

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS HOJAS DE OLIVO CULTIVAR CORATINA, DEL VALLE CENTRAL DE CATAMARCA

*Reales, Natalia**; *Gómez Patricia **; *Salim Rosales Claudia*; *Bravo María*; *Gómez, Elizabeth*

Facultad de Ciencias Agrarias- UNCa

SUMMARY

The ever-changing growth of olive cultivation in Catamarca during the 90's changed the productive reality of the province which became the biggest olive-oil producer of the country. Apart from producing oil, this industry generates residues coming from primary and industry production, among them, pruning residues. These are more and more abundant and have a rich potentiality in antioxidants, mainly polyphenols. This work aims at assessing the potentiality of olive tree pruning residues as a natural antioxidant source. The samples belong to Coratina variety leaves coming from the Central Valley, Catamarca. It also aims at evaluating the antioxidant activity of their extracts. For these purposes, ethanolic extracts were obtained coming from Coratina variety pruning; their phenolic performance was evaluated by the Folin-Ciocalteu assay, while the antioxidant activity by the application of the extracts on a lipidic substrate exposed to forced oxidation (80°C during 5 days). The evolution of oil oxidative process with and without treatment was followed by the Peroxide Index (according to ISO 3960-COI/T15-IUPAC 2501) and the Absorbance to the ultraviolet one (according to COI/T20/Doc. N°19). The results showed higher phenolic performance than the registered for other vegetable species; however, its incorporation to oil was low. At room temperature, the extracts had a protective effect, but once exposed to high temperatures, oxidative protection was not present. As a conclusion, all the oil samples had similar oxidative conditions.

Key words: *Olea Europaea* L - Coratina variety - agro industrial residues - polyphenols – antioxidant activity- .

RESUMEN

El vertiginoso crecimiento de la olivicultura en Catamarca en la década del 90 modificó la realidad productiva de la provincia que se convirtió en la mayor productora de aceite de oliva del país. Esta industria genera, además de aceite, residuos provenientes de la producción primaria e industrial entre ellos los restos de poda, cada vez más abundantes y con un potencial

rico en antioxidantes, principalmente polifenoles. El presente trabajo pretende valorar la potencialidad de los restos de la poda de olivos, de la variedad Coratina procedente del Valle Central de la Provincia de Catamarca, como fuente de antioxidantes naturales y evaluar la actividad antioxidante de sus extractos. Para ello se obtuvieron extractos etanólicos de hojas provenientes de la poda de la variedad Coratina y se evaluó su rendimiento fenólico, mediante el método de Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante a través de la aplicación de los extractos sobre un sustrato lipídico sometido a oxidación forzada (80°C durante 5 días). La evolución del proceso oxidativo de los aceites con y sin tratamiento se siguió mediante el Índice de peróxidos (según ISO 3960-COI/T15-IUPAC 2501) y la Absorbancia al ultravioleta (según COI/T20/Doc. N°19). Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento fenólico muy superior al registrado por otras especies vegetales; sin embargo, su incorporación al aceite fue baja. A temperatura ambiente los extractos ejercieron un leve efecto protector, pero una vez sometidos a altas temperaturas, no se evidenció protección oxidativa. Al finalizar el ensayo, todos los aceites llegaron a similares condiciones de oxidación.

Palabras claves: *Olea Europaea* L. cultivar Coratina – residuos agroindustriales – polifenoles - actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito industrial, tanto alimentario como cosmético y farmacológico, prevenir la oxidación de las grasas es un objetivo de gran interés [1]. El empleo de antioxidantes en la formulación de alimentos es cada vez más habitual, ya que actúan interrumpiendo los procesos oxidativos de degradación de lípidos y además porque se los vincula con la prevención de diversos procesos generadores de radicales libres responsables de enfermedades degenerativas en el cuerpo humano [2].

En la actualidad se dispone de diversos aditivos antioxidantes autorizados, aunque la mayoría son poco solubles en los propios lípidos a los que deben proteger. También se comercializan extractos vegetales con propiedades antioxidantes, no obstante hay una gran confusión en su diseño. Por otra parte los antioxidantes sintéticos están bajo sospecha de ser potenciales cancerígenos, por lo que están siendo sustituidos por antioxidantes naturales, y la investigación se ha dirigido hacia la búsqueda de fuentes vegetales alternativas [3] y [4]. Entre los antioxidantes naturales se destacan por su elevada actividad los compuestos polifenólicos, sobre todo los ortodifenoles [5].

