



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL
PERFIL FENÓLICO, ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y
BIODISPONIBILIDAD EN HOJAS Y
FRUTOS DEL OLIVAR**

Alumno: Krisel Frenesi Hidalgo Ramírez

Tutores: Eulogio José Llorent Martínez/
María Luisa Fernández de Córdoba

Dpto.: Química Física y Analítica



EULOGIO LLORENT MARTÍNEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR, Y MARÍA LUISA FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, MIEMBROS DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

Como **TUTORES** de D^a. Krisel Frenesi Hidalgo Ramírez, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2020-2021.

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, *“Estudio comparativo del perfil fenólico, actividad antioxidante y biodisponibilidad en hojas y frutos del olivar”* ha sido realizado por D^a. Krisel Frenesi Hidalgo Ramírez, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. Eulogio Llorent Martínez y María Luisa Fernández de Córdoba.

Jaén, a 23 de noviembre de 2021

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Familia Oleaceae: género <i>Olea</i>	6
1.1.1. Fitoquímicos del género <i>Olea</i>	6
1.1.2. Especie <i>Olea europaea</i>	7
1.1.3. Principales fitoquímicos de la especie <i>Olea europaea</i>	8
1.1.4. Propiedades saludables de los fitoquímicos de <i>Olea europaea</i>	12
1.2 Técnicas de extracción de compuestos fenólicos	14
1.3 Determinación del contenido en compuestos fenólicos en especies vegetales.....	17
1.3.1. Determinación de fenoles totales (TPC)	17
1.3.2. Determinación de flavonoides totales (TFC).....	18
1.3.3. Determinación de compuestos fenólicos individuales.....	18
1.4. Determinación de la actividad antioxidante de extractos de especies vegetales.....	20
1.4.1. Ensayo DPPH.....	20
1.4.2. Ensayo ABTS	21
1.4.3. Otros ensayos.....	21
1.5. Evaluación de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de especies vegetales: digestión simulada	23
1.5.1. Métodos para digestión simulada <i>in vivo</i>	25
1.5.2. Métodos estáticos para digestión <i>in vitro</i>	26
1.5.3. Métodos dinámicos para digestión <i>in vitro</i>	27
1.5.4. Comparación entre métodos <i>in vitro</i> y métodos <i>in vivo</i>	28
2. OBJETIVOS	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Perfil fenólico de hojas y frutos de <i>Olea europaea</i>	29
3.2 Actividad antioxidante de extractos de hojas y frutos de <i>Olea europaea</i>	39
3.3 Biodisponibilidad de los componentes fenólicos de hojas y frutos de <i>Olea europaea</i>	43
3.4. Posibles aplicaciones industriales de extractos de hojas de <i>Olea europaea</i> (suplementos alimenticios).....	47
4. CONCLUSIONES	48
5. REFERENCIAS	50

RESUMEN/ABSTRACT

El olivo, *Olea europaea*, es originario de la cuenca del Mediterráneo y partes de Asia. El fruto y las hojas ofrecen una amplia gama de aplicaciones tanto culinarias como terapéuticas. Numerosos estudios han puesto de manifiesto en los últimos años que sus extractos fenólicos son ricos en compuestos bioactivos y que su ingesta puede contribuir a reducir o prevenir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades crónicas.

En el presente Trabajo Fin de Máster se ha llevado a cabo un estudio comparativo de perfil fenólico, actividad antioxidante y biodisponibilidad de extractos de frutos y hojas de diferentes variedades de olivo. Se han revisado en primer lugar las técnicas analíticas empleadas habitualmente para la obtención de extractos fenólicos y los métodos usados para la determinación de su contenido total en compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como las estrategias empleadas para evaluar la biodisponibilidad de estos compuestos bioactivos. A continuación se ha revisado y comparado para las diferentes variedades de olivo: (a) su contenido total en compuestos fenólicos (TPC) y flavonoides (TFC) mediante los métodos de *Folin-Ciocalteu* y del tricloruro de aluminio, respectivamente; (b) los principales compuestos fenólicos identificados mediante Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS); (c) su actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); y (d) su biodisponibilidad determinada mediante métodos de digestión simulada *in vivo* e *in vitro*.

The olive tree, *Olea europaea*, is native to the Mediterranean basin and parts of Asia. The fruit and leaves offer a wide range of both culinary and therapeutic applications. Numerous studies have shown in recent years that its phenolic extracts are rich in bioactive compounds and that their intake can help reduce or prevent the risk of developing certain chronic diseases.

In this Master's Thesis, a comparative study of phenolic profile, antioxidant activity and bioavailability of extracts of fruits and leaves of different olive varieties has been carried out. The analytical techniques commonly used to obtain

phenolic extracts and the methods used to determine their total content of phenolic compounds and antioxidant activity, as well as the strategies used to evaluate the bioavailability of these bioactive compounds, were first reviewed. The following has been reviewed and compared for the different olive varieties: (a) their total content of phenolic compounds (TPC) and flavonoids (TFC) by means of the *Folin-Ciocalteu* and aluminum trichloride methods, respectively; (b) the main phenolic compounds identified by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS); (c) its antioxidant activity by means of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) tests; and (d) its determined bioavailability by *in vivo* and *in vitro* simulated digestion methods.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familia Oleaceae: género *Olea*

La familia Oleaceae es un grupo de árboles y arbustos de hoja caduca que comprende 28 géneros y 700 especies (Hashmi et al., 2015). Están distribuidas en todos los continentes, excepto en la Antártida, tanto en regiones templadas como tropicales. Muchas especies de la familia Oleaceae son de gran importancia económica, para la producción de aceite y frutos (olivo), madera (por ejemplo, fresnos), así como adornos y fragancias (por ejemplo, jazmines, lilas, etc.).

Oleaceae se divide en cinco tribus, Fontanesieae, Forsythieae, Jasmineae, Myxopyreae y Oleae, esta última está subdividida en cuatro subtribus (Oleinae, Fraxininae, Ligustrinae y Schreberinae).

El género *Olea*, perteneciente a la tribu Oleae, recibió su nombre del griego “elaia” y del latín “óleum”. Comprende 30 especies, de las que *Olea europaea* es la única que se utiliza como alimento y se encuentra en la región mediterránea (Hashmi et al., 2015).

1.1.1. Fitoquímicos del género *Olea*

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y se utilizan en la elaboración de alimentos funcionales, suplementos dietéticos, cosméticos y productos farmacéuticos. La preferencia de los consumidores por productos que contengan aditivos naturales, generalmente percibidos como más seguros y saludables, ha incrementado en los últimos años la demanda de ingredientes fitoquímicos.

La función básica de los fitoquímicos del género *Olea* es ayudar a la planta a protegerse de los insectos, virus, parásitos, temperaturas extremas, etc. Dentro de ellos existen diversas familias que poseen propiedades y estructuras muy variadas, destacando entre ellos los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y la lignina (Martín-Gordo, 2018). Cada una de las familias agrupa un número de compuestos

fenólicos variado, siendo la familia de los flavonoides, con cerca de 4 000 estructuras diferentes, una de las más estudiadas (Soler, 2009).

1.1.2. Especie *Olea europaea*

El olivo, *Olea europaea*, pertenece a la familia Oleaceae del género *Olea*. Se trata de un árbol de tamaño mediano, de unos 10 metros de altura, según la variedad y las condiciones de cultivo (Ray et al., 2015). Cultivado desde hace más de 7000 años, el olivo es un árbol de copa ancha y hoja perenne que es capaz de resistir temperaturas de 6-7 grados bajo cero en invierno y largas sequías en verano.

Las hojas del olivo son persistentes y duraderas pudiendo alcanzar los dos o tres años e incluso más. La floración del olivo se produce en primavera. Las inflorescencias se desarrollan en las axilas de las hojas. El fruto del olivo, la aceituna, es una drupa con una sola semilla compuesta por tres tejidos: endocarpo (hueso), el mesocarpo (pulpa) y el exocarpo (piel).

Dentro de la especie estudiada, *Olea europaea*, se encuentran tanto los olivos cultivados como los acebuches y las especies silvestres. Por esta razón, el olivo cultivado se incluye dentro de la subespecie *sativa* y el olivo silvestre o acebuche en la subespecie *sylvestris*. El material vegetal del olivo cultivado en España está constituido por numerosas variedades al igual que en otros países olivareros. Dentro de la gran diversidad de formas y tamaños podemos establecer una distinción entre cultivares de frutos pequeños (Picual, Koroneiki, Arbequina, etc.) y cultivares de fruto grande (Gordal Sevillana y Ascolana) (Barranco et al., 2008).

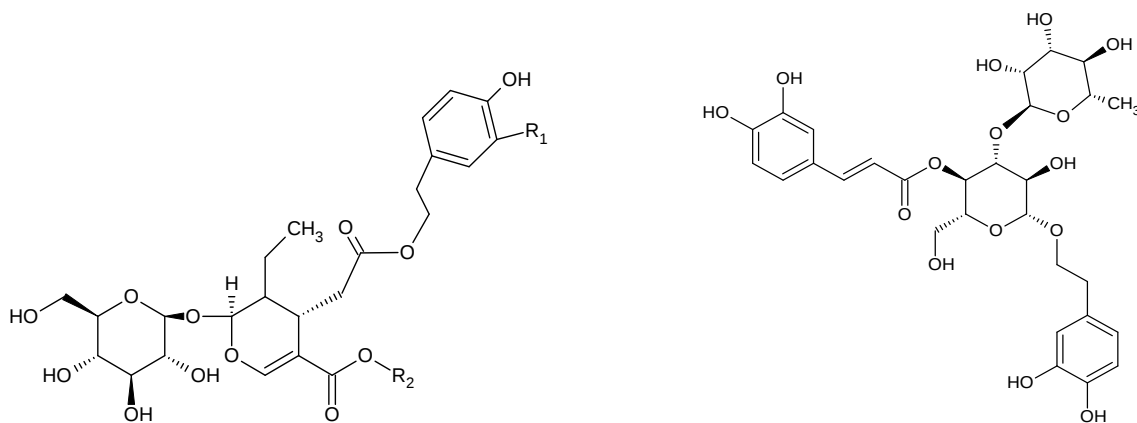
La especie *Olea europaea* (figura 1) se encuentra distribuida en diversas regiones de Asia, América, África y Oceanía. En la actualidad, el país que más olivos tiene es España, seguido por Italia, Portugal y Grecia. Además, España sigue siendo el principal país exportador y productor mundial de aceite.



Figura 1. *Olea europaea*: (a) árbol; (b) hojas; (c) inflorescencia; (d) frutos maduros; (e) corteza del tallo (Hashmi et al., 2015)

1.1.3. Principales fitoquímicos de la especie *Olea europaea*

Los principales fitoquímicos de la especie *Olea europaea* son los secoiridoides, flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y lignanos (Hashmi et al., 2015). Los iridoides son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los monoterpenos. Estos compuestos se encuentran en la naturaleza con estructuras cerradas (iridoides) o abiertas (secoiridoides) (Boluda & Terrero, 2013). Los secoiridoides están presentes sólo en plantas pertenecientes a la familia Oleaceae. Los secoiridoides mayoritarios en *Olea europaea* son oleuropeína, dimetiloleuropeína y ligustrósido (figura 2) (Machado et al., 2017). La oleuropeína y el ligustrósido son formas glucosiladas de ésteres del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol, respectivamente, mientras que la demetiloleuropeína es la forma ácida de la oleuropeína. Otro secoiridoide presente en la aceituna es el verbascósido (figura 2), en el que una molécula de hidroxitirosol y otra de ácido cafeico se encuentran unidas por un residuo de neohesperidosa.



Oleuropeína ($R_1=OH$; $R_2=CH_3$)

Ligustrósido ($R_1=H$; $R_2=CH_3$)

Demetiloleuropeína ($R_1=OH$; $R_2=H$)

Verbascósido

Figura 2. Principales secoiridoides identificados en *Olea europaea*.

La estructura química de los flavonoides consiste en un difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos fenilos (A y B) unidos a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (figura 3). De acuerdo con la IUPAC (Rauter et al., 2018), dependiendo de la posición del enlace del anillo B al resto de cromano/cromeno, se pueden asignar tres clases diferentes de flavonoides: flavonoides (en sentido estricto), isoflavonoides y neoflavonoides. Las otras clases de flavonoides con una estructura $C_6-C_3-C_6$ son las chalconas, las auronas y los pterocarpanos y sus derivados los cumestanos.

