



**UNIVERSIDAD DE LA SERENA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS  
TOCOFEROLES EN EL ACEITE DE OLIVA COMO COMPONENTE  
MINORITARIO. ESTADO DEL ARTE.**

**Memoria de título para optar al título de:  
QUÍMICO LABORATORISTA**

**PROFESOR GUÍA: MSC. FABIOLA J. JAMETT DÍAZ**

**CLAUDIO ENRIQUE ALFARO MALEBRÁN  
CARLA ANAIS CISTERNAS ARAYA**

**2011**

# HOJA DE CALIFICACIONES

<i>NOMBRES</i>	<i>CALIFICACION INFORME</i>	<i>CALIFICACION INDIVIDUAL</i>	<i>NOTA FINAL</i>

---

**PROFESOR GUIA**

---

**DIRECTOR DEPARTAMENTO**

---

**Dr. LUIS ARANCIBIA LOPEZ**  
**DIRECTOR**  
**ESCUELA DE QUIMICO LABORATORISTA**

**Fecha de presentación:** \_\_\_\_\_

**Fecha y Timbre de Recepción:** \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD DE LA SERENA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DIRECCIÓN DE ESCUELA**  
**QUIMICO LABORATORISTA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros Agradecimientos van hacia nuestros padres por estar siempre y darnos su apoyo a lo largo de nuestra carrera para llegar a ser profesionales.

A todas las personas que estuvieron presentes y se preocuparon por nosotros, a lo largo de los estudios, cuando los necesitamos en las situaciones complicadas y aquellas de diversión.

A nuestra profesora Fabiola Jamett por su amistad y sabios consejos.

## ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>1</b> Resumen	7
<b>2</b> Abstract	8
<b>3</b> Introducción	9
<b>4</b> Objetivos	11
<b>4.1</b> Objetivo General	11
<b>4.2</b> Objetivos Específicos	11
<b>5</b> Marco Teórico	12
<b>5.1</b> Variedades de Olivos y Producción de Aceite en Chile	12
<b>5.1.1</b> Arbequina	12
<b>5.1.2</b> Arbosana	13
<b>5.1.3</b> Frantoio	14
<b>5.1.4</b> Leccino	15
<b>5.1.5</b> Picual	16
<b>5.1.6</b> Koroneiki	17
<b>5.1.7</b> Coratina	18
<b>5.2</b> Proceso edafológicos del Olivo y su influencia sobre la composición química del Aceite de Oliva	19
<b>5.3</b> Aceite de Oliva	21
<b>5.4</b> Importancia Nutricional del Aceite de Oliva	24
<b>5.5</b> Tocoferoles	27
<b>5.6</b> Función y Mecanismo de acción de los Tocoferoles	28
<b>5.7</b> Contenido de Tocoferoles en el aceite de oliva	32
<b>5.7.1</b> Variación del contenido de tocoferoles en función de la madurez del fruto al momento de realizar la extracción del aceite.	34
<b>5.7.2</b> Variación del contenido de tocoferoles en función del tiempo de almacenamiento del aceite.	36
<b>5.7.3</b> Variación del contenido de tocoferoles en función de la variedad.	37
<b>5.7.4</b> Variación del contenido de tocoferoles en función de la modificación de factores agroclimáticos.	39
<b>5.7.5</b> Variación del contenido de tocoferoles en función de los métodos de cultivos empleados en el olivar.	40
<b>6</b> Discusión General del Tema	43
<b>7</b> Conclusión	46
<b>8</b> Referencias	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<b>Tabla 1</b>	Características agro-climáticas de la Región de Coquimbo. 20
<b>Tabla 2</b>	Unidades de calor para diversos estados fenológicos de variedades de Olivo, expresados como días-grado (base 12.5°C). 20
<b>Tabla 3</b>	Temperaturas críticas y efectos en diferentes estados fenológicos en olivo. 21
<b>Tabla 4</b>	Parámetros de Caracterización de distintas variedades de oliva. 22
<b>Tabla 5</b>	Composición de la Porción Insaponificable del Aceite de Oliva Virgen. 23
<b>Tabla 6</b>	Ingesta Diaria de Vitamina E. 27
<b>Tabla 7</b>	Clasificación de los Antioxidantes. 31
<b>Tabla 8</b>	Contenido de tocoferoles en muestras de Olivas de distintos cultivares [mg/kg] con distintos Índices de Madurez (MI). 35
<b>Tabla 9</b>	Contenido de tocoferoles en muestras de Aceite de Oliva, variedad Picual de dos campañas de producción 36
<b>Tabla 10</b>	Contenido de $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -Tocoferoles en 30 variedades distintas de olivo (mg/kg). 37
<b>Tabla 11</b>	Contenido de Tocoferoles en Aceites de Oliva Vírgenes monovarietales para las variedades Picual, Arbequina, Hojiblanca y Cornicabra. 39
<b>Tabla 12</b>	Contenido en tocoferoles de Aceite de Oliva obtenidos de distintas variedades de olivas en diferentes años de cosecha. 40
<b>Tabla 13</b>	Contenido de Tocoferoles [mg/kg] en Aceites de Oliva obtenidos de cultivos tradicionales e integrados de las Fincas: Viana, Calderona y Don Víctor. 41

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1</b>	Frutos de la variedad Arbequina. 13
<b>Figura 2</b>	Frutos de la variedad Arbosana. 14
<b>Figura 3</b>	Frutos de variedad Frantoio. 15
<b>Figura 4</b>	Frutos de variedad Leccino. 16
<b>Figura 5</b>	Frutos de la variedad Picual. 17
<b>Figura 6</b>	Frutos de variedad Koroneiki. 18
<b>Figura 7</b>	Frutos de variedad Coratina. 19
<b>Figura 8</b>	Corte meridiano del fruto. 21
<b>Figura 9</b>	Procesos de obtención de distintos tipos de Aceite de Oliva. 24
<b>Figura 10</b>	Dieta tipo mediterránea como factor protector de la enfermedad cardiovascular. 25
<b>Figura 11</b>	Fórmula estructural general de los Tocolos. 27
<b>Figura 12</b>	Estructura química de los cuatro tocoferoles precursores de la Vitamina E. 28
<b>Figura 13</b>	Mecanismo de Autooxidación. 29
<b>Figura 14</b>	Formación de producto de oxidación secundario. 30
<b>Figura 15</b>	Oxidación de la Vitamina E. 32
<b>Figura 16</b>	Acción Antioxidante. 33
<b>Figura 17</b>	Concentración de tocoferoles totales en Aceites de Oliva Vírgenes de distintas variedades (mg/kg). 34

## 1. RESUMEN

El Olivo es una especie que se ha adaptado a los distintos microclimas presentes en Chile. Dentro de las variedades cultivadas, se destacan Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Leccino, Frantoio, Picual y Coratina, las que son utilizadas para la producción de Aceite de Oliva Virgen.

El aceite obtenido es de gran calidad debido a la presencia de componentes minoritarios con características de antioxidantes, como los son los tocoferoles. Estos compuestos forman parte de la fracción insaponificable del Aceite de Oliva Virgen, previniendo la oxidación radicalaria en cadena provocada por radicales peróxidos. Estructuralmente, estos compuestos poseen una cabeza derivada del 6-Hidroxi metilcromano que contiene una cadena lateral fitilo. Se distinguen cuatro tocoferoles,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , los cuales, difieren en el grado de metilación del cromano.

La importancia nutricional de estos antioxidantes, se debe a que retardan el envejecimiento celular y previenen algunos tipos de enfermedades, actuando como Vitamina E, específicamente el  $\alpha$ -Tocoferol.

La concentración de Tocoferoles en el Aceite de Oliva Virgen es variable y se ve modificada por diversos factores como los son la zona de cultivo, la variedad de olivo, el índice de madurez del fruto del que se extrae el aceite, tiempo de almacenamiento y condiciones hídricas.

Teniendo todo esto en consideración, es que es posible entender la importancia de la cuantificación de estos componentes en el Aceite de Oliva Virgen.

## **2. ABSTRACT**

The Olive is a species that has adapted to the different microclimates present in Chile. Among the cultivars, Arbequina stand, Arbosana, Koroneiki, Leccino, Frantoio, and Coratina Picual, which are used for the production of virgin olive oil.

The oil obtained is of high quality due to the presence of minor components of Antioxidant characteristics, as are the tocopherols. These compounds are part of the unsaponifiable fraction of virgin olive oil, preventing radical chain oxidation caused by peroxide radicals. Structurally, these compounds have a derivated head of 6-Hidroxi metilcromano containing a phytyl side chain. There are four tocopherols,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , which differ in the degree of methylation of the chroman.

The nutritional importance of these compounds is due to slow the cellular aging and prevents certain types of diseases. Besides the action as Vitamin E that presents specifically  $\alpha$ -tocopherol.

The concentration of tocopherols in virgin olive oil is variable and is modified by various factors as are the growing area, variety of olive, the ripening index of the fruit of which oil is extracted, storage time and conditions water.

Considering this, it is possible to understand the importance of quantifying these components in virgin olive oil.

## **PALABRAS CLAVES**

Tocoferoles, Antioxidantes, Aceite de Oliva, Vitamina E, Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.



### 3. INTRODUCCIÓN

El olivo no es propio de Chile y se introdujo en el país a manos de las colonias españolas que allí se asentaron, donde encontró una vasta extensión de suelos fértiles y diversos climas que permitieron su rápida adaptación y producción de diversas variedades.

En 1560 ya había plantaciones de Olivos en México, extendiéndose luego a Perú, Argentina, California y Chile. En este último, el cultivo inicialmente con propósitos domésticos, comenzó en el valle central extendiéndose hasta el Valle del Limarí por el norte y hasta el Río Biobío por el sur. En esta extensión de terreno, la influencia de la Cordillera de los Andes y el Océano Pacífico generaron diversos microclimas, permitiendo la adaptación de diversas variedades. Éstos, además influenciaron los procesos edafológicos del Olivo modificando la composición lipídica de sus frutos, las aceitunas, otorgándoles características químicas y organolépticas únicas que son propias de las variedades cultivadas en Chile, las que luego son heredadas por el Aceite Virgen obtenido.

El Aceite de Oliva Virgen es un alimento al cual se le atribuyen diversas propiedades benéficas para la salud del consumidor. Éstas están relacionadas con la composición química del mismo, en la cual, es posible hallar numerosos ácidos grasos insaturados en su porción saponificable, y gran variedad de otros compuestos insaponificables.

En la fracción insaponificable del aceite, es posible encontrar los tocoferoles, los cuales, son componentes minoritarios con propiedades antioxidantes. Es posible distinguir cuatro tipos de tocoferoles,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -Tocoferol. La importancia nutricional de los tocoferoles, se debe a que presentan una elevada actividad antioxidante como Vitamina E en el organismo, previniendo el envejecimiento celular debido a la formación de radicales libres, lo cual, previene de múltiples enfermedades relacionadas con el daño celular.

El Aceite de Oliva Virgen es aquel producto que contiene los tocoferoles en forma natural, ya que en los refinados, si se encuentran, es en muy escasa cantidad o aparecen por adición posterior durante el proceso de obtención. La cantidad de estos compuestos en el Aceite de Oliva Virgen, varía según diversos factores, genéticos, edafoclimáticos, procesos o métodos de cultivo, tiempo de almacenamiento del

aceite una vez producido y maduración del fruto al momento de la recolección y molturación.