Catamarca ha logrado posicionarse en el liderazgo nacional de la producción olivícola, con una superficie de 24.000 hectáreas de cultivo, distribuida entre el Valle Central, Valle de

Pomán y Tinogasta. [6] y [7]. Como resultado de la producción de aceite de oliva se generan grandes cantidades de “desechos”, tanto en la fase de producción primaria como en la industrialización de la aceituna para producir aceite. En este contexto en la Facultad de Ciencias Agrarias, se abrió una línea de investigación que se planteó por objetivo recuperar y aprovechar los antioxidantes naturales presentes en los residuos de la industria olivícola otorgándoles un valor que abriría nuevas vetas comerciales al sector lo que simultáneamente evitaría el problema ambiental que genera la acumulación de residuos [8], [9] y [10]. En este sentido, el presente trabajo se plantea como objetivo valorar la potencialidad de los restos de la poda de olivos, de la variedad Coratina procedente del Valle Central de la Provincia de Catamarca, como fuente de antioxidantes naturales y evaluar la actividad antioxidante de sus extractos. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Extraer sustancias fenólicas presentes en hojas de olivos de la variedad Coratina cultivados en el Valle Central de la Provincia de Catamarca.
- Determinar el rendimiento medio en polifenoles totales y ortodifenoles de extractos de hojas de olivo de las variedades Coratina.
- Evaluar la actividad antioxidante de extractos de hojas de olivos de las variedades Coratina, a partir de su aplicación sobre un sustrato lipídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y acondicionamiento de muestras

a.- *Muestreo*: Se trabajó con hojas originarias de la poda de olivo (*Olea europaea* L.), cultivar Coratina, procedentes del Valle Central de Catamarca. La toma de muestras se efectuó por el equipo de investigación en el año 2007, mediante muestreo aleatorio simple, sobre plantas de la misma edad, sometidas a igual sistema de manejo cultural y bajo idénticas condiciones edafoclimáticas. Se procedió a la selección del lote, se eliminaron las filas y columnas de los extremos para evitar el efecto bordura y se escogieron por medio de sorteo 25 plantas, de las cuales se recogieron los restos de poda, que se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su acondicionamiento y posterior análisis.

b.- *Acondicionamiento de muestras*. Las ramas frescas se lavaron con abundante agua potable, se enjuagaron con agua destilada, y se dejaron escurrir sobre papel absorbente. Posteriormente se sometieron a secado en estufa durante 48 horas a una temperatura de 40 °C. Luego se procedió al deshojado en forma manual. Las muestras de hojas se homogeneizaron y se almacenaron en bolsas de papel exentas de humedad. Finalmente, se sometieron a molienda en molino de cuchilla de acero inoxidable, se pasaron a través de un tamiz plástico de 2 mm y se almacenaron en recipientes perfectamente identificados.

2. Obtención de extractos

- a- Se realizó la extracción de los fenoles contenidos en las muestras de hojas empleando una solución de etanol:agua 50% utilizando una relación 1:10 p/v. Los extractos se filtraron y se conservaron en la heladera [11].

3. Cuantificación de Polifenoles y ortodifenoles en extractos

Los antioxidantes que se cuantificaron en los extractos obtenidos, fueron los polifenoles totales (PFT) por el método de Gutfinger con Folín-Ciocalteu. Es un método espectrofotométrico en el cual se mide la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 725 nm. Los ortodifenoles (ODF) se determinaron por espectrofotometría UV-Visible usando el método del metavanadato de sodio a una longitud de onda de 370 nm. Para ambos parámetros se utilizó ácido cafeico como estándar y los resultados se expresaron como ppm de ácido cafeico.