Los flavonoides se pueden encontrar en forma libre (aglicona) o unidos a azúcares formando heterósidos. Los flavonoides glicosilados más comunes de *Olea europaea* son luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, quercetina-3-rutinósido y luteolina-5-O-glucósido (Cavaca et al., 2020) (figura 4).

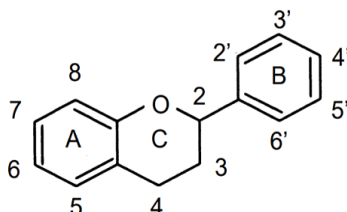
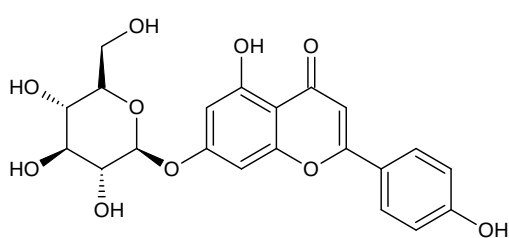
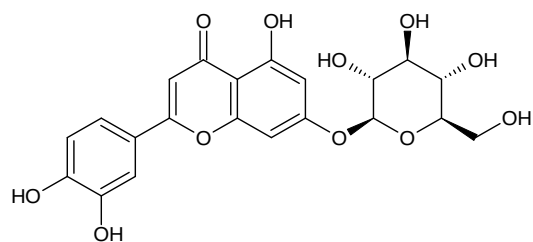


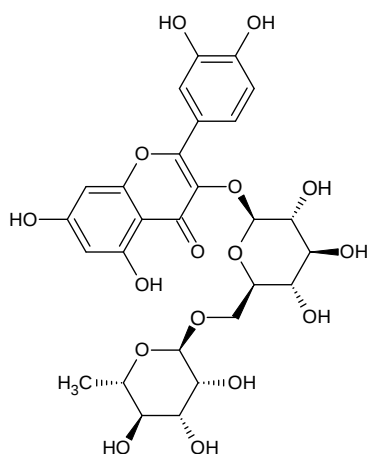
Figura 3. Estructura de los flavonoides.



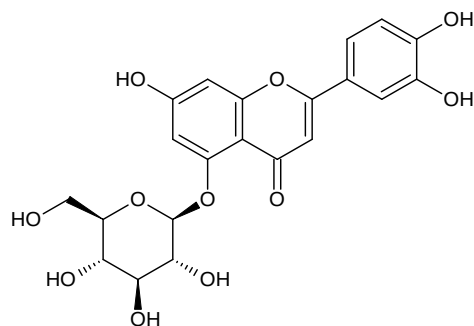
Apigenina-7-O-glucósido



Luteolina-7-O-glucósido



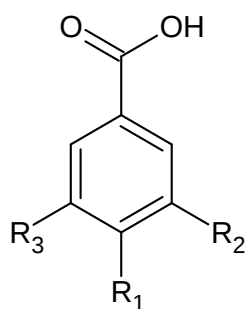
Quercetina-3-rutinósido



Luteolina-5-O-glucósido

Figura 4. Principales flavonoides identificados en *Olea europaea*.

Los ácidos fenólicos se clasifican en derivados del ácido benzoico y ácido cinámico. Los derivados del ácido benzoico (figura 5) son los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico, sirínico y gálico, mientras que los derivados del ácido cinámico (figura 6) incluyen los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Pereira et al., 2009)



	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido benzoico	H	H	H
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	OH	H	H
Ácido gálico	OH	OH	OH
Ácido vanílico	OH	OCH ₃	H
Ácido sirínico	OH	OCH ₃	OCH ₃

Figura 5. Principales ácidos hidroxibenzoicos de *Olea europaea*

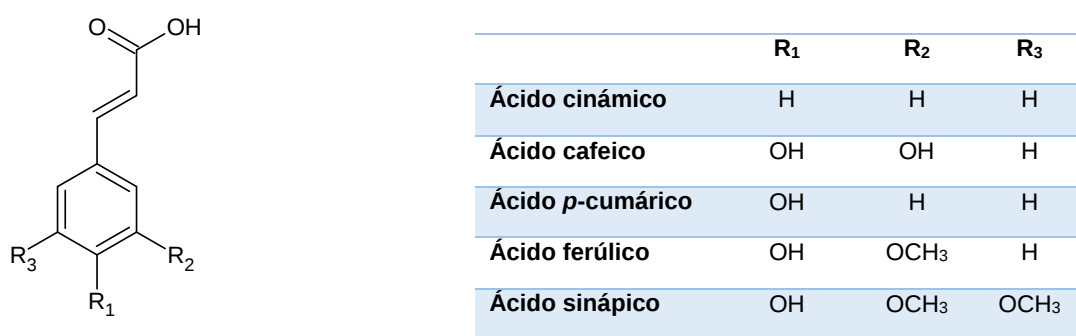


Figura 6. Principales ácidos hidroxicinámicos de *Olea europaea*.

Los alcoholes fenólicos más abundantes en la especie *Olea europaea* son el 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y el *p*-hidroxifeniletanol (tirosol) (Hashmi et al., 2015) (figura 7). Ambos compuestos están presentes en el aceite de oliva virgen en cantidades relativamente bajas, aunque su concentración aumenta durante el almacenamiento por la hidrólisis de los secoiridoides, oleuropeína y ligustrósido, que son relativamente abundantes en el aceite.

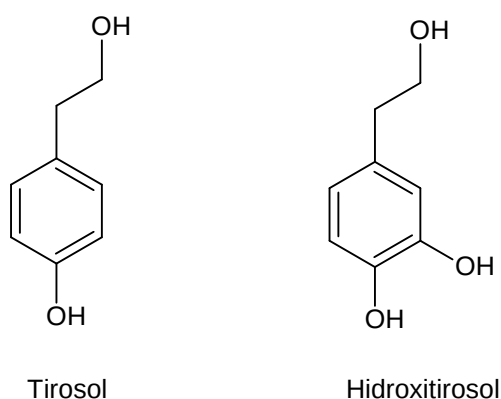


Figura 7. Principales alcoholes fenólicos de *Olea europaea*.

Los lignanos se basan en un esqueleto de carbono con dos unidades de fenilpropano unidas entre sí mediante los carbonos centrales de la cadena. Los lignanos más comunes en la especie *Olea europaea* son el pinoresinol y el acetoxipinoresinol (figura 8) (Brenes et al., 2002).

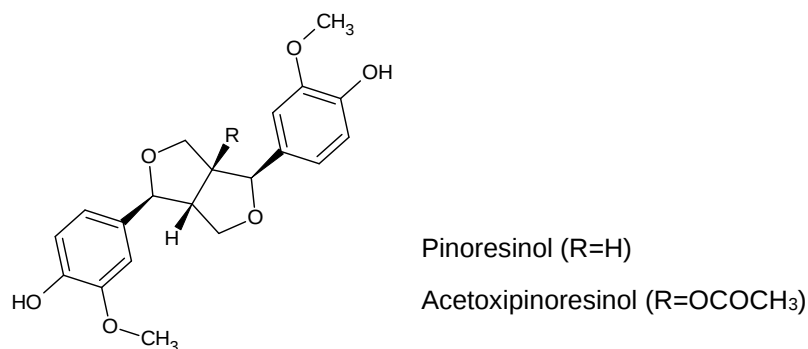


Figura 8. Principales lignanos identificados en *Olea europaea*.

1.1.4. Propiedades saludables de los fitoquímicos de *Olea europaea*.

La importancia de los fitoquímicos de *Olea europaea* se debe no solo a su participación en el sabor y aroma de las hojas y frutos sino también a su potente actividad antioxidante. Estos inhiben los radicales libres, los cuales inducen al estrés oxidativo que se cree que es un mecanismo fundamental en varios desordenes neurodegenerativos, cardiovasculares, cáncer, etc. Además de tener efectos sobre estas enfermedades también tienen actividades antimicrobianas, antitrombótico, etc.

Las principales propiedades de los fitoquímicos de *olea euroapea* se presentan en la figura 9 y se comentan más detalladamente a continuación.

- Efecto antioxidante. Los antioxidantes son sustancias que previenen los efectos adversos de los radicales libres. Estos son especies químicas que tienen en su estructura uno o más electrones desapareados, son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. La molécula estable que le cede el electrón se convierte a su vez en un radical libre por haber cedido su electrón, iniciándose así una reacción en cadena que destruye las células, moléculas y tejidos (Finkel & Holbrook, 2000). Los radicales libres se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético. Los más frecuentes son los radicales derivados de oxígeno, estos se denominan de forma colectiva especies reactivas de oxígeno (ROS).

- Efecto cardioprotector. La oleuropeína ha demostrado que es capaz de disminuir los riesgos de enfermedades cardiovasculares al prevenir la oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad) (Mushtaq et al., 2020).
- Efecto anticancerígeno. Los compuestos fenólicos de *Olea europaea* como el hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, ligustrósido, etc. han demostrado que son capaces de inhibir la formación de compuestos carcinogénicos, estimular la reparación del ADN dañado, inhibir la metástasis e invasión tumoral de otros tejidos y órganos (Hashmi et al., 2015).
- Efecto antidiabético. Numerosos estudios han demostrado el efecto antidiabético de los compuestos fenólicos de *Olea europaea*. Estos pueden reducir los niveles de glucosa en sangre. Algunos de los fitoquímicos que tienen evidencia de su actividad antiadiabética es la oleuropeína y el hidroxitirosol (Mushtaq et al., 2020).
- Efecto neuroprotector. El estrés oxidativo es un factor clave en el deterioro del sistema nervioso. Las enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson son algunos de los procesos neurodegenerativos más comunes. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos puede ser de gran ayuda en la prevención de este tipo de enfermedades (Mushtaq et al., 2020).
- Antimicrobiano. La especie *Olea europaea* se ha utilizado como remedio popular para la cura de numerosos trastornos infecciosos de origen bacteriano, fúngico y viral. La oleuropeína y el ácido cafeico son algunos de los compuestos que poseen esta actividad (Hashmi et al., 2015).

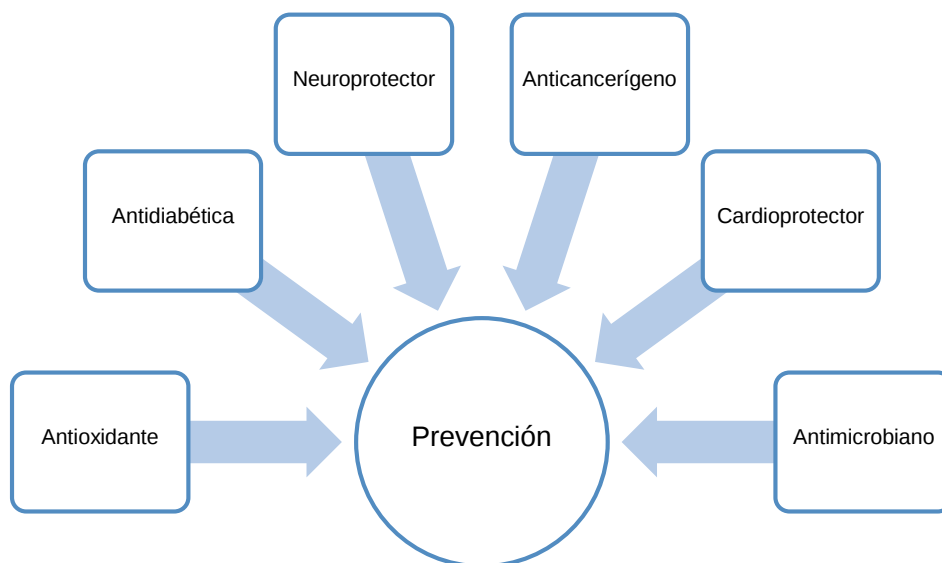


Figura 9. Principales propiedades saludables de los fitoquímicos de la especie *Olea europaea*

1.2 Técnicas de extracción de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos de las plantas se lleva a cabo diferenciando entre sus partes de forma individual: hojas, cortezas, raíces, frutos, flores, etc. Para obtener resultados significativos es importante realizar un buen muestreo. Antes del procedimiento de extracción, generalmente se requiere un pretratamiento que incluye el secado, los métodos más comunes son: el secado al aire, el secado por microondas, el secado en horno y la liofilización, siendo este último el método más habitual hoy en día. Posteriormente una reducción del tamaño de partícula moliendo o pulverizando la muestra para aumentar el contacto superficial entre la muestra y el disolvente de extracción.

