

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



Estudio de la composición fenólica del aceite de oliva virgen extra : caracterización y reactividad antioxidante

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Mercedes Becerra Herrera

Fecha de lectura: 24 de julio de 2013

Bajo la dirección de los doctores:

Rafael Beltrán Lucena
Ana Sayago Gómez

Huelva, 2013



UNIVERSIDAD DE HUELVA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



**Universidad
de Huelva**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA:
CARACTERIZACIÓN Y REACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:

Mercedes Becerra Herrera

Bajo la dirección de los directores:

Rafael Beltrán Lucena

Ana Sayago Gómez

Huelva, 2013

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA:
CARACTERIZACIÓN Y REACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Directores:

Dra. Ana Sayago Gómez
Profesora Titular de
Universidad

Dr. Rafael Beltrán Lucena
Catedrático de escuela
universitaria



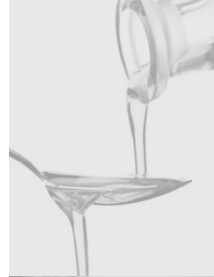
**UNIVERSIDAD DE HUELVA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y
CIENCIA DE LOS MATERIALES
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora
presentada por:

Mercedes Becerra Herrera

Agradecimientos



Bueno, pues aquí están... las primeras páginas que se lee todo aquel que abre una tesis. Espero sinceramente que todos os deis por aludidos; estas letras son realmente lo más importante de estos 4 años de trabajo que se culminan en este pequeño manuscrito, porque vosotros hacéis que todos los momentos vividos hayan merecido la pena.

No puedo empezar de otro modo sino que agradeciéndoles a mis directores de tesis, la Dra. Ana Sayago y el Dr. Rafael Beltrán, la confianza puesta en mí desde el primer día que pisé el laboratorio. Gracias por vuestra paciencia, por vuestro incondicional apoyo, por vuestro cariño y amistad, y por tan buenos ratos diarios tomando café... o tila.

También se merece una mención especial el Dr. Uwe Pischel, quien se ha comportado como director no oficial en parte de esta tesis prestándome toda su ayuda y conocimientos siempre que lo he necesitado. También agradecerle a Patri, Vania y Katia su ayuda y alegría en múltiples días compartidos en el Marie Curie.

A Mariluz, Valeria, María Beltrán, Dolores, Ikram y M^a Ángeles, compañeras de trabajo y amigas que han estado a mi lado tanto para hacer hablar a un HPLC en un momento de desesperación, como para reír luego de estos y otros miles de inolvidables momentos. A Daniel, por su ayuda, dedicación y su gran humor. Y cómo no, a Pepe, profesor de las puertas *rojas* que creyó en mi constancia y me empujó a este camino.

Cómo no mencionar a la gente que conocí en el Máster de Tecnología Química cuando inicié este camino. Lourdes, Juan,

Vero, Migue y M^a Ángeles, entre otros. Grandes compañeros y amigos que me abrieron sus puertas *azules* para ayudarme, compartir frustraciones, y sobre todo regalarme cada mañana el mejor de los saludos para tener un gran día.

Algo fundamental en mi trabajo diario ha sido el saber que iba a compartir un rato de descanso y absoluta diversión con los chicos de las puertas *verdes*. Gracias a Alberto “Waka”, Andrés, Alberto Vélez y Adrián por lograr que todos los momentos compartidos vayan acompañados de grandes carcajadas; son el mejor equipo A de Alegría, Ánimo, Amistad y Admiración por sus “peculiares bailes”, que he conocido y conoceré.

Otro gran pilar han sido las chicas bioquímicas e Iván. Gracias a Marta Vila, Rosa y María Cuaresma por contagiarme vuestro entusiasmo cada día. Iván, mil gracias por no pensar ni un segundo la respuesta cuando te he necesitado. A ti, por tus visitas diarias, y por la felicidad que irradas (que gran parte sabemos que se la debes a Juan), gracias Marta por innumerables momentos juntas.

Hemos llegado ahora hasta las puertas *amarillas*, gracias a Lola, Dino, Marco, Francisco, Diana, Julio y Alba por abrirme las puertas de sus casas y de sus vidas desde el día que los conocí.

Ahora es el momento de mi gente de siempre, mis “ambientólogos-trastocados”: Rafa, Sonia, Manuel, David, Meli, Lorena, Rafi, Fernando, Caro, Patri, Gonzalo, Fran, Luis, Lola, Adri, Carlos y Gracia (lo mejor que hay en la oficina de posgrado, gracias amiga!). Todo empezó en una sala de lectura del Galileo, y aquí

seguimos 11 años después, incansables de compartir ratos juntos porque es *iyo, deeeeeee locos* la suerte de tenernos... Sois la familia que me he permitido elegir y estoy realmente orgullosa de formar parte de ella.

Gran momento en este periodo ha sido mi estancia en Lecce, donde he trabajado con un equipo fantástico que me ofreció toda su amistad y cariño salentino desde que aterricé. Grazie mille a Giuseppe Vasapollo, Giuseppe Mele, Anna, Ermelinda, Rosy, Sonia e Raffaello. Non ho parole per descrivere il modo con cui mi avete accolta. Questo é stato uno dei periodi migliori della mia vita.

Aunque estemos lejos, siempre buscamos un lugar donde tomar un café, ponernos al día y tener la suerte de que pareciera ayer la última vez que nos vimos. A Víctor, Araceli, Noelia, Ale, Carlos, María Luisa, Patri, Ramón, Concha, Ángela, Charlie, Rosío, y en especial a Javi, mil gracias por las acogidas en casa, las ferias compartidas, las visitas exprés, y sobre todo, por las horas al teléfono demostrándome que la distancia es sólo un número que no dificulta la más sincera de las amistades.

Declaro culpables a tres grandes mujeres de que hoy esté yo aquí. Encarni, sister culpable por engancharme en la investigación, por ser mi mayor apoyo, y por estar siempre enrreándome para saber disfrutar cada día. Laura, culpable por enseñarme el valor de lo auténtico, y por mimarme tanto, jaja. María S., culpable porque hoy esté aquí en el momento oportuno, por ayudarme a cumplir mi sueño y por darme siempre sus mejores ánimos ante las adversidades varias del trabajo y de la vida. Gracias chicas, os quiero!

Gracias a las nuevas Estrellas que brillan de un modo muy especial en mi corazón, y a Manuel, el gran pilar que cimienta esa familia que me ha abrazado del modo más sincero, transparente y cariñoso que he visto jamás.

A Manu, que llegó a mi vida la vez que este reto para ayudarme a apreciar la multitud de momentos maravillosos que ambos me iban a aportar. Porque haces que quiera superarme cada día, por tu paciencia infinita, y porque haces que todos mis sueños se hagan realidad, GRACIAS.

Primazas; Concha, María, Carmen y Chari, y primazos... qué familia! Gracias por estar siempre disponibles tanto para disfrutar juntos como para prestar todo vuestro cariño y ayuda. Y finalmente, agradecerles a quienes se han sacrificado y a su vez más me han apoyado para que yo cumpliera este sueño; a mi familia. A mi padres y mi hermana, porque me han inculcado el valor del trabajo, de la entrega incondicional a tus seres queridos y de lo que representa la palabra Familia. A mi madre, paciente y comprensiva como nadie, mi ejemplo a seguir por su refrán "haz el bien y no mires a quién". A mi padre, que me ha contagiado su energía y su perfeccionismo y es el hombre más generoso que puedas conocer. Y a mi pequeña, hermana y mejor amiga, que me ha dado el punto de vista alternativo que necesitaba en más de una ocasión, por las charlas interminables, por su ternura y su infinita confianza. Ya sé por qué estas letras son las más difíciles de escribir; porque sin vosotros, nada de esto hubiese sido posible.

Nella vita l'amico è come l'aqua nel deserto. GRACIAS.

Resumen



El consumo y la producción de aceite de oliva virgen (AOV) se ha incrementado en los últimos años de manera considerable, lo que otorga a este producto de una gran importancia económica y social. Entre los compuestos del aceite de oliva, los fenoles resultan fundamentales para la estabilidad, sabor y aroma del aceite. Por ello, el estudio de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos presentes en el aceite y la caracterización de dichos compuestos se han convertido en temáticas de gran relevancia en la investigación de los efectos beneficiosos del AOV en la salud, motivo por el cual, se ha incluido este alimento dentro de los denominados “alimentos funcionales”.

Así pues, en la primera investigación realizada (capítulo 2) se hace uso del fluoróforo 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-eno (DBO) como alternativa al tradicional método espectrofotométrico en el cual se utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•). Esta nueva metodología proporciona un valor fijo, k_q ($M^{-1}s^{-1}$), para cada compuesto; siendo éste más fiable que el valor porcentual, Q , obtenido con el DPPH•.

Al comparar los resultados obtenidos con ambos ensayos, se ha comprobado que existe una relación estructura-reactividad antioxidante perfectamente correlacionada utilizando ambos métodos. Así pues, debido a sus ventajas inherentes, se propone el uso del DBO como método para determinar la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos.

Con el fin de aplicar este método a muestras de AOV, se compararon tres diferentes métodos de extracción de fenoles

totales (extracción líquido-líquido (ELL), micro extracción líquido-líquido (MELL) y extracción líquido-líquido con sonda de ultrasonido (ELLSU)) para trabajar del modo más eficiente posible (capítulo 3). El análisis estadístico de los datos demostró que el método MELL era un buen candidato para extraer fenoles totales.

Teniendo en cuenta el trabajo previo realizado con la Dra. Pizarro (*Pizarro et al., 2013*), en el cual se demostró que el método MELL era el más recomendable para extraer fenoles individuales en AOV, éste método fue optimizado con el fin de mejorar esta metodología. Los porcentajes de recuperación del método obtenidos fueron superiores al 80% para la mayoría de los compuestos estudiados.

Como una primera aproximación, para analizar los compuestos fenólicos individuales, se utilizó una cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector UV-Vis de diodos (HPLC-DAD). Trece compuestos fenólicos en una disolución estándar y en un aceite de oliva refinado dopado (AORD) fueron identificados y cuantificados. De este modo, queda demostrada la viabilidad de esta metodología para el fin propuesto.

Finalmente, con el objetivo de obtener mayor información cualitativa y cuantitativa de la composición fenólica del AOV, se desarrolló un método que combinaba la MELL con un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) acoplado a una fuente de ionización electrospray (ESI) y un detector de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (capítulo 4).

Se trabajó en el modo Reacción Múltiple Dinámica Monitorizada (DMRM); en el cual, se hace uso de tiempos específicos para cada compuesto, lo que proporciona una mayor selectividad y sensibilidad en los resultados.

La metodología propuesta se utilizó en una disolución multiestándar y en un aceite de oliva refinado dopado (AORD) y los valores obtenidos de repetitividad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación fueron menores en el AORD. También se ha estudiado el efecto matriz, los porcentajes de recuperación y la eficiencia del proceso haciendo uso del AORD. La aplicabilidad y fiabilidad de esta metodología se han confirmado con muestras de AOV reales de diferentes variedades.

Abstract



Virgin olive oil (VOO) production and consumption has significantly increased during the last years as a result of the worldwide recognition of the health benefits offered by the Mediterranean diet. VOO represent a global industry with substantial economic and social influence in many different countries. Phenols are between the most important compounds in VOO, influencing its stability, taste and aroma. Hence, the characterization (e.g., antioxidant reactivity) and quantification of VOO phenolic compounds has become fruitful and cutting edge research topic within food and analytical chemistry research areas. In this respect, VOO has recently been categorized by as “functional food” due to its demonstrated health benefits.

To this end, the first research covered in this thesis (chapter 2) compared two different analytical methods to measure phenols antioxidant reactivity. A conventional and well-established spectrophotometric method using the free radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) was compared with a new approach based on the use of the 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-eno (DBO) fluorophore. One of the main benefits of using the DBO method is obtaining a more accurate fix value, k_q ($M^{-1}s^{-1}$), for each compound instead of the percentage value, Q , offered by the DPPH• method.

The existence of a correlation between the chemical structure of each studied phenol and its antioxidant reactivity was proposed by both analytical procedures. Nevertheless, due to its inherent advantages as its lower cost and higher sensitivity, the DBO

method is proposed as the best analytical method to study the antioxidant reactivity of phenolic compounds.

Previous to the application of the DBO method to phenolic compounds from VOO it is necessary to assess the best extraction method to separate such phenolic compounds from other VOO components. To this respect, the third chapter of this thesis was dedicated to the comparison between three different extraction methods for the selective recovery of total phenols from VOO, namely: liquid-liquid extraction (LLE), liquid-liquid micro extraction (LLME) and liquid-liquid ultrasonic extraction (LLUSE). The statistical analysis of the results suggested the LLME method as the best candidate to extract total phenols from VOO.

Taking into account the results obtained in the previous collaborative research with Dr. Pizarro (*Pizarro et al., 2013*), where the LLME method was presented as the best extraction method to recover individual phenols from VOO, the LLME was selected as the extraction procedure previous to analyze both individual and total phenols in VOO. The recovery percentages obtained with this extraction method were consistently higher than 80% for the great majority of phenolic compounds studied.

As a first approach to analyze individual phenolic compounds, a high performance liquid chromatography equipped with a diode-array detector (HPLC-DAD) was used. This analytical technique allowed the identification and quantification of 13 of phenolic compounds in standard solutions and spiked refined olive oil (SROO).

The final study comprising this thesis research (chapter 4) aims to design and optimized a combined analytical method to obtain precise and sensitive qualitative and quantitative information of VOO phenolic composition. To this end, after VOO phenols were extracted using the LLME procedure, the samples were analyzed employing an ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) technique coupled to an electrospray ionization source (ESI) and tandem mass spectrometry (MS/MS). The MS/MS was used in dynamic multiple reaction monitoring (DMRM) mode, which allows an unequivocal identification and a reproducible quantification of VOO phenols in a wide range of concentrations.

This coupled analytical method was tested using multi-standard solutions and SROO. The results obtained in terms of reproducibility, repeatability and detection and quantification limits were favorable for the SROO samples. Additionally, a careful assessment of the matrix effect and the concomitant ion suppression/enhancement effect, the recovery percentages and the process efficiency was obtained for the SROO samples. Finally, the reliability and versatility of the state-of-the-art analytical technique employed and the analytical method designed was proved using three real samples of extra virgin olive oil.

Índice



CAPÍTULO 1: Introducción	1
1.1. EL ACEITE DE OLIVA	3
1.1.1. Contexto histórico y actual	3
1.1.2. El aceite de oliva virgen	7
1.1.3. Variedades españolas de aceitunas	8
1.1.4. Composición química del aceite de oliva	10
1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	13
1.3. OBJETIVOS	15
1.4. ESTRUCTURA DE LA TESIS	16
CAPÍTULO 2: Determinación de la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos mediante el radical libre DPPH• y la sonda fluorescente DBO	19
RESUMEN	21
ABSTRACT	23
2.1. INTRODUCCIÓN	25
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	30
2.2.1. Materiales	30
2.2.2. Ensayo con la sonda fluorescente DBO	31
2.2.3. Ensayo con el radical libre DPPH•	32
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
2.3.1. Desactivación (quenching) de la fluorescencia del DBO	35
2.3.2. Reactividad antioxidante obtenida mediante el uso del radical DPPH•	41
2.3.3. DBO vs DPPH	44
2.4. CONCLUSIONES	49

CAPÍTULO 3: Estudio comparativo de diferentes métodos de extracción para la determinación de la fracción fenólica del aceite de oliva	51
RESUMEN	53
ABSTRACT	55
3.1. INTRODUCCIÓN	56
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	60
3.2.1. Reactivos	60
3.2.2. Muestras	60
3.2.2.1. Preparación de un aceite refinado dopado	61
3.2.3. Métodos	62
3.2.3.1. Extracción líquido-líquido de fenoles totales con embudo de decantación	62
3.2.3.2. Micro extracción líquido-líquido de fenoles totales	62
3.2.3.3. Extracción líquido-líquido de fenoles totales con sonda de ultrasonido	64
3.2.3.4. Determinación colorimétrica del contenido fenólico total	65
3.2.3.5. Micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales	67
3.2.3.6. Análisis con HPLC-DAD	70
3.2.3.7. Estadística	71
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
3.3.1. Comparativa entre los métodos de extracción de fenoles totales	72

3.3.2. Parámetros de calidad del HPLC-DAD	74
3.3.3. Diseño experimental del método: Micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales	76
3.3.4. Repetitividad, reproducibilidad y porcentaje de recuperación del método completo para determinar fenoles individuales	84
3.3.5. Análisis de muestras reales	86
3.4. CONCLUSIONES	90

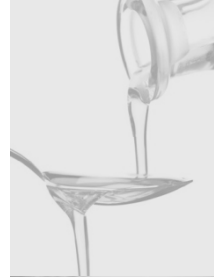
CAPÍTULO 4: Desarrollo de un método basado en una micro extracción líquido-líquido acoplada a un UHPLC-ESI-MS/MS para determinar compuestos fenólicos en el aceite de oliva

RESUMEN	93
ABSTRACT	95
4.1. INTRODUCCIÓN	96
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	100
4.2.1. Muestras y reactivos	100
4.2.2. Proceso de extracción	101
4.2.3. UHPLC-ESI-MS/MS	102
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
4.3.1. Optimización del método para determinar compuestos fenólicos	105
4.3.2. Parámetros de control de calidad	110
4.3.3. Análisis de muestras de aceite	115
4.3.3.1. Efecto matriz, porcentaje de recuperación y eficiencia del proceso	115

4.3.3.2. Validación y aplicación del método en muestras de aceite	118
4.4. CONCLUSIONES	125
CAPÍTULO 5: General conclusions	127
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXOS	155
Anexo 1. Índice de tablas	157
Anexo 2. Índice de figuras	160
Anexo 3. Relación de artículos publicados relacionados con la temática de la Tesis	164

Capítulo 1

Introducción



1.1. EL ACEITE DE OLIVA

1.1.1. Contexto histórico y actual

El legendario árbol del olivo y el aceite obtenido de sus frutos han acompañado a la historia de todas las culturas que se han desarrollado en la cuenca mediterránea. Ha jugado un papel ponderante en numerosos aspectos de la vida cotidiana tales como en la preparación de alimentos, cosmética, farmacopea y religión, entre otros. (Goor, 1966).

Una visión lo más general y certera posible sobre la producción, comercio y consumo del aceite de oliva en la actualidad nos hace conscientes de la importancia de éste en la economía de ciertas partes del mundo. Hoy en día, su producción se ha extendido más allá de las zonas mediterráneas, pero aún son éstas las mayores productoras de dicho aceite. Como se muestra en la Tabla 1.1, España es el país con mayor superficie cultivada y con la mayor producción de aceite del mundo. En el gráfico de la figura 1.1, quedan representados los porcentajes de producción de aceite de oliva mundial de cada uno de los países (*todos los datos estadísticos que se presentan en esta sección pertenecen a las bases de datos del COI (Consejo Oleícola Internacional), los cuáles son el resultado de recopilar las cifras suministradas regularmente por los estados miembros. También hay datos obtenidos de la FAO (Food and Agriculture Organization) de Naciones Unidas*).

La tabla 1.1 muestra los valores medios de las campañas olivareras desde el año 2007 hasta el año 2012. Como puede observarse, la superficie que empleada para este cultivo en España es muy superior al resto de países, lo que hace que su producción sea también considerablemente mayor.

Tabla 1.1. Superficie utilizada y producción de aceite de oliva de los países del mundo.

Países	Superficie ha (×1.000)	Producción
España	2573	1334.1
Italia	1167	474
Grecia	1230	309.4
Túnez	1600	156
Siria	500	151.6
Turquía	897	140
Marruecos	720	112
Mundo	10700	2876.6

Media de las campañas de 2007/08 a 2011/12. Fuente: ICO.

