

Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad

Por G. Beltrán, A. Jiménez, M.P. Aguilera y M. Uceda

Estación de Olivicultura y Elaiotecnia. CIFA «Venta del Llano»
Dirección Gral. de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
Apdo. 50 -23620 Mengíbar. Ján

RESUMEN

Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad.

Los compuestos fenólicos tienen gran importancia por su efecto sobre la estabilidad y las características sensoriales de los aceites de oliva vírgenes. En este trabajo se ha analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución la fracción fenólica de los aceites de oliva de la variedad Arbequina. Se han determinado el amargor K225, el contenido de polifenoles totales y la estabilidad de los aceites. De los compuestos fenólicos separados por HPLC, existe uno de ellos, con un tr: 34,49 min que presenta un elevado nivel de correlación con el amargor K225 y la estabilidad Rancimat a 98°C, presentando unos coeficientes de regresión altamente significativos, $p < 0.001$, de r : 0.974 y r : 0.918 respectivamente. Por tanto, se ha establecido el principal responsable del amargor K225 y la estabilidad oxidativa de los aceites de la variedad Arbequina.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de oliva virgen - Amargor - Estabilidad - Polifenol - Variedad Arbequina.

SUMMARY

Phenolic fraction analysis by HPLC of Arbequina virgin olive oils. Relationship with bitterness K225 and oil stability.

Phenolic compounds have a high importance because of their effect on shelf life and sensorial characteristics of virgin olive oil. In this paper, the phenolic fraction of Arbequina virgin olive oils has been characterized by HPLC. Bitterness index K225, total phenols and autoxidation stability have been evaluated for olive oil samples. From the phenolic compounds separated using HPLC method, one of them (tr: 34,49 min) was close correlated both with bitterness K225 and oil stability Rancimat at 98°C. The regression coefficients, with high significance $p < 0.001$, were r : 0.974 and r : 0.918 respectively. Phenolic compound responsible of bitterness K225 and oil stability has been found for the Arbequina virgin olive oils.

KEY-WORDS: Arbequina cultivar - Bitterness - Polyphenol - Stability - Virgin olive oil.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva virgen presenta un elevado contenido en polifenoles, como ha sido descrito por Váz-

quez *et al.* (1973) y Gutfinger (1981). Esos compuestos le confieren determinadas características a nivel químico, organoléptico y de la salud. A nivel químico, el efecto antioxidante de estos compuestos ha sido evidenciado en diferentes trabajos, de forma que se ha podido establecer un elevado grado de correlación entre contenido en polifenoles totales y estabilidad de los aceites (Gutiérrez *et al.*, 1977). De forma más reciente se han desarrollado trabajos en los que se ha intentado establecer la identidad de los compuestos fenólicos responsables de la estabilidad oxidativa en los aceites de oliva. En este sentido, Montedoro *et al.* (1992) determinan una correlación, con un coeficiente r^2 : 0.802, entre las unidades de área de un compuesto fenólico separado mediante cromatografía líquida y la estabilidad de aceites de oliva de variedades Italianas. En trabajos posteriores identifica el compuesto como la forma dialdehídica del ácido elenólico unido al 3,4-dihidroxifeniletanol (Montedoro *et al.*, 1993). Tsimidou *et al.* (1992) correlacionan la relación hidroxitirosol-tirosol con la estabilidad de aceites medida en función del índice de peróxidos.

Se ha observado que los compuestos fenólicos están implicados en las características sensoriales del aceite de oliva virgen. El amargor es un atributo sensorial positivo que está presente en el aceite de oliva virgen (COI, 1992). Este atributo es función del contenido en polifenoles (Gutiérrez *et al.*, 1977; Beltrán *et al.*, 1995). El amargor de los aceites puede ser cuantificado químicamente mediante la medida del K225 (Gutiérrez *et al.*, 1992), parámetro correlacionado con la evaluación sensorial del amargo (COI, 1992). Previamente, este mismo autor (Gutiérrez *et al.*, 1989) lleva a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de los extractos hidroalcohólicos procedentes de los aceites de oliva, estableciendo cuatro compuestos fenólicos correlacionados con la evaluación sensorial, sin establecer la identidad de los mismos.