A la hora de llevar a cabo la extracción se han de tener en cuenta algunos parámetros que influyen en el rendimiento de extracción como la temperatura, tipo de disolvente, tiempo de extracción y el número de extracciones. Los disolventes más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos son de carácter polar como metanol, etanol, acetona y acetato de etilo. También se utiliza mezclas de los disolventes anteriores con proporciones variables de agua (alcohol-agua) obteniéndose una mayor eficacia de extracción.

Las técnicas de extracción utilizadas son muy diversas. Algunas de ellas son más comunes como la maceración, extracción Soxhlet, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos y otras son menos utilizadas, como la extracción por fluidos supercríticos. A continuación, se describen estas técnicas de extracción.

- Maceración.

En esta técnica, la muestra se coloca en un recipiente cerrado con el disolvente de extracción y se deja reposar a temperatura ambiente por un periodo de 2 a 14 días. La maceración se lleva a cabo generalmente con etanol o metanol. No suele utilizarse agua ya que para tiempos de extracción demasiado largos puede producirse la formación de mohos (Manousi et al., 2019).

- Extracción Soxhlet

Esta técnica se basa en la realización de múltiples extracciones de manera automática (en continuo), utilizando el mismo disolvente, el cual recircula en el equipo (figura 10) evaporándose y condensando hasta agotar la muestra. La extracción se lleva a cabo en las siguientes etapas: 1) se coloca la muestra (finalmente pulverizada en el interior de un cartucho de papel) en el cuerpo central del extractor; 2) se cubre el cartucho de muestra con el disolvente de extracción y se añade este asimismo al matraz de extracción; 2) se calienta el disolvente hasta ebullición de forma que se evapora y alcanza el refrigerante; 3) el condensado cae en forma de gotas sobre el cartucho de muestra, elevando el nivel del disolvente que cubre el cartucho de muestra hasta un punto en que sifona y cae al matraz de extracción. La operación se repite hasta lograr la extracción completa. Los disolventes que se suelen emplear son agua, etanol y metanol (Pisoschi et al., 2016).

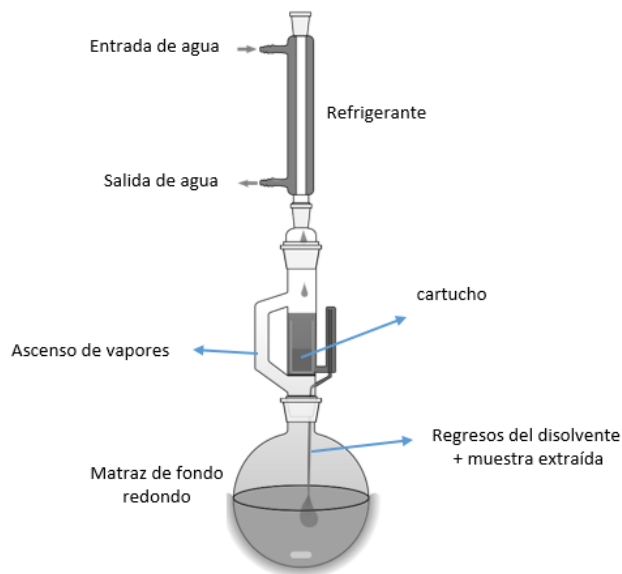


Figura 10. Extractor Soxhlet (Pisoschi et al., 2016)

- Extracción asistida por microondas (MAE).

Esta técnica consiste en la utilización de radiación de microondas para calentar el disolvente de extracción con el fin de facilitar la liberación de los solutos de la matriz de la muestra. El uso de microondas reduce el tiempo de extracción en comparación con la extracción asistida por ultrasonidos, proporciona un alto rendimiento y facilita la extracción. Los disolventes que normalmente se usan son metanol y etanol.

- Extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

Esta técnica, basada en el uso de ondas ultrasónicas, es simple, efectiva y económica (Khoddami et al., 2013). La sonicación da como resultado cavitación: generación de pequeñas burbujas de vacío o huecos en el líquido que implosionan en la muestra sólida dando como resultado una elevación de la temperatura y presión. Esto provoca la destrucción de las paredes celulares de la matriz vegetal y la extracción del material intracelular. Esta técnica se lleva a cabo con un baño o una sonda de ultrasonidos. La muestra se pone en contacto con un disolvente apropiado y se somete a sonicación a una temperatura controlada y tiempo determinado. Los disolventes que se suelen emplear son etanol, metanol, metanol/agua.

- Extracción por fluidos supercríticos (SFE)

Esta técnica se basa en el empleo de un fluido supercrítico como disolvente de extracción. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a temperatura y presión superiores a las correspondientes a su punto crítico, por lo que se comporta como un híbrido entre el estado líquido y el gaseoso. El dióxido de carbono (CO_2) es el disolvente más utilizado ya que no es tóxico ni inflamable, es altamente selectivo, se elimina fácilmente y es económico (Cavaca et al., 2020). La desventaja del CO_2 es su baja polaridad por lo que para mejorar la extracción de compuestos fenólicos se le añade metanol.

1.3 Determinación del contenido en compuestos fenólicos en especies vegetales.

1.3.1. Determinación de fenoles totales (TPC)

El ensayo TPC se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas (pH 10). El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo que se reducen para producir un cromóforo de color azul con máximo de absorbancia a 765 nm (Muñoz-Bernal et al., 2017). La reacción que se lleva a cabo se observa en la figura 11.

Este ensayo tiene algunos inconvenientes, y es que los extractos de plantas contienen una gran cantidad de biomoléculas que pueden interferir en los resultados ya que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Algunos de los principales compuestos que pueden interferir son los azúcares reductores como la glucosa y fructosa. Normalmente se utiliza ácido gálico como estándar de referencia. El contenido fenólico total se expresa en equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto (Rojas & Buitrago, 2018).

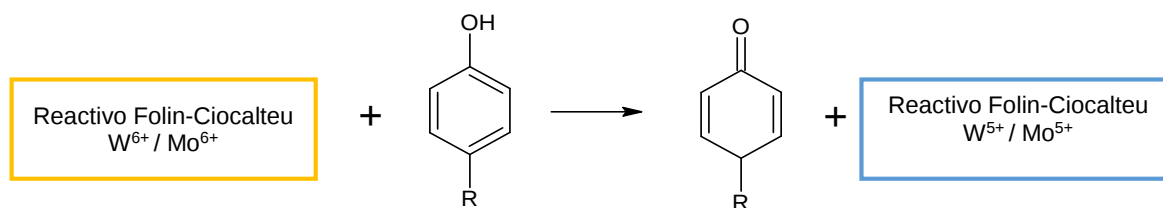


Figura 11. Reacción del reactivo Folin-Ciocalteu

1.3.2. Determinación de flavonoides totales (TFC)

Este ensayo se basa en la capacidad quelante de los flavonoides. Consiste en el uso de cloruro de aluminio (AlCl_3) para formar complejos estables con los flavonoides. Estos complejos presentan un color amarillo intenso medible por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm (Pontis, et al., 2014). Se utiliza una recta patrón de quercetina para estandarizar el método y obtener el contenido de flavonoides totales de la muestra. La reacción simplificada de la complejación de un flavonoide (quercetina) con AlCl_3 se observa en la figura 12.

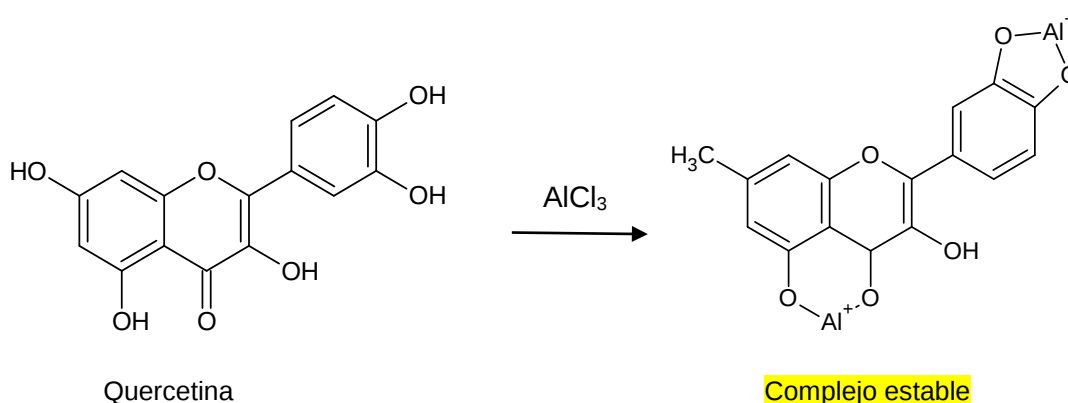


Figura 12. Reacción de la quercetina con AlCl_3

1.3.3. Determinación de compuestos fenólicos individuales

Para realizar la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de forma individual lo más habitual es usar cromatografía líquida (HPLC) acoplada a espectrofotometría UV-Vis y espectrometría de masas (MS). HPLC es una técnica analítica que permite la separación de los componentes de mezclas basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la fase estacionaria que rellena una columna cromatográfica. La

fase estacionaria más utilizada en la separación de compuestos fenólicos es C_{18} (Gómez-Caravaca et al., 2015).

La espectrometría de masas (MS) permite la identificación de los analitos utilizando la relación masa/carga (m/z) de los iones generados a partir de cada compuesto. Los diferentes tipos de espectrómetro de masas varían según el analizador que posean: trampa de iones (IT), cuadrupolo (Q), analizador de tiempo de vuelo (TOF) y sistemas híbridos como el Q-TOF. Los más empleados para el análisis de compuestos fenólicos son los Q-TOF e IT.

Por otra parte, la espectrofotometría UV-Vis permite la detección y cuantificación de los compuestos de una mezcla. Se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por el analito. Es simple, sensible, confiable y de bajo costo.

Se puede usar MS para cuantificar si se tiene patrones analíticos de los compuestos a cuantificar. En caso negativo, se usa UV-Vis utilizando un patrón comercial para cada familia química (por ejemplo, la quercetina para todos los flavonoles).

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realiza a partir de los cromatogramas del extracto y de patrones. En un cromatograma se observan una serie de picos que se corresponden a los analitos y patrones detectados. Para el análisis cuantitativo se puede usar la altura o el área del pico, siendo este último el más utilizado. Se construye una curva de calibración con estos datos mediante el cual se puede determinar la concentración del analito detectado.

1.4. Determinación de la actividad antioxidante de extractos de especies vegetales.

La determinación de la actividad antioxidante es llevada a cabo por diversos ensayos ya que no existe un método que refleje de forma completa el perfil del antioxidante. Los métodos DPPH y ABTS son los más utilizados para compuestos fenólicos.

1.4.1. Ensayo DPPH

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un método rápido, sencillo y económico. Se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes para captar el radical DPPH• a través de la disminución de la absorbancia, medida a 515 nm. Este radical es un compuesto orgánico nitrogenado estable de color violeta.

Cuando el radical DPPH• reacciona con los antioxidantes presentes en la muestra se produce una reducción que provoca la pérdida de color. Se usa habitualmente Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como estándar para construir la recta de calibrado (Dawidowicz et al., 2012). La reacción que se produce se muestra en la figura 13.

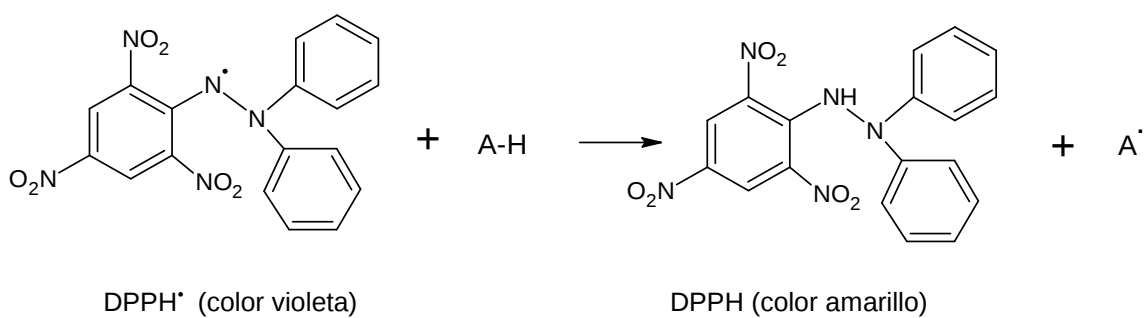


Figura 13. Reacción de DPPH• y un antioxidante (AH)

1.4.2. Ensayo ABTS

Este método se basa en la capacidad antioxidante de $\text{ABTS}^{•+}$ para capturar aniones radicales, que se genera a partir de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) u otro oxidante. El ensayo consiste en cuantificar el decrecimiento en la intensidad de la coloración del radical catión $\text{ABTS}^{•+}$ (azul) con un máximo de absorbancia a 734 nm. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC. En la figura 14 se muestra la reacción que se lleva a cabo.

