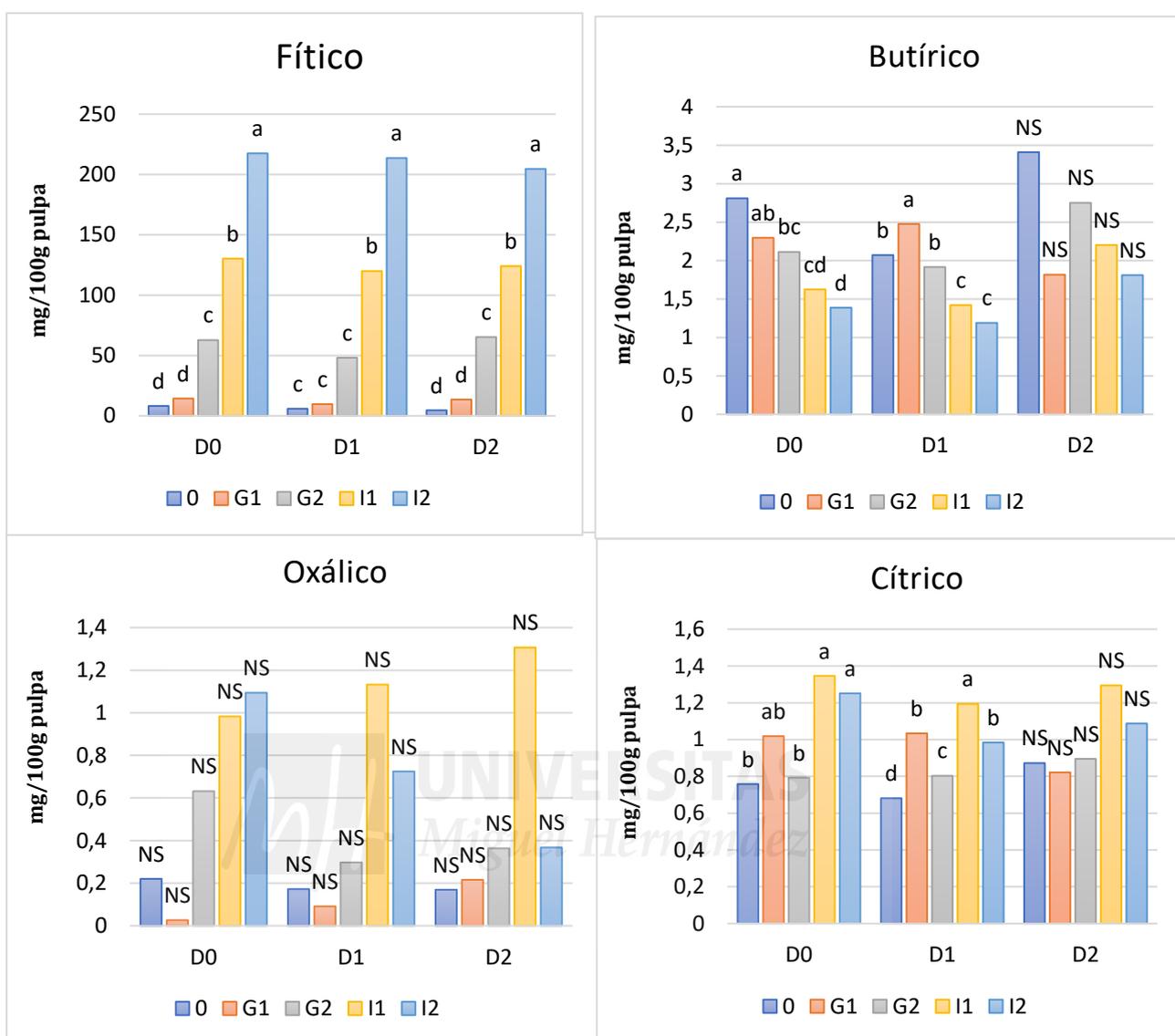


Figura 38. Ácidos orgánicos expresados en mg/100g de pulpa de aceituna (Coria del Río) a lo largo del proceso de digestión.

En las aceitunas procedentes de Coria del Río (**Figura 38**) ocurre lo mismo que en la finca Dos Hermanas, es decir, que el ácido mayoritario que se extrajo fue el fítico en las tres muestras (C0, C1 y C3) y en la fase intestinal de la digestión. Respecto al ácido cítrico la situación fue la misma, existe una mayor presencia durante la fase intestinal en las tres muestras.