Debido al propósito de Chile de explotar sus recursos y establecerse como potencia agroalimentaria, debe ser capaz de diferenciar sus productos de los obtenidos en otros países. En el caso del Aceite de Oliva, la caracterización de los componentes minoritarios, permitirá establecer la calidad de este producto.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

4.1.1 Establecer el estado del arte en la descripción y diferenciación de los tocoferoles en el Aceite de Oliva como componente minoritario.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- 4.2.1 Caracterizar las distintas variedades de Olivas y la producción de aceites vírgenes a partir de éstas, en Chile; con énfasis en la influencia del proceso de obtención en el contenido de tocoferoles.
- 4.2.2 Establecer la importancia nutricional del Aceite de Oliva, en función de su contenido de tocoferoles como agentes antioxidantes.
- 4.2.3 Describir la naturaleza química, función y mecanismo de acción de los tocoferoles como agentes antioxidantes a nivel celular.
- 4.2.4 Especificar los factores que modifican el contenido de tocoferoles presentes en el Aceite de Oliva Virgen.
- 4.2.5 Realizar una recopilación de estudios analíticos cuantitativos de técnicas aplicados a la identificación y cuantificación de tocoferoles en el Aceite de Oliva Virgen.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. VARIEDADES DE OLIVOS Y PRODUCCIÓN DE ACEITE EN CHILE.

Hoy Chile posee más de 20.000 hectáreas plantadas de olivos para la producción de Aceite de Oliva. Ésta en el año 2009 se incrementó en un 30% respecto al año 2008, con una producción de 8.500 toneladas (Asociación de Productores de Aceite de Oliva). De las variedades cultivadas en Chile, se destacan:

#### 5.1.1. Arbequina

De origen español, Autóctona de Cataluña (Lérida) y presente también en Baleares, planta muy rústica, resistente al frío y susceptible a clorosis férrica en terrenos muy calizos. Es muy apreciada por su precoz entrada en producción, excelente calidad de aceite y de elevada productividad. Se caracteriza por presentar un fruto ovalado, corto y casi simétrico de alrededor de 1.5 g que madura al finalizar el verano. Se utiliza exclusivamente para la obtención de aceite, con un rendimiento del 16 a 19%, aunque la media en la Región de Coquimbo es de 21%, produce un aceite de excelente calidad pero de baja estabilidad, de sabor afrutado y algo almendrado al final. Se cultiva principalmente en la Región de O'Higgins (Región VI) y florece en Octubre. Se destina principalmente a la exportación (Troncoso, H. 2006, Pinto, J. 2005, Barranco, D. 2008).



*Figura 1. Frutos de la variedad Arbequina. De H. Troncoso, 2006.*

### 5.1.2 Arbosana

Variedad proveniente de España, de la comarca de “El Arbos” en la provincia de Tarragona. Actualmente se proyecta como una de las variedades más interesantes por la calidad del aceite producido, ya que es muy frutado y aromático con particular aroma a plátano, suele presentar aromas secundarios como a flores y miel. El aceite obtenido a partir de esta variedad es estable, amargo y con un picante ligero. Presenta un fruto medio de forma esférica. El contenido en ácido oleico es de tipo medio-alto (73% base seca), mientras que el contenido en polifenoles (303mg/Kg) y su estabilidad son de tipo medio. (Asociación de Productores de Aceite de Oliva, Investigación y tecnología Agroalimentaria).

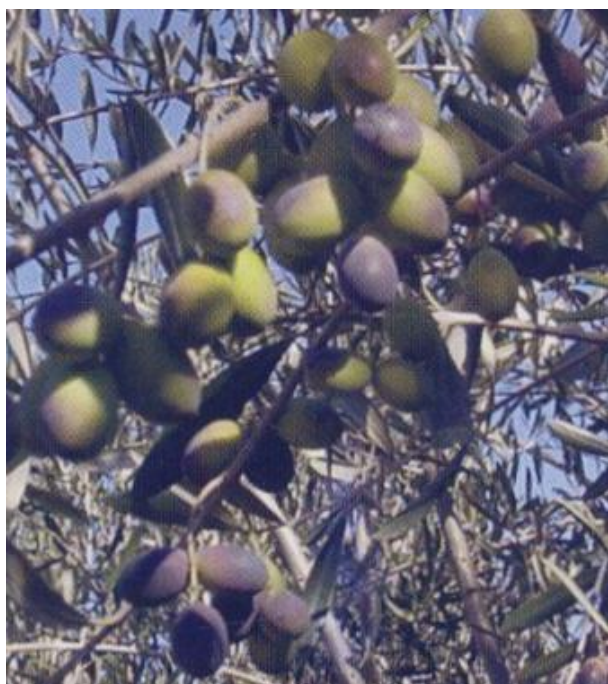


*Figura 2. Variedad Arbosana. De Investigación y Tecnología Agroalimentaria.*

### 5.1.3. Frantoio

Variedad proveniente de Italia, se cultiva principalmente en la región de O'Higgins con propósitos aceiteros. Florece en Noviembre y su maduración tiene lugar en Mayo. El fruto es ovalado, adquiere en la madurez un color violáceo muy característico, con puntuaciones notables, de tamaño mediano aproximadamente

unos 2.5 g, con un rendimiento en aceite del 22% (base húmeda). El contenido graso, en la Región, promedia un valor de 20,4%, estable y afrutado. Esta variedad es muy apreciada por su productividad elevada y constante y por su capacidad de adaptación a diferentes condiciones medioambientales, aunque sensible al frío invernal, al repilo, tuberculosis, moscas. Es una variedad tolerante a verticilosis. El aceite obtenido de esta variedad es muy apreciado en su lugar de origen, por sus características organolépticas así como por su estabilidad (Aguilera, M<sup>a</sup>P. 2002, Troncoso, H. 2006, Barranco, D. 2008).



*Figura 3. Frutos de variedad Frantoio. De H. Troncoso, 2006.*

#### **5.1.4. Leccino**

Variedad italiana, su floración tiene lugar en Octubre y su maduración en Marzo. Esta variedad es tolerante al frío, apreciada por su precoz entrada en producción y por su productividad elevada, además de una baja resistencia al desprendimiento del fruto que facilita su recogida (Aguilera, M<sup>a</sup>.P. 2002). Se considera tolerante a repilo y tuberculosis (Barranco, D. 2008). La aceituna de esta variedad es muy particular, ya que es ovoide, asimétrica y redonda en el ápice, de un tamaño medio de 2.0 a 2.5 g. El aceite que proporciona es de color verde, con un rendimiento del 21%. Se cultiva principalmente en la región de O'Higgins.



*Figura 4. Variedad Leccino. De Instituto Agronómico Per L'Oltremare, 2009.*

#### **5.1.5. Picual**

Variedad española, cultivada en la provincia de Jaén, en el Norte de Granada y en el Este de Córdoba. En Chile se cultiva principalmente en la región de O'Higgins para la obtención de aceite. Es una variedad que florece en Octubre y madura en Marzo. Proporciona aceites de gran calidad, muy estables y con una elevada riqueza en polifenoles y ácido oleico (78,93%). Se cultivan más de 600.000 hectáreas y es la variedad más abundante en el mundo (20% de todos los olivos) y, desde luego, en España (el 50% de todos los árboles existentes).

Su fruto es de tamaño medio, 3.2 g como referencia, su maduración es tardía. De forma alargada, y ensanchada en la mitad superior, con un rendimiento de aceite mayor al de las demás variedades 25 a 27%, de buena estabilidad. En la región de Coquimbo se ha registrado un contenido graso de 19,4% en base húmeda. Aceite amargo y picante, frutado, con aroma característico. Es una planta vigorosa, aunque susceptible de repilo y verticilosis (Troncoso, H. 2006, Pinto, J. 2005)



*Figura 5. Frutos de la variedad Picual. H. Troncoso, 2006.*

#### **5.1.6 Koroneiki**

Esta variedad proviene de Grecia, representa cerca del 60% de la superficie oleícola de ese país. Su fruto es asimétrico y pequeño, menor a 2 g, produce un aceite muy apreciado por sus características organolépticas, estabilidad y alto contenido en ácido oleico. Aceite frutado, de buen aroma, elegante, muy verde, bastante rico en ácido oleico, polifenoles y compuestos amargos, que le confieren una larga vida útil, siempre y cuando se le proteja de la acción directa de la luz (Asociación de Productores de Aceite de Oliva, Investigación y Tecnología Agroalimentaria).





*Figura 6. Frutos de Variedad Koroneiki. De Investigación y Tecnología Agroalimentaria.*

### **5.1.7 Coratina**

Variedad italiana que se cultiva principalmente en la región de Puglia (Bari). Por su altísimo contenido en polifenoles generalmente se utiliza para enriquecer mezclas y no como monovarietal. Su fruto es grande 5-6g, de alto rendimiento en el molino (21-23%), con una cantidad de polifenoles de 590mg/kg. Su aceite, cuando recién se ha extraído, es afrutado y picante con regusto amargo, herbáceo de color muy amarillento y estable. Esta variedad se caracteriza por la producción temprana y por su capacidad de adaptación a los diferentes suelos y climas. (Asociación de Productores de Aceite de Oliva, Instituto Agronómico Per L'Oltremare, 2009).



*Figura 7. Frutos de variedad Coratina. . De Instituto Agronómico Per L'Oltremare, 2009*

## **5.2 PROCESOS EDAFOLÓGICOS DEL OLIVO.**

La composición lipídica de los Aceites de Oliva varía por diversos factores, entre los cuales son determinantes, los factores genéticos y las características de suelo y clima de la zona de cultivo.

La altitud en la que se establece el olivar afecta la calidad del aceite y principalmente su composición química. El hecho de que la relación ácidos grasos insaturados/saturados cambien con la altitud tiene importancia, tanto como para el tiempo de vida útil del aceite como para su calidad sensorial. Aceites producidos en una zona con mayor altitud presentarán una mayor estabilidad oxidativa comparadas con aceites producidos en zonas de menor altitud. El efecto de la altitud sobre la composición de ácidos grasos se relaciona con la temperatura, ya que al disminuir, aumenta el contenido de ácidos grasos en los aceites (Troncoso, H. 2006).

En la Región de Coquimbo se presentan tres agroclimas (Tabla 1). El agroclima Ovalle que presenta una superficie aproximada de 1.509.000 ha. El agroclima La Ligua y, La Serena, las superficies de estas dos últimas zonas son 554.000 y 436.000 ha respectivamente (Troncoso, H. 2006).