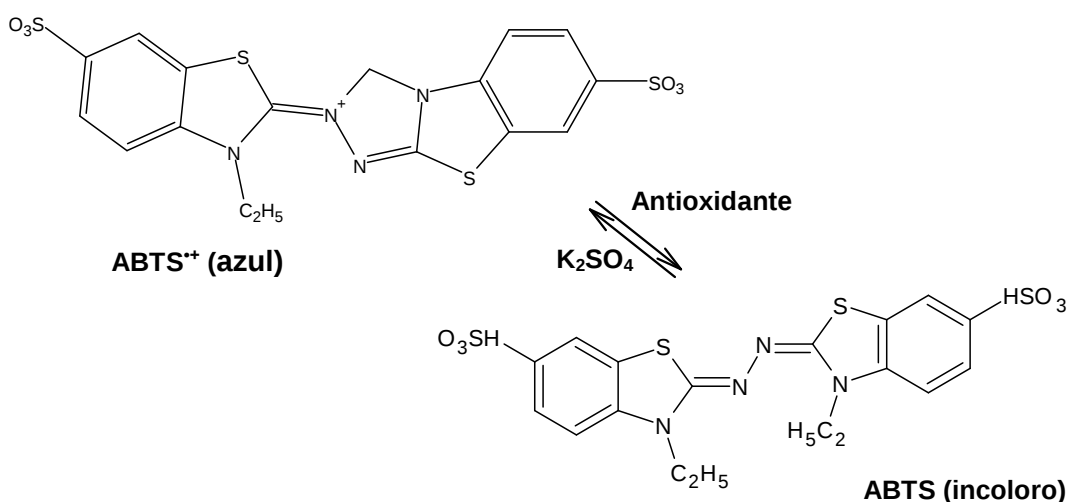


Figura 14. Reacción de $\text{ABTS}^{•+}$ con un antioxidante

1.4.3. Otros ensayos

- FRAP

Este ensayo mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro férrico. Se basa en la reducción de Fe^{3+} presente en el compuesto de 2,4,6-tripiridil-s-triazina TPTZ (incoloro) a Fe^{2+} (color azul) bajo la acción de un antioxidante por transferencia de electrones. La variación de coloración se mide mediante espectrofotometría a 593 nm. En la figura 15 se muestra la reacción que tiene lugar.

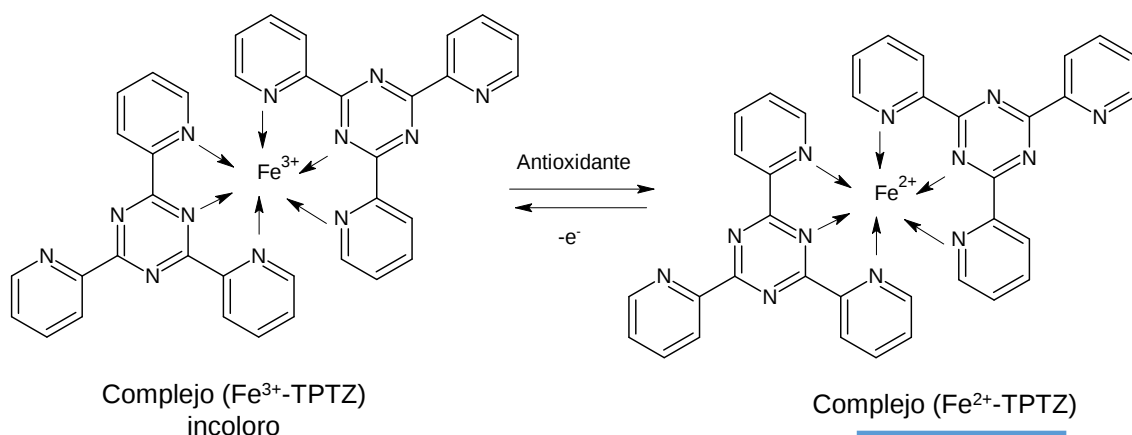


Figura 15. Reacción del complejo (Fe^{3+} -TPTZ) con un antioxidante.

- CUPRAC

El método CUPRAC (*Cupric ion Reducting Antioxidant Capacity*) mide el poder reductor de los antioxidantes para convertir el ion cúprico Cu^{2+} en ion cuproso Cu^+ (Özyürek et al., 2011). Se utiliza el catión bis(neocuproína) de Cu (II) como agente cromogénico oxidante. Este reactivo incoloro en presencia de antioxidantes se reduce a catión bis(neocuproína) de Cu (I) de color amarillo-naranja (Figura 16). El máximo de absorción está a 450 nm.

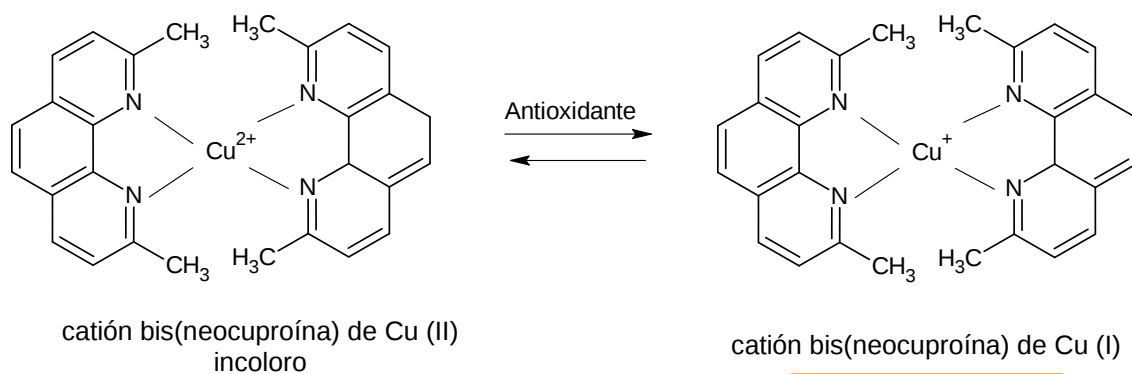


Figura 16. Mecanismo de reacción del método CUPRAC

1.5. Evaluación de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de especies vegetales: digestión simulada

La evaluación de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es fundamental para poder establecer su actividad biológica y determinar la concentración a la cual pueden ejercer sus efectos beneficiosos. La biodisponibilidad de las sustancias que se ingieren se define como la cantidad de componentes que se absorbe y alcanza la circulación sistémica, momento en el cual puede distribuirse por los tejidos y alcanzar los lugares donde ejercer su efecto fisiológico (Parada & Aguilera, 2007). Para que los compuestos fenólicos sean potencialmente biodisponibles tienen que ser bioaccesibles (cantidad de compuestos obtenidos de la matriz alimenticia durante la digestión gastrointestinal que están disponibles para ser absorbidos por el intestino).

Los compuestos fenólicos procedentes de los alimentos ingeridos a través de la dieta se ven sometidos a todo el proceso de digestión en el cual factores como el pH gástrico e intestinal, fermentación intestinal, secreción biliar, etc. pueden afectar a su biodisponibilidad. La digestión comienza en la boca, donde la masticación cumple varias funciones incluyendo la ruptura de partículas grandes de los alimentos a pequeños trozos para que las enzimas digestivas puedan actuar, lubricar y reblandecer las partículas de comida en un bolo propicio para tragar, lo que facilita posteriormente la absorción gastrointestinal de partículas de alimento (Pedersen et al., 2002). El bolo alimenticio formado en la boca atraviesa el esófago para llegar al estómago y, posteriormente, el alimento pasa al intestino delgado. En el caso de los flavonoides, aquellos que se encuentran en forma de agliconas son fácilmente absorbibles por el intestino; sin embargo, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en forma de ésteres, glucósidos u otro tipo de polímeros que no pueden ser absorbidos por el intestino en sus formas nativas. Por ello, estas sustancias deben sufrir una hidrólisis que se produce gracias a las enzimas que se encuentran en la mucosa del intestino (Manach et al, 2004). Una vez absorbidos, los compuestos fenólicos son metabolizados en el hígado y, después de esto, los metabolitos pasan al torrente sanguíneo y llegan a los tejidos donde pueden ejercer sus propiedades beneficiosas. Sin embargo, existen algunos compuestos fenólicos que ya absorbidos no pueden utilizarse como energía por lo que el organismo tiende a

excretarlos por la orina. Los compuestos fenólicos que no se absorben pasan al intestino grueso donde son eliminados en la orina y heces.

Existen diversos modelos de digestión simulada para el estudio de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, desde modelos *in vitro* hasta estudios *in vivo*. En la figura 17 se muestra las distintas etapas metabólicas de los compuestos fenólicos en la digestión.

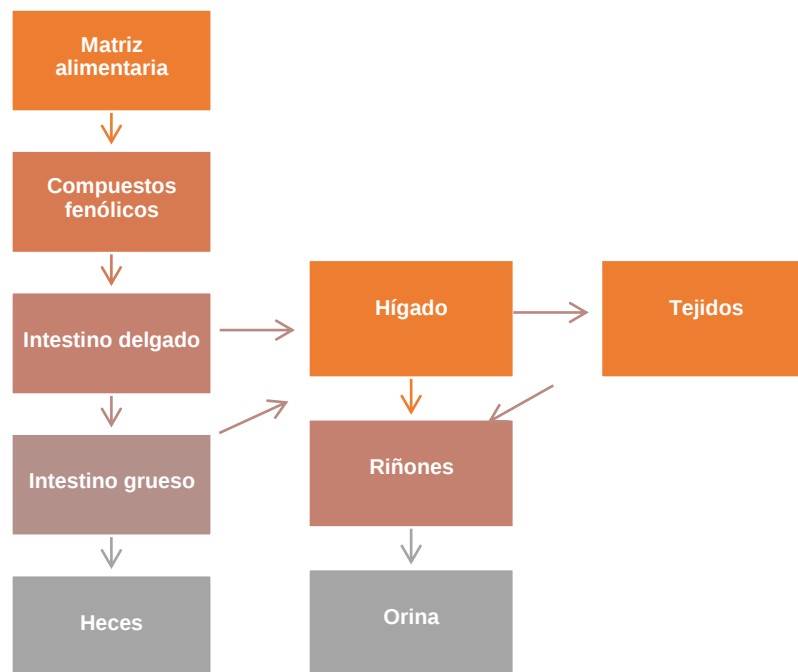


Figura 17. Etapas metabólicas de los compuestos fenólicos en la digestión

1.5.1. Métodos para digestión simulada *in vivo*

En las últimas décadas diferentes estudios han asociado el consumo de una dieta rica en alimentos vegetales con una menor incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Esta observación ha dado lugar a la realización de numerosos estudios de intervención en humanos y en animales (métodos *in vivo*) orientado a la identificación de los compuestos bioactivos responsables de dichos efectos preventivos (Prior, 2003).

Para determinar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, los estudios *in vivo* se desarrollan con la ingesta de una dosis oral del compuesto de interés y se recogen muestras de sangre en periodos de tiempo determinados, que pueden variar con relación a los niveles plasmáticos límites alcanzados por los compuestos estudiados o por sus metabolitos (Santos et al., 2019).

Un método para medir la tasa de absorción es medir la concentración plasmática de un determinado nutriente durante un tiempo de consumo constante de ese alimento. El inconveniente es la variabilidad fisiológica del individuo ya que puede existir interacción del nutriente con otros componentes de la dieta. Por lo que, cuando se realizan estos estudios suelen emplear grandes cantidades del compuesto que se quiere determinar para que no haya tanta influencia de otros compuestos sobre este (Santos et al., 2019).

En la figura 18 se muestra un esquema de los pasos que debe hacerse en un modelo de digestión simulada *in vivo*.