4. Aplicación de los extractos a los aceites

Caracterización del aceite testigo

La toma de muestras se realizó en Octubre del 2008. Se muestrearon 20 litros de aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina (testigo), procedentes de una aceitera del Departamento Valle Viejo, Catamarca. Al momento del ensayo (2010) se repitieron los análisis del aceite para conocer las condiciones iniciales del mismo al iniciar la investigación. Para ello se midieron los parámetros consignados a continuación:

- Fenoles totales: por método Folín Ciocalteu, a $\lambda = 725$ nm.
- Índice de peróxidos: según ISO 3960-COI/T15-IUPAC 2501.
- Absorbancia al ultravioleta: según COI/T20/Doc. N° 19.

En función de los análisis realizados se determinó que el aceite de oliva de Arbequina empleado como sustrato pertenece a la categoría *lampante*.

Aplicación de los extractos sobre sustrato lipídico

Se colocaron en un erlenmeyer de 2000 ml, 750 ml del aceite testigo. Posteriormente se incorporó con agitación enérgica y continua, el extracto previamente obtenido, en una concentración de 600 ppm en fenoles totales.

La mezcla se dejó reposar durante 48 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Luego se fraccionó en tres alícuotas de 250 ml y se colocaron en frascos color caramelo sin tapa, rotulados previamente. De igual manera se fraccionó al aceite testigo. Los tratamientos analizados fueron **T** (testigo), representado por el sustrato aceite de oliva virgen de arbequina de categoría lampante y **S-HC** (aceite utilizado como sustrato con extracto

etanólico de hoja Coratina). A continuación se realizó la primera toma de muestra del aceite testigo y del tratamiento, con sus correspondientes repeticiones. Posteriormente se introdujeron los 6 frascos en estufa a 60 °C. El seguimiento de la oxidación se llevó a cabo durante 5 días.

5. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos

La actividad antioxidante de los extractos de hojas de Coratina se evaluó en función de la capacidad de protección sobre la oxidación del aceite de oliva de Arbequina virgen lampante. Para ello se sometieron a oxidación forzada, mediante calefacción a 60 °C, alícuotas del aceite con y sin los extractos, colocadas en frasco de vidrio color caramelo y se llevó a cabo la determinación de PFT y ODF antes de someter al efecto de la temperatura a los testigos y al tratamiento. Periódicamente se evaluó el avance del proceso oxidativo a través del seguimiento del índice de peróxido y la absorbancia al ultravioleta (K232 y K270). El índice de peróxidos se cuantificó por volumetría iodométrica. La absorbancia al UV se determinó por espectrofotometría a 232 y 270 nm. Los ortodifenoles se determinaron por espectrofotometría UV-Visible usando el método del metavanadato de sodio.

6. Diseño experimental

A continuación se detalla el diseño del estudio y se operacionalizan las variables intervinientes.

a. “Extracción de compuestos polifenólicos”

| Material | Solvente |
|---------------------|------------|
| vegetal | Etanol 50% |
| Hoja de Coratina | <i>HE</i> |

Esquema Experimento “Extracción de compuestos polifenólicos”.

Variables dependientes:

- Polifenoles totales: Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura uno o más grupos bencénicos sustituidos por una o más funciones hidroxílicas. Se cuantifica por el método de Folín-Ciocalteu, utilizando ácido cafeico como estándar. Es un método espectrofotométrico en el cual se mide la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 725 nm. Los resultados se expresan como ppm de ácido cafeico.

- O-difenoles: Los o-difenoles son moléculas que poseen en su estructura uno o más grupos bencénicos sustituidos por al menos dos funciones hidroxílicas en la posición orto. Se determinan con molibdato de sodio al 5 % en etanol al 50 %, utilizando ácido cafeico como estándar. Es un método espectrofotométrico en el cual se mide la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 370 nm. Los resultados se expresan como ppm de ácido cafeico.

b. “Evaluación de la actividad antioxidante”

| | Aceite de oliva virgen lampante | Extracto Hoja-Etanol 50 % |
|-----------|------------------------------------|------------------------------|
| Sustratos | <i>T</i> | <i>S-HC</i> |

Esquema Experimento “Evaluación de la actividad antioxidante”

Variables independientes:

- Material vegetal: Hojas Coratina
- Solvente: Etanol acuoso 50%.
- Concentración fenólica: C: 600 ppm

Variable de control:

- Sustrato: S: Aceite de oliva virgen lampante.