*Tabla 1. Características agro-climáticas de la Región de Coquimbo. De H. Troncoso, 2006.*

<b>Agroclima</b>	<b>T° media °C</b>	<b>T° media máxima °C</b>	<b>T° media mínima °C</b>	<b>Horas frío</b>
<b>Ovalle</b>	16,6	28,5	6,3	1000
<b>La Ligua</b>	14,4	26,5	4,5	754
<b>La Serena</b>	13,5	21,0	7,0	342

La temperatura de cultivo, que varía según la altitud en que se encuentra el olivar, no debe superar los 35°C y no ser inferior a 25°C, el olivo es capaz de soportar hasta 40°C de temperatura sin sufrir quemaduras, sin embargo, su actividad fotosintética se detiene sobre los 35°C (Troncoso, H. 2006). Existe una relación entre la temperatura y la fecha de ocurrencia de los distintos estados fenológicos (floración, cuaja, maduración de los frutos). Esta relación se determina como las unidades de calor necesarias para que se inicien los estados fenológicos, expresados como número de días-grado en base a una temperatura de 12,5°C (Tapia, F. 2009).

En los días calurosos y secos del verano, la demanda atmosférica de agua es muy elevada lo que hace que el árbol transpire mucho, con el riesgo de presentar síntomas de marchitez, caída de hojas y daño de los frutos. Para evitar este problema, el olivo cierra sus estomas como mecanismo de protección para ahorrar agua, confiriéndole a esta especie mayor resistencia a la sequía (Troncoso, H. 2006). En la Tabla 2 y 3, se indican las unidades de calor para algunas variedades de olivo cultivadas en Chile y los umbrales térmicos y temperaturas críticas en diferentes estados de desarrollo del olivo respectivamente.

*Tabla 2. Unidades de calor para diversos estados fenológicos de variedades de Olivo, expresados como días-grado (base 12.5°C). De F. Tapia 2009.*

<b>Variedad</b>	<b>Requerimiento unidades de calor</b>			
	<b>Brotación Floración</b>	<b>Floración Cuaja</b>	<b>Cuaja Madurez</b>	<b>Floración Madurez</b>
<b><i>Arbequina</i></b>	160	69,4	996,5	1.065,90
<b><i>Frantoio</i></b>	160,1	84,9	976,3	1.061,20
<b><i>Leccino</i></b>	175	85,2	950,4	1.035,60
<b><i>Koroneiki</i></b>	141	66,5	1.024,50	1.091,00
<b><i>Coratina</i></b>	168,5	76,5	973,3	1.049,80

Tabla 3. Temperaturas críticas y efectos en diferentes estados fenológicos en olivo.  
De H. Troncoso, 2006.

Órgano	Temperatura °C	Efecto
Brotos tiernos	-5 a 0	Quemazón de ápices y heridas en ramillas.
Brotos menores de un año	-10 a -5	Muerte de ramillas.
Frutos	Menos de 5	Daños de frutos, pérdida de cantidad y calidad de aceite.
Floración	15 a 20	Buena floración.
Maduración	25 a 35	Buena acumulación de aceite.

### 5.3 ACEITE DE OLIVA

El Aceite de Oliva es el jugo oleoso, de color dorado o verdoso, denso y perfumado que se extrae, del fruto de olivo (*Olea Europaea*) por procesos de molturación, batido y centrifugación. La palabra aceite deriva del árabe “Az-Zait” que significa Aceite de Oliva (Albin, A. 2003). La Figura 8 representa un esquema de un corte meridiano del fruto.

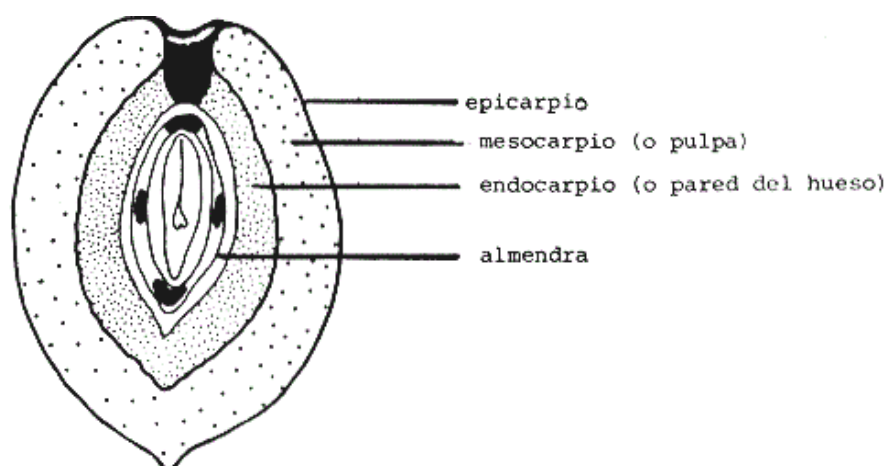


Figura 8. Corte meridiano del fruto del olivo, la aceituna u oliva.

El hueso de la aceituna también contiene aceite, la presencia de éste no perjudica sensiblemente la calidad y la estabilidad del aceite procedente del mesocarpio y, su proporción, en el aceite separado de la pasta, suele ser inferior al 1% (Primo, E. 1998). Para la caracterización del fruto de olivo se suelen determinar parámetros como: Peso Medio (PM [g]); Índice de Madurez (IM); proporción en

peso de piel (Ep), pulpa (P), hueso (HS) y semilla (S), porcentaje de humedad y materia volátil de cada fracción: piel (H Ep), pulpa (P), hueso (H Hs) y semilla (H S); algunos ejemplos se muestran en la Tabla 4 para las variedades Picual, Verdial y Nevadillo (Sánchez, S. 2003).

*Tabla 4. Parámetros de Caracterización de distintas variedades de oliva. De S. Sánchez 2003.*

<b>Variedad</b>	<b>PM (g)</b>	<b>IM</b>	<b>Ep</b>	<b>P</b>	<b>HS</b>	<b>S</b>	<b>H Ep</b>	<b>H P</b>	<b>H Hs</b>	<b>H S</b>
<b>Picual</b>	2,3	7,0	10,9	61,9	25,0	2,3	23,0	21,4	19,3	28,0
<b>Verdial</b>	2,7	4,0	8,5	63,9	15,1	2,5	43,1	50,6	20,8	32,4
<b>Nevadillo</b>	1,9	3,9	8,0	71,7	17,9	2,4	50,3	59,6	24,2	34,2

El rendimiento de aceite extraído depende de la variedad y estado de maduración de la aceituna, el suelo del cultivo, el clima, el tiempo de recolección. Estas variables son las mismas que otorgan las características organolépticas y químicas al fruto y, por consiguiente, al aceite. El Aceite de Oliva Virgen, por ser obtenido en forma mecánica, hereda del fruto el sabor, aroma natural, color, así como la composición de la fracción lipídica de las olivas de las cuales proviene.

La oliva posee una baja concentración de azúcar, una alta concentración de sustancias grasas, tocoferoles y polifenoles. El Aceite de Oliva se compone de una parte saponificable y otra insaponificable, la fracción saponificable, que comprende del 98 al 99% de su peso, está formada por triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos, presentando un elevado contenido en Ácido Oléico (C 18:1n-9) entre el 56-84%, un contenido en Ácido Palmítico (C 16:0) del 7 al 17% y un contenido del 3-21% de Ácido Linoléico (C 18:2) (Fitó, M. 2003).

El Ácido Oléico es un ácido graso mono insaturado, mientras que el contenido en ácidos grasos saturados oscila entre el 8 y el 14% y el de poliinsaturados entre el 4 y el 20%. Es factible, encontrar además, trazas de otros ácidos grasos como, Margárico o Esteárico.

La porción insaponificable, cuya composición se detalla en la Tabla 5, corresponde al 1,5% de su peso y es rica en compuestos fenólicos cuyas propiedades antioxidantes protegen al aceite de oliva de la autooxidación. Esta fracción no

saponificable es rica, además en antioxidantes naturales, como el  $\alpha$ -Tocoferol (5,7,8-trimetiltocol), también está compuesta por hidrocarburos, alcoholes triterpénicos y alifáticos, esteroides, sustancias volátiles, y trazas de Fe, Cu, Mn y Pb (López, N. 2008).

*Tabla 5. Composición de la Porción Insaponificable del Aceite de Oliva Virgen. De M. Fitó, 2003.*

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración/Porcentaje</b>
Hidrocarburos Totales	300-700 mg/100g
Escualeno	300-700 mg/100g
Clorofilas	0-9,7 mg /Kg
Carotenoides ( en $\beta$ -Caroteno)	0,5-10 mg/Kg
Luteína	30-60 %
$\beta$ -Caroteno	5-15 %
Tocoferoles	70-300 mg/Kg
$\alpha$ -Tocoferol	> 93 %
$\beta$ y $\gamma$ -Tocoferol	< 10 %
$\gamma$ -Tocoferol	< 1,5 %
Esteroides	80-240 mg/100g
$\beta$ -Sitoesterol	75-95 %
Campesterol	2-4 %
Estigmasterol	1-2 %
$\delta$ -5-Avenasterol	3-14 %
$\delta$ -7-Avenasterol	< 0,7 %
Compuestos fenólicos (en Ácido Cafeico)	5-500 mg/Kg
Alcoholes triterpénicos	100-300 mg/100g

Durante el proceso de obtención del aceite, que consta de los siguientes pasos: Molienda, Batido, Decantación y Bodega de aceite de oliva (Jamett F, 2007), sólo ocurre una transformación y manipulación mecánica del fruto, obteniéndose como resultado Aceite de Oliva Virgen, con todas las características propias de este producto. Sin embargo, el orujo y parte del aceite obtenido se someten a procesos químicos de refinación, los cuales alteran la composición original del Aceite de Oliva Virgen.

Fitó (2003) señala que, dependiendo de los procesos al cual es sometido el fruto del olivo, se obtendrán diferentes variedades de aceites. En la Figura 9 es

posible seguir los procesos secuenciales para la obtención de distintos tipos de aceites a partir de una misma materia prima. Dichos aceites, difieren tanto en sus caracteres organolépticos y químicos, como en su calidad.