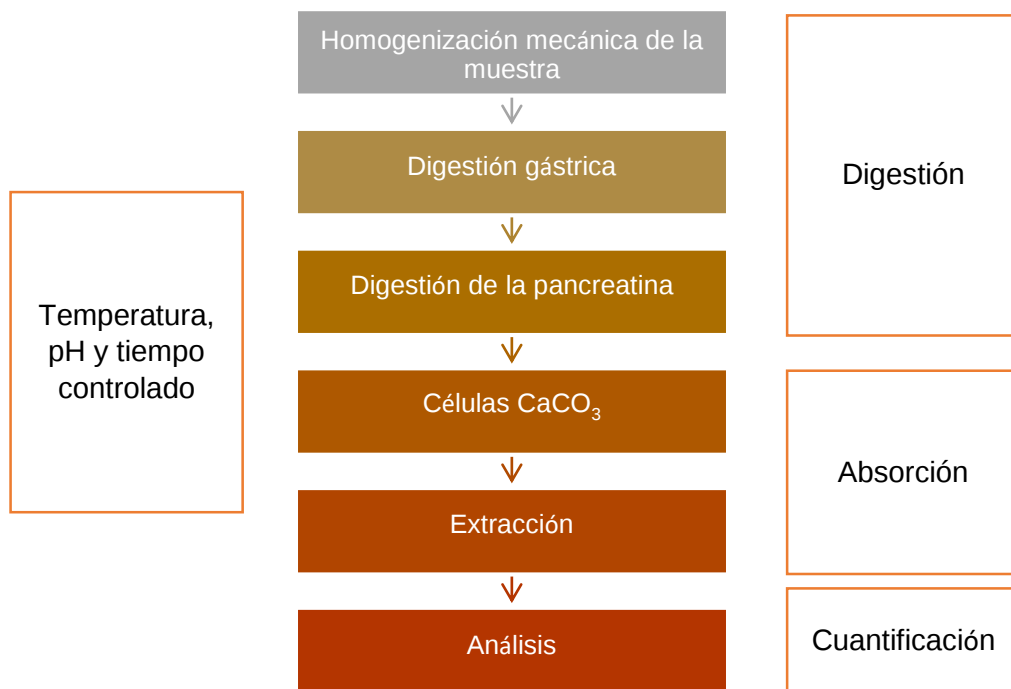


Figura 18. Diagrama de un modelo de digestión in vivo (Santos et al., 2019).

1.5.2. Métodos estáticos para digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* intenta simular las condiciones fisiológicas que ocurren durante la digestión en el tracto gastrointestinal humano. Normalmente en los ensayos de digestión *in vitro* se reproducen la fase oral, gástrica e intestinal y en menor medida la fermentación del intestino grueso (Donis-Rabanales et al., 2020).

- Fase oral. Los modelos estáticos no pueden mezclar bolos de saliva y alimentos altamente viscosos como se podrían ingerir *in vivo*. Por lo que, el alimento debe mezclarse con saliva artificial para obtener un aporte de líquido suficiente para mezclar en el paso gástrico.
- Fase gástrica. Es realizada con HCl o HCl-pepsina a pH y temperatura fijos, durante un periodo de tiempo determinado. El alimento es homogenizado en una disolución acuosa y, normalmente la pepsina es añadida siguiendo un ajuste de pH 1-2. La muestra se incuba a 37 °C durante 1-3 horas.

- Fase del intestino delgado. En el duodeno, el quimo que se vacía gradualmente del estómago se neutraliza con bicarbonato y se incuba con enzimas pancreáticas como lipasa, amilasa, proteasa y ribonucleasa con o sin sales biliares como emulsionantes (pH 6-7).

Los modelos estáticos son particularmente útiles donde hay una digestión limitada (pasos gástricos o intestinales), pero son menos aplicables en estudios de digestión total. Estos métodos se pueden utilizar para evaluar la influencia de las condiciones de digestión y para realizar estudios sobre el efecto de la estructura y composición de los alimentos, los factores dietéticos y el procesamiento de alimentos sobre la bioaccesibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos con el fin de establecer el valor nutricional de los alimentos y mejorar el diseño de los mismos. Los modelos estáticos se utilizan principalmente para estudios de digestión de alimentos simples y componentes de alimentos aislados o purificados.

1.5.3. Métodos dinámicos para digestión *in vitro*

En comparación con los modelos estáticos, los modelos dinámicos tienen la ventaja de que pueden simular los cambios continuos de las condiciones fisicoquímicas, incluida la variación del pH desde la boca hasta el estómago y el intestino, alterando las concentraciones de secreción de enzimas y las fuerzas peristálticas en el tracto gastrointestinal.

Los métodos dinámicos reemplazan las limitaciones de los modelos estáticos. Estos pueden ser monocompartimentados o bi-multicompartimentados. Dentro de los modelos monocompartimentados se encuentra el modelo gástrico dinámico (MGD) o el simulador gástrico humano (SGH). El MGD está compuesto por dos compartimentos diferentes que persiguen simular dos partes anatómicas del estómago, el cuerpo y el antro, sin embargo, no es capaz de reproducir las contracciones peristálticas gástricas. El modelo SGH si es capaz de producirlo de manera similar al del estómago. Estos dos modelos únicamente reproducen la fase gástrica de la digestión, y siguen presentando limitaciones debido a que no simulan el tiempo de transito real, ni el vaciado gástrico.

Los modelos bi- y multicompartimentados ofrecen la mejor de las alternativas en cuanto a reproducir el mayor número de procesos digestivos. El modelo TNO gastrointestinal TIM-1 es un modelo multicompartimental que engloba la parte gástrica y las tres regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) (Donis-Rabanales et al., 2020).

1.5.4. Comparación entre métodos *in vitro* y métodos *in vivo*

Los métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos laboriosos y no tienen restricciones éticas. Esto permite medir un número relativamente grande de muestras. La elección de condiciones controladas y la facilidad de muestreo en el sitio de interés hacen que los modelos *in vitro* sean muy adecuados para medir la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Sin embargo, los métodos *in vivo* pueden dar mejor información, pero la limitación es mayor debido a que es más laborioso, costoso y son éticamente cuestionables; por este motivo, las elaboraciones de nuevas metodologías suelen hacerse con alternativas *in vitro*.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster es el estudio comparativo de la composición y propiedades de los extractos fenólicos de hojas y frutos de diferentes variedades del olivo. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar y comparar los principales compuestos fenólicos identificados.
2. Estudiar y comparar el contenido total en compuestos fenólicos (TPC)
3. Estudiar y comparar el contenido total en flavonoides (TFC).
4. Estudiar y comparar su actividad antioxidante con diferentes metodologías.
5. Estudiar y comparar su biodisponibilidad mediante métodos de digestión simulada *in vivo* e *in vitro*.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil fenólico de hojas y frutos de *Olea europaea*.

En la tabla 1 se muestra el TPC y TFC de hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*. Para el ensayo TPC los resultados se expresan generalmente en miligramos de ácido gálico equivalente (GAE) por gramo de extracto seco y para el ensayo TFC en miligramos de quercetina equivalente (QE) por gramo de extracto seco. La variedad que presenta mayor TPC, utilizando como disolvente de extracción metanol, es frantoio (236,2 mg GAE/ g DE $\pm$ 11,02) seguido de corregiola (231,1 mg GAE/ g DE $\pm$ 11,15) y picholine moroccan (226,5 mg GAE/ g DE $\pm$ 1,32). Las variedades que tienen menor contenido son chemlali (2,2 – 4,6 mg equivalente de hidroxitirosol/ g DE) y neb jmel (1,9 – 2,7 mg equivalente de hidroxitirosol/ g DE). El mayor valor para el TPC se obtuvo en enero con 4,6 mg equivalente de hidroxitirosol/ g DE para la variedad chemlali y para la variedad neb jmel 2,7 mg equivalente de hidroxitirosol/g DE. La variedad chemlali es más rica en fenoles totales en comparación con la variedad ne jmel.

Si se comparan los resultados con la misma técnica de extracción (maceración) la variedad picholine moroccan (226,5 $\pm$ 1,32 mg GAE/ g DE) tiene un contenido superior en TPC, mientras que empleando la extracción asistida por ultrasonidos es la variedad frantoio con 236,2 mg GAE/ g DE $\pm$ 11,02.

La variedad que presenta mayor TFC, usando como disolvente de extracción metanol, es corregiola (5,39,53 $\pm$ 18,16 mg equivalente de rutina/ g DE), seguido de frantoio con 528,51 $\pm$ 43,87 mg equivalente de rutina/g DE y picholine moroccan con 291,04 $\pm$ 2,60 mg QE/ g DE. Las variedades que presentan menor TFC son chemlali (0,9-3,8 mg QE/g DE) y neb jmel (1,2-1,5 mg QE/g DE). Otra variedad que presenta menor contenido total de flavonoides con metanol:agua como extractante es jarbouï (3,1 $\pm$ 0,16 mg equivalente de catequina/ g DE).

Usando como técnica de extracción la maceración, la variedad picholine moroccan (291,04 $\pm$ 2,60 mg QE/ g DE) tiene un mayor contenido en TFC en comparación a las otras variedades. Mientras que empleando la extracción asistida por ultrasonidos es la variedad corregiola (539,53 $\pm$ 18,16 mg equivalente de rutina/ g DE).

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos en hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*

Variedad	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg QE/g DE)	Tratamiento de muestra	Referencia
Chétoui	47,5 ± 0,45	7,3 ± 0,5*	Maceración con metanol:agua	(Edziri et al., 2019)
Meski	34,6 ± 0,60	5,3 ± 0,20*	Maceración con metanol:agua	(Edziri et al., 2019)
Oueslati	29,0 ± 0,9	4,9 ± 0,2 *	Maceración con metanol:agua	(Edziri et al., 2019)
Jarboui	19,0 ± 0,85	3,1 ± 0,16*	Maceración con metanol:agua	(Edziri et al., 2019)
Picholine Moroccan	226,5 ± 1,32	291,04 ± 2,60	Maceración con metanol	(Lfitat et al., 2021)
Corregiola	231,1 ± 11,15	539,53 ± 18,16 **	Extracción asistida por ultrasonidos con metanol	(Goldsmith et al., 2015)
Frantoio	236,2 ± 11,02	528,51 ± 43,87 **	Extracción asistida por ultrasonidos con metanol	(Goldsmith et al., 2015)
Arbequina	8,3	5,25	Maceración con metanol	(Lorini et al., 2021)
Manzanilla	10,1	5,56	Maceración con metanol	(Lorini et al., 2021)
Picual	8,5	3,94	Maceración con metanol	(Lorini et al., 2021)
Chemlali	2,2 – 4,6***	0,9 – 3,8	Maceración con metanol	(Brahmi et al., 2013)
Neb jmel	1,9 – 2,7***	1,2 – 1,5	Maceración con metanol	(Brahmi et al., 2013)

GAE= equivalente de ácido gálico; DE= extracto seco; QE= equivalente de quercetina

*equivalente de catequina

** equivalente de rutina

***equivalente de hidroxitirosol

En la tabla 2 se muestran los compuestos fenólicos identificados en extractos de hojas de *Olea europaea* mediante HPLC. Los principales compuestos fenólicos identificados en las variedades arbequina, royal, picual, kalamon, koroneiki, megaritiki, chetoui, meski, ouslati y jarbouii son oleuropeína y luteolina-7-O-glucósido.

El contenido en los principales compuestos fenólicos identificados en extractos de hojas de distintas variedades de *Olea europaea* se muestra en la tabla 3. Las concentraciones más altas de oleuropeína se observan en las variedades arbequina, royal, picual, hojiblanca y cobrançosa, mientras que, en las variedades kalamon, koreneiki, megaritiki las concentraciones son menores. En las variedades chemlali y nebjmel las concentraciones de oleuropeína varían de 11,4 a 20,8 mg/100 g y 25,1 a 20,0 mg/100.

Las concentraciones de quercetina son más altas en las variedades arbequina, royal y picual en comparación con las encontradas en las variedades kalamon, koreneiki, megaritiki. En cuanto a las concentraciones de luteolina-7-O-glucósido, son mayores en las variedades arbequina, royal, hojiblanca y cobrançosa en comparación con las correspondientes a las variedades, chétoui, meski y ouslati.