En el ácido oxálico y butírico se observa que hay un aumento favorable en la asimilación, hasta la fase final del gastrointestinal, y posteriormente se produce una disminución significativa.

Hay varios estudios sobre los posibles beneficios del ácido fólico, por ejemplo, Zhou (1995), que sostiene que el ácido fólico interviene en la disminución de triglicéridos y colesterol. También se considera como un antioxidante natural, que tiene una función como la de reducir la peroxidación de lípidos y como conservante en los alimentos. Debido a este tipo de propiedades, es favorable que la concentración de ácido fólico vaya aumentando en nuestros resultados.

Autores como Cano-Lamadrid (2017), identificaron ácidos orgánicos como el fólico y el láctico, en aceitunas con tratamiento de riego deficitario controlado.

En aceitunas crudas de diferentes variedades se identificaron ácidos orgánicos como el ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, etc. (Nergiz, 2009).

Por otro lado, una vez que las aceitunas se proceden a someter a tratamientos con riego deficitario, se produce un cambio en el perfil de los ácidos, apareciendo el ácido fólico, ácido láctico y ácido acético (López-López, 2009), (Cortés-Delgado, 2016).



## 5. CONCLUSIÓN



El tratamiento de riego deficitario controlado (RDC) que se emplea en las aceitunas procedentes de dos fincas (Dos Hermanas y Coria del Río), se tradujo en un aumento en la concentración de antioxidantes y fenoles, especialmente las muestras que reciben un estrés hídrico moderado más corto (D1).

A lo largo de la digestión *in vitro* de aceitunas HidroSOSTenibles, se extrae favorablemente una elevada concentración de capacidad antioxidante y de fenoles totales, especialmente en la fase intestinal (I1), y empleando el método ABTS. Lo mismo ocurre si comparamos los resultados entre las dos fincas.

En el perfil de azúcares la maltoheptaosa destaca como el azúcar con mayor concentración en las aceitunas de ambas fincas. En la simulación de la digestión, principalmente en la fase gástrica (G1) destacan la maltoheptaosa y el manitol, siendo la maltoheptaosa la que más se extrajo en (D0), la muestra que no tiene RDC.

El perfil de ácidos orgánicos se ve favorecido, al emplear RDC, el ácido principal observado que se extrajo en la simulación de la digestión en mayor concentración fue el fítico, se puede observar una concentración mayor al emplear RDC que sin emplearlo.

Como conclusión general puede decirse que los tratamientos empleados en las aceitunas resultan adecuados para los fines empleados, en este caso mejora la capacidad antioxidante, fenoles, tanto ácidos como azúcares presentes. Además, se emplea como se expone anteriormente un tratamiento de riego deficitario controlado, por lo tanto, hay un gasto menor de agua y con un coste económico menor.

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue apoyado por el ministerio español de ciencia e innovación (MICINN), proyectos AGL2013-45922-C2-1-R y AGL2013-45922-C2-2-R.





UNIVERSITAT  
Miguel Hernández

## 6. BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

- AICA. (2017). Agencia de Información y Control Alimentarios.
- ASEMESA. (2017). Asemesa Asociación de Exportadores de Aceitunas de Mesa
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cano-Lamadrid, M., Girón, I. F., Pleite, R., Burló, F., Corell, M., Moriana, A., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2015). Quality attributes of table olives as affected by regulated deficit irrigation. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 1), 19-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.063>
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311. doi:[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- COI. (2017). Consejo Oleícola Internacional.
- FEN. (2017). Fundación española de la nutrición.
- Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., & Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87-92. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.002
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- MAPAMA. (2017). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175-1188. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5(6), 1113-1124. doi:10.1039/c3fo60702j
- Noguera-Artiaga, L., Lipan, L., Vázquez-Araújo, L., Barber, X., Pérez-López, D., & Carbonell-Barrachina, Á. (2016). Opinion of Spanish Consumers on Hydrosustainable Pistachios. *Journal of food science*, 81(10), S2559-S2565. doi:10.1111/1750-3841.13501
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Robles-Sanchez, R. M., Islas-Osuna, M. A., Astiazaran-Garcia, H., Vazquez-Ortiz, F. A., Martin-Belloso, O., Gorinstein, S., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009). Quality index, consumer acceptability, bioactive compounds, and antioxidant activity of fresh-cut "ataulfo" mangoes (*mangifera indica* L.) as affected by low-temperature storage. *J Food Sci*, 74(3), S126-134. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01104.x
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Academic Press.