Variable dependiente:

- Actividad antioxidante: se evalúa a través del avance del proceso oxidativo sobre un sustrato lipídico sometido a oxidación forzada, a partir del Índice de peróxidos y de las absorbancias al ultravioleta (K232 y K270).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de Polifenoles y ortodifenoles en extractos

En la tabla 1 se presentan la media de tres repeticiones del contenido en PFT del extracto etanólico de hojas de Coratina.

| PFT extracto Coratina (ppm) | Media | DS |
|--|--------------|-----------|
| 49118,87 | 49693,75 | 995,73 |
| 49118,87 | | |
| 50843,52 | | |

Tabla 1. Rendimiento fenólico de extracto de hojas de Coratina

El rendimiento fenólico obtenido por este material vegetal supera en gran magnitud el registrado por otras especies vegetales estudiadas como fuentes de antioxidante, existen publicaciones que señalan que el rendimiento de un extracto etanólico de porotos de soja fue de 343 ppm [1]. Inclusive es superior alcanzado por extractos etanólicos de hoja de Arbequina [10].

En la Tabla 2 y en el Gráfico 1 se presentan las medias de tres repeticiones del contenido en polifenoles totales (PFT) y orto-difenoles (ODF), expresados como miligramo de ácido cafeico por kilogramo, del testigo T y del tratamiento S-HC antes de su ingreso a estufa (día cero). Así mismo, se exponen las diferencias estadísticas, para las mediciones mencionadas, calculadas mediante el análisis unilateral de varianza por rangos de Kruskal Wallis, para un nivel de significancia del 5%.

| Código | Día | PFT | %Variación | ODF | %Variación |
|---------------|------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
| T | 0 | 46,17 A | | 29,99 A | |
| SHC | 0 | 69,28 A | 50,05 | 29,41 A | -1,94 |

Tabla 2. Contenido en PFT y ODF en el aceite testigo (T) y en el tratamiento (S-HC) en el día 0.

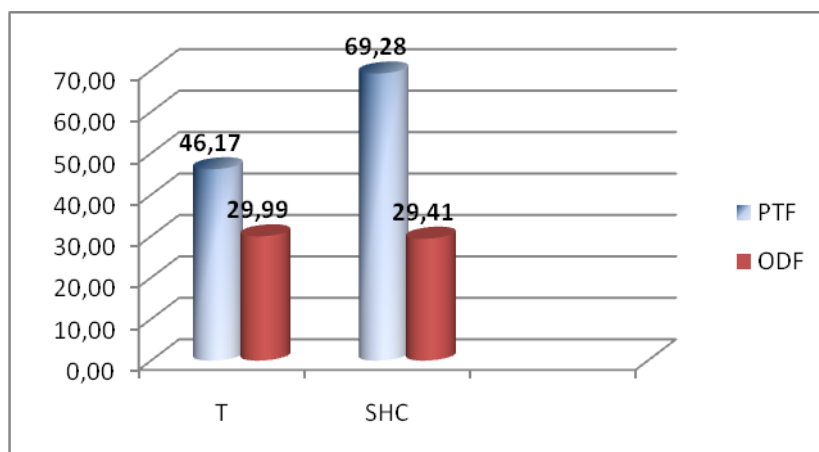


Gráfico 1. Contenido en PFT y ODF en aceite testigo (T) y en tratamiento (S-HC) el día 0.

La concentración de fenoles cuantificada para S-HC, resulta mayor que la del sistema testigo, aunque la diferencia a nivel estadístico no es significativa ($p=0,05$). El mismo comportamiento se manifiesta en los ODF (Tabla 2).

Se observa que, luego del agregado del extracto HC al sustrato, existe un incremento del contenido en PFT del 50,05%, a diferencia, se encontró que el contenido en ODF tuvo una disminución del 1,94%, posiblemente debido a un consumo interno de los mismos por el estado de oxidación del aceite empleado como sustrato, sin embargo dichos valores no fueron estadísticamente significativos.

De las 600 ppm de PFT adicionados al aceite a través de los extractos etanólicos de Coratina, sólo se cuantifican en un 3,85%, lo que evidencia un bajo porcentaje de incorporación fenólica. Este comportamiento, en parte, puede deberse a la poca miscibilidad de los componentes activos de los extractos en el sustrato, la que estaría condicionada por la naturaleza de las estructuras químicas de los biofenoles y su afinidad con el sustrato; conclusiones similares a las obtenidas en trabajos previos de aplicación de extractos de hoja y madera de arbequina sobre aceite de oliva virgen [10].