Tabla 2. Compuestos fenólicos identificados en hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*

Variedad	Técnica analítica	Compuestos fenólicos detectados	Referencia
Arbequina Royal Picual	HPLC-UV	Apigenina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido, oleuropeína, quercetina, verbascósido.	(Lama-Muñoz et al., 2020)
Kalamon	HPLC-MS	Secologanósido, dimetiloleuropeína, diglucósido de oleuropeína, luteolina-7-O-glucósido, rutina, oleuropeína, oleurosido, quercetina, ligustrósido, verbascósido	(Kiritsakis et al., 2010)
Koroneiki	HPLC-MS	Dimetiloleuropeína, diglucósido de oleuropeína, luteolina-7-O-glucósido, rutina, oleuropeína, oleurosido, quercetina, verbascósido.	(Kiritsakis et al., 2010)
Megaritiki	HPLC-MS	Dimetiloleuropeína, diglucósido de oleuropeína, luteolina-7-O-glucósido, rutina, oleuropeína, oleurosido, quercetina, ligustrósido, verbascósido.	(Kiritsakis et al., 2010)
Chetoui, Meski Ouslati	HPLC-UV	Hidroxitirosol, tirosol, ácido 4-hidroxibenzoico, rutina, luteolina-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, oleuropeína, apigenina.	(Edziri et al., 2019)
Jarbouii	HPLC-UV	Hidroxitirosol, tirosol, ácido 4-hidroxibenzoico, rutina, luteolina-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, oleuropeína, apigenina, hidrato de catequina.	(Edziri et al., 2019)

Tabla 3. Contenido en los compuestos fenólicos mayoritarios identificados en hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*

Variedad	Compuestos			Referencia
	Oleuropeína	Quercetina	Luteolina-7-O-glucósido	
Arbequina	7390,0	76,0	380,0	(Lama-Muñoz et al., 2020)
Royal	7180,0	41,0	247,0	(Lama-Muñoz et al., 2020)
Picual	6560,0	39,0	94,0	(Lama-Muñoz et al., 2020)
Hojiblanca	799,3	0,3	277,8	(Herrero et al., 2011)
Chétoui	43,0	-	17,6	(Edziri et al., 2019)
Meski	52,0	-	11,6	(Edziri et al., 2019)
Ouslati	24,6	-	11,3	(Edziri et al., 2019)
Jarbouii	25,9	-	21,8	(Edziri et al., 2019)
Cobrançosa	2647,1	-	420,9	(Pereira et al., 2007)
Kalamon	8,5	1,7	-	(Kiritsakis et al., 2010)
Koreneiki	4,9	1,1	-	(Kiritsakis et al., 2010)
Megaritiki	3,3	0,7	-	(Kiritsakis et al., 2010)
Chemlali	11,4-20,8	-	-	(Brahmi et al., 2013)
Neb jmel	25,1-20,0	-	-	(Brahmi et al., 2013)

mg/100 g extracto

En la tabla 4 se muestra el TPC y TFC correspondiente a frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*. La variedad que presenta mayor TPC, utilizando como disolvente de extracción metanol/agua, es cobrançosa con 50,1 – 33,9 mg GAE/ g DE, seguido de picual (43,5 – 28,9 mg GAE/ g DE) y galega vulgar (37,0 – 29,3 mg GAE/g DE). Las variedades con un contenido menor son dhokar y zalmati, con valores de 5,1 - 7,7 mg GAE/g DE y 3,7 - 8,7 mg GAE/g DE durante la maduración.

Otra variedad que tiene un alto contenido en TPC es cornezuelo con un 31,5 mg GAE/g DE. Neb jmel presenta un mayor contenido en TPC (8,0 – 4,4 mg equivalente de hidroxitirosol/ g DE) en comparación con la variedad chemlali (4,9 – 1,4 mg equivalente de hidroxitirosol/ g DE), utilizando como disolvente de extracción metanol.

Utilizando como disolvente de extracción metanol/agua, las variedades cobrançosa, picual y galega vulgar son las que presentan mayor TFC (36,6 - 20,0; 45,3 – 26,9; 30,4 – 20,0 mg equivalente de catequina/ g DE). Las que tienen menor TFC son las variedades chétoui (0,2 - 0,4 mg equivalente de catequina/ g DE), zalmati (0,1 - 0,3 mg equivalente de catequina/ g DE) y chemchali (0,2 – 0,3 mg equivalente de catequina/ g DE).

Los valores del TFC varían de 1,6 a 2,6 mg equivalente de catequina/ g DE y de 1,0 a 4,5 mg equivalente de catequina/ g DE para las variedades chemlali y nebjmel, empleando como disolvente extractante metanol.

Tabla 4. Contenido en compuestos fenólicos en frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*

Variedad	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg QE/g DE)	Tratamiento de muestra	Referencia
Cornezuelo	31,5	-	Extracción asistida por ultrasonidos con metanol	(Fernández-Poyatos et al., 2019)
Picual	43,5 – 28,9	36,6 - 20,0**	Maceración con metanol/agua	(Gouvinhas et al., 2017)
Cobrançosa	50,1 – 33,9	45,3 – 26,9**	Maceración con metanol/agua	(Gouvinhas et al., 2017)
Galega vulgar	37,0 – 29,3	30,4 – 20,0**	Maceración con metanol/agua	(Gouvinhas et al., 2017)
Dhokar	5,1 – 7,7	0,07 – 0,12**	Maceración con metanol/agua	(Jemai et al., 2009)
Cellina di Nardo	14,0 - 31,8	-	Maceración con metanol/agua	(Aprile et al., 2019)
Chemlali	4,9 – 1,4*	2,6-1,6**	Maceración con metanol	(Brahmi et al., 2013)
Neb jmel	8,0 – 4,4*	4,5 – 1,0**	Maceración con metanol	(Brahmi et al., 2013)
Chétoui	3,4 – 9,2	0,2 - 0,4**	Maceración con metanol/agua	(Bouaziz et al., 2010)
Zalmati	3,7 – 8,7	0,1 - 0,3**	Maceración con metanol/agua	(Bouaziz et al., 2010)
Chemchali	4,1 – 10,5	0,2 – 0,3 **	Maceración con metanol/agua	(Bouaziz et al., 2010)

GAE= equivalente de ácido gálico; DE= extracto seco; QE= equivalente de quercetina

*equivalente de hidroxitirosol

**equivalente de catequina

En la tabla 5 se muestran los compuestos fenólicos identificados en frutos de *Olea europaea* mediante HPLC. Los principales compuestos identificados en las variedades chétoui, dhokar, manzanilla, royal, arbequina, morisca son oleuropeína y verbascósido. El compuesto luteolina-7-O-glucósido está presente en todas las variedades, excepto en manzanilla y royal.

El contenido en los compuestos fenólicos mayoritarios identificados en extractos de frutos de diferentes variedades de *Olea europaea* se muestran en la tabla 6. Los niveles de oleuropeína disminuyen de 402 a 250, 302 a 133, 370 a 100, 329 a 16, 223,1 a 63 y 543 a 514 mg/100g para las variedades chétoui, chemchali, zalmati, dhokar, arbequina y picolimon, respectivamente, durante la maduración del fruto. En el caso de las variedades royal, cornezuelo, picual, cobrançosa, morisca sus valores aumentan de 36 a 280, 61 a 160, 107 a 152, 124 a 327 y 195 a 263,9 mg/100 g, respectivamente. Los niveles máximos de oleuropeína oscilan entre 152 y 543 mg/100 g.

Para las variedades chétoui, chemchali, zalmati, picudo el contenido de hidroxitirosol aumenta durante la maduración del fruto (10 a 60, 20 a 100, 20 a 162 y de 58 a 110 mg/100 g). Para las variedades chemlali y neb jmel este contenido disminuye (10,5 – 4,8 y 5,5 – 1,6 mg/100 g). Los valores máximos de hidroxitirosol oscilan entre 60 y 162 mg/100 g.

La variedad que presenta un alto mayor contenido en hidroxitirosol es zalmati seguido de picudo. Y el que presenta un menor contenido es la variedad nebjmel.

El contenido de verbascósido aumenta de 8 a 36,0 mg/100 para la variedad royal, de 5,8 a 17,8 mg/100 g para picual, de 67 a 123 mg/100 g para arbequina, de 13 a 36 mg/100 g para morisca y de 18 a 62 mg/100 g para picolimon. Mientras que, para la variedad cobrançosa disminuye de 451 a 289 mg/100 g. Siendo este el que mayor contenido presenta en comparación a las variedades mencionadas. Y el que presenta menor concentración es cornicabra con 2,2-7,2 mg/100 g.

Tabla 5. Compuestos fenólicos identificados en frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*

Variedad	Técnica analítica	Compuestos fenólicos identificados	Referencia
Chétoui	HPLC-MS	Hidroxitirosol, oleósido, nuzhenida, 11-metiloleósido, rutina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-rutinósido, verbascósido, 6- β -hexopiranosil-oleósido, 6- β -desoxihexopiranosil-oleósido, oleuropeína, oleuropeína aglicona.	(Bouaziz et al., 2010)
Dhokar	HPLC-MS	Hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol, oleósido, nuzhenida, 11-metiloleósido, derivado de oleuropeína aglicona, rutina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-rutinósido, verbascósido, 6'- β -hexopiranosil-oleósido, ligustrósido, 6'-desoxihexopiranosil-oleósido, oleuropeína, glucósido de oleuropeína.	(Jemai et al., 2009)
Manzanilla	HPLC-MS	Ácido gálico, tirosol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido siríngico, verbascósido, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, oleuropeína, ácido cinámico.	(McDonald et al., 2001)
Royal	HPLC-MS	Ácido cítrico, glucósido de hidroxitirosol, ácido 1- β -glucosil-aciclodihidroelenólico, oleósido/secologanósido, oleósido-11-metiléster, oleuropeína aglicona, rutina, verbascósido, dihidrooleuropeína, 6'- β -hexopiranosiloleósido, aciclodihidroelenolato de hidroxitirosol, derivado de glucósido de ácido elenólico, oleuropeína, isómero de comselogósido, isómero de oleuropeína, derivado del ácido siríngico, ligustrósido.	(Fernández-Poyatos et al., 2021b)
Arbequina	HPLC-MS	Oleuropeína, dimetiloleuropeína, hidroxitirosol, verbascósido, rutina, luteolina-7-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido, apigenina-7-O-glucósido, cianidina-3-O-rutinósido, cianidina-3-O-glucósido.	(Gómez-Rico et al., 2008)
Morisca	HPLC-MS	Oleuropeína, hidroxitirosol, verbascósido, rutina, luteolina-7-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido, apigenina-7-O-glucósido, cianidina-3-O-rutinósido, cianidina-3-O-glucósido	(Gómez-Rico et al., 2008)

Tabla 6. Contenido en los compuestos fenólicos mayoritarios identificados en frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*.

Variedad	Compuestos			Referencia
	Oleuropeína	Hidroxitirosol	Verbascósido	
Chétoui	402 - 250	10 - 60	-	(Bouaziz et al., 2010)
Chemchali	302 - 133	20 - 100	-	(Bouaziz et al., 2010)
Zalmati	370 - 100	20 - 162	-	(Bouaziz et al., 2010)
Dhokar	329 - 16	20,4 - 32	-	(Jemai et al., 2009)
Royal	36,0 - 280,0	-	8,3 - 36,0	(Fernández-Poyatos et al., 2021b)
Cornezuelo	61-160	-	0 - 6,4	(Fernández-Poyatos et al., 2021a)
Cornicabra	72-56	-	2,2-7,2	(Fernández-Poyatos et al., 2021a)
Picual	107-152	-	5,8 - 17,8	(Fernández-Poyatos et al., 2021a)
Cobrançosa	124 - 327,0	11 - 16	451 - 289	(Ferro et al., 2020)
Arbequina	223,1 - 63,0	34,9	67 - 123	(Gómez-Rico et al., 2008)
Morisca	195 - 263,9	34,6	13 - 36	(Gómez-Rico et al., 2008)
Picolimon	543 - 514	26 - 43	18 - 62	(Gómez-Rico et al., 2008)
Picudo	344 - 231	58 - 110	-	(Gómez-Rico et al., 2008)
Chemlali	2,3 - 3,4	10,5 - 4,8	-	(Brahmi et al., 2013)
Neb jmel	1,6 - 4,6	5,5 - 1,6	-	(Brahmi et al., 2013)

mg/100 g extracto

3.2. Actividad antioxidante de extractos de hojas y frutos de *Olea europaea*.

En la tabla 7 se muestra la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*. La mayoría de los resultados se expresan generalmente en mmol equivalente de trolox (TE) por cada 100 gramos de extracto seco.