Debido a la producción y al consumo de aceite de oliva en nuestro país, éste se ha convertido en un producto clave en el comercio español. Por ello, la reglamentación para el mismo está siempre actualizada. Las características físicas, químicas y organolépticas de los aceite de oliva y orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de tales características están regidas por el Reglamento de ejecución (UE) n° 299/2013 de la comisión de 26 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

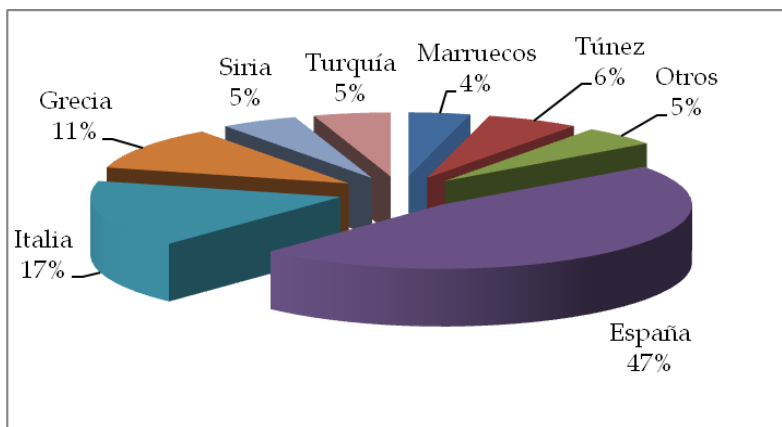


Figura 1.1. Porcentajes de los principales países productores de aceite de oliva.

En dicho Reglamento se hace incapié en que los Estados miembros se cercioren de que los controles de conformidad se lleven a cabo de forma selectiva, sobre la base de un análisis de riesgos, y con la frecuencia apropiada, con el fin de garantizar que el aceite de oliva comercializado se ajusta a la categoría declarada. La clasificación de los aceites de oliva establecida por este reglamento es la siguiente:

- Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 0.8%; su conterido en ceras es menor o igual a 250 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.
- Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 2%; su conterido en ceras es menor o igual a 250 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

- ☑ Aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, es superior al 2%; su conterido en ceras es menor o igual a 300 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

- ☑ Aceite de oliva refinado: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 0.3%, su conterido en ceras es menor o igual a 350 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

- ☑ Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes): aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 1%; su conterido en ceras es menor o igual a 350 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

En este trabajo, sólo se ha trabajado con aceite de oliva virgen extra, debido a que sus cualidades organolépticas (olor, color y sabor) y su capacidad antioxidante lo convierten en el mejor de los aceites tanto para uso gastronómico como para la salud (*Cicerale et al., 2012*).

1.1.2. El aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen, es el zumo natural procedente del fruto del olivo: olivas o aceitunas, que durante su elaboración no tiene contacto en ningún momento con productos químicos o disolventes orgánicos.

El aceite de oliva virgen se puede consumir crudo, sin necesidad de ser refinado (*Olías et al., 1993*). Ésta es la razón por la cual, la composición del aceite de oliva virgen no se ve alterada, conservando todas sus propiedades nutricionales, sus cualidades organolépticas y sus efectos beneficiosos para la salud, ya que durante el proceso de refinado de un aceite se pierden muchos compuestos, especialmente de la fracción insaponificable, de gran valor biológico, formándose nuevos compuestos (radicales libres, peróxidos, ácidos grasos conjugados, etc...), que pueden tener efectos nocivos.

Cuando este zumo oleoso procede de frutos sanos, recogidos en su mejor momento, de forma correcta y bajo una elaboración adecuada, da lugar a un aceite de excepcionales características organolépticas: olor, color y sabor. Una mala técnica de recolección del fruto, una maduración anormal o un tiempo inadecuado de almacenamiento en las tolvas a la espera de ser molturado, provocan la alteración del aceite de oliva, afectando a sus características organolépticas y aumentando su acidez, siendo necesario, en ocasiones, su refinado para que sea apto para el consumo humano.

1.1.3. Variedades españolas de aceitunas

Las variedades predominantes de aceitunas de almazara en España son las siguientes: Picual, Picudo, Arbequina, Hojiblanca, Cornicabra, Verdial, Empeltre y Lechín. En este trabajo, se ha trabajado con las variedades: Picual, Arbequina y Hojiblanca.

- ♣ Picual: Es la variedad más importante del mundo, representando el 50 % de las aceitunas y árboles de España y aproximadamente el 20 % mundial. Su difusión geográfica está claramente ligada a Andalucía, principal región productora a nivel mundial, y en concreto a las provincias de Jaén, Córdoba y Granada. Esta variedad recibe diferentes nombres según la zona de producción, pero su nombre principal se debe a la forma del fruto como un pezón pronunciado terminado en pico.



Figura 1.2. Aceitunas de la variedad Picual.

La aceituna madura es de color negro, tamaño mediano y presenta una relación pulpa/hueso alta, además de un elevado rendimiento graso (27%) (*Oliveras, 2005*). Desde el punto de vista físico-químico, su aceite resulta excelente por su composición de ácidos grasos y su cantidad de antioxidantes naturales.

- ♣ **Arbequina:** Se halla entre las variedades españolas más conocidas. Aunque llega a internarse en las provincias de Zaragoza y Huesca, en la comunidad de Aragón, es originaria de la localidad de Arbeca (Lérida), de donde le viene el nombre, encontrándose extensamente extendida por las provincias de Tarragona y Lérida, ambas en la comunidad de Cataluña. Es una variedad muy resistente al frío (*Fernández et al., 2010*). Su árbol de tamaño pequeño, permite su cultivo intensivo. Aunque su fruto es uno de los más pequeños utilizados, sus aceites son de exquisito flavor frutado, temprana producción, elevadas cosechas y buen rendimiento graso.



Figura 1.3. Aceitunas de la variedad Arbequina.

- ♣ **Hojiblanca:** su área de influencia se extiende por Andalucía, en concreto por el este de la provincia de Sevilla, Córdoba y Málaga. Su nombre se debe al color del envés de la hoja. Aunque con muchas oscilaciones, su fruto suele ser de tamaño grande a grueso alcanzando de media los 4,3 gramos. Su rendimiento en aceite es bajo, con una media entre 17-19%. El aceite presenta una composición de ácidos grasos muy equilibrada con ácidos saturados relativamente más bajos que en el resto de los aceites de otras variedades.



Figura 1.4. Aceitunas de la variedad Hojiblanca.

1.1.4. Composición química del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva es una matriz compleja compuesta principalmente por triglicéridos; en menor proporción, posee una composición de ácidos grasos muy característica, con un contenido en ácido oleico del 56-84% y un contenido del 3-21% de ácido

linoleico, y un 0.5-1.5% de constituyentes no glicéridos. Por lo tanto, en el aceite de oliva existen dos fracciones, una saponificable y otra insaponificable. Esta segunda, a pesar de estar en una menor proporción, contiene compuestos fundamentales para la estabilidad, sabor y aroma del aceite.

En el siguiente esquema (figura 1.5) se muestran los compuestos presentes en ambas fracciones:

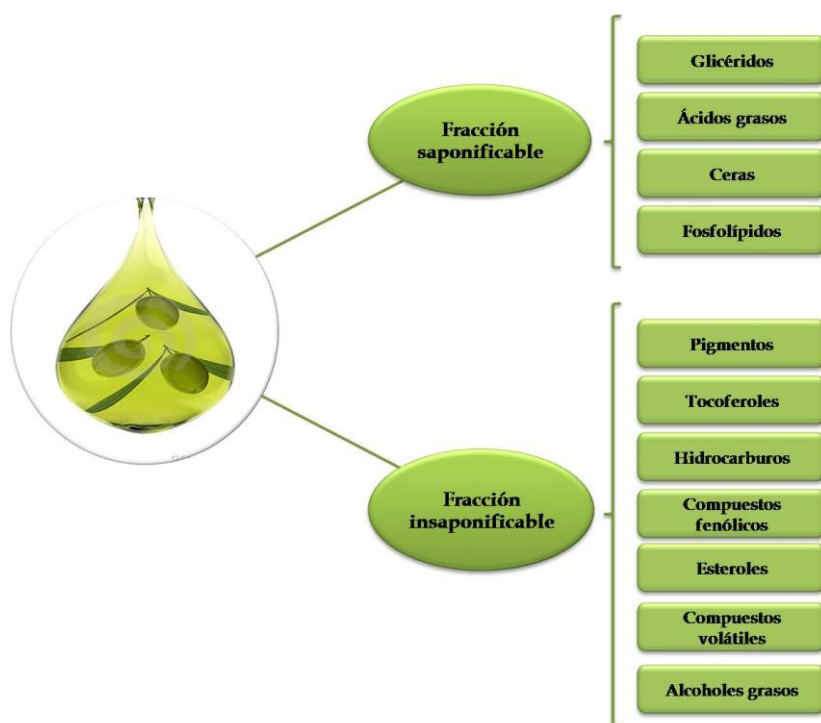


Figura 1.5. Esquema de la composición química del aceite de oliva virgen.

De todos estos compuestos presentes en el aceite, los compuestos fenólicos juegan un papel clave en la estabilidad y el sabor del aceite (Gutiérrez-Rosales et al., 1992); pero la concentración de ellos está muy influenciada por el clima (Kalua et al., 2005), la variedad de la aceituna, el proceso de extracción del aceite (Servili

et al., 1996), las condiciones de almacenamiento, etc (*Morello et al., 2004; Montedoro et al., 1992; Amiot et al., 1986*).

Por ello, en el siguiente apartado vamos a centrarnos en los compuestos fenólicos del aceite de oliva y sus funciones.

1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles son sustancias solubles en agua, que se encuentran en el mesocarpio de las aceitunas y se transfieren al aceite de oliva virgen durante el proceso de extracción. De todos los aceites de oliva, es en el aceite de oliva virgen, donde hay un mayor contenido de fenólico, ya que el proceso del refinado reduce drásticamente su contenido, mostrando importantes pérdidas en compuestos como la oleuropeína y el ligtrósido, y en lignanos (*Owen et al., 2000*).

En los últimos años, se habla de alimentos funcionales cuando se ha demostrado que un alimento posee un efecto beneficioso sobre una ó varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales (*Life Sciences Institute, Europe, 1999*). El aceite de oliva se ha considerado un alimento funcional gracias, entre otras propiedades, a los compuestos fenólicos que posee, lo que revela su importancia en el consumo habitual.

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva han manifestado tener las siguientes propiedades fundamentales:

- 1) Tienen una capacidad antioxidante superior a la de la vitamina E cuando actúan sobre la oxidación de lípidos y ADN (*Fitó et al., 2000; Visioli et al., 1999*).

- 2) Previenen la disfunción endotelial, causante de enfermedades como la arterioesclerosis, la hipertensión arterial, etc (*Carluccio et al. 2003*).
- 3) Mejoran la transcripción del ARNm de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (*Marsella et al., 2004*).
- 4) Poseen una potencial actividad quimiopreventiva y tienen efectos anti-inflamatorios (*Beauchamp et al., 2005*).

Por ello, el estudio de la actividad antioxidante de compuestos fenolicos presentes en el aceite y la caracterización de dichos compuestos se han convertido en temáticas de gran importancia en la investigación de los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la salud.

1.3. OBJETIVOS

Debido al papel que juegan los antioxidantes frente a la prevención de enfermedades; en la actualidad, la investigación está encaminada a conocer los mecanismos por los que el aceite de oliva virgen ejerce efectos beneficiosos para la salud. En este sentido, se pretende estudiar los mecanismos de acción antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen, así como caracterizar de la forma más efectiva posible, tales compuestos.

A partir este planteamiento, podemos desglosar los principales objetivos de la presente tesis en los siguientes:

- ✿ Determinar la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos utilizando un método espectrofluorimétrico alternativo a los espectrofotométricos tradicionales.
- ✿ Comparar y optimizar procedimientos de extracción de compuestos fenólicos totales e individuales para trabajar de la forma más eficiente y económica posible.
- ✿ Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos por técnicas de cromatografía de líquidos.
- ✿ Desarrollar una nueva metodología para determinar compuestos fenólicos en UHPLC-ESI-MS/MS.

1.4. ESTRUCTURA DE LA TESIS

La tesis está compuesta por esta introducción, tres capítulos principales y un capítulo último de conclusiones generales. A su vez cada capítulo principal está estructurado en introducción, metodología, resultados y discusión, y conclusiones; de tal forma que pueden ser leídos de forma independiente. Esta estructuración tiene el inconveniente de que cierta información puede resultar redundante, sin embargo debido a la variedad de temas tratados y enfoques empleados en los tres capítulos principales, se hace deseable dotar a cada capítulo de la independencia necesaria para su óptima comprensión. Según esto, la estructura de la tesis queda de la siguiente forma:

Capítulo 1: Introducción

En él se aborda el contexto histórico y actual del aceite de oliva, se realiza una descripción del aceite de oliva virgen como alimento funcional, sus variedades y su composición química. Por último, centramos la atención del mismo en los compuestos fenólicos presentes en el aceite y sus propiedades beneficiosas para la salud, lo que los convierte en nuestro objeto de estudio principal.

Capítulo 2: Determinación de la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos mediante el radical libre DPPH• y la sonda fluorescente DBO

En este capítulo se realizará un estudio de la reactividad antioxidante de los fenoles más representativos en el aceite de oliva

utilizando un novedoso método espectrofluorimétrico gracias al uso del 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-eno (DBO). Para proporcionar mayor fiabilidad al estudio, los resultados se compararán con los obtenidos por un ensayo espectrofotométrico paralelo utilizando el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•).

Capítulo 3: Estudio comparativo de diferentes métodos de extracción para la determinación de la fracción fenólica del aceite de oliva

En el tercer capítulo de la tesis se compararán tres métodos de extracción con el objetivo de encontrar la metodología más apropiada para extraer los compuestos fenólicos totales del aceite de oliva virgen. Logrado este primero objetivo, se optimizará el método elegido para extraer los compuestos fenólicos individuales y se optimizará una metodología basada en el empleo de un HPLC-DAD para identificar y cuantificar dichos compuestos de la forma más eficiente y rápida posible.

Capítulo 4: Desarrollo de un método basado en una micro extracción líquido-líquido acoplada a un UHPLC-ESI-MS/MS para determinar compuestos fenólicos en el aceite de oliva.

El cuarto capítulo optimizará una metodología donde se combinan una micro extracción líquido-líquido que nos permitirá economizar en tiempo y dinero; y una tecnología de última generación de análisis proporcionada por el uso del UHPLC-ESI-

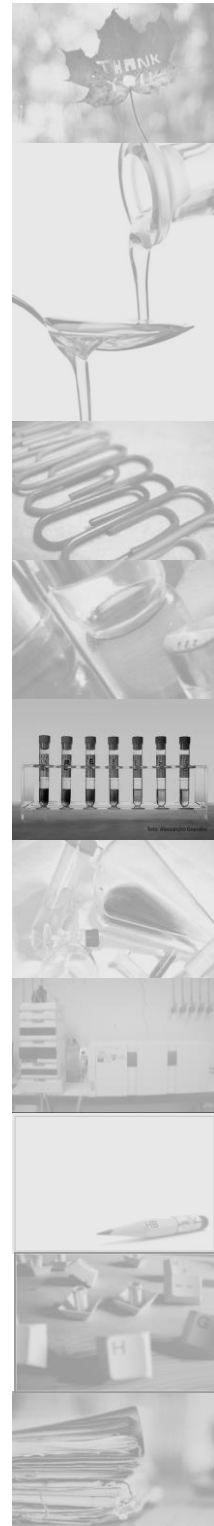
MS/MS que nos proporcionará una información fiable y reproducible de la composición fenólica del aceite de oliva.

Capítulo 5: Conclusiones generales

En el último capítulo se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en la realización de la tesis teniendo en cuenta los resultados y discusiones comentados en los capítulos anteriores.

Capítulo 2

Estudio de la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos mediante el radical libre DPPH• y la sonda fluorescente DBO



RESUMEN

La reactividad antioxidante de algunos compuestos fenólicos característicos del aceite de oliva virgen se ha analizado utilizando dos metodologías diferentes. Por un lado, se determinó la reactividad antioxidante gracias al método espectrofotométrico tradicional mediante el uso del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), y por otro lado, se ha utilizado el compuesto fluoróforo, 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-eno (DBO). Éste último ha supuesto una mejora en la medida debido a la utilización de la espectroscopía de fluorescencia para este propósito. Esta nueva metodología proporciona un valor fijo de una constante k_q ($M^{-1}s^{-1}$) para cada compuesto similar en diferentes disolventes. De este modo, la fiabilidad de los resultados se ha visto incrementada considerablemente.

Contrastando ambas metodologías, se han establecido 4 grupos basándonos en la relación estructura-reactividad antioxidante mostrada por los compuestos fenólicos estudiados. El estudio de esta información demuestra que la reactividad antioxidante aumenta en relación al número de grupos hidroxilo (-OH) y grupos metoxi (-OCH₃). Esto sucede porque el primero está involucrado en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y el segundo toma parte en el mecanismo de transferencia de protones acoplada a electrones (PECT). Además, debido al mecanismo PECT, un mayor número de insaturaciones en la cadena lateral del compuesto, y la posición *orto* del grupo -OH

suponen un incremento es la reactividad antioxidante del compuesto.

Por lo tanto, se propone el uso del DBO mediante espectroscopia de fluorescencia para determinar la reactividad antioxidante de los compuestos fenólicos como una alternativa rápida y eficiente en comparación con las técnicas anteriores aplicadas en este campo.

ABSTRACT

The antioxidant reactivity of some characteristic phenolic compounds from virgin olive oil has been analyzed using two methodologies. On one hand, it was tested the reactivity thanks to the traditional spectrophotometric method by using the free radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•); and on the other hand, the fluorophore compound, 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-ene (DBO) has allowed an improvement due to the use of fluorescence spectroscopy for this purpose. This new methodology provides a fixed value k_q ($M^{-1}s^{-1}$) for each compound which is also similar in different solvents. Because of that, a major reliability is given to the results.

Contrasting both methodologies, it has been established 4 groups basing on the structure-antioxidant reactivity relationship which is shown by the phenolic compounds studied. The study of all of this information proves that the antioxidant reactivity increases in relation to the number of hydroxyl (-OH) and methoxy (-OCH₃) groups. This happens because the first one is involved in the transfer of hydrogen atoms (HAT), and the second one takes part in the proton transfer mechanism coupled to electrons (PECT). Additionally, due to the PECT mechanism, the greater number of unsaturations the compounds have in their side chain, and the *orto* position of radical -OH, the higher antioxidant reactivity they show.

Thus, it is proposed the use of DBO by fluorescence spectroscopy to determinate the antioxidant reactivity of phenolic

compounds as a fast and efficient alternative comparing with previous techniques which were applied in this field.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son una de las fuentes más importantes de compuestos bioactivos de la dieta humana y se encuentran fundamentalmente formando parte de frutas, bebidas, chocolate, y en menor proporción, de verduras, legumbres y cereales. Esta familia de compuestos puede definirse como aquella en la cual sus componentes poseen como mínimo un anillo aromático unido al menos a un grupo hidroxilo (-OH). A lo largo de los años se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos (Orzechowski *et al.*, 2002; Saura-Calixto y Goñi, 2006). Representan a una amplia cantidad de sustancias divididas en subgrupos tales como: ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos.

Estos compuestos son potentes antioxidantes debido a su alta capacidad de captación de radicales libres ($R\bullet$) (Perona *et al.*, 2006). La principal característica estructural responsable de la reactividad antioxidante de los compuestos fenólicos (AH) es el grupo hidroxilo que poseen, debido al hecho de que los fenoles son capaces de donar el átomo de hidrógeno a los radicales libres, deteniendo así la cadena de propagación que se produce durante su proceso de oxidación. El mecanismo que tiene lugar es la inhibición o ralentización de los procesos después de que hayan comenzado capturando (*scavenging*) a los radicales portadores de cadena, generalmente, radicales peroxilo ($ROO\bullet$). El proceso detallado consiste en la transferencia de hidrógeno para formar hidroperóxidos ($ROOH$) y un radical mucho menos reactivo ($A\bullet$)

derivado del antioxidante. Un esquema simplificado de la forma de actuar estos antioxidantes se muestra en la figura 2.1.