En la Tabla 3 y en los Gráficos 2, 3 y 4, se exponen las medias de los indicadores de formación de productos de oxidación primaria (IP y K232) y de oxidación secundaria (K270), y sus % de variación en el aceite testigo y en el tratamiento en función del tiempo. Los valores presentados corresponden a las medias de tres repeticiones.

| | Días de Ensayo | % de variación | |
|-------------|----------------|----------------|---------------|
| | | T | S-HC |
| IP | 0 | 20,33 A | 20,16 A |
| | 1 | 24,83 A | 22,13 24,49 A |
| | 3 | 33,64 A | 65,47 28,65 B |
| | 5 | 31,65 A | 55,68 30,99 A |
| | | | |
| K232 | 0 | 3,58 A | 3,26 A |
| | 1 | 3,96 A | 10,61 3,45 A |
| | 3 | 1,92 A | -46,37 1,91 A |
| | 5 | 2,07 A | -42,18 2,09 A |
| | | | |
| K270 | 0 | 0,25 A | 0,23 A |
| | 1 | 0,23 A | -6,50 0,27 A |
| | 3 | 0,27 A | 6,84 0,26 A |
| | 5 | 0,27 A | 6,93 0,28 A |
| | | | |

Tabla 3. Medias y porcentajes de variación del testigo (T) y el tratamiento (S-HC).

El IP, antes de la inducción a la oxidación del aceite testigo y el tratamiento, se reduce en un 0,84% en S-HC con respecto al testigo. Es decir, que a temperatura ambiente, el extracto ejerce un mínimo efecto protector sobre el sustrato lipídico estadísticamente no significativo.

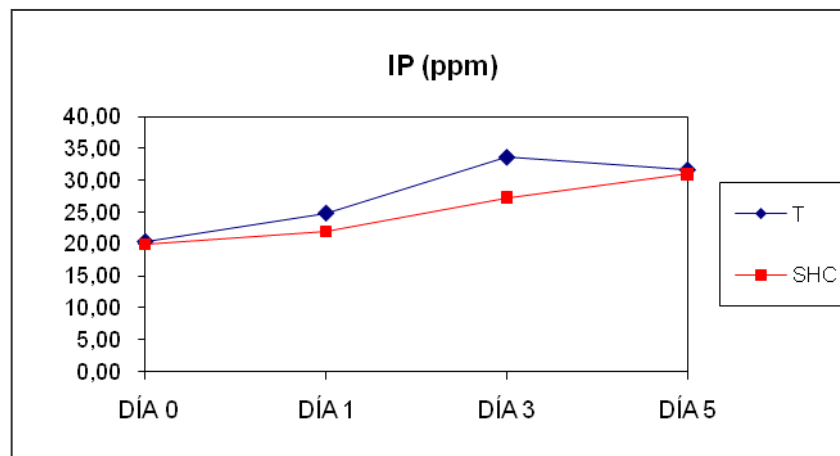


Gráfico 2. Evolución de IP del aceite testigo y tratamiento S-HC en función del tiempo.

Una vez sometidos el aceite testigo y tratamiento a condiciones de oxidación forzada, los porcentajes de incremento son del 22,13% y 21,48% para T y S-HC respectivamente (Tabla 3), es decir, los CF del extracto amortiguan levemente la acción radicalaria en el proceso de

oxidación del aceite. Este hecho se observa en los valores de IP que se mantienen por debajo de T (Gráfico 2), aunque, salvo en el tercer día, no se hallaron diferencias significativas (Tabla 3). Resultados que parecen concordar con los obtenidos por otros investigadores, concluyen que los extractos de hoja de olivo resultan eficaces para prevenir la oxidación, medida a través del incremento de IP, de muestras de aceite de oliva y de girasol, sometidos durante 13 días a 80 °C [5].