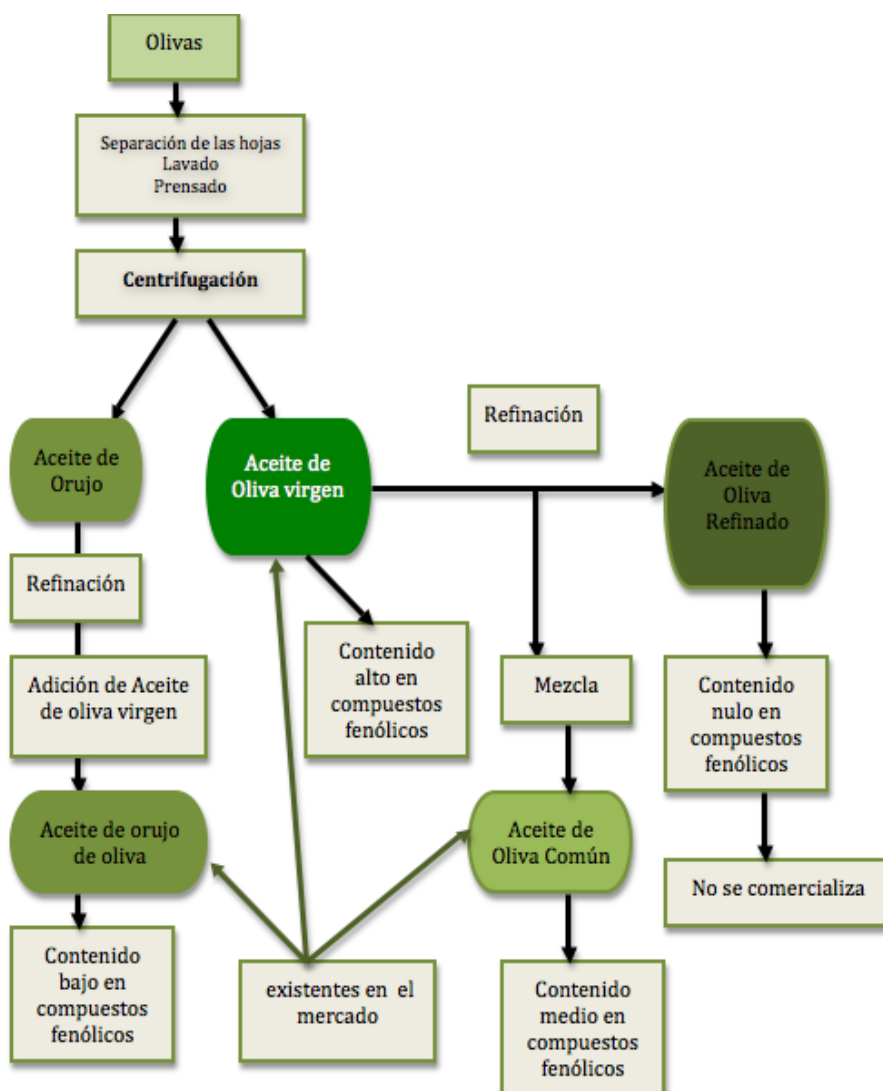


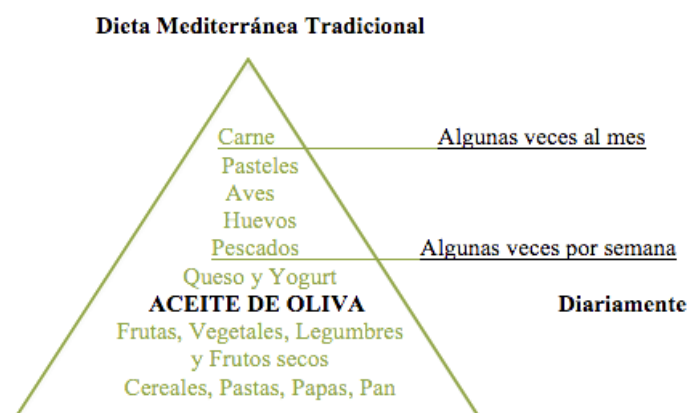
Figura 9. Procesos de obtención de distintos tipos de Aceite de Oliva. De M. Fitó, 2003.

#### 5.4 IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL ACEITE DE OLIVA

El valor biológico y terapéutico del Aceite de Oliva está directamente relacionado con su composición química, por su gran cantidad de ácidos grasos (mayoritariamente Ácido Oleico) y componentes menores antioxidantes, destacando la presencia de  $\alpha$ -Tocoferol (por su acción como Vitamina E),  $\beta$ -Caroteno como Provitamina A y de los polifenoles, todos ellos con una alta capacidad antioxidante.

Todos estos compuestos están presentes en los Aceites de Oliva vírgenes, ya que en los refinados se pierde una importante fracción de ellos. Se han observado pérdidas de hasta un 50% de tocoferol debido al proceso de extracción química que se emplea para su obtención (Gracia, I. 2001).

Estudios nutricionales han demostrado la asociación de un consumo de alimentos ricos en Vitamina E y una reducción en la mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares. Por su contenido en esta vitamina, se ha vinculado el beneficio del consumo de Aceite de Oliva con otras enfermedades además de, aquellas que están en relación con la presión arterial, como lo son la prevención de la aterosclerosis, diabetes, estrés oxidativo, cáncer, desacelera el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y ayudar a reducir los niveles de colesterol. Debido a que el Aceite de Oliva cumple un papel fundamental como integrante básico en la Dieta Mediterránea tradicional, se le ha relacionado a ésta con la prevención de enfermedades cardiovasculares y se le ha valorado por su efecto beneficioso sobre la salud, estos efectos se le atribuyen debido al alto contenido de compuestos con propiedades antioxidantes y un elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados. Además se ha descrito que la Vitamina E juega un rol importante como regulador genético a nivel ARN<sub>m</sub> o proteína, lo que podría tener consecuencias en la regulación de transcripción de genes, estabilidad del ARN<sub>m</sub>, traducción de proteínas y estabilidad protéica. (Fitó, M. 2003 y Sayago, A. 2007). En la Figura 10 se presenta la pirámide que representa una dieta mediterránea clásica.



*Figura 10. Dieta tipo mediterránea como factor protector de la enfermedad cardiovascular. De M. Fitó, 2003.*



El Aceite de Oliva además de condicionar un menor estado oxidativo celular, protege contra posibles efectos de un estrés oxidativo generado por causas diversas. Por ejemplo en el ejercicio físico conduce a una mayor oxidación debido a que los órganos activos aumentan el consumo de oxígeno hasta un 200%, además de generar radicales libres por otras vías. El grado de oxidación que se produce dependerá del grado de insaturación de las membranas y de la capacidad antioxidativa celular, que a su vez va a depender del aporte alimenticio de componentes antioxidantes. Por esto, el Aceite de Oliva con un perfil lipídico fundamentalmente monoinsaturado (Ácido Oleico), de muy baja potencialidad oxidativa y un elevado contenido en antioxidantes fenólicos y Vitamina E, representa una de las vías para prevenir nutricionalmente el estrés oxidativo.

El contenido de tocoferoles disminuye en el Aceite de Oliva cuando es utilizado para la preparación de alimentos, la pérdida de Vitamina E causa su desestabilización, siendo los procesos de fritura, asado o cocción a fuego lento aquellos en los que se producen las mayores pérdidas de esta vitamina, al existir un mayor contacto con el calor y el oxígeno (Sayago, A. 2007).

Estimar las necesidades diarias de Vitamina E para el ser humano no es fácil, ya que dependerá de la edad, la actividad física, el crecimiento, el estado de salud o enfermedad, etc. (Sayago, A. 2007).

Sayago (2007) asigna un valor de 30 unidades internacionales de Vitamina E que equivalen a 20 mg de tocoles expresados como  $\alpha$ -Tocoferol, mientras que Pinto (2005) propone un consumo diario de 25 g de Aceite de Oliva Virgen la que proporciona el 50% de la ingesta diaria recomendada de Vitamina E en hombres y el 62% en mujeres. Otras organizaciones recomiendan una ingesta diaria en función a la edad, sexo y estado fisiológico, estos valores referenciales se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Ingesta Diaria de Vitamina E. De A Sayago, 2007.

Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)	Gestantes (mg/día)	Lactancia (mg/día)
1-3	6	6		
4-8	7	7		
9-13	11	11	15	19
14 +	15	15	15	19

## 5.5 TOCOFEROLES

El Tocoferol o Vitamina E, fue descubierta en 1922. Es una biomolécula lipofílica con una leve solubilidad en plasma, fluidos extracelulares y citosol, por lo que está unida a proteínas específicas y lipoproteínas durante su absorción, transporte y distribución (Baracaldo, C. 2004). Químicamente, los Tocoles son un grupo de compuestos que incluyen cuatro Tocoferoles y cuatro Tocotrienoles, cuya fórmula estructural se muestran en la Figura 11. Todos ellos tienen significativas propiedades antioxidantes (Conrado, S. 2008). El nombre tocoferol viene del griego tokos (nacimiento) y pherein (manifestar o poner a la luz), el sufijo “ol” se añadió para indicar la naturaleza alcohólica de la sustancia (Sayago, A. 2007). Estructuralmente, estos compuestos poseen una cabeza derivada del 6-Hidroximetilcromano que contiene una cadena lateral fitilo.

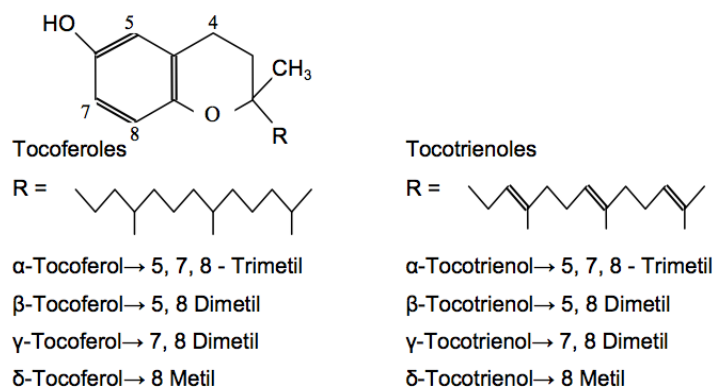
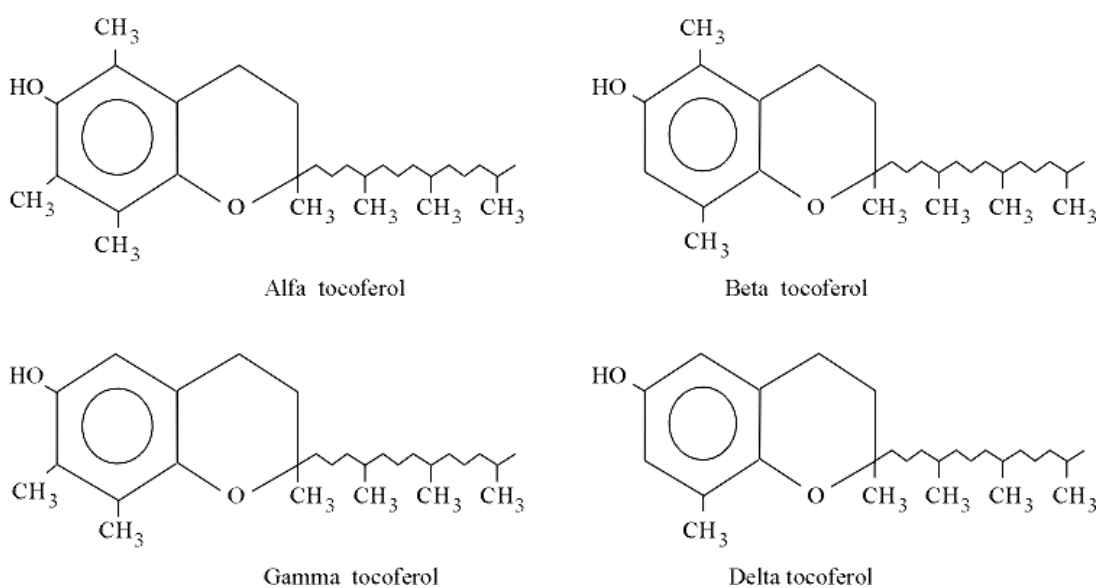


Figura 11. Fórmula estructural general de los Tocoles.