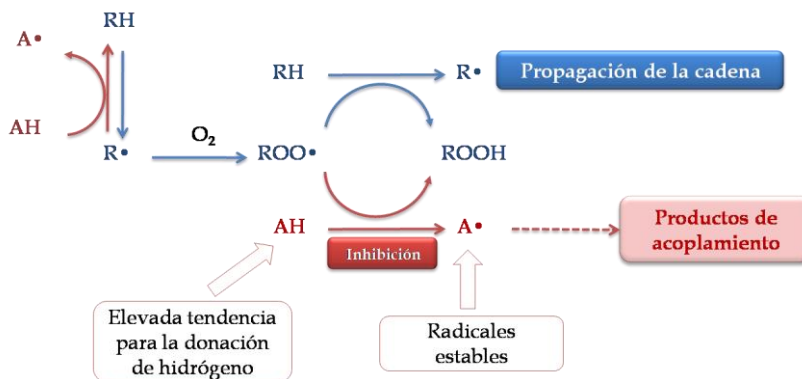


Figura 2.1. Mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes. AH : antioxidante, A^\bullet : radical estable, RH : sustrato, R^\bullet : radical libre, $ROOH$: hidroperóxido, ROO^\bullet : radical peroxilo.

Es bien conocido el hecho de que la presencia de un segundo grupo hidroxilo en la posición *orto* aumenta la tasa de transferencia de átomos de H a los radicales peroxilo (Lucarini y Pedulli, 1994). Además, la cadena de alquilo que conecta el anillo fenólico y el grupo carboxílico o alcohol que contienen algunos compuestos fenólicos es de vital importancia para estabilizar el radical formado (Nenadis et al., 2003). Todo esto ha hecho que haya crecido el interés en estudiar la reactividad antioxidante de varios compuestos fenólicos mediante métodos espectrofotométricos.

En los estudios de cinética de reacciones, el radical más utilizado ha sido el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($DPPH^\bullet$) (Liangli Yu et al., 2002; Sánchez Samaniego et al., 2007; Poerio et al., 2008; Koprivonajk et al., 2008). La importancia de este

radical se debe principalmente a características tales como su comportamiento en diferentes disolventes, estabilidad, color y disponibilidad comercial. Los antioxidantes fenólicos (AH) han sido un sustrato muy apropiado para estos estudios debido a que se presume que sus reacciones con DPPH• son similares a las reacciones con radicales peroxilo, ROO•.

En anteriores estudios se han establecido dos mecanismos diferentes que suceden en la abstracción de átomos de hidrógeno de los fenoles (*Litwinienko e Ingold, 2007, Foti y Daquino, 2006*): la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y la transferencia de protones acoplada a electrones (PECT) (*Tishchenko et al., 2008*). Estos procesos complican el estudio de la reactividad antioxidante de los fenoles si sólo se utiliza la medida obtenida de la cinética de la reacción del antioxidante con el radical estable DPPH• en un espectrofotómetro convencional (*Foti et al., 2011*).

Para dar solución a esta problemática, en este trabajo se ha estudiado la reactividad antioxidante de los fenoles mediante la desactivación (*quenching*) de la fluorescencia de la sonda 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-eno (DBO), la cual posee una alta sensibilidad y selectividad hacia el mecanismo de acción de los antioxidantes (figura 2.2). Su aplicación es sencilla y además la reacción es inmediata, lo que supone un gran ahorro de tiempo. Este cromóforo, cuando se encuentra en estado excitado singlete n,π^* , se comporta de forma similar a un radical libre (*Nau, 1998*).



Figura 2.2. Estructura molecular del 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-eno (DBO).

De este modo, la eficacia de los compuestos fenólicos como captadores de radicales se evaluó mediante su reactividad hacia una sonda de fluorescencia 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-eno (DBO) en estado excitado singlete n,π^* (Pischel *et al.*, 2006; Anbazhagan *et al.* 2008a, b; Anbazhagan y Renganathan, 2009; Nau, 1998). El DBO muestra una pronunciada tendencia a experimentar reacciones directas de abstracción de hidrógeno con alcoholes, éteres, alcanos, fenoles y alquilbencenos. Aprovechando esta propiedad, el DBO se ha utilizado en este trabajo para investigar la reactividad antioxidante de diversos compuestos fenólicos procedentes del aceite de oliva y la relación de ésta con la estructura del compuesto, ya que previamente Torres de Pinedo y col. describieron esta relación utilizando el radical estable DPPH• (Torres de Pinedo *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos con este método fluorimétrico fueron contrastados con los obtenidos utilizando el radical estable DPPH•.

Como se ha citado anteriormente, el consumo de aceite de oliva presenta efectos beneficiosos para la salud, lo que lleva a considerarlo como un ingrediente básico en la dieta mediterránea (Owen *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2004; Cicerale *et al.*, 2008). La importancia de este alimento se debe, entre otras cualidades,

a las propiedades antioxidantes que posee gracias a la elevada cantidad de compuestos fenólicos que se han encontrado en él; por este motivo, los fenoles elegidos para este trabajo han sido algunos de los más representativos en el aceite de oliva (*Bendini et al., 2007*). En la figura 2.3 se muestran los compuestos fenólicos seleccionados.

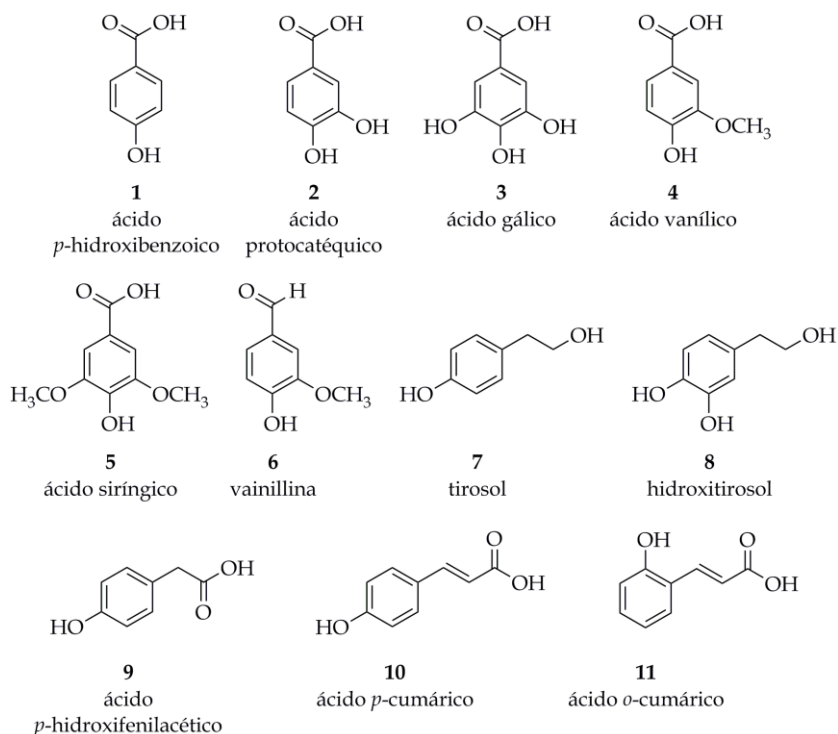


Figura 2.3. Estructuras de los compuestos fenólicos.

Como puede observarse en la figura 2.3, las estructuras de los compuestos son muy diversas, lo que se intuye que puede proporcionar bastante información sobre las posibles reacciones que se espera que sucedan en los dos estudios realizados.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales

El DBO se obtuvo como donación del Prof. W. M. Nau, Universidad Jaccobs de Bremen, Alemania, y se sintetiza de acuerdo con un procedimiento previamente publicado (*Askani, 1965*). El ácido gálico (99%), ácido protocatéquico (97%) y ácido siríngico (98%) fueron adquiridos de Aldrich. El DPPH• (99%), ácido vanílico (97%), vainillina (98%), tirosol (97%), ácido *p*-hidroxifenilacético (100%), ácido *p*-hidroxibenzoico (99%), ácido *p*-cumárico (98%) y *o*-cumárico (97%), se adquirieron de Fluka. El hidroxitirosol fue adquirido del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Sevilla, España.

El metanol de calidad espectrofotométrica (99.9%) fue obtenido de Panreac. El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Para los ensayos con el radical libre DPPH•, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (Termo Spectronic Helios-γ v4.60, Cambridge, UK). Para los estudios de *quenching* de la fluorescencia del DBO se empleó un espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian, California, USA). Todas las medidas se realizaron por triplicado a temperatura ambiente en presencia de oxígeno.

2.2.2. Ensayo con la sonda fluorescente DBO

Este ensayo se realizó en dos disolventes diferentes: en agua Mili-Q y en una mezcla agua/metanol (76:24, v/v). Inicialmente se trabajó en agua Mili-Q porque el DBO en este disolvente tiene un tiempo de vida τ_0 superior al que tiene en otros disolventes, pero para poder comparar los resultados con los del ensayo con DPPH•, se realizaron también todas las mediciones en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v). De este modo también podemos comprobar si existen diferencias en las reactividades antioxidantes obtenidas para cada compuesto al utilizar diferentes disolventes.

La concentración de DBO con la que se trabajó fue controlada mediante el valor de absorbancia obtenido a 364 nm (λ_{\max}). Este valor fue de 0.05 para todos los ensayos.

Con el fin de obtener el *quenching* para cada antioxidante fenólico, 50 μL de cada compuesto a una concentración 0.04 M fueron añadidos a 3 mL de DBO disueltos en agua o en una mezcla de agua/metanol (76:24, v/v). Posteriormente, se administraron cantidades crecientes del antioxidante (siempre volúmenes de 50 μL). El espectro de fluorescencia se midió para $\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm. El *quenching* de la fluorescencia en el máximo de la banda de emisión del DBO (420 nm en agua y 417 nm en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v) fue monitorizado. Los datos se representaron de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 1):

$$\tau_0/\tau = I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [\text{AH}] \quad (\text{ec. 1})$$

Donde I_0 es la intensidad del DBO en ausencia de antioxidante, I es la intensidad del DBO en presencia de antioxidante, k_q es la constante de quenching, τ_0 es el tiempo de vida del DBO en ausencia de antioxidante y $[AH]$ es la concentración del antioxidante.

Las pendientes de las rectas obtenidas para cada antioxidante equivalen a: $k_q \tau_0$, por lo tanto, el valor de la pendiente dividido por el tiempo de vida τ_0 (en ausencia de antioxidante) nos proporcionó la constante bimolecular de quenching (k_q) para cada uno de los compuestos estudiados. El tiempo de vida τ_0 fue de 325 ns para los ensayos en agua (Nau et al., 1999) y de 75.3 ns (medida obtenida en un I900 TCSPC de Edinburgh Instruments) para los ensayos en la mezcla de agua/metanol (76:24, v/v).

2.2.3. Ensayo con el radical libre DPPH•

En este ensayo, la reactividad antioxidante de varios compuestos fenólicos se determinó mediante el uso del DPPH• que presentó su banda de absorción a 515 nm, desapareciendo ésta tras su reducción debido a la presencia de un antioxidante. La figura 2.4 muestra la reacción del DPPH• con una molécula antioxidante.

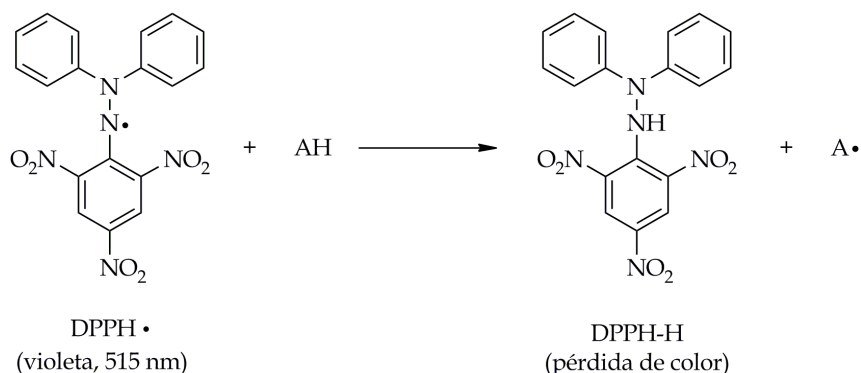


Figura 2.4. Estructura del DPPH antes y después de reaccionar con un antioxidante (AH).

Para realizar este ensayo, se preparó una disolución diariamente de DPPH• 0.06 mM en metanol. Los compuestos antioxidantes con una concentración 0.5 mM fueron disueltos en una mezcla agua/metanol (76:24, v/v). Se utilizó el metanol como blanco de referencia. La absorbancia se midió a 515 nm en una cubeta de cuarzo (1 cm de longitud de trayecto óptico), a la cual se añadieron 2 ml de solución de DPPH•. Posteriormente, 1 mL del estándar antioxidante fue añadido a los 2 mL de DPPH• y la absorbancia de esta mezcla se midió en el momento de adicionarlo y después de 5 minutos. Es importante señalar que los datos obtenidos han sido corregidos teniendo en cuenta la dilución que se produce al adicionar el antioxidante al DPPH•. La reactividad de captación de radicales libres fue expresada en términos de porcentajes de reducción de la absorbancia del DPPH•, y se calculó utilizando la ecuación 2:

$$Q = \frac{A_{DPPH\cdot} - A_t}{A_{DPPH\cdot}} \times 100\% \quad (\text{ec. 2})$$

Donde $A_{DPPH\cdot}$ es la absorbancia inicial del DPPH• en ausencia de antioxidante y A_t es la absorbancia tras la adición y a los 5 minutos. De este modo, obtenemos los siguientes valores de Q : Q_0 y Q_5 para el minuto 0 y 5, respectivamente.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Desactivación (*quenching*) de la fluorescencia del DBO

Los valores de *quenching* para los diferentes compuestos fenólicos fueron calculados en agua y en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v). Inicialmente, se empezó a trabajar en agua debido al largo tiempo de vida (τ_0) de la fluorescencia del DBO en ausencia de antioxidante en este disolvente ($\tau_0 = 325$ ns) (Nau *et al.*, 1999). Este disolvente presentó como problema que no todos los compuestos eran solubles en él; debido a ello, se decidió utilizar también la mezcla agua/metanol (76:24, v/v) como disolvente. El tiempo de vida del DBO en este disolvente en ausencia de antioxidante es de 75.3 ns. Este valor para el tiempo de vida de la sonda en ausencia de antioxidante fue medido en la Universidad Jacobs de Bremen, Alemania.

Cuando se realiza un barrido entre 350 y 600 nm para una λ de excitación de 364 nm; el espectro del emisión del DBO presenta su máximo a 420 nm cuando se emplea el agua como disolvente, y 417 nm para la mezcla agua/metanol (76:24, v/v). La figura 2.5 muestra un ejemplo del espectro de fluorescencia del DBO en el ensayo en el cual se ha utilizado ácido gálico como antioxidante y el agua como disolvente. Se observa como a medida que aumenta la concentración de antioxidante se va produciendo una disminución del valor de la intensidad inicial de la fluorescencia del DBO. La cantidad de *quenching*, la cual se cuantificó mediante

datos experimentales obtenidos de la intensidad del DBO en ausencia (I_0) y en presencia de antioxidantes (I), depende de la concentración del antioxidante; y la constante de la reacción (k_q) debe respetar la ecuación de Stern-Volmer. Las regresiones obtenidas a partir de los datos experimentales para el *quenching* de la fluorescencia fueron lineales para todos los antioxidantes estudiados proporcionando resultados muy consistentes.

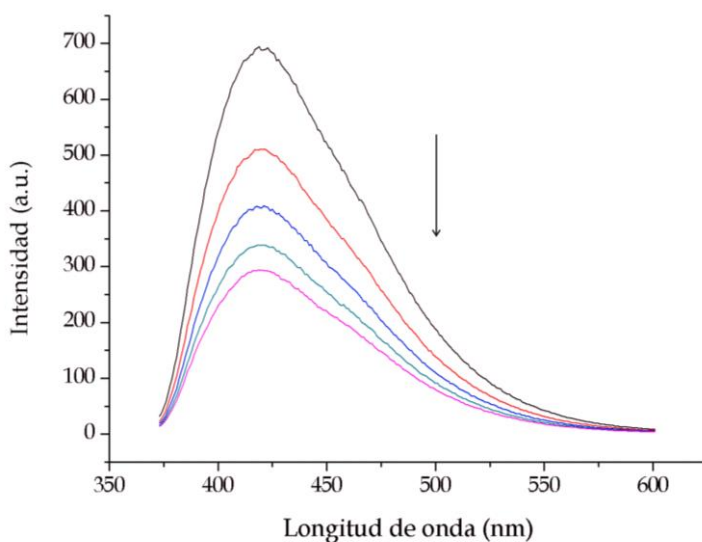


Figura 2.5. Espectro del *quenching* de la fluorescencia del DBO en agua al interactuar con diferentes concentraciones de ácido gálico.

El proceso de desactivación (*quenching*) puede producirse mediante dos mecanismos: la abstracción directa del átomo de hidrógeno o la formación de un complejo excitado de transferencia de carga (Pischel *et al.*, 2000; Pischel y Nau, 2000). Valgimigli y sus colaboradores concluyeron que la abstracción de hidrógeno sólo

proviene de los enlaces O-H, ya que los enlaces C-H en compuestos fenólicos no tienen esta capacidad (Valgimigli *et al.*, 1996).

Resulta importante señalar que en otros compuestos como los derivados de compuestos benzofuranos, el enlace C-H sí es capaz de ceder protones (Lundgren *et al.*, 2006). Las constantes del *quenching* bimolecular (k_q) para cada uno de los compuestos fenólicos disueltos en agua y en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v) se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Valores de k_q para los compuestos antioxidantes en agua y en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Antioxidante	$k_q/ 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [a] H ₂ O	$k_q/ 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [b] MeOH 24%
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.3	0.6
Ácido protocatéquico	1.3	1.6
Ácido gálico	2.4	2.7
Ácido vanílico	-	1.0
Ácido siríngico	1.8	1.6
Vainillina	-	9.9
Tirosol	0.7	1.1
Hidroxitirosol	-	1.3
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	0.5	0.8
Ácido <i>p</i> -cumárico	2.1	3.5
Ácido <i>o</i> -cumárico	-	7.9

[a]: Constante bimolecular para el *quenching* de la fluorescencia del DBO en agua; $\tau_0 = 325 \text{ ns}$.

[b]: Constante bimolecular para el *quenching* de la fluorescencia del DBO en una mezcla de H₂O/MeOH (76:24, v/v); $\tau_0 = 75.3 \text{ ns}$.

Los resultados recopilados en la tabla previamente mencionada muestran que al comparar los valores de k_q obtenidos en los dos disolventes (salvo para los compuestos: ácido vanílico, vainillina, hidroxitirosol y ácido *o*-cumárico, de los cuáles no pudieron obtenerse valores debido a su insolubilidad en agua), se observó que los valores bastante similares aunque ligeramente superiores en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v). El orden de magnitud para todos ellos fue de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dicha tabla también declara que el compuesto fenólico con más reactividad antioxidante es la vainillina (6), con un valor de k_q de $9.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; por el contrario, el ácido *p*-hidroxibenzoico (1) es el tiene menos reactividad antioxidante ya que mostró un valor de k_q de $0.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

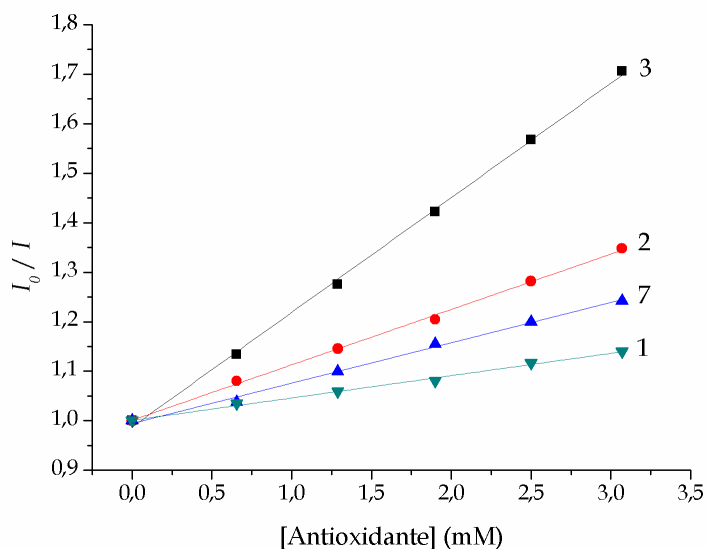


Figura 2.6. Representación de los datos del quenching según la ecuación de Stern-Volmer para los antioxidantes: ácido *p*-hidroxibenzoico (1), ácido protocatéquico (2), ácido gálico (3) y tirosol (7).