Finalmente, los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen suscitan especial interés debido a sus efectos sobre la salud. Así, se ha evidenciado el efecto protector de la oleuropeína y el hidroxitirosol sobre la oxidación de las LDL (Visioli *et*

al., 1994). Así mismo, se ha demostrado la actividad hipocolesterolemica e hipoglucemiante de la oleuropeína (Ficarra *et al.*, 1991; Le Tutor *et al.*, 1992; Driss *et al.*, 1996).

La variedad Arbequina constituye la principal variedad cultivada en Cataluña con aproximadamente 71,000 ha (Barranco *et al.*, 1996), si bien actualmente está siendo implantada en diferentes regiones españolas como es el caso de amplias zonas de Andalucía. En trabajos desarrollados en la Estación de Olivicultura, se ha estudiado el contenido en polifenoles totales, amargor (K225), estabilidad y composición en polifenoles (HPLC) (Uceda *et al.*, 1994, Beltrán *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1994) en aceites de esta variedad, así como la influencia sobre estos parámetros de la época de recolección, el efecto del riego/secano (Beltrán *et al.*, 1995) y las condiciones de extracción del aceite (datos sin publicar).

La estabilidad y el amargor, en los aceites de oliva vírgenes, adquieren una notable importancia desde el punto de vista comercial, en especial para los aceites de aquellas variedades que, como es el caso de la Arbequina, se caracterizan por ser poco estables y apenas amargos, como consecuencia de su composición ácida y bajo contenido en polifenoles (Jiménez *et al.*, 1995).

En este trabajo, se analiza mediante HPLC la fracción fenólica de los aceites de la variedad Arbequina, con el objetivo de determinar componentes que puedan estar implicados de forma directa en ambas determinaciones: estabilidad y amargor.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras de aceituna

Los frutos utilizados para la extracción de los aceites proceden de olivos de la variedad Arbequina, cultivados en el Jardín de Variedades de la Estación de Olivicultura en Mengíbar (Jaén) y del Campo de Variedades «El Capitán» en Jimena (Jaén). Las 36 muestras de frutos fueron recolectadas en un índice de madurez (Uceda *et al.*, 1975) comprendido entre 1,47 y 4,94 durante las Campañas 97/98 y 98/99.

2.2. Extracción de aceite

El aceite fue obtenido mediante sistema de extracción Abencor, batiendo la masa de aceituna a 28°C durante 30 minutos. Los aceites fueron centrifugados a 4500 rpm durante 5 minutos y fueron conservados a -20°C hasta el momento de su análisis.

2.3. Polifenoles totales en aceite

La determinación del contenido en polifenoles totales en aceite se llevó a cabo mediante extracción

con metanol:agua (60:40), siguiendo el método propuesto por Vázquez *et al.* (1973), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu y medida colorimétrica a 725 nm. Los resultados fueron expresados como ppm de ácido cafeico.

2.4. Amargor (K225)

El índice de amargor K225, se determinó por separación en fase sólida (SPE) de los compuestos fenólicos y medida a 225 nm del extracto obtenido (Gutiérrez *et al.*, 1992).

Para las medidas espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro HP8452A UV-vis con detector tipo diodoarray.

2.5. Extracción de los compuestos fenólicos para determinación por HPLC

Se emplea, modificado, el método de extracción descrito en trabajos previos (Beltrán *et al.*, 1995), se parte de 1,5 g de aceite, que se disuelve en hexano, posteriormente se extrae con 1,25 ml de MeOH:agua (60:40) dos veces. Se eliminan los restos de aceite extrayendo dos veces con hexano y se lleva a un volumen final de 2,5 mL.