Los Tocoferoles son compuestos heteroácidos de alto peso molecular, se

pueden distinguir cuatro Tocoferoles,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , precursores de la Vitamina E (Acetato de Tocoferilo) (Pramparo, M. 2005). La diferencia entre ellos radica en la posición de varios grupos metilo, como se observa en la Figura 12. El  $\alpha$ -Tocoferol tiene la mayor actividad biológica y es la forma de Vitamina E más ampliamente disponible en los alimentos, que supone el 95% del total de los tocoferoles, el 5% restante lo constituyen el  $\beta$ -Tocoferol y  $\gamma$ -Tocoferol que poseen un marcado efecto antioxidante (Pinto, J. 2005).

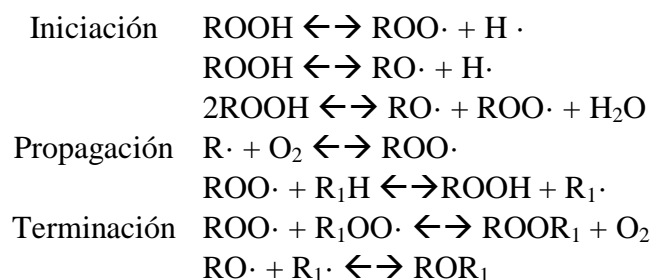


*Figura 12. Estructura química de los cuatro tocoferoles precursores de la Vitamina E.*

## 5.6 FUNCIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS TOCOFEROLES

Los tocoferoles tienen función antioxidante previniendo el deterioro del Aceite de Oliva debido a la autooxidación u oxidación fotosintetizada donde actúan como secuestrantes de oxígeno. La autooxidación es un proceso en el que los lípidos reaccionan con el oxígeno mediante una reacción en cadena de radicales libres (Boskou, D. 1998). Un radical libre es una molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, entregándole una configuración espacial que le otorga inestabilidad y elevada reactividad, esto se traduce en una vida corta, llevándolo a combinarse inespecíficamente con diversas moléculas (Rodríguez, J. 2001). En el proceso de autooxidación (Figura 13), la Iniciación ocurre al descomponerse los hidroperóxidos, que a su vez pueden formarse

en la etapa de Propagación al reaccionar una molécula de lípido con el oxígeno en estado simple excitado. (Boskou, D. 1998).



*Figura 13. Mecanismo de Autoxidación. De Boskou, 1998.*

Otro proceso de deterioro del aceite es la Oxidación Fotosintetizada, en el que la formación de hidroperóxidos ocurre por acción de la luz. Para que el oxígeno sea capaz de combinarse con un hidroperóxido debe hallarse en su estado excitado, los pigmentos como clorofila, porfirinas y flavinas, absorben la luz en el espectro visible alcanzando un nivel de excitación, para luego transferir el exceso de energía al oxígeno, el oxígeno excitado reacciona con una molécula grasa y formará hidroperóxidos para continuar la secuencia de reacciones mostradas en la Figura 13. La oxidación fotosintetizada no puede evitarse o retardarse mediante la adición de antioxidantes, sino sólo con secuestrantes de oxígeno libre como los tocoferoles, otros secuestrantes son los quelatos de Níquel y el  $\beta$ -Caroteno. La oxidación de moléculas con uno o más dobles enlaces, provoca la formación de varios compuestos que afectan a la estabilidad del aceite y sus características organolépticas, esto se conoce como oxidación secundaria (Figura 14) (Boskou, D. 1998).

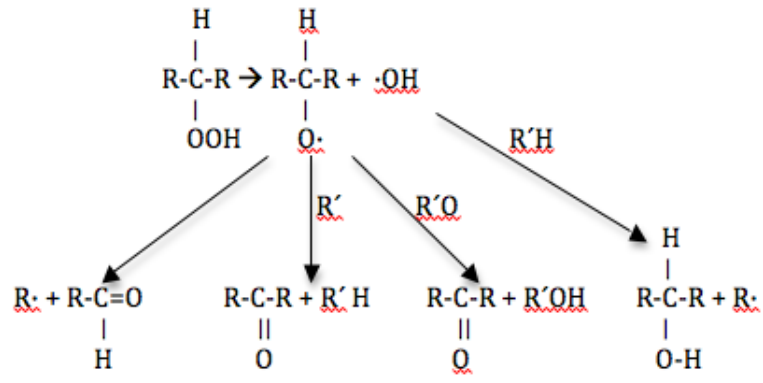


Figura 14. Formación de producto de oxidación secundario. De Boskou 1998.

En un medio biológico, los radicales libres son capaces de combinarse con distintas moléculas integrantes de las estructuras celulares como: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez, J. 2001). Para alcanzar una elevada estabilidad electroquímica el radical libre capta un electrón de las moléculas estables como las anteriormente nombradas, luego de haber tomado el electrón, que necesita, la molécula que antes era estable se convierte en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye las células (Avello, M. 2006).

Especies reactivas del Oxígeno, es el término que se aplica a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, lo que lo hace el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno, En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno formando agua sin formación de intermediarios tóxicos, sin embargo existe un pequeño porcentaje (en torno al 5%) en el que se forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales, son literalmente radicales libres, el anión superóxido y el hidroxilo (Avello, M. 2006).

La función biológica principal de los Tocoferoles es su acción antioxidante, ayuda a evitar la oxidación producida por los radicales libres manteniendo la integridad de la membrana celular, protege también contra la destrucción de la Vitamina A, el Selenio, los aminoácidos sulfurados y la Vitamina C, por otro lado, ayuda al cuerpo a utilizar la Vitamina K reforzando el sistema inmunitario. Este

nutriente además es parte del colesterol LDL y actúa como protector del efecto oxidativo de los radicales libres, cada molécula de Vitamina E protege de la oxidación a 1.000 moléculas de ácidos grasos (Baracaldo, C. 2004).

Los Tocoferoles, presentes naturalmente en la mayoría de las grasas de origen vegetal, pueden ser parcialmente eliminados durante el proceso de obtención y/o fabricación de los aceites y no se encuentran en cantidades apreciables en las grasas de origen animal. Pueden añadirse a las grasas éstos u otros antioxidantes después del procesado para mejorar su estabilidad frente a la oxidación en el producto final (Ziller, S. 1994).

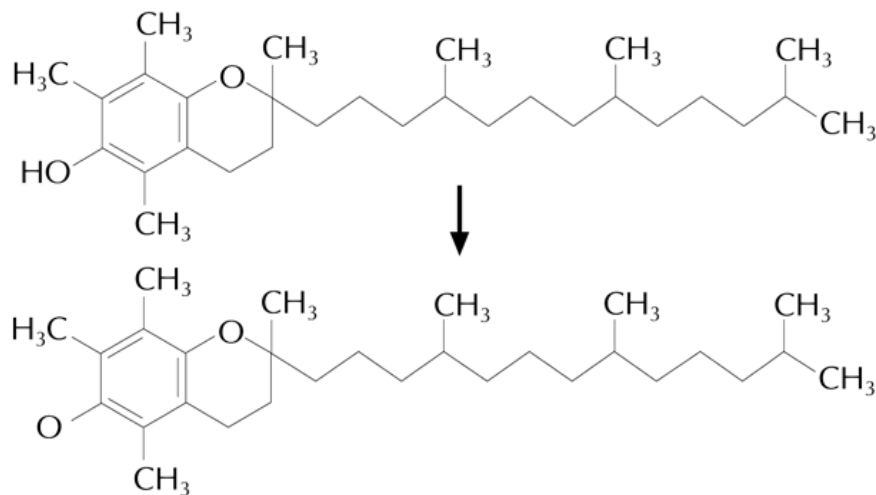
El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico y que en el caso de la Vitamina E puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden clasificar en exógenos y endógenos, los exógenos son los que provienen de la dieta y, dentro de esta categoría, se encuentra la Vitamina E (Avello, M. 2006). En la Tabla 7 se muestra una clasificación de antioxidantes. Cada uno de éstos posee una afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios, La Vitamina E, el  $\beta$ -Caroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula, su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La Vitamina E es considerada el protector de moléculas lipídicas más importante (Rodríguez, J. 2001). Ésta neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido (Rodríguez, J. 2001).

*Tabla 7. Clasificación de los Antioxidantes. De J. Rodríguez, 2001.*

<b>Exógeno</b>	<b>Endógeno</b>
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Coenzima Q
$\beta$ -Caroteno	Acido Tióctico
Flavonoides	Cofactor: Licopenos, Cobre, Zinc, Hierro, Manganeso.
	Enzimas: Catalasa, Superóxido dismutasa, Glutación, Peroxidasa.

El  $\alpha$ -Tocoferol, en su actividad antioxidante, pierde un átomo de hidrógeno del hidroxilo aromático formándose un radical mucho menos reactivo radical-Tocoferoxil. En la Figura 15 Se observa el radical Tocoferoxil (Arguelles, S. 2004).



*Figura 15. Oxidación de la Vitamina E.*

Este radical puede ser reducido por la Vitamina C<sub>red</sub> para recuperar el  $\alpha$ -Tocoferol, éste reciclado de antioxidantes requiere una razón óptima de Vitamina C y E para proporcionar protección antioxidante al organismo. Este balance, entre otros, puede ser fundamental para evitar altos niveles de estrés oxidativo (Arguelles, S. 2004). Por esta razón, la forma de sustituir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitamina E (Avello, M. 2006). En la Figura16 es posible ver la interrelación vitamínica para el reciclado de Vitamina E.

## **5.7. CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN EL ACEITE DE OLIVA**

En el Aceite de Oliva, el contenido de tocoferoles varia de 5-15 mg/100g siendo mayoritario el  $\alpha$ -Tocoferol (52-87%) (Jamett, F. 2007), en menor cantidad se encuentra el  $\beta$ -Tocoferol (10-20%) y el  $\gamma$ -Tocoferol (7-23%), ya que éstos son muy fáciles de oxidar. Los tocoferoles son excelentes agentes antioxidantes naturales y le entregan estabilidad a la grasa o aceite que los posee, siendo su contenido mayor en los Aceites de Oliva Virgen (Jamett, F. 2007).

La concentración de Tocoferoles en los Aceites de Oliva Vírgenes varía de

manera significativa en función de diversos factores como son: grado de madurez del fruto en el momento de la recolección, la variedad de la aceituna, duración del almacenamiento (Pinto, J. 2005), factores agronómicos, el cultivo y condiciones agroclimáticas (Beltrán, G. 2010). En la Figura 15, es posible observar cómo el contenido total de Tocoferoles es distinto en diversas variedades de Aceites de Oliva Virgen.