La figura 2.6 muestra las rectas obtenidas a partir de los valores de *quenching* de la fluorescencia del DBO que se produce en presencia de diferentes concentraciones de algunos de los fenoles estudiados, tales como: ácido *p*-hidroxibenzoico (1), ácido protocatéuico (2), ácido gálico (3) y tirosol (7).

Los diferentes valores obtenidos para las pendientes de los distintos compuestos estudiados podrían justificarse en función a su estructura. Así, a continuación se muestra una explicación de los valores obtenidos.

Como previamente se ha mencionado, la vainillina (6) fue el compuesto que presentó el mayor valor, por lo tanto, es el que posee mayor reactividad antioxidante. Sin embargo, este hecho resulta curioso debido a que, a pesar de que la estructura del ácido vanílico y la de la vainillina es la misma con la diferencia de que el primero posee un grupo ácido y el segundo un grupo aldehído en uno de los radicales del anillo de benceno, los valores para sus k_q son de 1.0 y 9.9 M⁻¹s⁻¹, respectivamente. Este hecho hace pensar que el grupo aldehído supone un incremento considerable en la reactividad antioxidante de un compuesto. Los siguientes antioxidantes con los valores superiores de k_q fueron el ácido *p*-cumárico (10) y ácido *o*-cumárico (11); ambos poseen tanto un grupo hidroxilo como una cadena lateral insaturada unida a un grupo ácido, siendo los únicos de todo el grupo estudiado que tienen esta estructura. Esto demuestra que las insaturaciones favorecen las reacciones de transferencia de carga como mecanismo de desactivación (Adam y Nikolaus, 1998). Es importante señalar que

el valor obtenido para el ácido *o*-cumárico es el doble que para el ácido *p*-cumárico; esto se debe a que el primero tiene el grupo -OH en posición *orto* (Lucarini y Pedulli, 1994). El siguiente compuesto con mayor reactividad antioxidante fue el ácido gálico (3), con tres grupos hidroxilo y una cadena simple donde tiene un grupo ácido. Posteriormente, el ácido siríngico (5) y el ácido protocatéuico (2), ambos con un grupo ácido unido al benceno, y con la diferencia de un grupo hidroxilo y dos grupos metoxi en los radicales para el primero, y dos grupos hidroxilo para el segundo, presentaron un valor de $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este resultado evidencia que la reactividad de dos grupos metoxi es relativamente equivalente a la reactividad de un grupo hidroxilo en posición *orto*.

A continuación, el hidroxitirosol (8) presentó un valor de k_q algo inferior ($1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), debido a que la cadena lateral que posee no favorece su reactividad antioxidante. Tras estos compuestos, el ácido vanílico (4), con un grupo hidroxilo y un grupo metoxi en sus radicales, y el tirosol (7), con un grupo hidroxilo, mostraron valores de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este caso, al igual que lo que ocurre con el ácido siríngico y el ácido protocatéuico demuestra la importancia que revela el complejo de transferencia de carga frente a la abstracción directa de un átomo de hidrógeno en el mecanismo de desactivación de la fluorescencia.

Finalmente, los valores más bajos de las constantes k_q se obtuvieron para los antioxidantes **1** (ácido *p*-hidroxibenzoico) y **9** (ácido *p*-hidroxifenilacético), los cuales presentaron valores de un orden de magnitud inferior al resto. Estos últimos compuestos

tienen sólo un grupo hidroxilo en posición *para* con la capacidad de reaccionar con el DBO.

2.3.2. Reactividad antioxidante obtenida mediante el uso del radical DPPH•

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con el *quenching* de la fluorescencia del DBO, se realizó otro estudio utilizando el radical DPPH•, el cual es el más utilizado para estudios de cinética (Sánchez Samaniego *et al.*, 2007; Poerio *et al.*, 2008). De acuerdo con la literatura publicada, el DPPH• debe estar disuelto en metanol; por lo tanto trabajamos con éste disuelto en metanol y los antioxidantes disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Se midió la absorbancia del DPPH• en ausencia de antioxidante a 515 nm ($A_{DPPH\bullet}$); inmediatamente tras la adición del antioxidante, y tras 5 minutos.

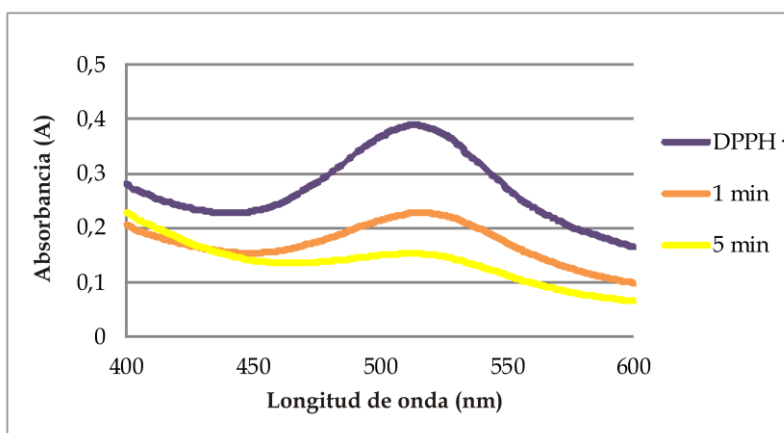


Figura 2.7. Espectros de la absorbancia del DPPH• en ausencia del antioxidante Tirosol, y en presencia de éste en los minutos 0 y 5.

La figura 2.7 muestra un ejemplo de cómo varía la absorbancia del DPPH• en presencia de antioxidante, en este caso, el antioxidante en cuestión ha sido el tirosol. Utilizando la ecuación 2 descrita en la sección 2.2.3, se obtuvieron dos valores de Q . Por un lado: $Q_0 = (1 - A_0/A_{DPPH\bullet}) \times 100\%$, y por otro lado: $Q_5 = (1 - A_5/A_{DPPH\bullet}) \times 100\%$; donde A_0 es la absorbancia observada directamente después de la adición del antioxidante y A_5 es la absorbancia observada tras 5 minutos. La tabla 2.2 muestra los valores de Q obtenidos utilizando las ecuaciones previamente descritas.

Tabla 2.2. Valores de Q para los compuestos antioxidantes disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Antioxidante	Q_0 (%) ^[a] MeOH 24%	Q_5 (%) ^[b] MeOH 24%
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	7.6	7.6
Ácido protocatéquico	18.3	80.7
Ácido gálico	43.4	82.4
Ácido vanílico	6.9	9.5
Ácido siríngico	14.4	81
Vainillina	2.1	3.6
Tirosol	12.3	41.1
Hidroxitirosol	63.8	74.8
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	8.7	9.1
Ácido <i>p</i> -cumárico	4.2	5.1
Ácido <i>o</i> -cumárico	1.1	2.9

[a]: $\lambda_{\text{obs}} = 515$ nm directamente tras la adición del antioxidante

($t = 0$ min). $Q_0 = (1 - A_0/A_{DPPH\bullet}) \times 100\%$.

[b]: $\lambda_{\text{obs}} = 515$ nm, 5 minutos tras la adición del antioxidante

($t = 5$ min). $Q_5 = (1 - A_5/A_{DPPH\bullet}) \times 100\%$.

La tabla 2.2 muestra los valores de Q_0 y Q_5 obtenidas para los antioxidantes estudiados. A partir de los resultados obtenidos se han definido tres tipos de compuestos que describo a continuación:

- 1) Los antioxidantes que tienen una rápida reacción con DPPH•, porque la abstracción de hidrógeno se produce cuando entran en contacto el antioxidante y la disolución de DPPH•, (ácido gálico e hidroxitirosol)
- 2) Los antioxidantes tales como el ácido protocatéquico, ácido siríngico y tirosol, los cuales necesitan 5 min para reaccionar con el DPPH•.
- 3) Los antioxidantes que no reaccionan con el DPPH• en los primeros 5 min (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, vainillina, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido *p*-cumárico y ácido *o*-cumárico).

Los antioxidantes del primer grupo (ácido gálico e hidroxitirosol) son los únicos que tienen tres grupos hidroxilo capaces de donar su protón. El ácido protocatéquico (2) y el tirosol (7) tienen dos grupos hidroxilo, y el ácido siríngico (5) es el único antioxidante que tiene un grupo hidroxilo y dos grupos metoxi. En este caso, se evidencia la importancia de los grupos metoxi en la reactividad antioxidante obtenida. El resto de los compuestos sólo tienen un grupo hidroxilo, por lo tanto, los valores de Q obtenidos resultaron muy bajos.

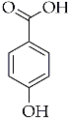
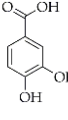
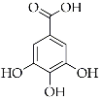
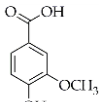
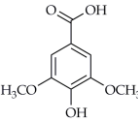
2.3.3. DBO vs DPPH

Finalmente, se han diferenciado varios grupos de reactividad antioxidante en función de la estructura de los compuestos de acuerdo con los valores comprobados con la sonda de fluorescencia (DBO) y el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH•). Tomando en consideración la relación estructura-reactividad de los compuestos antioxidantes, se han conseguido establecer 4 grupos diferentes.

Grupo A: dicho grupo está formado por el ácido *p*-hidroxibenzoico (1), ácido protocatéquico (2), ácido gálico (3), ácido vanílico (4) y ácido siríngico (5). Lo primero a mencionar de este grupo es la evidencia de que un aumento en el número de grupos hidroxilo en el anillo de benceno aumenta proporcionalmente la reactividad antioxidante del compuesto, debido al hecho de que hay más átomos de hidrógeno que pueden ser donados (*Rice-Evans et al., 1996*). Así, la k_q y Q de: ácido gálico > ácido protocatéquico > ácido *p*-hidroxibenzoico. La tabla 2.3 muestra los valores de k_q y Q para los compuestos que forman el grupo A.

Por otra parte, la presencia de grupos metoxi también aumenta la reactividad del antioxidante ya que participan en la transferencia de carga. Así, los valores que aparecen en la tabla 2.3 reflejan que el valor de k_q y Q del ácido siríngico (5) es superior al del ácido vanílico (4).

Tabla 2.3. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo A disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Grupo	Nº	Estructura	$k_q/10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Q_0 (%) ^[a]	Q_5 (%) ^[b]
A	1		0.6	7.6	7.6
	2		1.6	18.3	80.7
	3		2.7	43.4	82.4
	4		1.0	6.9	9.5
	5		1.6	14.4	81

[a]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$ directamente tras la adición del antioxidante ($t = 0 \text{ min}$).

$$Q_0 = (1 - A_0 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

[b]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$, 5 minutos tras la adición del antioxidante ($t = 5 \text{ min}$).

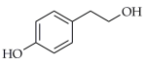
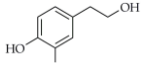
$$Q_5 = (1 - A_5 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

Es interesante mencionar que el ácido protocatéquico (**2**) y el ácido siríngico (**5**) tienen valores similares de k_q y Q ; de lo que se podría deducir que la reactividad de dos grupos metoxi es equivalente a la reactividad de un grupo hidroxilo.

El grupo B comprende dos compuestos: tirosol (**7**) e hidroxitirosol (**8**). El hidroxitirosol tiene dos grupos hidroxilo y el tirosol sólo tiene uno, debido a esto, el hidroxitirosol, presenta el

mayor valor de k_q y Q . En la tabla 2.4 se muestran los valores para el grupo B.

Tabla 2.4. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo B disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Grupo	Nº	Estructura	$k_q/$ $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Q_0 (%) ^[a]	Q_5 (%) ^[b]
B	7		1.1	12.3	41.1
	8		1.3	63.8	74.8

[a]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$ directamente tras la adición del antioxidante ($t = 0 \text{ min}$).

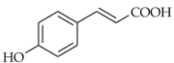
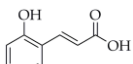
$$Q_0 = (1 - A_0 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

[b]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$, 5 minutos tras la adición del antioxidante ($t = 5 \text{ min}$).

$$Q_5 = (1 - A_5 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

El grupo C está constituido por el ácido *p*-cumárico (**10**) y ácido *o*-cumárico (**11**). La tabla 2.5 muestra los valores de k_q y Q para los compuestos del grupo C.

Tabla 2.5. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo C disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Grupo	Nº	Estructura	$k_q/$ $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Q_0 (%) ^[a]	Q_5 (%) ^[b]
C	10		3.5	4.2	5.1
	11		7.9	1.1	2.9

[a]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$ directamente tras la adición del antioxidante ($t = 0 \text{ min}$).

$$Q_0 = (1 - A_0 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

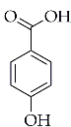
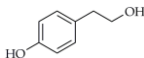
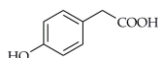
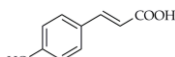
[b]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$, 5 minutos tras la adición del antioxidante ($t = 5 \text{ min}$).

$$Q_5 = (1 - A_5 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

El ácido *o*-cumárico tiene un valor de k_q de $7.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v), mientras el ácido *p*-cumárico presenta un valor de $3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que evidencia que la posición *orto* del grupo hidroxilo proporciona una mayor reactividad antioxidante al compuesto en cuestión (Lucarini y Pedulli, 1994).

Finalmente, un cuarto grupo (grupo D) compuesto por ácido *p*-hidroxibenzoico (1), tirosol (7), ácido *p*-hidroxifenilacético (9) y ácido *p*-cumárico (10) fue establecido.

Tabla 2.6. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo C disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).

Grupo	Nº	Estructura	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Q_0 (%) ^[a]	Q_5 (%) ^[b]
D	1		0.6	7.6	7.6
	7		1.1	12.3	41.1
	9		0.8	8.7	9.1
	10		3.5	4.2	5.1

[a]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$ directamente tras la adición del antioxidante ($t = 0 \text{ min}$).

$$Q_0 = (1 - A_0 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

[b]: $\lambda_{\text{obs}} = 515 \text{ nm}$, 5 minutos tras la adición del antioxidante ($t = 5 \text{ min}$).

$$Q_5 = (1 - A_5 / A_{\text{DPPH}\cdot}) \times 100\%.$$

Todos estos compuestos tienen un grupo fenol en común, pero la cadena lateral es diferente para cada uno de ellos. Los valores más bajos de k_q fueron los del ácido *p*-hidroxifenilacético y ácido *p*-hidroxibenzoico; seguidos por el tirosol y el ácido *p*-

cumárico, debido a la insaturación que posee en la cadena lateral, la cual facilita las reacciones de transferencia de carga. La tabla 2.6 muestra los valores de k_q y Q para los compuestos que forman el grupo D.

Tras este análisis de los resultados, podemos concluir que el *quenching* de la fluorescencia del DBO es un método óptimo para evaluar la reactividad antioxidante de los compuestos fenólicos, por un lado debido a la buena relación encontrada al comparar los datos con los obtenidos utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH•); y por otra parte debido a su rapidez y al menor consumo de muestra y reactivos que es necesario para dicho análisis.

2.4. CONCLUSIONES

Con el presente estudio se pretende demostrar la efectividad de la sonda fluorescente (DBO) para la determinación de la reactividad antioxidante de compuestos fenólicos. Tras realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos utilizando el DBO y el DPPH•, se observaron similitudes en cuanto a la relación estructura/reactividad antioxidante.

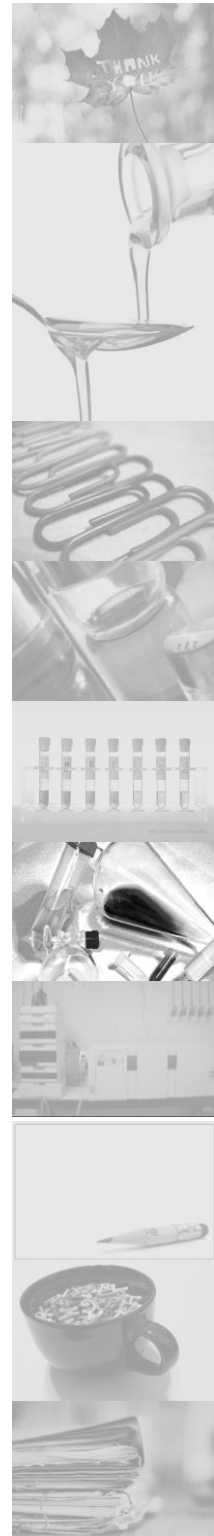
El uso del DBO como una nueva alternativa al radical libre DPPH• implica un menor consumo de tiempo para realizar los análisis, y nos proporciona un valor fijo en diferentes disolventes de una constante k_q para cada uno de los compuestos estudiados, dando lugar a resultados fiables y reproducibles.

Por todo lo mencionado, sugerimos el uso de esta nueva metodología espectrofluorimétrica para el estudio de la reactividad antioxidante frente a las espectrofotométricas comúnmente utilizadas. Así, abrimos nuevas vías de estudio con el objetivo de determinar la reactividad antioxidante en muestras de aceite de oliva con esta nueva metodología propuesta.

Capítulo 3

Estudio comparativo de diferentes métodos de extracción para la determinación de la fracción fenólica del aceite de oliva

Parte de este capítulo está basado en el artículo:
M. Luz Pizarro, Mercedes Becerra, Ana Sayago, María Beltrán and Rafael Beltrán. (2013). Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil, *Food Analytical Methods* 6,123-132.



RESUMEN

Con el fin de evaluar la eficacia del método de extracción de fenoles totales, se ha realizado una comparación entre diferentes métodos (extracción líquido-líquido (ELL), micro extracción líquido-líquido (MELL) y extracción líquido-líquido con sonda de ultrasonido (USO)) utilizando una muestra de aceite de oliva virgen (AOV). El análisis estadístico de los datos analíticos obtenidos en función del contenido de fenoles totales, mostró que la MELL y USO pueden ser una alternativa fiable al procedimiento tradicional basado en la ELL, la cual necesita más cantidad de muestra, genera más desechos y requiere más tiempo, siendo a su vez, una técnica más tediosa.

El trabajo publicado en colaboración con la Dra. Pizarro (*Pizarro et al., 2013*) mostró que la MELL era la metodología de extracción más eficiente para los compuestos fenólicos individuales presentes en el AOV. Por este motivo, las condiciones de la MELL fueron optimizadas con el fin de mejorar esta metodología.

Por último, para analizar compuestos fenólicos individuales, se utilizó una cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector UV-Vis de diodos (HPLC-DAD). Gracias a esta técnica analítica, se identificaron y cuantificaron 13 compuestos fenólicos en la disolución estándar y en el aceite de oliva refinado dopado (AORD). Ocho compuestos fueron encontrados en las muestras de AVO.

Para calcular los porcentajes de recuperación de los fenoles individuales extraídos con el método MELL, se utilizó un AORD. Los valores fueron superiores al 80% para la mayoría de los casos. Así, se demostró la eficacia y la fiabilidad de ambas metodologías para determinar el contenido fenólico en muestras de aceite de oliva.

ABSTRACT

A comparison between different extraction methods has been performed in order to assess their effectiveness for the analysis of total phenols (liquid-liquid extraction (LLE), liquid-liquid micro extraction (LLME), and ultrasound liquid-liquid extraction (USE)) from virgin olive oil (VOO). Statistical analysis of the analytical data obtained for the total phenol content of a VOO, showed that LLME and USE can represent a reliable alternative to the traditional procedure based on LLE that needs more amount of sample, generates more wastes, and is more time consuming.

The work published by Pizarro et al. (*Pizarro et al., 2013*) showed that the LLME was the most efficient extraction method of individual phenolic compounds in olive oil. For this reason, the conditions of the LLME were optimized with the purpose of improving this methodology.