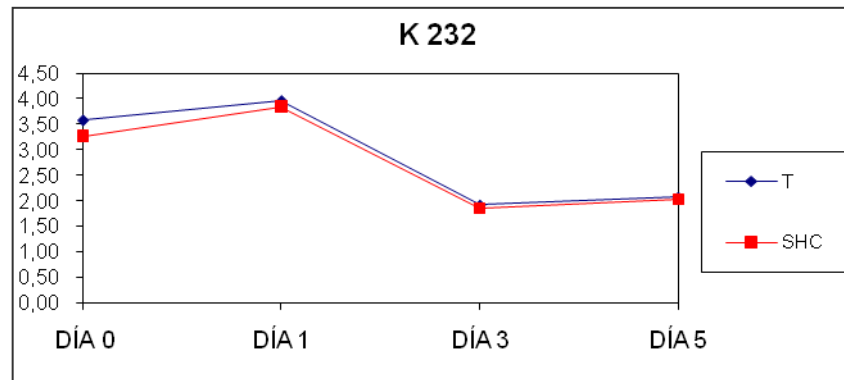


Gráfico 3. Evolución de K232 del aceite testigo y tratamiento S-HC en función del tiempo.

En el día 0, la K232 muestra una leve protección del extracto sobre el aceite (Gráfico 3) estadísticamente no significativa. En contraste al comportamiento observado por el IP, al ser sometido a calentamiento los valores de K232 de los aceites tratados y sin tratar no se diferencian.

Una vez sometidos el tratamiento y el aceite testigo a altas temperaturas, el extracto ejerció un leve efecto protector, no significativo, sobre la formación de compuestos de oxidación primaria (IP y K232).

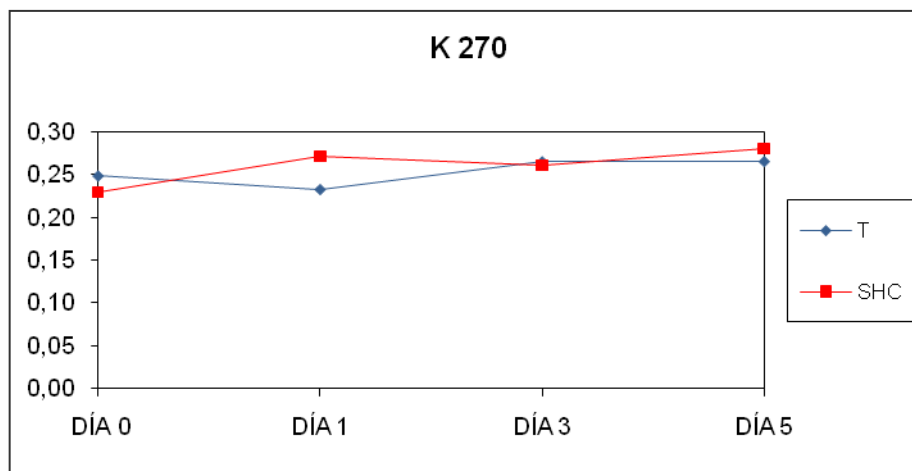


Gráfico 4. Evolución de IP del aceite testigo y tratamiento S-HC en función del tiempo.

En cuanto a la oxidación secundaria, no se hallan diferencias significativas entre las K270 del tratamiento y el testigo; superando al testigo durante el primer día de calentamiento. Sin embargo, se puede observar que estos valores bajaron durante el primer día de aplicación (día 0), con lo cual se interpreta una ligera protección. Para el quinto día de ensayo, tanto los aceites tratados como los testigos llegaron a condiciones de oxidación similares.

La leve reducción en el IP, K232 y K270 al aplicar los tratamientos al aceite, junto a la poca miscibilidad de los extractos en el sustrato podrían explicar la baja concentración de PFT cuantificados después del agregado de los mismos al aceite.