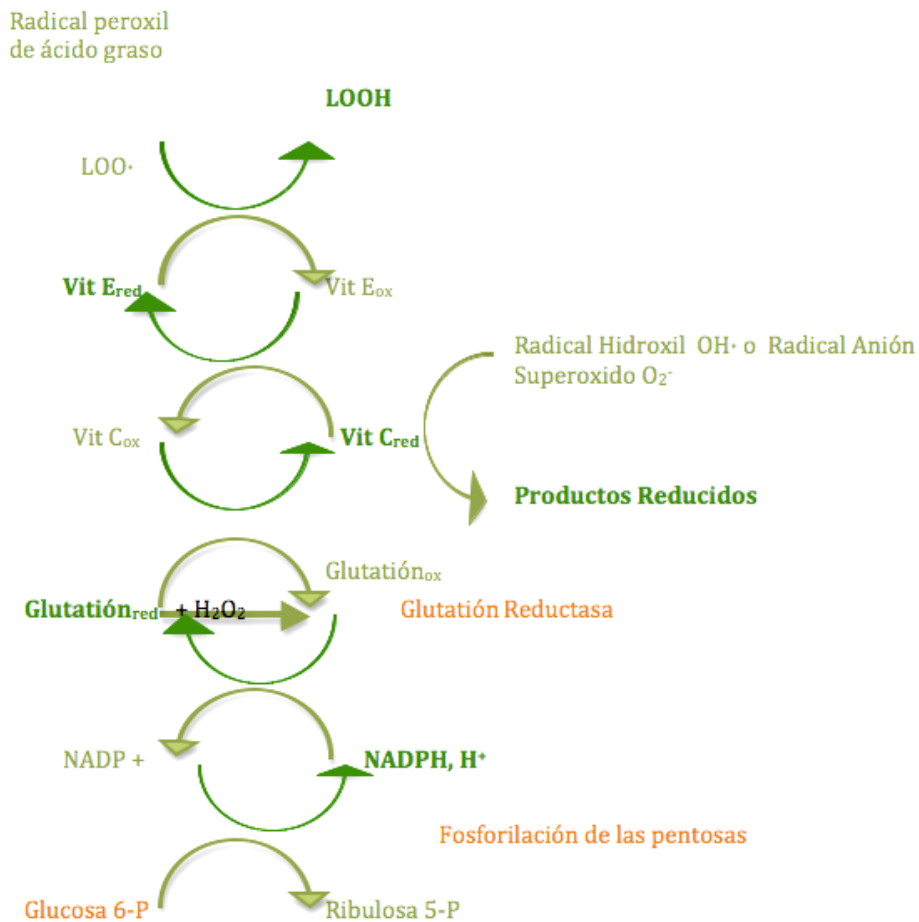
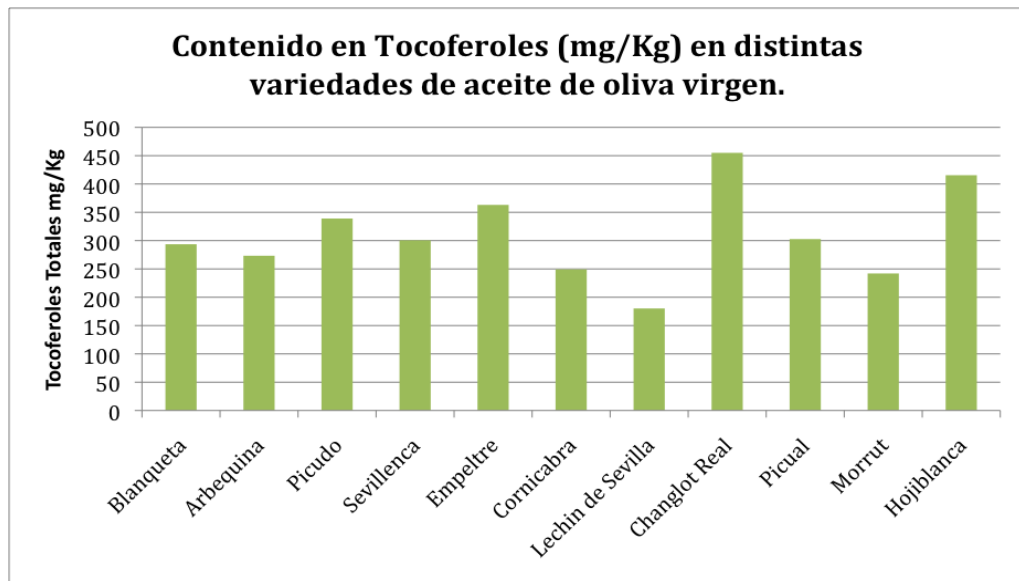


Figura 16. Acción Antioxidante. Modificado de De M. Fitó, 2003.





*Figura 17. Concentración de tocoferoles totales en Aceites de Oliva Vírgenes de distintas variedades (mg/kg). De J. Pinto.*

### **5.7.1. Variación del contenido de tocoferoles en función de la madurez del fruto al momento de realizar la extracción del aceite.**

La concentración de los tocoferoles es mayor cuando las aceitunas se recogen en el primer periodo de la cosecha, para el periodo final de la recolección el contenido de tocoferoles disminuye. Esto se debe a que con el avance del grado de maduración, disminuyen los aldehídos en beneficio de los alcoholes y compuestos fenólicos. (Inia, 2007). La biosíntesis del tocoferol continua después de la recolección, por lo que el Aceite de Oliva obtenido de olivas molidas inmediatamente, luego de la recogida, tendrán una menor concentración en comparación con las olivas que se han dejado almacenadas por periodos de 10 a 15 días antes de la molienda (Jamett, F. 2007). Esto se debe a que cuando el fruto alcanza la madurez, aún en el olivo, la biosíntesis sigue su curso, con la consiguiente pérdida de aromas y fragancias del aceite y, en última instancia, dando lugar a la caída natural del fruto, obteniéndose aceites de mala calidad (Aguilera, M. 2002).

Beltrán (2010) realizó un estudio que consideró la variación del contenido de tocoferoles en muestras de olivas a diferentes Índices de Madurez (MI), en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos por este autor. Se puede observar la

disminución de  $\alpha$ -Tocoferol y tocoferoles totales a medida que aumenta el Índice de Madurez de las aceitunas sujetas a estudio. Sin embargo, el contenido de  $\beta$ -Tocoferol se mantiene constante, mientras que el  $\gamma$ -Tocoferol aumenta, esta tendencia es repetitiva en todos los cultivares analizados. Estos datos llevan a la conclusión de que el  $\alpha$ -Tocoferol es el compuesto cuya síntesis comienza más tempranamente y es el con mayor actividad antioxidante en el fruto, pues su contenido decrece mayoritariamente con el avance de la madurez. Por su parte, la síntesis el  $\beta$ -Tocoferol, parece no ser influenciada por el proceso de madurez y, finalmente, el  $\gamma$ -Tocoferol aumenta a medida avanza este proceso.

*Tabla 8. Contenido de tocoferoles en muestras de Olivas de distintos cultivares [mg/kg] con distintos Índices de Madurez (MI). De G. Beltrán 2010.*

<b>Contenido de Tocoferoles mg/Kg</b>				
	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>	<b>Total</b>
<b>Cv Cobrancosa</b>				
<b>MI 1</b>	291.7 $\pm$ 2.4	0.9 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.1	298.0
<b>MI 2</b>	252.9 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.1	261.8
<b>MI 3</b>	246.6 $\pm$ 1.6	1.0 $\pm$ 0.1	13.0 $\pm$ 0.0	260.6
<b>MI 4</b>	222.6 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	235.5
<b>MI 5</b>	224.8 $\pm$ 3.6	1.0 $\pm$ 0.0	16.1 $\pm$ 0.1	241.9
<b>MI 6</b>	234.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	251.6
<b>MI 7</b>	221.4 $\pm$ 1.7	1.0 $\pm$ 0.1	15.7 $\pm$ 0.0	238.1
<b>Cv Madural</b>				
<b>MI 3</b>	219.9 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	225.8
<b>MI 4</b>	212.1 $\pm$ 1.5	0.9 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.0	220.6
<b>MI 5</b>	218.8 $\pm$ 2.1	0.9 $\pm$ 0.0	7.1 $\pm$ 0.1	226.8
<b>MI 6</b>	209.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.1	216.3
<b>MI 7</b>	202.2 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.0	208.8
<b>Cv Verdeal Transmontana</b>				
<b>MI 1</b>	188.5 $\pm$ 2.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	189.4
<b>MI 2</b>	169.4 $\pm$ 2.8	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0	171.3
<b>MI 3</b>	135.4 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1	139.4
<b>MI 4</b>	145.5 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 0.1	149.3
<b>MI 5</b>	146.1 $\pm$ 1.1	0.9 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1	150.6
<b>MI 6</b>	133.6 $\pm$ 1.4	0.9 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	138.5

### 5.7.2. Variación del contenido de tocoferoles en función del tiempo de almacenamiento del aceite.

Con el fin de estudiar la influencia del periodo de almacenamiento del aceite sobre el contenido en tocoferoles, Romero (2002) analizó los compuestos antioxidantes presentes en Aceites de Oliva de las temporadas 1999/2000 y 2000/2001, este autor observó una pronunciada disminución de los polifenoles frente a una variación mínima en el contenido de tocoferoles a lo largo del tiempo, concluyendo que la fecha de adquisición de los aceites en el mercado puede ser importante desde el punto de vista del contenido de antioxidantes polifenólicos. En cuanto a los tocoferoles, no se detectó diferencias significativas en su contenido para cada variedad según la fecha de comercialización del aceite (Romero, C. 2002). La Tabla 9 muestra los resultados obtenidos en este estudio. Donde se aprecia una leve disminución para la campaña 1999/2000 y un comportamiento inverso para la campaña 2000/2001.

Lo primero que es posible señalar, al comparar los resultados para polifenoles y tocoferoles, es que si bien, ambos poseen actividad antioxidante, los primeros otorgan estabilidad oxidativa al aceite, mientras que la actividad antioxidante de los tocoferoles se manifiesta más en un medio biológico, es por ello que se le cataloga como nutriente esencial: Vitamina E.

*Tabla 9. Contenido de tocoferoles en muestras de Aceite de Oliva, variedad Picual de dos campañas de producción de distintas fechas. De Romero 2002.*

	<b>Campañas de Recolección</b>			
	<b>1999/2000</b>		<b>2000/2001</b>	
<b>Tocoferoles [mg/kg]</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	247,6	211	310,9	339
<b><math>\beta</math>-Tocoferol</b>	5,5	7,7	9,4	10,8
<b><math>\gamma</math>-Tocoferol</b>	22,9	30,1	33,3	36,9
<b>Totales</b>	276	248,8	353,6	386,7

### **5.7.3. Variación del contenido de tocoferoles en función de la variedad.**

Con el propósito de estudiar la variabilidad de contenido en tocoferoles en Aceites de Olivas en función de los factores genéticos del fruto, Beltrán (2010)

realizó un monitoreo de 30 especies diferentes de olivos. En este estudio, el autor separó y determinó mediante HPLC, los tres isómeros de tocoferoles, Tabla 10, hallándose un rango de 84 a 463 mg/Kg de tocoferoles totales, en el que el 95% del contenido lo constituye el  $\alpha$ -Tocoferol, siguiéndoles el  $\gamma$ -Tocoferol de 1 a 29 mg/kg y trazas del isómero  $\beta$ .