Finally, a high-performance liquid chromatography equipped with a diode-array detector (HPLC-DAD) was used to analyze individual phenolic compounds. In this way, 13 phenolic compounds were identified and quantified in standard solution and spiked refined olive oil (SROO). Eight compounds were found in VOO samples.

A SROO was used to calculate the recoveries of the phenolic compounds studied by using LLME. These values were higher than 80% in most cases. Thus, the efficiency and reliability of both methodologies were demonstrated to determine phenolic compounds in olive oil.

3.1. INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva virgen (AOV) es el principal aceite de consumo de la dieta mediterránea. Este aceite se obtiene de aceitunas maduras únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones, sobre todo térmicas, que no provoquen la alteración del aceite y cuyo tratamiento no sea otro que el del lavado, decantación, centrifugado y la filtración. Se trata de un aceite vegetal con excelentes cualidades organolépticas y nutricionales que proporciona efectos beneficiosos para la salud humana. Estos efectos se deben principalmente a su capacidad antioxidante (gracias a su contenido en fenoles, tocoferoles, carotenoides y otros componentes) (*Méndez y Falqué, 2007; Kiritsakis y Christie, 2000*).

“Polifenoles” o “compuestos fenólicos” es un término que se utiliza frecuentemente para definir aquellas sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (*Harborne y Dey, 1989; Escarpa y González, 2001*). Este grupo hidroxilo es el responsable de evitar o ralentizar la oxidación al poseer la capacidad de captar los radicales libres que la provocan. Los fenoles son capaces de donar el átomo de hidrógeno del hidroxilo a los radicales libres, interrumpiendo así la propagación del proceso de oxidación.

Esto explica las tendencias investigadoras que tratan de poner de manifiesto la existencia de una posible correlación entre la actividad antioxidante y la composición fenólica del AOV (*Servili y Montedoro, 2002; Ninfali et al., 2001*). Los compuestos fenólicos

contribuyen a la estabilidad del AOV y prolongan su vida útil en comparación con otros aceites vegetales (*Angerosa et al., 2000; Toschi et al., 2005*).

Además, estos compuestos otorgan al AOV un papel importante en el tratamiento y la prevención de enfermedades crónicas asociadas a la generación de sustancias con carácter oxidante; tales como la aterosclerosis, la neurodegeneración, y otros procesos normales de envejecimiento. Por último, cabe mencionar que dichos compuestos también están relacionados con las características organolépticas que afectan el sabor y el gusto (amargor y purgencia), y con las cualidades nutritivas del AOV (*Andrews et al., 2003; Gutiérrez Rosales et al., 2003*).

La fracción fenólica de un AOV consiste en una mezcla heterogénea de compuestos, tales como: ácidos fenólicos, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos y flavonoides.

La concentración de estas especies se ve influida por muchos factores (*García-González et al., 2010*), tales como el área de producción (*Tura et al., 2007; Vinha et al., 2005*), el clima (*Kalua et al., 2005*), la variedad de aceituna (*Tura et al., 2007*), las técnicas de cultivo (*Tovar et al., 2001*), el momento de maduración de la fruta (*Gutiérrez et al., 1999*), el proceso de extracción del aceite (*Servili et al., 1996*), así como las condiciones de su almacenamiento tras su obtención (*Morello et al., 2004*).

Debido a todos estos factores, es de especial importancia conseguir desarrollar métodos analíticos con dos objetivos fundamentales:

- ✓ Extraer rápida y eficazmente los compuestos fenólicos presentes en el AOV.
- ✓ Obtener una óptima separación y determinación cualitativa y cuantitativa de dichos compuestos (Tsimidou et al., 1992).

En la última década se han propuesto numerosos procedimientos analíticos para la extracción de compuestos fenólicos (Brenes et al., 1999; Brenes et al., 2000; Carrasco-Pancorbo et al., 2005). Los métodos comúnmente utilizados para aislar la fracción fenólica polar del AOV están basados en la extracción líquido-líquido (ELL) (Brenes et al., 2000; Owen et al., 2000a; Owen et al., 2000b; Vázquez Roncero, 1978), y en la extracción en fase sólida (SPE) (Servili et al., 1999; Favati et al., 1994; Favati et al., 1995; Andreoni y Fiorentini, 1995; Mateos et al., 2001).

El objetivo de este trabajo, está centrado en los métodos de extracción líquido-líquido. En estos métodos suelen utilizarse disolventes lipófilos con diferentes porcentajes de metanol (Owen et al., 2000a, b.), metanol/agua (Vázquez Roncero, 1978), tetrahidrofurano/agua, o N,N-dimetilformamida (Brenes et al., 2000).

Cuando la fracción fenólica se ha aislado, puede llevarse a cabo la determinación cualitativa y cuantitativa de los fenoles totales mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (*Gutfinger y Am, 1981*), y de los fenoles individuales mediante técnicas de separación y determinación utilizando cromatografía líquida de alta resolución con un detector UV-Vis de diodos (HPLC-DAD).

El objetivo de este trabajo de investigación es comparar diferentes métodos de extracción basados en los procedimientos de extracción líquido-líquido con el fin de determinar el contenido de fenoles totales e individuales optimizando al máximo la relación calidad-tiempo de análisis.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados para las medidas espectrofotométricas, tales como: metanol, n-hexano, Folin-Ciocalteu, ácido acético glacial, e hidróxido de sodio fueron de calidad espectrofotométrica (99,9%) (Panreac, Barcelona, España). Los siguientes compuestos fueron obtenidos de la casa comercial Fluka (Steinheim, Alemania): tirosol (97%), ácido cafeico (98%), ácido vanílico (97%), ácido *p*-cumárico (98%), *o*-cumárico (97%) y la vainillina (98%). El ácido gálico (99%), la rutina (95%), y el ácido sinapico (98%) eran de Aldrich (EE.UU.). La apigenina (99%), luteolina (99%), y oleuropeína (99%) fueron compradas a Extrasynthèse (Genay, Francia). El hidroxitirosol ha sido cedido por el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia (Sevilla, España).

El agua Mili-Q se obtuvo de un sistema de purificación Mili-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

3.2.2. Muestras

Para llevar a cabo el estudio de la repetitividad y reproducibilidad de los métodos de extracción de fenoles totales en el aceite de oliva, se utilizó un aceite de oliva virgen extra comercial, perteneciente a la variedad Picual.

Posteriormente, para comparar entre los diferentes métodos de extracción de fenoles individuales, se preparó un aceite de oliva dopado añadiendo concentraciones conocidas de los fenoles que se iban a estudiar a una matriz de aceite al que previamente mediante un proceso de refinado, se le eliminaron todos los compuestos fenólicos. Este aceite se ha denominado: aceite de oliva refinado dopado (ARDO). Se calculó la repetitividad, reproducibilidad y porcentaje de recuperación de los tres métodos utilizados.

Para demostrar la fiabilidad del método para muestras de aceite, se utilizaron dos muestras de aceite de oliva virgen extra de las variedades Picual y Arbequina.

3.2.2.1. Preparación de un aceite de oliva refinado dopado

Para preparar el aceite de oliva refinado dopado con los fenoles de estudio; se pesan treinta gramos de aceite de oliva refinado y se trasladan a un matraz de fondo redondo de 100 mL. Las disoluciones madre estándar de cada compuesto se preparan en metanol y se agregan al aceite refinado. Durante 24 horas, el aceite de oliva preparado se remueve bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de este proceso, se utiliza un rotavapor para eliminar el disolvente. La concentración final que tienen los 13 compuestos fenólicos seleccionados (ácido gálico, hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, ácido cafeico, vainillina, ácido *p*-cumárico, ácido sinapico, ácido *o*-cumárico, rutina, oleuropeína, luteolina y apigenina) en el aceite de oliva refinado dopado es de 40 µg/g. El aceite de oliva refinado dopado y las disoluciones estándar se almacenan a 4 °C.

3.2.3. Métodos

En este trabajo, tres metodologías diferentes (micro extracción líquido-líquido (MELL), extracción líquido-líquido (ELL), y extracción líquido-líquido mediante sonda de ultrasonido (EUS) (Hernanz et al., 2008; Rodrigues y Pinto., 2007) se utilizaron para la extracción de la fracción fenólica de un aceite de oliva comercial con el fin de determinar su contenido total de fenoles mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu del modo más económico, rápido y ecológico posible.

3.2.3.1. *Extracción líquido-líquido de fenoles totales con embudo de decantación*

Este método de extracción se realizó de acuerdo con el método descrito por Vázquez et al. (Vázquez Roncero et al., 1973). El método fue ligeramente modificado. El proceso seguido fue: se pesan 10 g de aceite y se disuelven en 50 mL de n-Hexano, se agita y se extraen sucesivamente con tres porciones de 20 mL cada una de metanol al 60 %, agitando durante 2 minutos. Se reúne las fases metanólicas de cada extracción en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua Mili-Q. En la siguiente figura 3.1 se muestra un esquema del método mencionado.

3.2.3.2. *Micro extracción líquido-líquido de fenoles totales*

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante una variación del método de Murkovic et al. (Murkovic et al., 2004). El aceite de oliva (500 mg) se diluyó con 1 mL de una mezcla de

metanol/agua (80:20, v/v) en tubos Eppendorf de 2 mL. Después de agitar la muestra durante 1 minuto utilizando un vórtex (Heidolph relax top, JP Selecta, Barcelona), ésta se centrifugó (Microcentrífuga MiniSpin® Plus, Eppendorf, Madrid) a 13.400 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Este proceso se realizó tres veces. Los tres extractos se combinaron y fueron disueltos en un matraz de 10 mL con agua Mili-Q. La figura 3.2 muestra un esquema de dicho método.

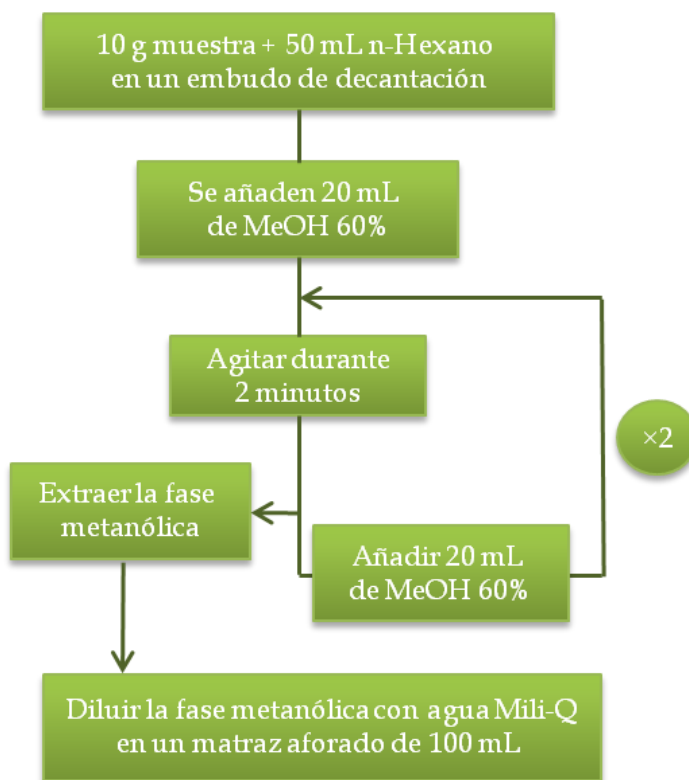


Figura 3.1. Esquema del método de extracción líquido-líquido con embudo de decantación.

3.2.3.3. *Extracción líquido-líquido de fenoles totales con sonda de ultrasonido*

Para este método, el aceite de oliva (500 mg) se extrajo con 1 mL de una mezcla de metanol/agua (80:20, v/v) en un tubo de centrífuga de polietileno de 50 mL con fondo cónico, el cual introducimos posteriormente en un baño con hielo.

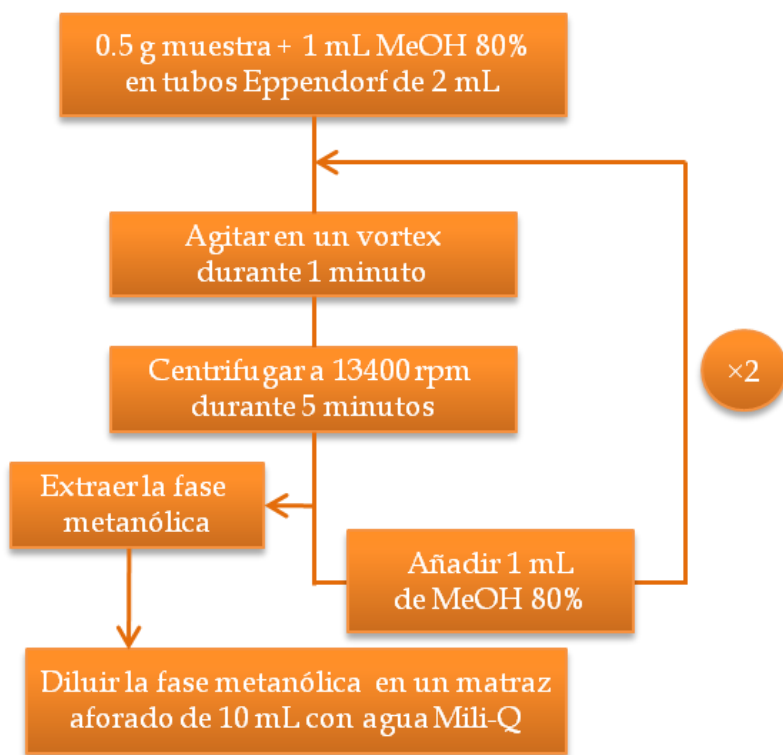


Figura 3.2. Esquema del método de micro extracción líquido-líquido.

Esta mezcla fue sonicada usando una sonda de ultrasonido con la punta de titanio (Bandelin Sonoplus UW 2200, Progen Scientific, London, UK). Esta sonda se sumergió 2 cm en la disolución durante 3 ciclos de 10 segundos cada uno a 20 °C.

Luego, la disolución se transfirió a un tubo Eppendorf y ésta fue centrifugada a 13.400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este proceso fue realizado tres veces. Las fases metanólicas de cada proceso fueron reunidas en un matraz aforado de 10 mL enrasando con agua Mili-Q. Para facilitar la comprensión del método, la figura 3.3 muestra un esquema del método desarrollado.

3.2.3.4. *Determinación colorimétrica del contenido fenólico total*

Para determinar cuantitativamente los polifenoles en el AOV, se realizó el método descrito por Gutfinger et al. (*Gutfinger y Am, 1981*) con pequeñas modificaciones.

El método se basa en un ensayo colorimétrico en el que se produce la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con los grupos hidroxilo funcionales de los compuestos fenólicos dando lugar a una coloración azul. Cinco mililitros de la disolución acuosa-metanólica de compuestos fenólicos extraída del AOV se diluyeron en 15 ml de agua Mili-Q; posteriormente, se adicionaron 1.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó la mezcla y se esperaron 3 minutos para que se estabilizara. A continuación, se añadieron 2.5 mL de hidróxido sódico al 6% (v/v). Tras 5 min, la mezcla de reacción se diluyó con agua Mili-Q hasta enrase y se homogeneizó en un matraz aforado de 25 mL. Finalmente se esperaron 2 horas hasta medir la absorbancia de las disoluciones.

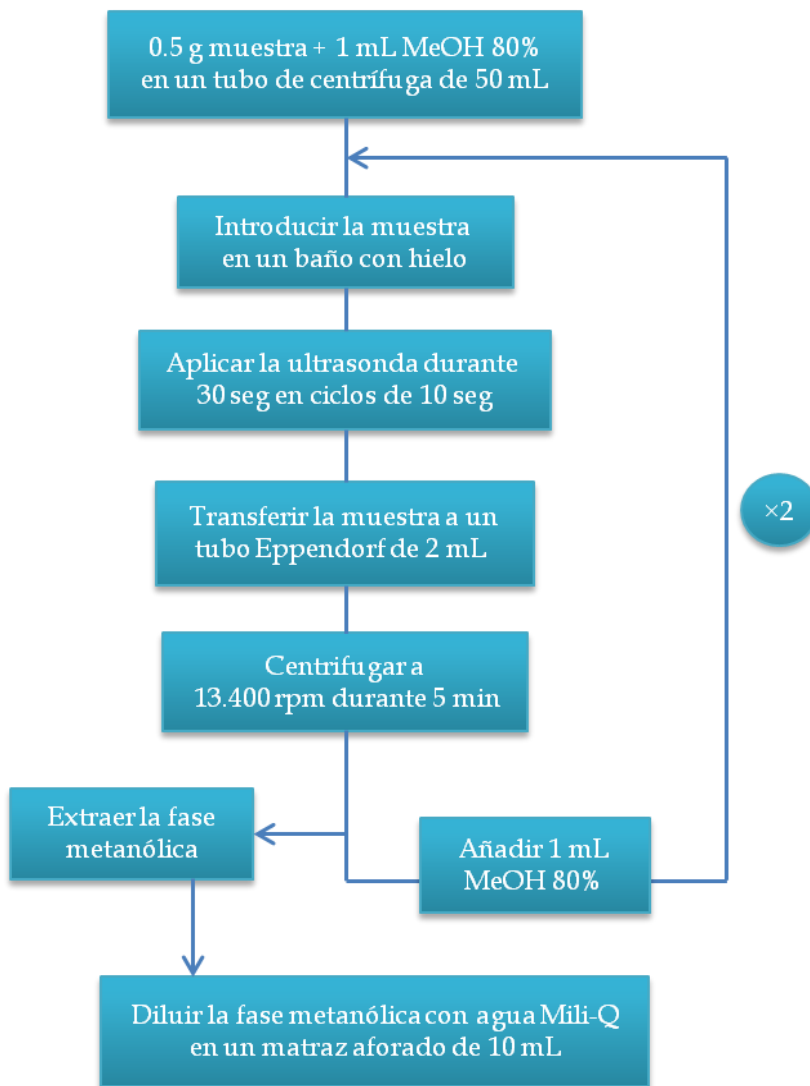


Figura 3.3. Esquema del método de extracción líquido-líquido con sonda de ultrasonido.

Tras este periodo de tiempo, la absorbancia de las soluciones fue determinada frente a un blanco, utilizando un espectrofotómetro UV-vis (Termo Spectronic Helios-γ v4.60, Cambridge, UK) a una longitud de onda de 725 nm. Para llevar a cabo la cuantificación de las muestras, se preparó una curva de

calibrado con ácido cafeico en el rango de 0-10 mg/L. Los resultados de se expresaron como miligramos de ácido cafeico por kilogramo de aceite (ppm).

3.2.3.5. *Micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales*

A continuación, basándonos en los resultados mostrados en el artículo publicado por Pizarro et al. (*Pizarro et al., 2013*) donde variaciones en los métodos de extracción EUS y MELL, y una extracción en fase sólida fueron usadas para identificar y cuantificar los fenoles individuales presentes en el AOV; el método MELL fue seleccionado para tal fin.

Las modificaciones que se realizaron en el método “Micro extracción líquido-líquido de fenoles totales” fueron llevadas a cabo con el objetivo de minimizar la manipulación de la muestra, el consumo de reactivos y la generación de residuos.

Para poner a punto este método, se realizó un diseño experimental (EPHA) a dos niveles (variando el peso de la muestra y el volumen de extractante) con la intención de mejorar la recuperación y la eficiencia del método MELL desarrollado previamente en colaboración con la Dra. Pizarro (*Pizarro et al., 2013*). Se realizaron todas las combinaciones posibles utilizando las siguientes condiciones: 500 mg y 800 mg de muestra, y 500 μ L y 800 μ L de la mezcla metanol/agua (80:20, v/v). El ensayo se hizo por duplicado para asegurarnos la fiabilidad de los resultados y poder

establecer las interacciones entre los factores. En la tabla 3.1 se muestra el diseño experimental realizado.

Tabla 3.1. Diseño experimental del proceso de extracción.