- Para el ensayo DPPH

Las variedades que presentan mayor actividad antioxidante son manzanilla, picual y arbequina (9353, 7204 y 6517 mmol TE/100 g DE), mientras que, para las variedades frantoio (7,3 mmol TE/100 g DE), koroneiki (6,7 mmol TE/100 g DE) y arbosana (7,3 mmol TE/100 g DE) la actividad es menor. Otras de las variedades que tienen mayor actividad antioxidante son chétoui y oueslati, con porcentajes de inhibición del radical libre DPPH de 87.1 y 70.5 %, respectivamente.

El parámetro IC₅₀ expresa la concentración de compuesto que proporciona el 50 % de eliminación de radicales libres iniciales, por lo que, a menos valores de IC₅₀, mayor actividad antioxidante. De acuerdo a esto, las variedades coratina (IC₅₀ 22,9 µg/mL) y leccino (IC₅₀ 69,3 µg/mL) presentan mayor actividad antioxidante en comparación a la variedad picholine moroccan (IC₅₀ = 720 µg/mL)

- Para el ensayo ABTS

Las variedades que presentan mayor actividad antioxidante son manzanilla (8479 mmol TE/100 g DE), seguido de picual (7199 mmol TE/100 g DE), arbequina (6550 mmol TE/100g DE), chétoui (83,0 % de inhibición del radical libre ABTS) y oueslati (75,0 % de inhibición del radical libre ABTS). La actividad antioxidante es menor para las variedades frantoio (6,7 mmol TE/100 g), koroneiki (7,0 mmol TE/100 g) y arbosana (7,1 mmol TE/100 g).

Tabla 7. Actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de extractos de hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*.

Variedad	DPPH (mmol TE/100g DE)	ABTS (mmol TE/100g DE)	Referencia
Picholine Moroccan	720*	820*	(Lfitat et al., 2021)
Leccino	69,3*	-	(Ghasemi et al., 2018)
Coratina	22,9*	-	(Ghasemi et al., 2018)
Arbequina	6517	6550,0	(Lorini et al., 2021)
Manzanilla	9353	8479,0	(Lorini et al., 2021)
Picual	7204	7199,0	(Lorini et al., 2021)
Frantoio	7,3	6,7	(Antunes et al., 2020)
Koroneiki	6,7	7,0	(Antunes et al., 2020)
Arbosana	7,3	7,1	(Antunes et al., 2020)
Gemlik	62,3**	156,0	(Khanum et al., 2020)
Sevillano	57,3**	123,0	(Khanum et al., 2020)
Chétoui	87,1**	83,0**	(Edziri et al., 2019)
Meski	47,3**	60,0**	(Edziri et al., 2019)
Oueslati	70,5**	75,0**	(Edziri et al., 2019)
Jarboui	61,6**	68,0**	(Edziri et al., 2019)

* IC₅₀ (µg/mL): Concentración que proporciona 50 % de eliminación de radicales libres iniciales

**% de inhibición de radical libre

En la tabla 8 se muestra la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de diversas variedades de frutos de *Olea europaea*.

- Para el ensayo DPPH

La actividad antioxidante aumenta durante la etapa de maduración para las variedades chétoui (IC_{50} =184-10,2 μ g/mL), zalmati (IC_{50} =150-11,3 μ g/mL) y dhokar (IC_{50} =152-8,1 μ g/mL).

La variedad cellina di nardo (9,1 mmol TE/100g DE) presenta menos actividad antioxidante en comparación a cornezuelo (23 mmol TE/100g DE).

- Para el ensayo ABTS

La variedad meski presenta más actividad antioxidante (46 mmol TE/100g DE) en comparación a las variedades cornezuelo (31 mmol TE/100g DE) y chemlali (21 mmol TE/100g DE). Las variedades santulhana (IC_{50} = 460 μ g/mL) y cobrançosa (IC_{50} = 480 μ g/mL) presentan una mayor actividad antioxidante en comparación a la variedad negrita de freixo (IC_{50} = 1160 μ g/mL).

Las actividades antioxidantes aumentan durante la etapa de maduración para las variedades chétoui (0,25-2,1 mmol/L TE), zalmati (0,7-2,3 mmol/L TE) y dhokar (0,25-2 mmol/L TE).

Tabla 8. Actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de extractos de frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*.

Variedad	DPPH (mmol TE/100g DE)	ABTS (mmol TE/100g DE)	Referencia
Cellina Di Nardo	0-9,1	-	(Aprile et al., 2019)
Cobrançosa	-	480*	(Malheiro et al., 2011)
Santulhana	-	460*	(Malheiro et al., 2011)
Negrita de Freixo		1160*	(Malheiro et al., 2011)
Cornezuelo	23	31	(Fernández-Poyatos et al., 2019)
Meski	-	46	(Othman et al., 2008)
Chemlali	-	21	(Othman et al., 2008)
Chétoui	184,1-10,2*	0,25-2,1**	(Bouaziz et al., 2010)
Chemchali	50,1-3,8*	0,7-2,3**	(Bouaziz et al., 2010)
Zalmati	150,2-11,3*	0,25-2**	(Bouaziz et al., 2010)
Dhokar	152,0-8,1*	-	(Jemai et al., 2009)

**mmol/L TE

* IC₅₀ (µg/mL) : Concentración que proporciona 50 % de eliminación de radicales libres iniciales

3.3 Biodisponibilidad de los componentes fenólicos de hojas y frutos de *Olea europaea*.

Son muy escasos los estudios llevados a cabo hasta la fecha sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de extractos de hojas y frutos en *Olea europaea*. En la tabla 9 se muestra los resultados encontrados en bibliografía en el caso de hojas de diferentes variedades de *Olea europaea* obtenidos mediante una digestión simulada *in vivo* e *in vitro*.

- Método de digestión *in vivo*

Derraik et al., (2013) evaluaron los efectos de la suplementación de cápsulas de extractos de hojas de olivo (oleuropeína: 51,12 mg/día, hidroxitirosol: 9,67 mg/día) sobre la acción de la insulina en hombres con sobrepeso de mediana edad. Este estudio tuvo una duración de 12 semanas. Demostraron que la cápsula de extracto de hoja de olivo mejoró un 15-20 % de la sensibilidad a la insulina.

- Método de digestión *in vitro*

Para la variedad carrasqueña, la concentración de oleuropeína disminuye después de la digestión (22421,0 a 1546,9 mg/kg). Ocurre lo mismo con la concentración de hidroxitirosol (10856,0 a 1201,4 mg/kg), verbascósido (1005,8 a 101,5 mg/kg) y luteolina-7-O-glucósido (3841,5 a 755,4 mg/kg).

Al igual que en el caso anterior, para la variedad arbequina, las concentraciones de los compuestos fenólicos identificados después de la digestión disminuyen: oleuropeína (22 541,8 a 1447,9 mg/kg), hidroxitirosol (10 924,7 a 1124,4mg/kg), verbascósido (914,4 a 79,6mg/kg) y luteolina-7-O-glucósido (3741,9 a 268,9mg/kg).

Los valores de las concentraciones de los principales compuestos fenólicos identificados antes y después de la digestión simulada de las variedades carrasqueña y arbequina son similares.

Tabla 9. Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de hojas de diferentes variedades de *Olea europaea*.

Digestión simulada <i>in vivo</i>						
Muestra	Compuestos	Sujetos	Tiempo	Resultados (ng/ml)	Referencia	
Cápsula de extracto de hoja de olivo	Oleuropeína: 51,12 mg/día Hidroxitirosol: 9,67 mg/día	Hombres con sobrepeso de mediana edad	12 semanas	Mejora del 15-20 % de la sensibilidad a la insulina	(Derraik et al., 2013)	
Digestión simulada <i>in vitro</i>						
Variedad	Compuestos (mg/kg)					Referencia
		Oleuropeína	Verbascósido	Hidroxitirosol	Luteolina-7-O-glucósido	
Carrasqueña	Sin digerir	22 421,0	1005,8	10856,0	3841,5	(Rocha-Pimienta et al., 2020)
	Digerido	1546,9	101,5	1201,4	755,4	
Arbequina	Sin digerir	22 541,8	914,4	10 924,7	3741,9	(Martín-Vertedor et al., 2016)
	Digerido	1447,9	79,6	1124,4	268,9	

En la tabla 10 se muestra la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de frutos de *Olea europaea* obtenida mediante una digestión simulada *in vivo* e *in vitro*.

- Método de digestión *in vivo*

En un estudio llevado a cabo por kundisová et al. (2020) se suministraron aceitunas de mesa arbequina (7,70 g/kg) a ratas de laboratorio. Los resultados se analizaron a los 30 minutos y demostraron que las concentraciones disminuyeron después de la digestión (luteolina-7-O-glucósido: $2,28 \pm 0,19$ a $0,008 \pm 0,003$ mg/kg, hidroxitirosol: $764 \pm 9,47$ mg/kg a $0,08 \pm 0,01$, verbascósido: $26,6 \pm 2,74$ a $0,07 \pm 0,01$ mg/kg, ácido *p*-cumárico: $0,53 \pm 0,03$ a $0,10 \pm 0,01$ mg/kg).

- Método de digestión *in vitro*

Para la variedad cornezuelo la concentración de oleuropeína disminuye después de la digestión (3130 a 800 mg/kg). Ocurre lo mismo con la concentración del isómero de comselogósido (3760 a 590 mg/kg), ligustrósido (366 a 150 mg/kg), glucósido de ácido elenólico (1390 a 900 mg/kg) y oleósido (267 a 160 mg/kg).

Tabla 10. Efecto de la digestión simulada *in vivo* e *in vitro* en la concentración de los compuestos fenólicos en frutos de diferentes variedades de *Olea europaea*.

Digestión simulada <i>In vivo</i>					
Muestra	Compuestos (mg/kg)	Sujetos	Tiempo	Resultados (µg) **	Referencia
Aceitunas de mesa arbequina	Oleuropeína: 1,96 ± 0,21	Ratas de laboratorio	30 min	Oleuropeína: -	(Kundisová et al., 2020)
	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido: 2,28 ± 0,19			Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido: 0,008 ± 0,003	
	Hidroxitirosol: 764 ± 9,47			Hidroxitirosol: 0,08 ± 0,01	
	Verbascósido: 26,6 ± 2,74			Verbascósido: 0,07 ± 0,01	
	Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,53 ± 0,03			Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,10 ± 0,01	
Dosis suministrada: 7,70 g/kg*					
Digestión simulada <i>In vitro</i>					
Variedad	Compuestos (mg/kg)	Sin digerir (mg/kg)		Digerido (mg/kg)	Referencia
Cornezuelo	Oleuropeína	3130		800	(Fernández-Poyatos et al., 2019)
	Isómero de comselogósido	3760		590	
	Ligustrósido	366		150	
	Glucósido de ácido elenólico	1390		900	
	Oleósido	267		160	

*g de aceituna deshuesada/kg peso corporal

**µg en plasma:

3.4. Posibles aplicaciones industriales de extractos de hojas de *Olea europaea* (suplementos alimenticios)

Las hojas de *Olea europaea*, además de tener un gran potencial para usos medicinales, cosméticos y farmacéuticos, podrían encontrar aplicaciones en el desarrollo de una amplia gama de suplementos alimenticios (Markhali et al., 2020). Estas hojas se comercializan en forma de infusiones, hojas enteras, hojas pulverizadas, extractos líquidos o comprimidos (Tsimidou & Papoti, 2010). Los suplementos de extracto de hoja de olivo se comercializan como promotores de la salud del corazón, ayudando al cuerpo a prevenir el daño de los radicales libres.

- Encapsulación de extractos de hojas de olivo.

Mourtzinou y col. encapsularon el extracto de hoja de olivo con β -ciclodextrina mediante la mezcla de componentes en medio acuoso y el posterior proceso de liofilización. Demostraron que la encapsulación con β -ciclodextrina evitaba la oxidación de los fenoles al aumentar la resistencia a la temperatura. Además, el proceso de encapsulación aumentó la solubilidad acuosa del compuesto fenólico de la hoja de olivo en más de un 150% (Markhali et al., 2020).

- Enriquecimiento de aceites con hojas de olivo.