*Tabla 10. Contenido de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -Tocoferoles en 30 variedades distintas de olivo (mg/kg). De G. Beltrán, 2010.*

	Tocoferoles [mg/kg]				Vitamina E Total
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	Totales	
<b>Alameño de Cabra</b>	337	3	18	358	340
<b>Arbequina</b>	223	1	nd	224	223
<b>Asnal</b>	414	4	21	439	418
<b>Baladi Souri</b>	247	2	4	253	248
<b>Blanqueta</b>	328	4	3	335	331
<b>Bolvino</b>	183	4	1	188	185
<b>Cakir</b>	266	2	14	282	268
<b>Cornicabra de Mérida</b>	301	4	29	334	306
<b>Dam</b>	287	3	2	292	289
<b>Frantoio</b>	260	4	2	266	262
<b>Itarsca Njelica</b>	82	2	nd	84	83
<b>Leccino</b>	344	4	13	361	347
<b>Lentisca</b>	444	5	14	464	448
<b>Loaine</b>	204	2	5	211	206
<b>Mochorrón</b>	502	3	5	510	504
<b>Manzanilla de Sevilla</b>	153	nd	11	164	154
<b>Maureya</b>	189	3	10	202	192
<b>Mollar de Ziezar</b>	313	4	26	343	318
<b>Negrillo de Estepa</b>	438	4	3	445	440
<b>Ocal</b>	201	1	12	215	203
<b>Ojo de Liebre</b>	428	4	24	456	432
<b>Olivo Mancha Real</b>	220	3	4	227	222
<b>Pajarero</b>	233	3	nd	236	235
<b>Picual</b>	208	2	14	224	211
<b>Racimal de Jaén</b>	331	5	nd	336	334
<b>Razzola</b>	234	3	2	239	236
<b>Rechino</b>	297	3	15	315	300
<b>Veridal de Cádiz</b>	306	4	21	331	310

<b>Villalonga</b>	159	2,5	1	163	160
<b>Promedio SD</b>	278 ± 102	2,8 ± 1,3	9,6 ± 9,1	291 ± 105	281 ± 102
<b>CV (%)</b>	36,5	44,1	94,7	35,9	36,4

Aguilera (2002), difiere levemente de los resultados obtenidos por Beltrán (2010), en un estudio de caracterización del aceite de las variedades Leccino y Frantoio, en el cual, la primera de ellas presenta un contenido total de tocoferoles de 314 mg/kg y la segunda 181 mg/kg. Si bien, estos valores difieren entre ambos estudios, son concordantes en que la variedad Leccino posee una cantidad mayor de tocoferoles que su símil Frantoio. Por su parte, Romero (2003) realizó una caracterización del contenido de antioxidantes en Aceites de Oliva, con énfasis en el contenido de polifenoles, en el que se incluyeron los tocoferoles como parámetros de comparación, para las variedades: Picual, Arbequina, Hojiblanca y Cornicabra. El estudio consideró la separación y cuantificación de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -Tocoferol, cuyos resultados son mostrados en la Tabla 11, para las dos primeras variedades, Picual y Arbequina, los valores son similares. Sin embargo, para el aceite de la variedad Cornicabra, el contenido de  $\alpha$ -Tocoferol determinado por Beltrán (2010) supera en más de 100 mg/kg al determinado por Romero (2003).

*Tabla 11. Contenido de Tocoferoles en Aceites de Oliva Vírgenes monovarietales para las variedades Picual, Arbequina, Hojiblanca y Cornicabra. De C. Romero 2003.*

<b>Tocoferol</b>	<b>Variedad de Olivo [mg/kg]</b>			
	<b>Picual</b>	<b>Arbequina</b>	<b>Hojiblanca</b>	<b>Cornicabra</b>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	223,4	174,1	252,1	191,2
<b><math>\beta</math>-Tocoferol</b>	1,7	0,8	1,9	1,5
<b><math>\gamma</math>-Tocoferol</b>	13,3	2,3	8,4	9,6
<b>Totales</b>	238,4	177,2	262,4	202,3

#### **5.7.4. Variación del contenido de tocoferoles en función de la variación de factores agroclimáticos.**

Beltrán (2010) en un estudio de tres años de cosechas distintas, de tres variedades de olivos: Frantoio, Hojiblanca y Picual, señala sobre la incidencia de los factores agroclimáticos de la zona de cultivo y, que la variabilidad por año de los

cultivares en la composición lipídica de las olivas dependerá del nivel de lluvias; es así que los aceites cosechados en años más secos presentan un contenido en tocoferoles mayor (Beltrán, G. 2010). En la Tabla 12 se muestran los resultados del estudio de Beltrán (2010) y se observa cómo, a pesar, de tratarse de la misma especie de olivo y olivar, los factores climáticos inciden directamente en el contenido de tocoferoles en el aceite.

*Tabla 12. Contenido en tocoferoles de Aceite de Oliva obtenidos de distintas variedades de olivas en diferentes años de cosecha. De G. Beltrán 2010.*

		Año de Cosecha			
		1996-97	1997-98	1998-99	Promedio
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol (mg/kg)</b>	Frantoio	227±23	224±23	268±32	240±33
	Hojiblanca	265±20	314±36	344±38	307±46
	Picual	268±36	274±54	303±39	268±53
<b><math>\beta</math>-Tocoferol (mg/kg)</b>	Frantoio	1.9±0.6	2.2±0.6	2.2±0.2	2.1±0.5
	Hojiblanca	3±0.7	3.8±0.5	3.4±0.5	3.4±0.6
	Picual	2.1±0.6	2.8±0.3	2.6±0.7	2.5±0.6
<b><math>\gamma</math>-Tocoferol (mg/kg)</b>	Frantoio	3±1.3	1.8±0.5	3.1±0.9	2.6±1.1
	Hojiblanca	3.5±1.3	4.4±2.3	3.5±0.8	3.8±1.6
	Picual	6.1±2.6	4±3.1	5.3±1.2	5.1±2.5
<b>Tocoferoles totales mg/Kg</b>	Frantoio	232±23	228±23	274±33	245±33
	Hojiblanca	271±21	322±35	351±38	315±46
	Picual	236±34	281±52	311±38	276±51
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol (VE) mg/Kg</b>	Frantoio	228±23	225±23	270±32	241±33
	Hojiblanca	267±20	316±36	346±38	309±33
	Picual	230±36	276±54	305±3	270±44

#### **5.7.5. Variación del contenido de tocoferoles en función de los métodos de cultivos empleados en el olivar.**

El método de cultivo, empleado en el olivar, también tiene incidencia en el contenido de tocoferoles en el fruto y, por consiguiente en el aceite. Cayuela (2006), investigó la diferencia de las calidades de Aceites de Oliva Virgen obtenidos de manera tradicional y de forma integrada (considera el manejo y control de plagas). En los resultados obtenidos se destaca que los valores más altos de esteroides totales y tocoferoles corresponden a los aceites de producción integrada. Sin embargo, se señala que para el  $\beta$ -Tocoferol no existen diferencias significativas en los sistemas de

producción; para  $\gamma$ -Tocoferol se encuentran valores más altos en las muestras correspondientes al aceite de producción integrada. La Tabla 13 recoge los resultados obtenidos en este estudio comparativo de los aceites realizados por Cayuela.

*Tabla 43. Contenido de Tocoferoles [mg/kg] en Aceites de Oliva obtenidos de cultivos tradicionales e integrados de las Fincas: Viana, Calderona y Don Víctor. De Cayuela 2006. M1: 15-12-2003 y M2: 19-01-2004.*

		Fincas de Cultivo					
		Viana		Calderona		Don Víctor	
Parámetro	Cultivo	M1	M2	M1	M2	M1	M2
$\alpha$ -Tocoferol	Int.	304	284	379	295	358	414
	Con.	245	339	287	308	311	266
$\beta$ -Tocoferol	Int.	7,15	4,34	11	7,98	9,71	12,5
	Con.	7,07	11,9	9,51	7,57	9,88	5,5
$\gamma$ -Tocoferol	Int.	17,4	15,7	21	15,6	21,9	14,9
	Con.	11,7	11,2	18,8	13,3	16	12,4

*M1 y M2 son muestras tomadas en distintas fechas; Int.:*

*Producción Integrada; Con: Producción Convencional o tradicional.*

Si consideramos las dos variables anteriores: condiciones climáticas del cultivo y métodos de cultivo, en el que se consideran la fertilización, también es posible establecer un parámetro de comparación pues aunque dos cultivares sean tratados de idéntica manera en la fertilización y sistema de riego, los factores de temperatura, pH y naturaleza del suelo, modifican los nutrientes disponibles modificando los procesos productivos. Es por ello, que Cimato (1990) señala que, en cualquier caso, el estado nutritivo del árbol es el primer factor determinante de su fuerza biológica y, por tanto, de su producción. A su vez, se ha comprobado que fertilizantes nitrogenados retrasan la maduración, ya que los tratamientos con urea reducen los fenómenos florales (Inia, 2007). Y cómo ya se especificó en el apartado 5.7.3, la maduración del fruto incide directamente en la proporción y cantidad de tocoferoles presentes en el Aceite de Oliva.

Por su parte, el riego ejerce influencia sobre el contenido de fenoles presentes en la fracción insaponificable. Los polifenoles confieren a los aceites provenientes de

zonas más áridas, características amargas. La poda, en otra perspectiva, regula las características y distribución de la fructificación del árbol. Los frutos situados en las zonas mejor aireadas e iluminadas (copa de árboles) son más grandes y con mayor contenido en aceite que los situados en zonas internas de árbol y con menos luz (Guerero, 1994).



## 6. DISCUSIÓN GENERAL DEL TEMA

El Olivo (*Olea Europeae*) es una planta versátil de origen europeo, capaz de adaptarse a distintos microclimas presentes en el territorio chileno, donde son cultivadas distintas variedades. Algunas de ellas, por su alto contenido y calidad de grasa son preferidas sobre otras para la obtención de aceite.

Si bien, el Olivo es capaz de adaptarse a diferentes microclimas, variaciones en la temperatura o altitud en la que se encuentra el olivar, son capaces de modificar la composición química del aceite además de sus caracteres organolépticos. La modificación química del aceite se observa en el cambio de la relación entre ácidos grasos insaturados/saturados, además de la estabilidad oxidativa, siendo menos lábiles aquellos aceites que sean obtenidos a partir de zonas de cultivo con mayor altitud.

Los distintos procesos de producción de aceite dan como resultado distintos tipos de aceite, con diferencias en sus características organolépticas y químicas. El valor nutricional del Aceite de Oliva Virgen, se debe a su composición química, destacándose el perfil de ácidos grasos como componentes mayoritarios y su contenido en antioxidantes como componentes minoritarios. Entre estos componentes, se destacan los tocoferoles.

Los aceites refinados, contienen menor cantidad de tocoferoles, en comparación con aquellos aceites obtenidos únicamente por molturación y centrifugación del fruto.

Los tocoferoles, son un grupo de isómeros particular de los Tocolos. Se distinguen cuatro  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -Tocoferol, los que difieren en el grado de metilación del anillo fenólico. La importancia de estos compuestos es su actividad antioxidante, la que se manifiesta en dos situaciones distintas. En primer lugar, los tocoferoles dentro del aceite son capaces de secuestrar el Oxígeno que reacciona con los hidroperóxidos retardando el enranciamiento y la oxidación por acción de radicales libres. En segunda instancia, en un medio biológico, los tocoferoles son parte de una vía metabólica en la cual participa además la Vitamina C para inhibir o disminuir la producción de radicales libres producto de otros procesos metabólicos dentro de la

célula. Al disminuir la cantidad de radicales libres en la célula, se protege principalmente a las membranas celulares, relacionándose inmediatamente un consumo apropiado, de estos compuestos, con enfermedades que se produzcan por daño de tejido, como lo son problemas de presión arterial, aterosclerosis, diabetes, estrés oxidativo y cáncer. Múltiples investigaciones, demuestran que un consumo adecuado de alimentos ricos en antioxidantes evita la mortalidad por enfermedades cardiovasculares.