Ensayo	Peso muestra (mg)	Volumen extractante (μL)
1	500	500
2	500	800
3	800	500
4	800	800
5	500	500
6	500	800
7	800	500
8	800	800

Los volúmenes de la muestra de extractante se agitaron en un vórtex durante 1 min y se centrifugaron a 13.400 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Los otros dos ciclos fueron eliminados para evitar un exceso de metanol que diluye el extracto y que debe ser eliminado en un rotavapor.

El extracto metanólico obtenido se pasó a través de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm y diámetro de 17 mm. Por último, 150 μL del extracto se diluyeron con agua Mili-Q hasta 0.5 mL en un vial de 1.5 mL. La figura 3.4 muestra el esquema de este método para facilitar la comprensión del mismo.

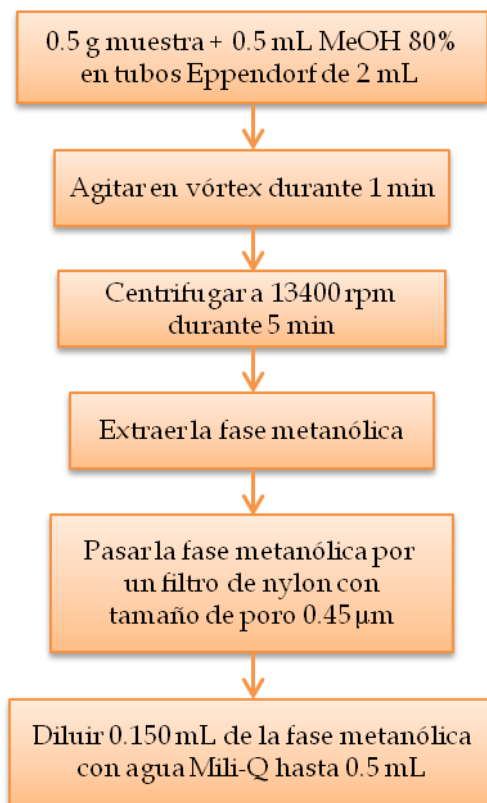


Figura 3.4. Esquema del método de micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales.

Cien microlitros de este extracto fueron inyectados en el HPLC-DAD para poder determinar si el método de extracción es óptimo para la mayoría de los compuestos fenólicos. Por un lado, para evaluar la efectividad del método desarrollado, se calcularon los porcentajes de recuperación; por otro lado, la precisión del mismo fue obtenida gracias a los ensayos de repetitividad y reproducibilidad realizados.

3.2.3.6. Análisis con HPLC-DAD

Para llevar a cabo el análisis de los fenoles individuales en el extracto metanólico, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector UV-Vis de diodos (Agilent 1100 (Palo Alto, CA, EE.UU.)).

Para obtener una óptima separación de los compuestos fenólicos, se utilizó una columna C18 Nova-pack en fase reversa (4 μm , 300 \times 3,9 mm ID, Waters Co., Milford, Massachusetts, EE.UU.). Se aplicó un gradiente entre dos fases móviles: fase A (agua/metanol/ácido acético, 93:5:2, v/v/v) y fase B (agua/metanol/ácido acético, 17:81.3:1.7, v/v/v). La tabla 3.2 muestra el gradiente empleado.

Tabla 3.2. Gradiente de fases móviles del HPLC-DAD.

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
5	100	0
50	60	40
60	40	60
65	25	75
70	0	100
80	100	0
85	100	0

El flujo fue de 1 mL/min y la columna se mantuvo a 20 °C. El volumen inyectado fue de 100 μL . La detección se realizó mediante un barrido entre 190 y 700 nm.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando los valores de las áreas obtenidas a 280 nm para el ácido gálico, hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, ácido cafeico, vainillina, ácido *o*-cumárico y oleuropeína, a 320 nm para el ácido *p*-cumárico y ácido sinápico, y a 360 nm para la rutina, luteolina y apigenina.

Los ensayos cuantitativos fueron obtenidos usando curvas de calibración externas para todos los estándares fenólicos. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores medios.

3.2.3.7. *Estadística*

Las diferencias significativas entre las diversas técnicas de extracción fueron analizadas mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA). Se consideraron que las diferencias eran significativas cuando los valores de *p* eran inferiores a 0.05 y los valores medios de concentración se compararon mediante la técnica de LSD con un nivel de confianza del 95%.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Comparativa entre los métodos de extracción de fenoles totales

Para comparar los métodos de extracción utilizados en la determinación de fenoles totales: extracción líquido-líquido con embudo de decantación, micro extracción líquido-líquido y extracción líquido-líquido; se evaluó la precisión de cada método mediante la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad. Los valores obtenidos fueron estimados a través de los promedios de los coeficientes de variación (% RSD). Para realizar el ensayo de la repetibilidad, se utilizó un aceite de oliva virgen extra sobre el que se aplicaron los diferentes procesos de extracción cinco veces en el mismo día. La reproducibilidad fue estudiada realizando los procesos de extracción 3 veces al día, durante cinco días diferentes.

Además, cada día se analizaron cinco muestras del mismo aceite y se calculó su concentración utilizando la recta de calibrado de ácido cafeico previamente descrita. La tabla 3.3 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3.3. Repetitividad, reproducibilidad y valor medio de los métodos de extracción de fenoles totales.

Método	Repetitividad (%RSD)	Reproducibilidad (%RSD)	Valor medio (mg/Kg)
ELL	2.7	6.8	427.08
MELL	5.1	7.4	449.58
EUS	9.4	7.9	459.57

Analizando los valores mostrados en la tabla 3.3 en cuanto a la precisión de los métodos de extracción de fenoles totales, los coeficientes de variación obtenidos (%RSD) fueron buenos para los tres métodos, mostrando valores inferiores a 9,4% para la repetitividad y 7,9% para la reproducibilidad, siendo el método ELL, el que mostró los mejor valores. Por otra parte, el método EUS presentó los valores más altos para los coeficientes de variación (9,4% para la repetitividad y 7,9% para la reproducibilidad); este hecho se puede atribuir a la dificultad en el mantenimiento de la temperatura de la muestra durante el proceso. Finalmente, el método MELL presenta óptimos valores de RSD para la repetitividad (5,1%) y reproducibilidad (7,4%). Este método presenta las ventajas de consumir menos cantidad de muestra, de reactivos, y tiempo, y además generar menos residuos que los otros dos métodos estudiados.

A los valores obtenidos para fenoles totales (Tabla 3.2), se les aplicó un test one-way ANOVA, para poner de manifiesto la posible existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos. Cuando la prueba LSD se aplicó para determinar las diferencias significativas entre los métodos, no se encontraron diferencias significativas entre el método MELL y el EUS; sin embargo, ambos presentaron valores medios significativamente diferentes en comparación con los obtenidos por el método ELL. Aunque el método ELL obtuvo los mejores valores de precisión, esta técnica presenta los valores más bajos de concentración de fenoles totales extraídos del aceite de oliva. Este método también tiene el inconveniente de que necesita más cantidad de muestra,

genera más residuos, y consume más tiempo que los otros métodos estudiados.

3.3.2. Parámetros de calidad del HPLC-DAD

Los extractos se analizaron con un HPLC-DADC. Empleando las condiciones descritas anteriormente, se logró la resolución completa de todos los compuestos estudiados (figura 3.5).

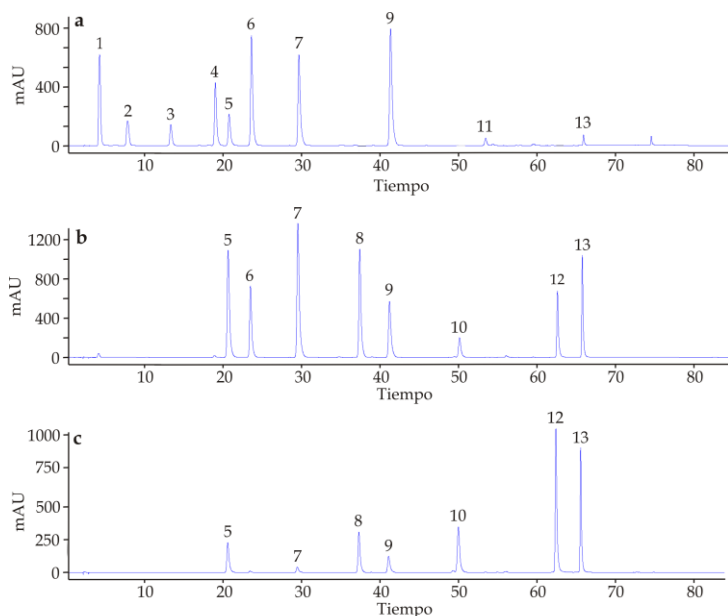


Figura 3.5. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una disolución estándar a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 1: ácido gálico; 2: hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 5: ácido cafeico; 6: vainillina; 7: ácido p-cumárico; 8: ácido sinápico; 9: ácido o-cumárico; 10: rutina; 11: oleuropeína; 12: luteolina; 13: apigenina.

La figura 3.5 muestra los perfiles fenólicos de elución de una mezcla de soluciones estándar a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). Los cromatogramas muestran que los alcoholes y ácidos fenólicos eluyen en primer lugar antes de llegar al minuto 45,

mientras que los flavonoides debido a su mayor hidrofobicidad, eluyen después de los 60 min, momento en el cual aumenta la concentración de metanol en la fase móvil.

La identificación de los picos cromatográficos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención y espectros obtenidos a partir de las disoluciones estándar.

Como puede observarse en la figura 3.5, la cromatografía nos ha permitido separar claramente cada uno de los compuestos estudiados, facilitando así la futura aplicación de dicho método a muestras reales de aceite.

Una vez alcanzada la completa resolución de los picos, se procedió a evaluar el rango lineal ($\mu\text{g}/\text{mL}$), el coeficiente de correlación (r^2), las curvas de calibración y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (Tabla 3.4). Para calcular los LOD y LOQ, se utilizó un método estadístico (*Anderson, 1989; Armbruster et al., 1994*) basado en las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = 3 \times S_b / m \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_b / m \quad (\text{eq. 2})$$

Donde S_b es la desviación estándar de la recta de calibrado y m es la pendiente de la misma. Los límites de detección fueron consistentemente bajos para todos los compuesta fenólicos, estando éstos en un rango entre 0.010 y 0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los límites de cuantificación presentaron valores entre 0.032 y 0.221 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero la mayoría de los compuestos obtuvieron valores en torno a 0.040 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 3.4).

Las curvas de calibración fueron realizadas a partir de 15 disoluciones estándar, en las cuáles las concentraciones oscilaron desde 0.02 hasta unos 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la mayoría de compuestos. Como puede verse en la tabla 3.4, los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0.999 para la mayoría de los compuestos dentro del rango lineal estudiado.

3.3.3. Diseño experimental del método: Micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales

Se realizó un diseño experimental en un aceite de oliva refinado dopado con el fin de reducir el consumo de reactivos a utilizar y la generación de residuos que ello conlleva. Los porcentajes de recuperación obtenidos en las diferentes condiciones de cada ensayo se muestran en la tabla 3.5. Las diferentes condiciones probadas se han evaluado a través de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada uno de los fenoles analizados.

El análisis de los resultados mediante gráficos de Pareto permite observar la influencia de los diferentes factores estudiados sobre los porcentajes de recuperación de los fenoles extraídos.

La figura 3.6 muestra los gráficos de Pareto para un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Tabla 3.4. Linealidad, ecuación de la recta, LOD y LOQ en soluciones estándar.

Compuestos fenólicos	Linealidad		Ecuación de la recta	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
	Rango lineal ($\mu\text{g/mL}$)	r^2			
Ácido gálico	0.02 – 33.68	0.999	$y = 259.09x - 31.146$	0.010	0.034
Hidroxitirosol	0.03 – 48.58	0.999	$y = 60.538x - 7.077$	0.010	0.032
Tirosol	0.02 – 38.88	0.999	$y = 56.313x - 10.731$	0.011	0.035
Ácido vanílico	0.02 – 34.02	0.999	$y = 189.42x - 29.034$	0.011	0.036
Ácido cafeico	0.02 – 34.27	0.999	$y = 101.94x - 9.79$	0.013	0.043
Vainillina	0.02 – 34.19	0.999	$y = 329.98x - 17.506$	0.011	0.036
Ácido p-cumárico	0.02 – 34.94	0.999	$y = 651.32x - 33.133$	0.011	0.037
Ácido sinápico	0.02 – 34.78	0.998	$y = 456.38x + 34.697$	0.030	0.100
Ácido o-cumárico	0.02 – 33.77	0.994	$y = 484.59x - 169.32$	0.066	0.221
Rutina	0.02 – 35.45	0.999	$y = 148.01x - 13.642$	0.012	0.041
Oleuropeína	0.02 – 34.27	0.999	$y = 22.121x - 4.113$	0.019	0.062
Luteolina	0.02 – 33.60	0.999	$y = 369.64x - 14.32$	0.021	0.071
Apigenina	0.02 – 33.60	0.999	$y = 333.47x - 1.814$	0.017	0.056

Tabla 3.5. Porcentajes de recuperación del diseño experimental en un aceite refinado dopado (%).

Compuestos fenólicos	Ensayos							
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^a	6 ^b	7 ^c	8 ^d
Ácido gálico	77.9	75.6	76.0	73.5	79.6	80.6	80.6	77.1
Hidroxitiroso	89.7	87.0	85.4	83.7	90.7	89.0	89.4	87.1
Tiroso	91.4	92.6	90.4	86.3	91.7	88.8	90.3	89.0
Ácido vanílico	88.3	91.1	88.2	84.1	88.7	88.2	86.8	86.9
Ácido cafeico	88.9	89.8	87.4	85.3	89.8	88.8	90.3	89.0
Vainillina	74.3	79.2	69.3	70.6	74.9	76.5	69.2	72.5
Ácido <i>p</i> -cumárico	82.3	83.7	74.9	78.6	83.1	83.0	81.4	81.6
Ácido sinápico	77.9	71.9	52.8	71.8	79.5	78.9	75.3	75.7
Ácido <i>o</i> -cumárico	90.9	87.0	77.9	85.2	90.8	87.8	88.7	89.3
Rutina	46.4	38.6	46.5	35.3	48.5	47.4	57.3	46.0
Oleuropeína	49.9	38.5	54.9	38.9	52.5	50.3	58.6	48.2
Luteolina	63.3	76.0	54.1	72.9	65.4	75.5	64.6	75.0
Apigenina	75.0	86.2	62.8	80.6	77.0	85.0	73.4	83.3

^a 500mg muestra + 500 µL MeOH/agua (80:20, v/v)

^b 500mg muestra + 800 µL MeOH/agua (80:20, v/v)

^c 800mg muestra + 500 µL MeOH/agua (80:20, v/v)

^d 800mg muestra + 800 µL MeOH/agua (80:20, v/v)

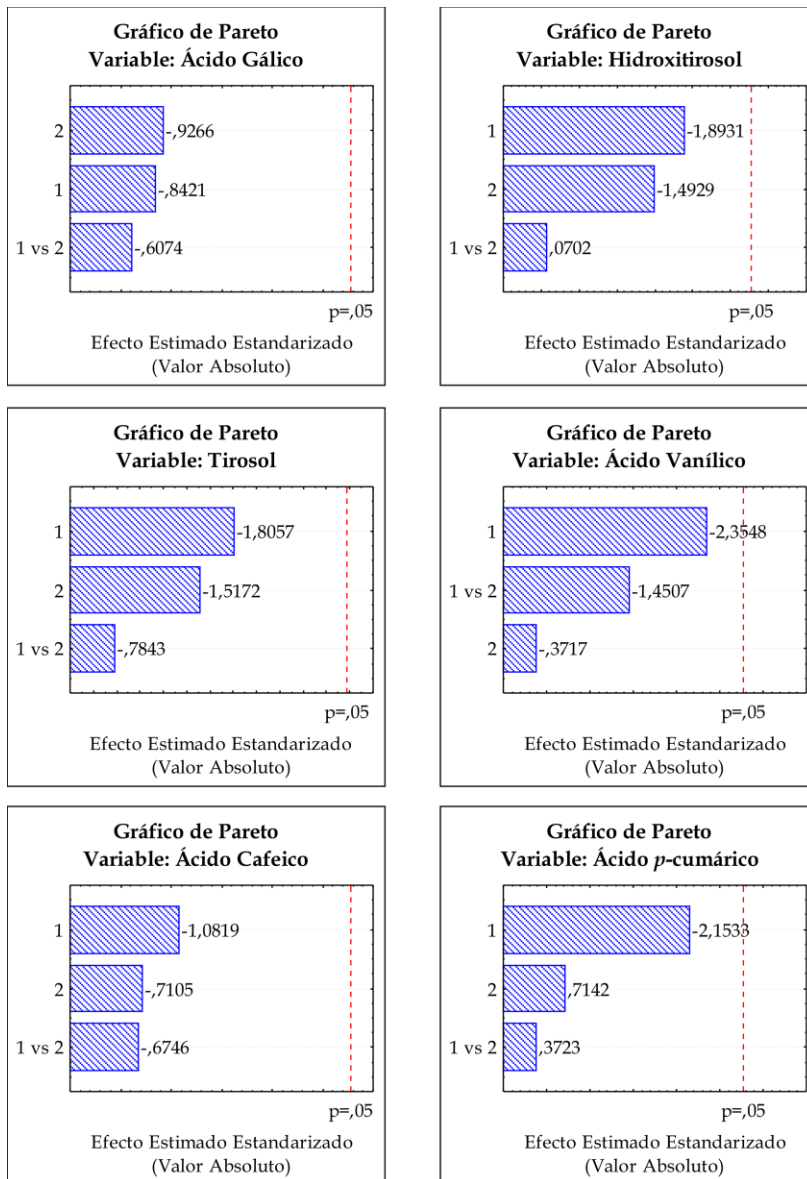


Figura 3.6. Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (μL), respectivamente.

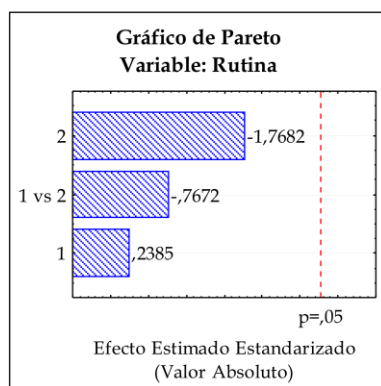
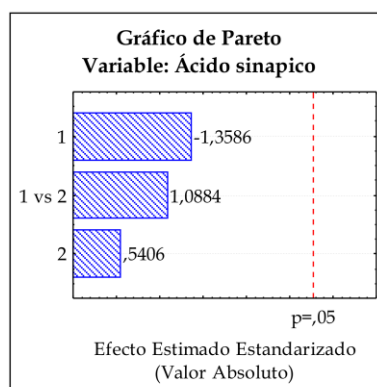
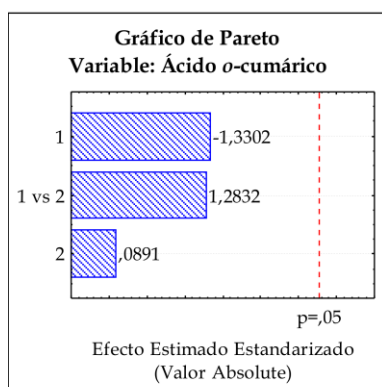
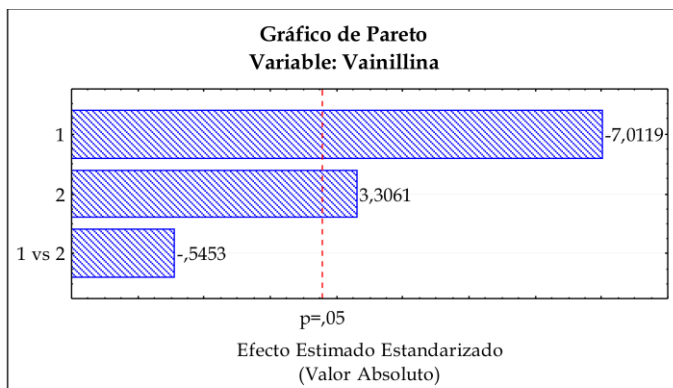


Figura 3.6. (continuación) Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (μL), respectivamente.