2.6. Análisis de la composición fenólica del aceite mediante HPLC

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard HP1100 equipado con bomba cuaternaria, equipo de termostatación de columnas, muestreador automático termostatación y detector diodoarray.

La separación cromatográfica se desarrolló con una columna RP18 Pecosphere (Perkin Elmer-BrownLee Columns) de 83mm x 4.6mm i.d., de un tamaño de partícula de 3µm. La detección se llevó a cabo a 280 nm y a una temperatura de 25°C para el muestreador y el equipo de termostatación de la columna. La velocidad de flujo fue de 0.45 mL/min.

La fase móvil empleada fue ácido acético al 2% en agua(A) y acético al 2% en Metanol(B) para un tiempo de análisis de 70 minutos con el siguiente gradiente: 90% A/ 10% durante 10 minutos, 80%A/ 20%B en 8 min., 80%A/ 20%B durante 2 min, 60%/ 40% en 10 min, 50%/50% en 10 min y 0%A/ 100%B en 10 min hasta el final del análisis. Se inyectaron 20 µL del extracto.

Se determinaron los espectros Uv-Vis para la caracterización de cada uno de los compuestos fenólicos separados durante el análisis, en el rango de 190 a 400 nm, por medio del detector diodoarray del cromatógrafo de líquidos.

2.7. Estabilidad de los aceites

La medida de la estabilidad de los aceites se llevó a cabo utilizando el equipo Rancimat 670 (Methrom

Co., Basel, Switzerland) a 98°C de temperatura con un flujo de aire de 10 L/h. Los resultados se expresaron, como tiempo de inducción, en horas (Gutiérrez *et al.*, 1989).

2.8. Análisis de datos

Se emplea para el análisis estadístico de los datos el software estadístico SAS. Se efectúa, inicialmente, un análisis de la correlación por pasos para establecer que compuestos estaban más correlacio-

nados con cada uno de los parámetros analizados. Posteriormente, se efectúa un análisis de la regresión con los compuestos seleccionados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se representa un cromatograma HPLC típico obtenido de la fracción hidroalcohólica de los aceites analizados.

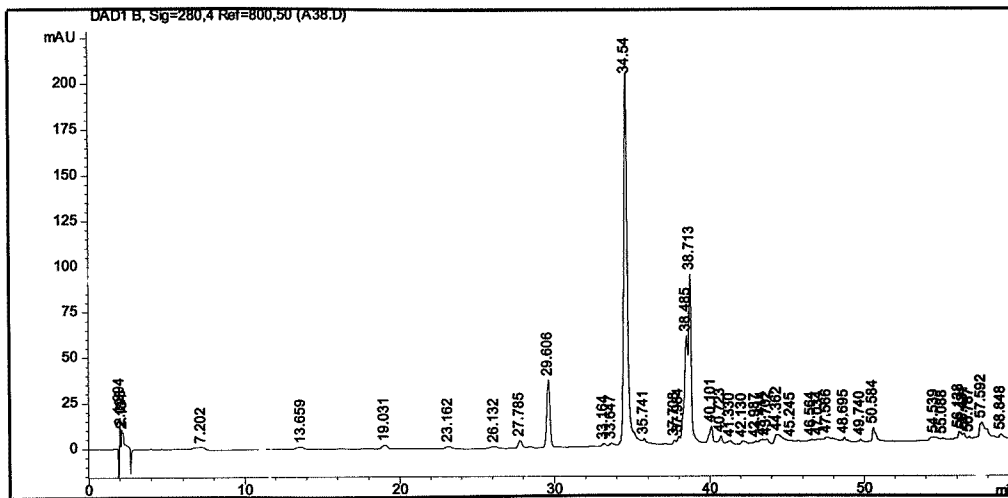


Figura 1
Cromatograma HPLC de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina

Para el amargor, el rango utilizado en este estudio ha sido desde el valor 0.07, que correspondería con aceites no amargos, hasta valores de 0.57 que estarían muy por encima del valor 0.36 que se establece para considerar un aceite extremadamente amargo. Se observa (figura 2) una correlación altamente significativa, $r = 0.962$ ($p < 0,001$), entre el contenido en polifenoles totales y la medida del amargor mediante K225, de acuerdo con lo descrito por diferentes autores (Uceda *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1992).