De los cuatro isómeros conocidos de los tocoferoles, el que posee mayor actividad como antioxidante es el  $\alpha$ -Tocoferol, también conocido como Vitamina E, siguiendo, en orden decreciente, el  $\beta$ -Tocoferol.

Estructuralmente estos compuestos tienen la similitud de poseer un grupo metilo en la posición  $\alpha$  del anillo fenólico. Con el propósito de prevenir el envejecimiento celular por acción de la Vitamina E, se recomienda una ingesta diaria de 8 a 10 mg de vitamina E, los que están contenidos en 40 a 50 g de Aceite de Oliva Virgen.

El contenido de tocoferoles en el Aceite de Oliva Virgen varía en función de diversos factores. Para empezar, las distintas variedades de olivas, difieren entre ellas en el contenido de tocoferoles además de la proporción de cada uno. Por otra parte, la madurez del fruto al momento de la recolección también incide sobre la cantidad de estos antioxidantes.

El aceite obtenido de frutos con menor IM contendrá mayor cantidad de tocoferoles que aquellos con un IM mayor, además la biosíntesis de estos compuestos continuará en el fruto entero de 10 a 15 días luego de ser recolectado, por lo cual, el aceite producido a partir de olivas que se dejan madurar, durante este periodo, luego de la recolección, presentarán mayor concentración de tocoferoles que las molidas inmediatamente luego de la recolección.

Otro factor que modifica el contenido de tocoferoles en el aceite, es el periodo de almacenamiento, a mayor tiempo de almacenaje, disminuye el  $\alpha$ -Tocoferol

notoriamente y levemente los restantes, esto se debe a que reacciona con el Oxígeno que queda retenido en el envase.

Finalmente, las condiciones de cultivo también inciden en el contenido de tocoferoles en el aceite. Un factor agroclimático, como lo es la disponibilidad de agua ambiental y de riego, incide sobre este parámetro. El aceite obtenido de olivas cultivadas en años secos, Tendrán un mayor contenido de tocoferoles que aquellas de años con mayores precipitaciones. La variación de estos compuestos debido a la disponibilidad de recursos hídricos, no es selectiva para un isómero determinado de los tocoferoles, sino que el aumento o disminución se produce en forma general. Otra condición de cultivo es el método que se emplea para el cuidado de los olivos, un método integral que incluya el control de plagas y manejo de residuos fitosanitarios, asegura un aumento en el contenido de tocoferoles.

## 7. CONCLUSIONES

De todas las especies de olivos que se han adaptado a los microclimas y suelos de Chile, se destacan las variedades Arbequina, Arbosana, Frantoio, Koroneiki, Coratina, Leccino y Picual para la producción de Aceite de Oliva Virgen, los cuales, son de elevada calidad debido a sus componentes minoritarios, entre ellos, los tocoferoles cuyo contenido se verá modificado por el proceso de refinación.

Los tocoferoles cumplen una función biológica importante al participar en vías metabólicas que retardan el envejecimiento celular. La concentración de éstos, en distintas variedades de olivas, variará de manera tal, que es posible establecer el contenido de tocoferoles como un parámetro de calidad del aceite, tanto desde el punto de vista nutricional, como de su estabilidad. La estabilidad estará en directa relación con el contenido de antioxidantes presentes en los aceites, entre los cuales junto con los tocoferoles, también se pueden mencionar los polifenoles. Es por esto que la identificación y determinación de estos constituyentes en los aceites de oliva, representa un parámetro importante para la caracterización y diferenciación de los Aceites de Oliva Vírgenes producidos Chile.

La dispersión en los valores encontrados para los tocoferoles en los diferentes estudios citados, anteriormente, señalan que las diferencias se deben a múltiples causas: genéticas, factores agroclimáticos, técnicas de cultivo, maduración del fruto y tiempo de almacenamiento. Por lo que la magnitud en que cada variable modifica el contenido de tocoferoles en los Aceites de Oliva Virgen debe ser sujeta estudio. Cuantificar y caracterizar estos constituyentes en productos nacionales entregará una herramienta robusta que podría diferenciar los aceites chilenos de aceites obtenidos en otras latitudes.

## 8. REFERENCIAS

1. Aguilera M<sup>a</sup>P., D. Ortega, G. Beltrán, A. Jiménez, A. Fernández, M. Uceda. Caracterización del aceite de oliva virgen de variedades italianas (Frantoio y Leccino) Cultivadas en Andalucía.
2. Albin A., J Villamil. 2003. Aceite de Oliva tradicional sabor mediterráneo, rejuvenecido en tierra Uruguayas.
3. Arbosana IRTA i43. Vitis Navarra selección. Disponible en Internet: <http://www.vitisnavarra.com/imgs/PDFs/arbosana.pdf>
4. Arguelles S., S. García, A. Machado, A. Ayala. 2004. El uso de antioxidantes en el control del envejecimiento. Medicina estética.com, revista profesional, sumario nº 17. Sevilla, España.
5. Avello M., M. Suwalsk. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Concepción, Chile.
6. Baracaldo C., E. Poveda., E. Ordóñez., M. Rodríguez., P. Ayala., W. Delgado., M. Guerra. 2004. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementación con aceites vegetales de diferentes fuentes.
7. Barranco D., R. Fernández-Escobar, L. Rallo. 2008. El Cultivo del Olivo. Madrid, España.
8. Beltrán G., A. Jiménez, C. Del Río, S. Sánchez, L. Martínez, M. Uceda, M. P. Aguilera. 2010. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. España.
9. Boskou, D. 1998. Química y tecnología del Aceite de Oliva. Universidad de Aristóteles de Salónica. Grecia.
10. C. Baracaldo, E. Poveda, E. Ordóñez, M. Rodríguez, P. Ayala, W. Delgado, M. Guerra. 2004. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementación con aceites vegetales de diferentes fuentes. Lecturas sobre Nutrición no. 44. Instituto Nacional de Salud. Colombia.
11. Carmona I., G. Moglia. Asociación de productores de Aceite de Oliva Chile Oliva. Disponible en Internet: [http://www.chileoliva.cl/en\\_chile.php](http://www.chileoliva.cl/en_chile.php)
12. Cayuela J.A., J.M. García, F. Gutiérrez. 2006. Influencia de la producción integrada del olivar sobre la calidad del aceite de oliva virgen.

13. Cimato A. 1990. La calidad del aceite de oliva virgen y los factores agronómicos. *Olivae* N°31, p. 20-31.
14. Conrado S. 2008. Análisis proximal de semillas no comunes: Palma Chilena (*Jubaea chilensis*), Cilantro (*Coriandrum sativum*), Mora (*Rubus glaucus*), Rosa Mosqueta (*Rosa* aff. *rubiginosa*) y su caracterización de su aceite.
15. E. Psomiadou, M. Tsimidou. 1998. Simultaneous HPLC Determination of tocopherols, carotenoids and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *J. Agric. Food Chem* 46. Aristotle University of Thessaloniki, Greece.
16. Enciclopedia encydia beta. Disponible en Internet: <http://es.wikilingue.com/ca/Koroneiki>
17. Espinoza C., R. Carrasco, S. Jacobsen. Determinación de tocoferoles por HPLC en aceite de Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro14/cap5.9.htm>
18. Fitó M. 2003. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos.
19. Gimeno E., A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. De La Torre, M. C. López-Sabater. 2001. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (Phenolics,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotene) in virgin olive oil. España.
20. Glyszyńska A., E. Sikorska. 2004. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. Poznań, Poland.
21. Gracia I. 2001. Obtención de aceite de orujo mediante extracción con fluidos supercríticos. Universidad de Castilla.
22. Guerrero J., 1994. Nueva Olivicultura. 281 p. Tercera Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
23. Guinda A., A. Lanzón, J.J. Rios, T. Albi. 2002. Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexano.
24. Humanes, Civantos. 1992. El aceite de oliva (2ª parte).

25. Huneus., Polloni, A. Navarro, C. Vial, C. Vergara. 2000. Consorcio viveros de Chile S.A. Chile. Disponible en internet: <http://cvchile.cl/CAT/cat.htm>
26. Instituto Agronómico per l'Oltremare – Firenze. 2009. Promotion of the Production and Marketing of Olive Oil. Pakistan. Disponible en internet: <http://www.oliveoilpakistan.com>
27. ISO 3696: 1987, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods.
28. ISO 5555: 1991, Animal and Vegetable fats and oils - Sampling.
29. ISO 5725: 1986, Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.
30. Jamett F., A. Benavides., H. Troncoso y M. Astorga. 2007. Caracterización de aceites de oliva en zonas de la Región de Coquimbo. 68p. Boletín Inia 161. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Intihuasi, La Serena, Chile.
31. Loyola N., R López., C Acuña. 2008. Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva extravirgen.
32. Matos Luis., S. Cunha, J. Amaral, J. Pereira, P. Andrade, R. Seabra, B. Oliveira. 2005. Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobranc, osa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. Portugal.
33. Navas P. 2009. Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinífera* L.) con énfasis en los componentes minoritarios. Archivos latinoamericanos de nutrición. Órgano oficial de la sociedad Latinoamericana de nutrición. Venezuela.
34. Olivid viveros. Disponible en Internet: <http://www.olivid.com.ar/variedades/coratina.html>
35. Pinto J., J. Martínez. 2005. El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Sanidad y Consumo.
36. Pocklington W., Dieffenbacher. 1988. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography. UIPAC Vol. 60 No. 6.

37. Pramparo M., S. Prizzon., M.A. Martinello. 2005. Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización.
38. Rodas B., S. Morera, A. I. Castellote, M. C. López-Sabater. 2003. Rapid determination by reversed-phase high performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. Barcelona, España.
39. Rodríguez J., J. Menéndez, Y. Trujillo. 2001. Radicales libres en la Biomedicina y estrés Oxidativo. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Cuba.
40. Romero C., A. García, M. Brenes, P. García, A. Garrido. 2003. Contenido polifenólico del aceite de oliva.
41. Sakouhi F., S. Harrabi, C. Absalon, K. Sbei, S. Boukhchina, H. Kallel. 2007.  $\alpha$ -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea Europea L.*): Changes in their composition during ripening and processing. Tunisia.
42. Sayago A., M.I. Marín, R. Aparicio, M.T. Morales. 2007. Vitamina E y Aceites Vegetales. Sevilla, España.
43. Tapia F., A. Ibacache, C. Sierra, P. Larraín, F. Riveros, L. Martínez. 2009. Seminario manejo agronómico industrial olivícola. 91p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Intihuasi, Chile.
44. Tous J., A. Romero. Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Cataluña, España.
45. Troncoso H., F. Jamett, A. Benavides y M. Astorga. 2006. Caracterización de aceites de oliva en zonas de la Región de Coquimbo. 30p. Boletín Inia 153. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Intihuasi, La Serena, Chile.