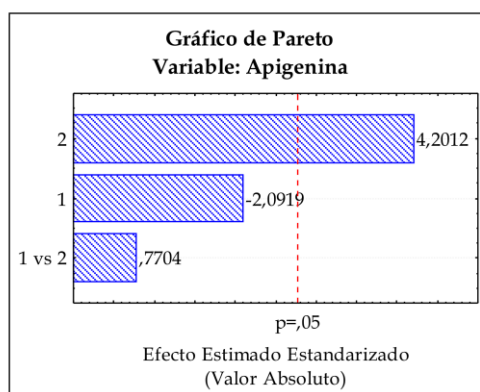
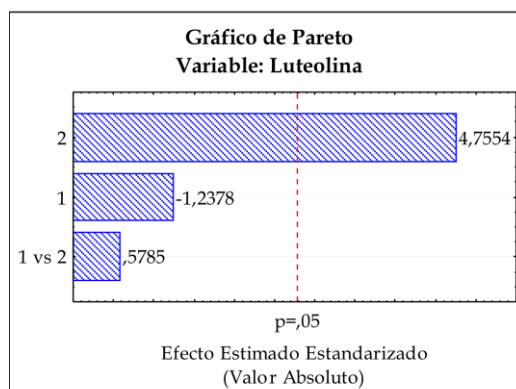
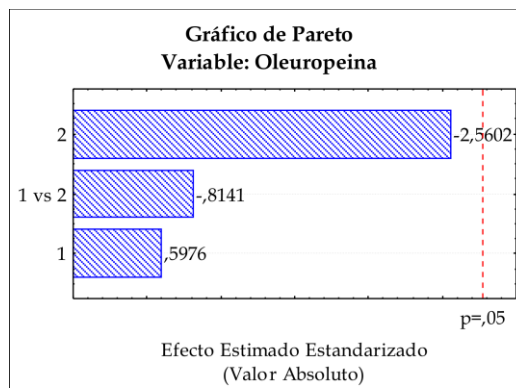


Figura 3.6. (continuación) Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (μL), respectivamente.

Varias conclusiones se obtuvieron teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla 3.5 y en la figura 3.6. Los gráficos de Pareto muestran que no hay diferencias significativas en la mayoría de los compuestos entre utilizar 500 mg o 800 mg de muestra, y 500 μ L o 800 μ L de extractante, con excepción de la vainillina, para la cual, los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron utilizando 500 mg de muestra y 800 μ L de extractante.

Por otro lado, para la luteolina y apigenina también existen diferencias significativas pero sólo en el caso del volumen de extractante. En ambos casos, los resultados obtenidos indican que los porcentajes de extracción de estos compuestos son mejores utilizando 800 μ L como volumen de extractante.

Para observar de una forma más intuitiva, mediante un código de color, cuáles son los valores de las variables y las combinaciones que proporcionan los mejores resultados, se representaron las superficies de isorrespuesta por familias de compuestos fenólicos.

La figura 3.7 muestra las superficies de isorrespuesta sobre la extracción de los ácidos fenólicos, los alcoholes fenólicos, los flavonoides y el total de los compuestos, siendo las zonas rojizas las que corresponden a los valores más altos de porcentajes de extracción.

Como se muestra en la figura, para el grupo de ácido fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico y ácido sinápico) y alcoholes fenólicos

(hidroxitirosol y tirosol), las mejores condiciones son 500 mg de muestra y 500 μL de extractante. Para los flavonoides (rutina, luteolina y apigenina), las mejores condiciones son 500 mg de muestra y 800 μL de extractante, hecho que corrobora los valores mostrados por los gráficos de pareto. Y finalmente, para el total de los compuestos, la superficie de isorrespuesta obtenida muestra que es más conveniente el uso de 500 mg de muestra y que las diferencias entre el uso de 500 μL u 800 μL de extractante no son significativas.

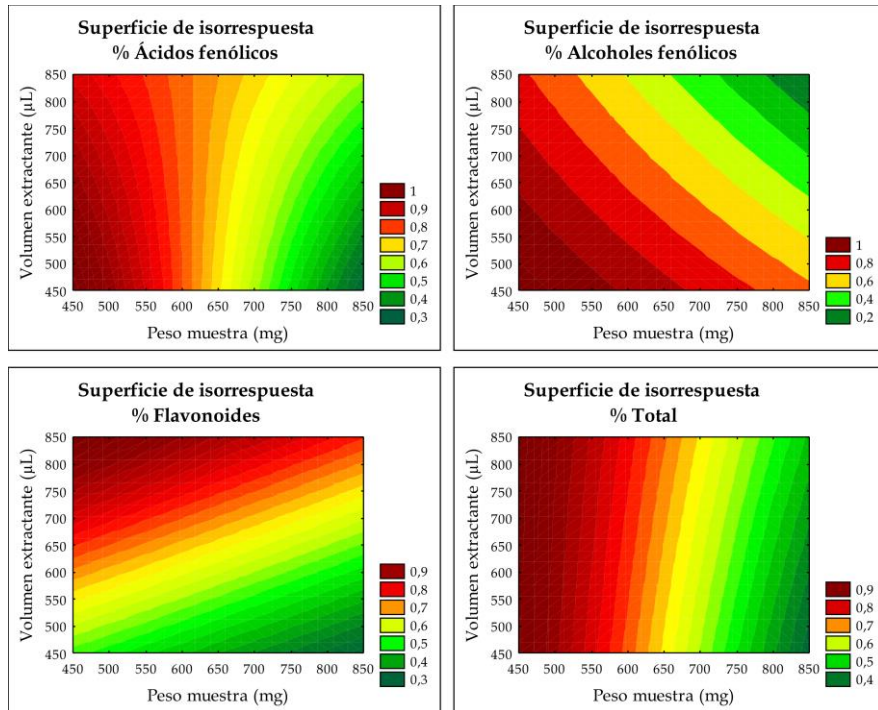


Figura 3.7. Gráficos de superficies de isorrespuesta de los porcentajes de recuperación de los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides y fenoles totales.

Considerando los datos mencionados, se decidió trabajar utilizando 500 mg de muestra y 500 μ L de metanol/agua (80:20, v/v), ya que estas condiciones fueron las más favorables para la mayoría de los compuestos estudiados. El uso de estas condiciones se justifica además, porque los compuestos que tenían porcentajes de recuperación mejores en estas condiciones son los que tienen una mayor capacidad antioxidante y son mayoritarios en el AOV.

Cuando se comparan estos datos con los obtenidos con anterioridad en el grupo (*Pizarro et al., 2013*), vemos que se obtienen mejores porcentajes de recuperación con el nuevo método para la mayoría de los compuestos estudiados. Por lo tanto, procedió a validar el método cromatográfico utilizando el método de MELL previamente mencionado.

3.3.4. Repetitividad, reproducibilidad y porcentaje de recuperación del método completo (MELL-HPLC-DAD) para la determinación de fenoles individuales

Para validar el método desarrollado, se evaluó la repetitividad y reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (%RSD), y se volvieron a calcular los porcentajes de recuperación realizando la media de estas muestras de AORD. Los resultados se muestran en la tabla 3.6.

Los valores de %RSD fueron bastante buenos para considerar que el método es óptimo para conseguir extraer, separar y cuantificar con la mayor efectividad posible, los compuestos fenólicos de un aceite de oliva.

Por un lado, los valores de %RSD de la repetitividad fueron menores del 2.2% para la mayoría de los compuestos estudiados, con la excepción de la rutina y la oleuropeína que presentaron valores de 6.4% y 8.6% respectivamente.

Tabla 3.6. Repetitividad, reproducibilidad y porcentajes de recuperación del método completo de determinación de compuestos fenólicos individuales.

Compuestos fenólicos	Repetitividad (%RSD)	Reproducibilidad (%RSD)	Re (%)
Ácido gálico	1.2	3.1	82.0
Hidroxitirosol	1.3	2.5	93.8
Tirosol	1.9	2.5	94.9
Ácido vanílico	1.8	2.6	91.6
Ácido cafeico	1.7	3.2	93.7
Vainillina	1.6	2.4	77.2
Ácido <i>p</i> -cumárico	1.5	2.9	85.6
Ácido sinapico	1.7	3.8	80.1
Ácido <i>o</i> -cumárico	1.6	3.5	91.2
Rutina	6.4	10.6	54.0
Oleuropeína	8.6	11.8	53.4
Luteolina	2.2	6.0	66.3
Apigenina	1.6	4.6	79.2

Re (%): porcentaje de recuperación.

Por otro lado, ocurre algo similar con los valores obtenidos para el %RSD en el estudio de la reproducibilidad. En este caso, los valores estuvieron en un rango entre el 2.4% y el 6%, a excepción, de nuevo, de la rutina y la oleuropeína que presentaron valores en torno al 11%.

En cuanto a los porcentajes de recuperación obtenidos para la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados, éstos presentaron valores superiores al 80%. Resulta importante señalar los porcentajes de recuperación obtenidos para la rutina (54.0%) y la oleuropeína (53.4%), los cuáles están relacionados con los valores de %RSD mostrados.

Para la situación particular que presentan la rutina y la oleuropeína en relación a los parámetros medidos, se puede sugerir, que los comportamientos son diferentes debido a las diferencias en las propiedades físicas del analito hidrófilo en una matriz lipófila, las cuáles no permiten una partición completa de estos compuestos durante el procedimiento de extracción (*Perri et al., 1999*).

3.3.5. Análisis de muestras reales

Una vez que la metodología analítica ha sido validada, ésta se aplicó para calcular la concentración de 9 compuestos fenólicos en muestras de AOVE de las variedades Arbequina y Picual (tabla 3.7).

Como muestra la tabla 3.7, las concentraciones de la mayoría de los compuestos fenólicos son similares en ambas variedades, con excepción del hidroxitirosol y tirosol que son claramente superiores en la variedad picual. Por el contrario, el valor del derivado del hidroxitirosol es inferior en dicha variedad.

Tabla 3.7. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/kg) presentes en dos variedades de AOVE.

Compuestos fenólicos	Picual	Arbequina
Hidroxitirosol	29.71	18.69
Tirosol	12.32	6.68
Ácido vanílico	1.09	1.15
Vainillina	0.45	0.57
Ácido p-cumárico	0.71	0.46
Derivado hidroxitirosol	4.52	8.88
Ácido o-cumárico	1.38	1.43
Luteolina	3.49	3.35
Apigenina	1.23	1.13

A continuación, se muestran las figuras 3.8 y 3.9 que corresponden a los cromatogramas a 280, 320 y 360 nm de las muestras arbequina y picual, respectivamente.

Para evitar confusiones, se ha conservado la numeración inicial utilizada en la disolución estándar y en el aceite de oliva refinado dopado. Además, se ha añadido un compuesto nuevo caracterizado presente en las muestras, el derivado del hidroxitirosol. Esta técnica no nos permite saber de qué derivado se trata, por ello resulta fundamental seguir optimizando metodologías analíticas para obtener la mayor información posible del material de estudio, en este caso, el aceite de oliva virgen extra.

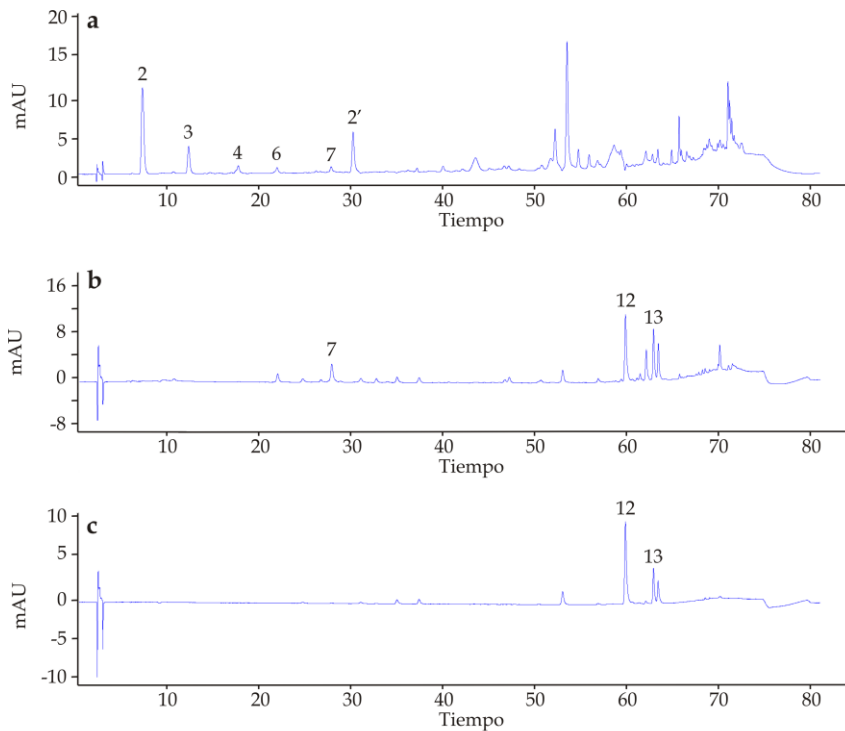


Figura 3.8. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una muestra de aceite de la variedad Arbequina a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 2: hidroxitirosol; 2': derivado del hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 6: vainillina; 7: ácido *p*-cumárico; 12: luteolina; 13: apigenina.

Como puede observarse, el perfil fenólico de las diferentes variedades es bastante diferente al final del cromatograma. Debido a ello, es necesario seguir estudiando dicho perfil con técnicas más avanzadas para optimizar la identificación y cuantificación de la mayor cantidad de compuestos fenólicos posible.

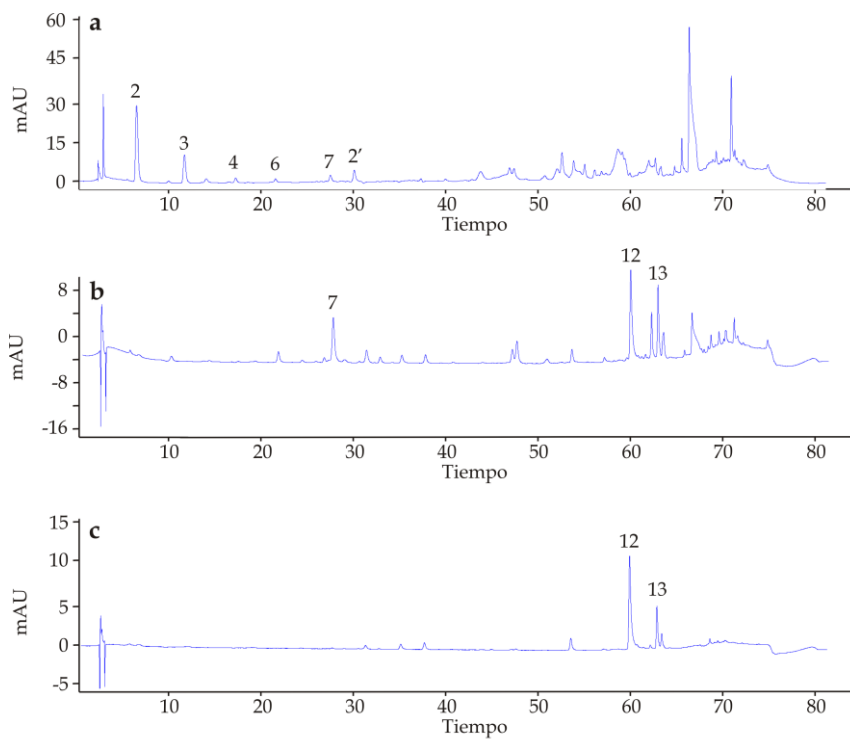


Figura 3.9. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una muestra de aceite de la variedad Arbequina a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 2: hidroxitirosol; 2': derivado del hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 6: vainillina; 7: ácido *p*-cumárico; 12: luteolina; 13: apigenina.

3.4. CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha demostrado la rapidez y eficiencia a la hora de extraer compuestos fenólicos del aceite de oliva utilizando un nuevo método llamado micro extracción líquido-líquido (MELL). Cuando este método se ha comparado con la extracción líquido-líquido con sonda de ultrasonido (EUS) y la extracción líquido-líquido (ELL), se ha observado que el método EUS obtuvo el mayor promedio de fenoles totales; sin embargo, la inexistencia de diferencias significativas entre ambos métodos unidos a los mejores valores de repetitividad y reproducibilidad del MELL, y a sus ventajas inherentes, tales como el menor consumo de disolvente y tiempo, hacen del método de MELL, el elegido para la extracción de fenoles totales en el aceite de oliva.

Posteriormente, con la optimización del método cromatográfico en un HPLC-DAD y la mejora en el método de MELL para fenoles individuales, se ha demostrado que la metodología que se presenta es consistente y es la más favorable para realizar este tipo de ensayos, ya que los valores de %RSD son menores del 10% y los porcentajes de recuperación fueron superiores al 80% en la mayoría de los casos.

Capítulo 4

Desarrollo de un método basado en una micro extracción líquido-líquido acoplada a un UHPLC-ESI-MS/MS para determinar compuestos fenólicos en el aceite de oliva

Este capítulo está basado en el artículo:

Mercedes Becerra-Herrera, María Sánchez-Astudillo, Rafael Beltrán and Ana Sayago. Determination of phenolic compounds in olive oil: new method based on liquid-liquid micro extraction and UHPLC-ESI-MS/MS. Submitted to Talanta.



RESUMEN

La combinación de una técnica de extracción con un novedoso método analítico ha sido realizada y evaluada con el objetivo de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos (alcoholes fenólicos, derivados secoiridoides, lignanos, flavonoides, ácidos fenólicos y aldehídos) que se pueden encontrar en el aceite de oliva virgen (AOV) del modo más eficiente y rápido permitido.

Con el propósito de reducir la cantidad de muestra, reactivos y tiempo necesario, se ha desarrollado un método de micro extracción líquido-líquido (MELL) combinado con un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) acoplado a una fuente de ionización electrospray (ESI) y un detector de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Para detectar los compuestos se trabajó en modo Reacción Múltiple Dinámica Monitorizada (DMRM); en el cual, se hace uso de tiempos específicos con un delta de tiempo para cada compuesto.

La UHPLC presenta grandes ventajas frente a la HPLC en términos de ahorro de tiempo y de disolvente. Además, la resolución y la eficiencia de la UHPLC dieron lugar a un menor consumo de disolvente y volumen de inyección de muestras.

La metodología propuesta se utilizó en una disolución multiestándar y los parámetros de control de calidad se compararon con los obtenidos en un aceite de oliva refinado dopado (AORD). En general, la repetitividad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación mostraron valores más bajos

en AORD que en la disolución multiestándar. El efecto matriz, los porcentajes de recuperación y la eficiencia del proceso se ha estudiado haciendo uso del AORD. Los porcentajes de recuperación del método de extracción estuvieron alrededor del 90% y la eficiencia total del método completo fue mayor del 80% en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados. El examen de todos estos parámetros reveló que el trabajar directamente en la matriz del aceite de oliva, la cual está más cerca de comportarse como una muestra real, proporciona mejores resultados. La aplicabilidad y fiabilidad de esta metodología se han confirmado con muestras de AOV reales de diferentes variedades.

ABSTRACT

A novel analytical approach has been performed and evaluated for the identification and quantification of phenolic compounds (phenolic alcohols, secoiridoids derivatives, lignans, flavonoids, phenolic acids and aldehydes) which can be found in virgin olive oil (VOO).

With the purpose of reducing the amount of sample, reagents and time consumed, an improved liquid-liquid micro extraction (LLME) method combining with ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to electrospray ionization sources (ESI) and tandem mass spectrometry (MS/MS) in Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) mode has been developed.

The proposed methodology was used in standard solution and the quality control parameters obtained were compared with those achieved in spiked refined olive oil (SROO). Generally, the repeatability, reproducibility, detection and quantification limits showed lower values in SROO than in standard solution. Matrix effect, recovery and process efficiency have been studied using SROO. The recoveries were around 90% and the process efficiency of the whole method was higher than 80% in most of the phenolic compounds studied. Examination of all of these parameters revealed that working straight in the olive oil matrix, which is closer to behave as a real sample, provides better results. The applicability and reliability of this methodology have been confirmed using real VOO samples.