De la aplicación del análisis estadístico a las áreas obtenidas en el análisis cualitativo por HPLC de la fracción fenólica, se ha podido establecer una correlación entre la medida química del amargor (K225) y uno de los compuestos fenólicos presentes en el aceite (figura 3) caracterizado por un tiempo de retención tr: 34.49 min. La correlación entre K225 y las unidades de área de este compuesto es muy elevada $r: 0.974$ para una significación $p < 0.001$.

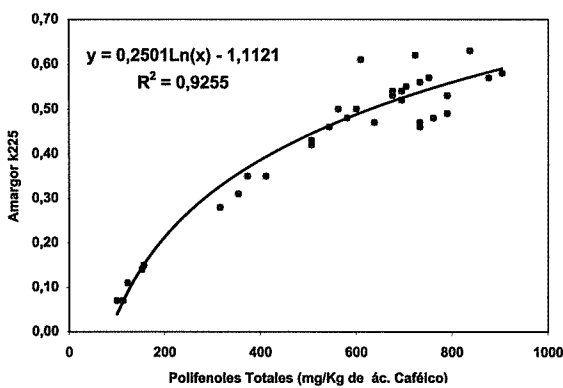


Figura 2
Gráfico de la correlación entre el contenido en polifenoles totales (mg/kg de ác. cafeico) y el amargor K225

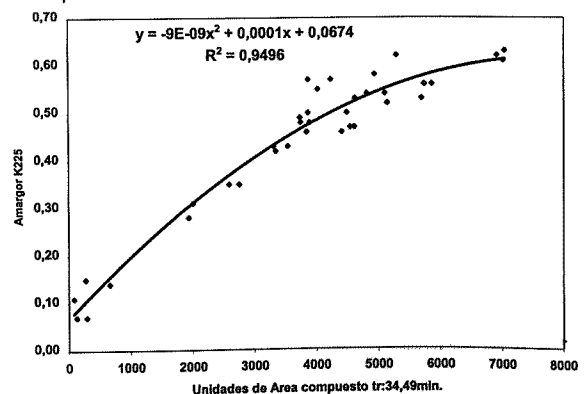


Figura 3
Correlación entre las unidades de área del compuesto tr: 34,49 min y el amargor K225

En cuanto a la estabilidad de los aceites de la variedad Arbequina, éstos se caracterizan por ser aceites poco estables (Jiménez *et al.*, 1994) debido a su composición en ácidos grasos (bajo contenido en ácido oleico y alto en ácido linoleico) que hace que presenten una baja relación mono/polinsaturados (Jiménez *et al.*, 1995). De ahí, que sea de gran interés el efecto antioxidante que les puedan aportar los compuestos fenólicos a estos aceites. En la figura 4 queda patente el elevado grado de correlación entre el contenido en polifenoles y la estabilidad en los aceites utilizados en el trabajo. Diferentes autores (Montedoro *et al.*, 1992; González-Quijano *et al.*, 1977) determinan una correlación lineal entre ambos parámetros. Sin embargo, y debido al amplio rango en el contenido en polifenoles totales de los aceites analizados (100 ppm - 904 ppm), se ha encontrado una mejor correlación mediante el empleo de una curva de tipo logarítmico obteniéndose un coeficiente de correlación de $r: 0,89$.