La adición de extractos de hojas de olivo a los aceites vegetales es eficaz para promover la estabilidad frente a la oxidación y retener los componentes nutritivos de los aceites, lo que aumenta su vida útil. Ammar y col., realizaron una investigación sobre el efecto de la adición de hojas de olivo en aceite de oliva virgen extra (añadido antes de la extracción del aceite) sobre el perfil fenólico de las muestras de aceite extraídas de cultivares tunecinos. Estos autores encontraron un incremento significativo de contenido fenólico en el aceite recuperado tratado con 3% de hojas de olivo. La incorporación de hojas de olivo a los aceites de oliva tunecinos (cultivo oueslati) demostraron aumentar la concentración de compuestos fenólicos (44%), clorofila (alrededor de 67%) y carotenoides (alrededor de 62%) en el aceite (Markhali et al., 2020).

- Enriquecimiento de aceitunas de mesa con hojas de olivo

La oleuropeína y el hidroxitirosol son los compuestos fenólicos mayoritarios en las aceitunas de mesa. Como muestran algunos estudios (Zoidou et al., 2010) durante la elaboración de aceitunas de mesa se pierde una cantidad significativa de compuestos fenólicos por degradación, hidrólisis o dilución en salmuera. Al mismo tiempo su presencia en el producto final aumenta su valor nutricional debido a su poder antioxidante. Un estudio llevado a cabo por Lalas y col. demostraron que es posible incrementar el valor nutricional de la aceituna de mesa utilizando los compuestos fenólicos de las hojas de olivo (Markhali et al., 2020).

4. CONCLUSIONES

Hojas de *Olea europaea*

- Las variedades que presentan mayor contenido en fenoles y flavonoides, empleando como disolvente de extracción metanol, son corregiola, frantoio y picholine moroccan.
- Los compuestos fenólicos mayoritarios identificados en los extractos de las variedades de *Olea europaea* estudiadas son oleuropeína y luteolina-7-O-glucósido.
- La variedad arbequina es la que presenta mayor concentración en oleuropeína, quercetina y luteolina-7-O-glucósido.
- Las variedades que presentan mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH son manzanilla, picual, arbequina, chétoui, oueslati, coratina y leccino. En cuanto al radical ABTS, son las variedades manzanilla, picual, arbequina, chétoui y oueslati.
- Los ensayos de digestión simulada *in vitro* para la variedad carrasqueña muestran que, tras la digestión, se produce una reducción del 93,1 % para la oleuropeína, 89,9 % para el verbascósido, 89,9% para el hidroxitirosol y 80,3 % para la luteolina-7-O-glucósido.
- Los ensayos de digestión simulada *in vitro* para la variedad arbequina muestran que, tras la digestión, se produce una reducción del 93,6 % para

la oleuropeína, 91,3 % para el verbascósido, 89,7% para el hidroxitirosol y 92,8 % para la luteolina-7-O-glucósido.

Frutos de *Olea europaea*

- Las variedades que presentan mayor contenido en fenoles y flavonoides son cobrançosa, picual y galega vulgar.
- Los principales compuestos fenólicos identificados en las variedades chétoui, dhokar, manzanilla, royal, arbequina, morisca son oleuropeína y verbascósido. El compuesto luteolina-7-O-glucósido está presente en todas las variedades, excepto en manzanilla y royal.
- La concentración más baja en oleuropeína corresponde a las variedades chemlali y neb jmel.
- La concentración más alta de hidroxitirosol corresponde a las variedades chemchali, zalmati y picudo.
- Las variedades que presentan mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH son chétoui, zalmati, dhokar y cornezuelo. En cuanto al radical ABTS, las variedades con mayor actividad son meski, santulhana y cobrançosa.
- Los ensayos de digestión simulada *in vitro* para la variedad cornezuelo muestran que, tras la digestión, se produce una reducción del 74,4% para la oleuropeína, 84,3% para un isómero del comselogósido, 59,0% para el ligustrósido, 35,2% para un glucósido del ácido elenólico y 40,1% para el oleósido.

Estos resultados reflejan que las hojas y frutos de la especie *Olea europaea* son una fuente importante de compuestos bioactivos antioxidantes, en concreto de compuestos fenólicos. Sin embargo, se conoce aún muy poco sobre el destino de estos compuestos tras su ingestión. Es necesario conocer no solo la concentración en la que se encuentran sino también su biodisponibilidad a fin de poder valorar adecuadamente su importancia nutricional. El estudio de todos estos aspectos constituye actualmente un amplio campo de investigación por desarrollar.

5. REFERENCIAS

- Antunes, B. da F., Otero, D. M., Moreira Oliveira, F., Jacques, A. C., & Avila Gandra, E. (2020). Antioxidant and antimicrobial activity of olive trees cultivated in the Campanha Gaúcha region. *Brazilian Journal of Development*, 6(4), 21791–21805.
- Aprile, A., Negro, C., Sabella, E., Luvisi, A., Nicolì, F., Nutricati, E., Vergine, M., Miceli, A., Blando, F., & De Bellis, L. (2019). Antioxidant activity and anthocyanin contents in olives (CV cellina di nardò) during ripening and after fermentation. *Antioxidants*, 8(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8050138>
- Boluda, C. J., & Terrero, J. D. (2013). Iridoides y secoiridoides (1): Clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. *Revista de Fitoterapia*, 13(2), 153–161.
- Bouaziz, M., Jemai, H., Khabou, W., & Sayadi, S. (2010). Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1750–1758. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4013>
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., & Hammami, M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.042>
- Brenes, M., García, A., Rios, J. J., García, P., & Garrido, A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), 615–625. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00591.x>
- Cavaca, L. A. S., López-Coca, I. M., Silvero, G., & Afonso, C. A. M. (2020). The olive-tree leaves as a source of high-added value molecules: Oleuropein. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 64, 131-180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00005-X>
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method

- (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>
- Derraik, J. G. B., de Bock, M., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., Hodgkinson, S. C., Hofman, P. L., & Cutfield, W. S. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLOS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057622>
- Donis-Rabanales, F., Montalvo-González, J., López-Ruiz, T., Ruiz-Huerta, L., & Caballero-Ruiz, A. (2020). Protocolos de digestibilidad para modelos gástricos in vitro.pdf. *Memorias Del Congreso Nacional De Ingeniería Biomédica*, 7(1), 385–392.
- Edziri, H., Jaziri, R., Chehab, H., Verschaeve, L., Flamini, G., Boujnah, D., Hammami, M., Aouni, M., & Mastouri, M. (2019). A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon*, 5(5), e01604. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01604>
- Fernández-Poyatos, M. P., Llorent-Martínez, E. J., & Ruiz-Medina, A. (2021a). Effect of ripening on the phenolic composition and mineral content of three varieties of olive fruits. *Foods*, 10(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods10020380>
- Fernández-Poyatos, M. P., Llorent-Martínez, E. J., & Ruiz-Medina, A. (2021b). Phytochemical profile and mineral content of Royal variety olive fruits. Influence of the ripening stage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, 103671. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103671>
- Fernández-Poyatos, M. P., Ruiz-Medina, E. ., & Llorent-Martínez, E. . (2019). Phytochemical profile, mineral content, and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olives. Influence of in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 297, 124933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.207>
- Ferro, M. D., Lopes, E., Afonso, M., Peixe, A., Rodrigues, F. M., & Duarte, M. F. (2020). Phenolic profile characterization of “galega vulgar” and “cobrancosa”

- portuguese olive cultivars along the ripening stages. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/app10113930>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Ghasemi, S., Koohi, D. E., Emmamzadehashemi, M. S. B., Khamas, S. S., Moazen, M., Hashemi, A. K., Amin, G., Golfakhrabadi, F., Yousefi, Z., & Yousefbeyk, F. (2018). Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extracts from seventeen cultivars of Iranian olive (*Olea europaea* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 55(11), 4600–4607. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3398-1>
- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Sadeqzadeh, E., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2015). Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*, 20(7), 12992–13004. <https://doi.org/10.3390/molecules200712992>
- Gómez-Caravaca, A. M., Lozano-Sánchez, J., Contreras Gámez, M. D. M., Carretero, A. S., & Taamalli, A. (2015). Bioactive Phenolic Compounds from *Olea Europaea*: A Challenge for Analytical Chemistry. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* (Issue Lc). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50015-X>
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.02.003>
- Gouvinhas, I., Domínguez, R., Gironés-Vilaplana, A., Carvalho, T., Machado, N., & Barros, A. (2017). Kinetics of the Polyphenolic Content and Radical Scavenging Capacity in Olives through On-Tree Ripening. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5197613>
- Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of olea europaea (olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/541591>

- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., & Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7511–7520. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.053>
- Jemai, H., Bouaziz, M., & Sayadi, S. (2009). Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2961–2968. <https://doi.org/10.1021/jf8034176>
- Khanum, F., Zahoor, T., Khan, M. I., Asghar, M., & Sablani, S. S. (2020). Antioxidant, antibacterial and functional-food-packaging potential of leaf extract from Pakistani olive cultivars. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(3), 735–742. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/20.8313>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1517-x>
- Kundisová, I., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2020). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Plasma by LC-ESI-MS/MS and Their Bioavailability after the Ingestion of Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(37), 10213–10222. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04036>
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626>

- Lfitat, A., Zejli, H., Bousraf, F. Z., Bousselham, A., El Atki, Y., Gouch, A., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2021). Comparative assessment of total phenolics content and in vitro antioxidant capacity variations of macerated leaf extracts of *Olea europaea* L. and *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Materials Today: Proceedings*, 45(Part 8), 7271–7277. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.990>
- Lorini, A., Aranha, B. C., Antunes, B. da F., Otero, D. M., Jacques, A. C., & Zambiasi, R. C. (2021). Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times. *Food Chemistry*, 345(October 2020), 128758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128758>
- Machado, N., Gouvinhas, I., Sobreira, C., Domínguez-Perles, R., Gomes, S., Rosa, E., & Barros, A. I. R. N. A. (2017). Critical review on the significance of Olive phytochemicals in plant physiology and human health. *Molecules*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111986>
- Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.023>
- Manousi, N., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2019). Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. In *Engineering Tools in the Beverage Industry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815258-4.00010-x>
- Markhali, F. S., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Olive tree leaves-A source of valuable active compounds. *Processes*, 8(9), 1177. <https://doi.org/10.3390/PR8091177>
- Martín-Gordo, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos: Un Acercamiento a su Biosíntesis, Síntesis y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Martín-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J. A., Espino, J., & Delgado-Adámez, J. (2016). Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value. *Phytotherapy Research*, February, 1172–1179.

<https://doi.org/10.1002/ptr.5625>

- McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M., & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1), 73–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Mushtaq, A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Bhatti, I. A., & Romdhane, M. (2020). Olive. *Medicinal Plants of South Asia*, 541–555. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102659-5.00040-9>
- Othman, N., Roblain, D., Thonart, P., & Hamdi, M. (2008). Tunisian table olive phenolic compounds and their antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, 73(4), 235–240. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00711.x>
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21–32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). *RBSC5 Black 135*. 5, 117–129.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211.

<https://doi.org/10.3390/molecules14062202>

- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 SUPPL.), 570–578. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.570s>
- Rauter, A. P., Ennis, M., Hellwich, K. H., Herold, B. J., Horton, D., Moss, G. P., & Schomburg, I. (2018). Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 90, Issue 9). <https://doi.org/10.1515/pac-2013-0919>
- Ray, N. B., Lam, N. T., Luc, R., Bonvino, N. P., & Karagiannis, T. C. (2015). Cellular and Molecular Effects of Bioactive Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, 53–91. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50009-4>
- Rocha-Pimienta, J., Martín-Vertedor, D., Ramírez, R., & Delgado Adámez, J. (2020). Pro-/antioxidant and antibacterial activity of olive leaf extracts according to bioavailability of phenolic compounds. *Emirates Journal of Food and Agricultural*, 32(6).
- Rojas, J., & Buitrago, A. (2018). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3>
- Santos, D. I., Saraiva, J. M. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>

- Soler, A. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional*. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8394/Tasc1de1.pdf?sequence=1&isAll>
- Tsimidou, M. Z., & Papoti, V. T. (2010). Bioactive Ingredients in Olive Leaves. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00039-5>
- Zoidou, E., Melliou, E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P., & Alexios-Leandros, S. (2010). Identification of Throuba Thassos , a Traditional Greek Table Olive Variety , as a Nutritional Rich Source of Oleuropein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 46–50. <https://doi.org/10.1021/jf903405e>