CONCLUSIONES

- El rendimiento fenólico obtenido por las hojas de olivo del cultivar Coratina supera en gran magnitud el registrado por otras especies vegetales estudiadas como fuentes de antioxidante natural.
- Se observó una escasa incorporación de los extractos fenólicos de hoja de olivo en el aceite. A pesar de ello, a temperatura ambiente resultó suficiente para ejercer un leve efecto protector (no significativo).
- Los indicadores de oxidación primaria de lípidos (IP, K232 y K270) del tratamiento S-HC, evidenciaron un leve efecto de amortiguación de la acción radicalaria del extracto sobre el proceso de oxidación del aceite; sin embargo este no fue estadísticamente significativo, debido posiblemente a la baja incorporación y a la escasa distribución de estos compuestos en el medio lipídico, a la termolabilidad de los fenoles incorporados con los extracto y al probable agregado de compuestos que catalizan la oxidación ante el incremento de la temperatura.
- A los cinco días de ensayo los extractos no evidenciaron protección alguna ante el proceso de oxidación forzada y el incremento de los parámetros oxidación del aceite tratado por encima del testigo hace suponer que el extracto sometido a las condiciones del ensayo presenta un efecto pro-oxidante.
- Teniendo en cuenta la riqueza fenólica evidenciada por el extracto etanólico de hoja de Coratina, la baja capacidad antioxidante de los extractos sobre el aceite a temperatura ambiente y la falta de respuesta de los mismos en condiciones forzadas de oxidación, se hace necesario estudiar la actividad del extracto sobre otros sistemas en los que los extractos puedan tener una mejor distribución interfacial de los extractos por lo que se sugiere evaluar el comportamiento de los extractos sobre emulsiones acuosas que permitan una mejor distribución interfacial de los fenoles de los extractos en el sustrato y favorezcan

los mecanismos de protección antioxidante. Así mismo, se considera necesario realizar estudios y/o análisis previos de la composición química de los extractos empleados para verificar el porcentaje de afinidad con el que se inicia el ensayo.

- Por otra parte sería también necesario ensayar nuevas condiciones de trabajo, especialmente en lo referido a la temperatura empleada para forzar la oxidación. Se sugiere termostatar a temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. López Luengo M. (2006). “El olivo. *Propiedades terapéuticas*”. *Ámbito Farmacéutico. Fitoterapia (OFFARM)*. N° 11. Vol. 25. Pp. 56-59.
- [2]. Janczuk L., Gutiérrez M., Della Rocca P. (2007). “Antioxidantes naturales en aceites comestibles”. *Revista aceites y grasas*. Vol. 2. N° 67. Pp. 330-333.
- [3]. Frankel E. (1996). “Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality”. *Food Chemistry*. [4]. Meyer A., Heinomen M., Frankel E. (1998). *Food Chemistry*. N° 61. Pp. 71-75. Vol. 57. Pp. 51-55.
- [5]. Hartzallah H., Kiritsakis A. (1999). “Efecto antioxidante de los extractos fenólicos de la hoja y el fruto del olivo”. *Ciencia y Técnica*. N° 77. Pp. 47-49.
- [6]. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación - Subsecretaria de Alimentación y Mercados - Dirección Nacional de Alimentación. (2002). Catamarca, Argentina. Disponible en: <www.catamarca.guia.com.ar>.
- [7]. Andrada C., Luna M., Gómez P. (2008). “La reconversión productiva de la olivicultura en Catamarca”. *La Alimentación Latinoamericana*. N° 276. Pp. 54-60.
- [8]. Gómez P., Dalla Lasta M., Bravo M., Rosales Salim C., Gómez E., Castillo D. (2008) “Efecto de extractos de alperujo de Arbequina y Coratina sobre la estabilidad de aceite de oliva virgen”. *IV Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida*. Ed. Universitaria de resúmenes- Línea científica. Catamarca, Argentina. Pp. 171.

[9]. Gómez P., Dalla Lasta M., Porcú E., Bravo M., Nieto S., Kaen R. (2007). “Evaluación de la actividad antioxidante de extracto fenólico de alperujo”. Aceites y Grasas Nº 67. Tomo XVII. Vol 2. Pp.336-341.

[10]. Gómez, E., Salím Rosales, C. (2009). “Actividad antioxidantes de extractos de residuos de poda de olivos – Olea europea L.- cultivar Arbequina procedentes del Valle Central de Catamarca”. Trabajo Final de Licenciatura. Pp. 53-61.

[11]. Gómez E., Salim Rosales C., Gómez P., Bravo M. (2008). “Métodos de extracción de polifenoles en hojas y residuos leñosos de Olivos”. IV Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Ed. Universitaria de resúmenes- Línea científica. Catamarca. Argentina. Pp. 296.