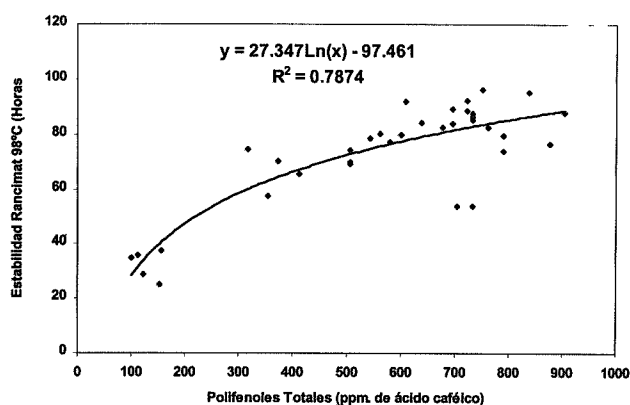


Figura 4

Correlación entre el contenido en polifenoles totales (mg/Kg de ac. Caféico) y la estabilidad Rancimat a 98°C.

Como resultado del análisis de la regresión se ha podido establecer que, de entre los compuestos fenólicos separados mediante cromatografía líquida (HPLC) presentes en el aceite, de nuevo es el compuesto correspondiente al pico con $tr: 34,49$ min el que presenta un coeficiente de regresión más elevado con la estabilidad Rancimat a 98°C con un valor de $r: 0.918$ y a un nivel de significación del 99% (figura 5).

Por tanto, se ha establecido la existencia de un compuesto fenólico presente en los aceites de oliva vírgenes de la variedad Arbequina que ejerce su actividad a dos niveles: químico y sensorial.

A nivel químico, debido a su actividad antioxidante, es el principal responsable de la resistencia a la oxidación de estos aceites medida en Rancimat 98°C. Y a nivel sensorial, influye en la percepción del amargo en el aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina como demuestra la alta correlación entre la medida del K225 y la presencia de este compuesto fenólico.

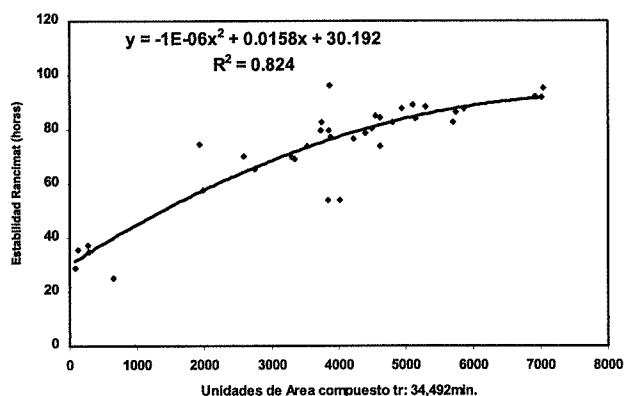


Figura 5

Correlación entre las unidades de área del compuesto $tr:34,49$ min y la estabilidad Rancimat a 98°C

Actualmente se están desarrollando en La Estación de Olivicultura y Elaiotecnia diferentes trabajos para la identificación y caracterización química de este compuesto fenólico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con fondos del Proyecto CAO97-D01-C11-02 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (I.N.I.A). Nuestro agradecimiento a D. Rafael Torres González propietario del Campo de Variedades «El Capitán» de Jimena (Jaén) por su colaboración desinteresada.

BIBLIOGRAFÍA

- Barranco, D. (1996).—«Variedades y patrones» en *El cultivo del olivo*. p.61.—Barranco, D., Fernández-Escobar, R., y Rallo, L.—(Ed. Científicos). Coedición: MundiPrensa-Junta de Andalucía.
- Beltrán, G., Jiménez, A., Uceda, M. (1995).—«Efecto del régimen hídrico de cultivo sobre la fracción fenólica del aceite de oliva de la variedad Arbequina».— *Actas del 1^{er} Simposio del olivo Arbequina en Cataluña*. Borjas Blancas. 153-155.
- C.O.I. (1987).—«Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen».— T-20.
- Driss, F., Duranthon, V., Viard, V. (1996).—«Effects biologiques des composés polyphenoliques de l'olivier».— *Corps Gras* 3, 448-451.
- Ficarra, P., Ficarra, R., De Pasquale, A., Monforte, M.T., Calabro, M.L. (1991).—«HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L.».— *Il Farmaco* 46, 803-815.
- González-Quijano, R., Janer del Valle, C.L., Janer del Valle, M.L., Gutiérrez-Rosales, F., Vázquez-Roncero, A. (1977).—«Relación entre polifenoles y la calidad del aceite de oliva».— *Grasas y Aceites* 28, 101-106.
- Gutfinger, T. (1981).—«Polyphenols in olive oils».— *J.A.O.C.S* 58, 966-968.
- Gutiérrez Rosales, F., Perdiguero, S., Gutiérrez, R., Olías, J.M. (1992).—«Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil».— *J.A.O.C.S* 69(4), 394-395.

- Gutiérrez Rosales, F. (1989).—«Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes. Comparación entre el método del oxígeno activo (A.O.M) y el método rancimat».—*Grasas y Aceites* **40**, 1-5.
- Gutiérrez, F., Albi, M.A., Palma, R., Ríos, J.L., Olías, J.M. (1989).—«Bitter taste and virgin olive oil: correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis».—*Journal of Food Science* **54**, 68-70.
- Jiménez, A., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L., Ruano, M.T., Arroyo, F. (1994).—«Estudio de la estabilidad, el K225 y el K270 en distintas variedades de aceite de oliva virgen».—Abstracts of the technical Meetings of Working Groups: Plant Material and Oil Technology and Quality. FAO Inter-Regional Cooperative Research Network on Olives. Córdoba.
- Jiménez, A., Uceda, M. (1995).—«Características químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina».—Actas del 1^{er} Simposio del olivo Arbequina en Cataluña. Borjas Blancas. 153-155.
- Le Tutor, B., Guedon, D. (1992).—«Antioxidative activities of *Olea europaea* L. Leaves and related phenolics compounds».—*Phytochemistry* **31**, 1173.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E. (1992).—«Simple and hydrolizable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC».—*J. Agric. Food Chem.* **40**, 1571-1576.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A. (1993).—«Simple and hydrolizable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Characterizations of the secoiridoid derivatives».—*J. Agric. Food Chem.* **41**, 2228-2234.
- Tsimidou, M., Papadopulos, G., Boskou, D. (1992).—«Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. Part I».—*Food Chem.* **45**, 141-144.
- Uceda, M., Frías, L. (1975).—«Harvest dates: evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality».—Proceedings del II Seminario Oleícola Internacional.—Consejo Oleícola Internacional. Córdoba.
- Uceda, M., Jiménez, A., Hermoso, M., Frías, L. (1994a).—«Efecto del cultivar, del año y de la época de recolección en la variabilidad de distintos parámetros físico-químicos del aceite de oliva virgen».—Abstracts of the technical Meetings of Working Groups: Plant Material and Oil Technology and Quality. FAO Inter-Regional Cooperative Research Network on Olives. Córdoba.
- Uceda, M., Jiménez, A., Hermoso, M., Frías, L. (1994b).—«Caracterización de variedades de aceite de oliva virgen mediante parámetros indicadores de calidad nutricional».—Abstracts of the technical Meetings of Working Groups: Plant Material and Oil Technology and Quality. FAO Inter-Regional Cooperative Research Network on Olives. Córdoba.
- Vázquez Roncero, A., Janer del Valle, C., Janer del Valle, M.L. (1973).—«Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva».—*Grasas y Aceites* **24**, 350-357.
- Visioli, F., Galli, C. (1994).—«Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation».—*Life Sci.* **55**, 1965-1971.

Recibido: Junio 1999
Aceptado: Septiembre 1999