4.1. INTRODUCCIÓN

El Aceite de Oliva Virgen (AOV) es un componente esencial de la dieta mediterránea, con reconocidos efectos beneficiosos sobre la salud humana (*García-Villalba et al., 2012; Cicerale et al., 2010*). Se ha demostrado en numerosos estudios, que los compuestos fenólicos afectan considerablemente a las propiedades organolépticas y a la estabilidad oxidativa del AOV (*Romani et al., 1999*). Es importante destacar que estos compuestos poseen una alta actividad antioxidante (*Servili y Montedoro, 2002; Antolovich et al., 2004; Škerget et al., 2005*) y además tienen la capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (*Leenen et al., 2002*). También desempeñan un papel fundamental en los mencionados efectos saludables del AOV. Entre otros, estos compuestos fenólicos se han asociado a la prevención de algunos tipos de cáncer, enfermedades coronarias, diabetes y envejecimiento de las células (*García-Villalba et al., 2012; Romani et al., 1999*).

La fracción fenólica del AOV está compuesta principalmente por alcoholes fenólicos (hidroxitirosol, tirosol) y sus derivados secoiridoides (*Lavelli y Bondesan, 2005*), ligados a las formas aldehídica y dialdehídica del ácido elenólico (tales como la oleuropeína, la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), el 4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno (3,4-DHPEA-AC), la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada a tirosol (*p*-HPEA-EDA), el *p*-4-hidroxifenilethanol-ácido elenólico, un isómero del ligustrósido

aglicona (*p*-HPEA-EA), 3,4-dihidroxifeniletanol-ácido elenólico, un isómero de la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) y su forma metilada (metil 3,4-DHPEA-EA)). Algunos componentes de menor importancia también están comúnmente presentes, como son: los lignanos (pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol), flavonoides (rutina, luteolina y apigenina), los ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido homovanílico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido protocatéquico, ácido sinapico, ácido *p*-hidroxifenilacético y ácido *p*-hidroxibenzoico), y los aldehídos (vainillina). Todos estos compuestos contribuyen a la estabilidad y a la larga vida útil que se observa típicamente en el AOV a diferencia de otros aceites vegetales (*Angerosa et al., 2000*).

Varios métodos analíticos se han propuesto para determinar los compuestos fenólicos, utilizando diferentes métodos de extracción, y técnicas de separación y cuantificación (*Ryan y Robards, 1998*). Los procedimientos de extracción se han considerado comúnmente como el cuello de botella en los métodos de análisis para estudiar el AOV, ya que dicho procedimiento tiene un impacto significativo en la precisión de los resultados. En este trabajo, un método de micro extracción líquido-líquido (MELL) ha sido perfeccionado (*Pizarro et al., 2013*). Este método de extracción requiere menos cantidad de muestra, genera un menor volumen de residuos, y es más rápido que otros métodos de extracción convencionales, tales como las extracciones en fase sólida (*Servili et al., 1999; Mateos et al., 2001*) y las extracciones líquido-líquido (*Vázquez Roncero et al., 1973; Jerman et al., 2010*).

La rapidez del análisis y mejora de la eficiencia, así como la reducción de los costos del mismo siempre es deseable en cualquier aplicación de la cromatografía líquida. Estas características han sido mejoradas en la nueva generación de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), así como su capacidad para proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa (*Nováková et al., 2006*).

Además, el uso de UHPLC acoplado a fuentes de ionización por electrospray (ESI) y espectrometría de masas (MS/MS) se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución inimaginables hace unos años con instrumentos considerados de alta/media rendimiento.

Teniendo en cuenta todos estos progresos, es de esperar que la técnica UHPLC-ESI-MS/MS juegue un papel clave en el futuro de la cromatografía líquida (*Ferrer et al., 2005; Suárez et al. 2009*).

A pesar de la alta fiabilidad de los ensayos cuantitativos utilizando UHPLC-ESI-MS/MS, la integridad de los datos resultantes puede verse afectada en alguna medida por una pérdida de selectividad en el análisis debido al llamado “efecto matriz”. Este efecto dependiente de la matriz también se conoce

como el “efecto de la supresión/incremento del ión” (*Matuszewski et al., 2003; Fu et al., 1998; Choia et al., 2001*). Para eliminar o minimizar este efecto de la matriz, se debe realizara una optimización del método de extracción de la muestra y de la separación cromatográfica de los analitos (*Taylor, 2005*).

Este estudio describe un rápido, específico, fiable y sensible método analítico para la determinación simultánea de 28 compuestos fenólicos presentes frecuentemente en el AOV. Con este fin, la metodología diseñada utiliza una innovadora micro extracción líquido-líquido (MELL) para la obtener el extracto fenólico del AOV, seguida por un UHPLC-ESI-MS/MS para la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en el mismo. El método fue validado usando soluciones estándar y un aceite de oliva refinado dopado (AORD) con concentraciones conocidas de cada patrón. También se estudió el efecto supresión/incremento del ión y las diferentes respuestas de cada compuesto fenólico a este efecto dependiente de la matriz fueron discutidas. Por último, el método fue aplicado a muestras de aceite de oliva virgen extra (AOVE) con el fin de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en ellos.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Muestras y reactivos

Los compuestos fenólicos, tales como: ácido gálico (99%), ácido protocatéquico (97%), ácido sinápico (98%), rutina (95%) y pinosresinol (95%) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El ácido vanílico (97%), vainillina (98%), ácido cafeico (98%), tirosol (97%), ácido ferúlico (99%), ácido *p*-hidroxifenilacético (100%), ácido cinámico (99%), ácido *p*-hidroxibenzoico (99%), ácido *m*-cumárico (99%), ácido *p*-cumárico (98%) y ácido *o*-cumárico (97%), se adquirieron de Fluka (Steinheim, Alemania). Apigenina (99%), luteolina (99%) y oleuropeína (99%) fueron adquiridos de Extrasynthèse (Genay, Francia). El hidroxitirosol se sintetizó en el Departamento de Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia (Sevilla, España). Para preparar las soluciones madre estándar de compuestos fenólicos (con concentraciones que van desde 400 hasta 4000 g/mL), la cantidad apropiada del reactivo sólido se pesó y se disolvió en 25 mL de metanol calidad HPLC de Panreac. Estas soluciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad. Se preparó un multiestándar (con una concentración final de 20 mg/mL de cada compuesto fenólico) mediante la dilución con metanol de las soluciones madre y se almacenó a 4 °C en oscuridad. Esta solución se pasó a través de un filtro de nylon de 0.22 µm antes de inyectarlo en el UHPLC-ESI-MS/MS.

El acetonitrilo y ácido acético glacial de calidad espectrofotométrica fueron suministrados también por Panreac (Barcelona, España).

El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

El aceite de oliva refinado (AOR) es el aceite de oliva obtenido de aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado que no provoquen ninguna modificación de la estructura glicerídica inicial. Debido a estas propiedades que posee el AOR, éste fue utilizado como blanco en los siguientes estudios: porcentajes recuperación del proceso de extracción, efecto matriz, eficiencia del proceso y parámetros de calidad. Para probar la aplicabilidad del método desarrollado, se preparó un AORD (Pizarro *et al.*, 2013). Para dopar el aceite, se pesaron treinta gramos de AOR, se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 100 mL y se mezcla con la cantidad necesaria de cada estándar fenólico. La concentración final de los 20 compuestos fenólicos seleccionados (ácido gálico, ácido protocatéquico, hidroxitirosol, ácido *p*-hidroxibenzoico, tirosol, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido vanílico, ácido cafeico, vainillina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *m*-cumárico, ácido sinápico, rutina, ácido *o*-cumárico, oleuropeína, ácido cinámico, luteolina, apigenina y pinoresinol) en el AORD fue 40 mg/g. Durante 24 horas, este aceite preparado fue agitado bajo una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se utilizó un rotavapor para eliminar el disolvente. Por último, este AORD se almacenó a -20 °C en oscuridad.

4.2.2. Proceso de extracción

Como se mencionó anteriormente, se utilizó un método de extracción (MELL) específicamente diseñado para la determinación

de compuestos fenólicos individuales en muestras de AOV (ver apartado 4.2.3.5. Micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales). Con este método se logra una reducción significativa en el tiempo de extracción, en la cantidad de muestra y los reactivos empleados y en los residuos generados, lo que conlleva por lo tanto, una reducción en los costes del mismo. De este modo, 500 mg de AOV se extrajeron con 0,5 mL de la mezcla metanol/agua (80/20, v/v) en tubos Eppendorf de 2 mL. La mezcla resultante se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 13400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase metanólica se pasó a través de filtro de nylon de 0.22 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. A continuación, 0.150 mL de la fase metanólica se diluyeron con agua Mili-Q hasta 0.5 mL en un vial de 1.5 mL. Diez microlitros de esta solución fueron inyectaron en el UHPLC-ESI-MS/MS.

4.2.3. UHPLC-ESI-MS/MS

Los análisis cromatográficos se realizaron en un UHPLC Agilent serie 1200 (Agilent, EE.UU.) con un sistema de bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío, un inyector automático refrigerado y un compartimento para la columna termostatizado.

La separación se llevó a cabo utilizando una columna analítica Zorbax SB-C18 (2,1 mm \times 50 mm, 1,8 μm) (Agilent). Una óptima separación de los analitos se consiguió utilizando un gradiente de fase móvil binario a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de inyección fue de 10 mL. Los disolventes fueron (A)

agua/ácido acético (0.2%), con un pH 3.10 y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado se muestra en la tabla 4.1. Tras este gradiente, finalmente, se regresa a las condiciones iniciales en 5 min.

Tabla 4.1. Gradiente de fases móviles del UHPLC-ESI-MS/MS.

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
3	95	5
15	60	40
15.5	0	100

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se obtuvo usando un 6410 Triple Quadrupolo LC/MS equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y controlado por el software MassHunter Workstation (Agilent, EE.UU.). Las condiciones de trabajo fueron:

- Voltaje del capilar: 4000 V
- Flujo de gas: 10 L/min
- Temperatura del gas: 300 °C
- Presión del nebulizador: 35 psi

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó, cuando era posible, utilizando los estándares comerciales. En el caso de los compuestos derivados de compuestos fenólicos que no eran comerciales, la estimación de sus valores fue lograda mediante equivalentes. De acuerdo con esto, la concentración estimada del ácido homovanílico fue expresada como equivalente

del ácido vanílico ($\mu\text{g}/\text{mL}$); la del 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA como equivalente de la oleuropeína ($\mu\text{g}/\text{mL}$); y la del 1-acetoxipinoresinol como equivalente del pinoresinol ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Los siguientes compuestos: 3,4-DHPEA-AC, metil 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA fueron identificados pero no cuantificados porque ni ellos estaban comercialmente disponibles ni hay estándares de compuestos fenólicos equivalentes para ellos. Todos los compuestos que las no estaban comercialmente disponibles, se identificaron de acuerdo con la literatura publicada (Suárez *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011) y los resultados obtenidos gracias al Software MassHunter Optimizer.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Optimización del método para determinar compuestos fenólicos

En trabajos anteriores se han utilizado diversas fases móviles en UHPLC-ESI-MS/MS tales como: ácido fórmico/formiato amónico (*Barceló-Barrachina et al., 2004*), ácido acético/agua (*Suárez et al., 2008*), ácido fórmico/agua (*Herrero et al., 2011; Alarcón et al., 2012*) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). En este trabajo, se utilizaron previamente tres fases móviles diferentes para comprobar con cuál de ellas se obtenía una resolución completa de todos los compuestos, a saber: 1) 0.05% formiato amónico/0.05% ácido acético/agua, 2) 0.1% formiato amónico/0.1% ácido acético/agua, y 3) 0.2% ácido acético/agua. Estas fases móviles mostraron valores de pH de 4.0, 3.6 y 3.1, respectivamente. De entre todas ellas, la configuración de la tercera fase móvil (0.2% ácido acético/agua) se seleccionó sobre basándonos en que ésta presentó la mejor resolución de los compuestos fenólicos estudiados.

Para optimizar la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en las soluciones estándar y muestras de AOV, se realizó un ensayo con todas las combinaciones posibles entre dos flujos diferentes de fase móvil (0.2 y 0.5 mL/min) y tres volúmenes de inyección (5, 10 y 20 μ L). La combinación de la velocidad de flujo 0.4 mL/min y 10 μ L de volumen de inyección mostró la mejor separación de los compuestos en un período de 15 minutos. Por último, se testó el uso del ESI en modo de ion positivo

y negativo, y se observó que todos los compuestos fenólicos ionizan principalmente en modo negativo.

La figura 4.1 muestra un cromatograma UHPLC-MS/MS obtenido de la mezcla de solución estándar a concentración de 20 mg/mL usando las condiciones previamente optimizadas.

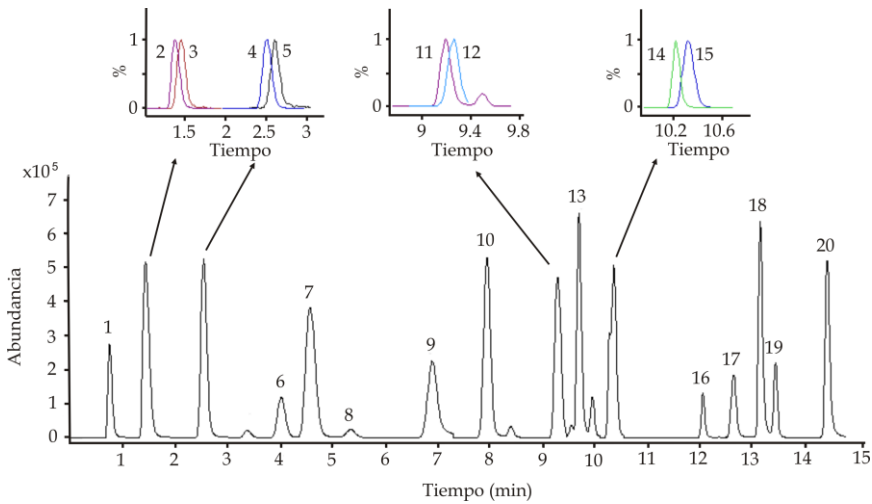


Figura 4.1. Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en modo DMRM en el análisis UHPLC-MS/MS de compuestos fenólicos en la solución multiestándar.

La designación de los picos fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido *p*-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido *p*-hidroxifenilacético, (7) ácido vanílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido *p*-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido *m*-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido *o*-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinosresinol, (20) apigenina.

La detección se realizó en modo: Reacción múltiple dinámica monitorizada (DMRM) (Agilent 6400 triple cuadrupolo). La mejora de este modo respecto modo MRM convencional es el uso de tiempos específicos con un delta de tiempo para cada compuesto en lugar de un segmento de tiempo. El modo DMRM cuenta con datos de rendimiento, calidad y resultados equivalentes o mejores que el resto; además, y el desarrollo de métodos y su modificación es más sencillo. Para identificar correctamente los diferentes compuestos se utilizaron las dos transiciones más sensibles. La transición más sensible de las dos fue utilizada para la cuantificación y la siguiente se usó para la confirmación del compuesto. Las transiciones de MRM y los parámetros de adquisición correspondientes (voltaje del cono y energía de colisión) se optimizaron de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la infusión de 20 mg/mL aproximadamente de cada compuesto en la fase móvil. Los iones producto obtenidos están de acuerdo con los mencionados en la literatura (*Suárez et al., 2008; Barceló-Barrachina et al., 2004; Savarese et al., 2007*). Se consiguieron monitorizar dos transiciones para todos los compuestos, excepto para el 1-acetoxypinoresinol y el metil 3,4-DHPEA-EA. Para estos dos compuestos, sólo una transición se monitorizó debido a la falta de sensibilidad observada de los iones producto (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos.

Compuestos fenólicos	Ion precursor (m/z)	DMRM 1 (cuantificación)		DMRM 2 (confirmación)		Fragmentador (V)	Tiempo de retención (min)
		Ion producto (AR, %)	EC (V)	Ion producto	EC (V)		
Ácido gálico	169	125 (100)	12	79.1	24	128	0.7
Ácido protocatéquico	153	109 (100)	12	123.1	12	104	1.4
Hidroxitiroso	153.2	125.1 (100)	12	123.1	8	128	1.5
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	137	93.1 (100)	12	65.1	32	104	2.5
Tirosol	137.2	119.1 (100)	12	106.1	12	110	2.6
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	151	107 (100)	0	79.1	16	80	3.3
Ácido vanílico	167.2	152 (100)	8	108	28	104	3.9
Ácido cafeico	179.2	135 (99.7)	12	107.1	24	104	4.5
Vainillina	151.1	136.1 (100)	8	92	20	80	6.8
Ácido <i>p</i> -cumárico	163.2	119.1 (104.9)	12	93	32	104	7.8
Ácido ferúlico	193.1	134 (100)	12	178	8	104	9.2
Ácido <i>m</i> -cumárico	163.2	119 (38.6)	12	93.1	32	104	9.3
3,4-DHPEA-AC	195.1	59.1 (100)	8	135	0	128	9.6
Ácido sinápico	223.1	208 (100)	8	93.1	32	104	9.6

AR: abundancia relativa.

Tabla 4.2 (continuación). Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos.

Compuestos fenólicos	Ion precursor (m/z)	DMRM 1 (cuantificación)		DMRM 2 (confirmación)		Fragmentador (V)	Tiempo de retención (min)
		Ion producto (AR, %)	EC (V)	Ion producto	EC (V)		
Rutina	609.2	300.1 (100)	36	301	32	216	10.2
Ácido <i>o</i> -cumárico	163.2	119.1 (59.5)	12	93.1	36	128	10.3
Oleuropeína	539.5	275.1 (100)	16	307.1	16	152	12
3,4-DHPEA-EDA	319.1	59 (100)	4	69.1	32	104	12.1
3,4-DHPEA-EA	377.1	275.1 (100)	0	95.1	12	104	12.4
Ácido cinámico	147	103.1 (100)	4	77	20	80	12.6
Luteolina	285.2	133 (100)	32	175.1	20	182	13
Pinoresinol	357.1	136 (100)	28	151.1	16	128	13.3
1-Acetoxy-pinoresinol	415.1	239 (100)	40	-	-	128	13.6
Ácido homovanílico	181	137.1 (100)	8	109.1	12	200	13.7
Metil 3,4-DHPEA-EA	409	95 (100)	20	-	-	104	13.7
<i>p</i> -HPEA-EA	361.1	291.1 (100)	0	101	8	104	13.7
<i>p</i> -HPEA-EDA	303.1	59.1 (100)	8	285	0	128	13.8
Apigenina	269.2	117 (100)	32	107.2	24	152	14.3

AR: abundancia relativa.

Algunos compuestos fenólicos tuvieron tiempos de retención similares; por una parte, el ácido sinápico y el 3,4-DHPEA-AC, y por otra parte, el ácido homovanílico, metil 3,4-DHPEA-EA y *p*-HPEA-EA. Estos compuestos fueron identificados mediante diferentes transiciones de cuantificación y confirmación. El delta del tiempo de retención fue de 1 min para todos los compuestos, excepto para el ácido *o*-cumárico y ácido *m*-cumárico, que fue de 0.5 min. La excelente estabilidad de los tiempos de retención de cada uno de los compuestos fenólicos aumentó considerablemente la sensibilidad del análisis. La figura 4.2 muestra los cromatogramas en DMRM correspondientes a las primeras transiciones (cuantificativas) de los compuestos fenólicos.

4.3.2. Parámetros de control de calidad

Tras lograr una separación aceptable de los compuestos y optimizar las condiciones del MS/MS, se estudiaron los parámetros de calidad del método cromatográfico con el fin de establecer las características del mismo, asegurando una adecuada identificación, confirmación y cuantificación de los compuestos estudiados. La precisión del método, expresada como repetitividad (en el mismo día) y reproducibilidad (entre días) en términos de desviación estándar relativa (%RSD) se evaluó para cada compuesto fenólico en la solución estándar a concentraciones de 15 µg/mL.

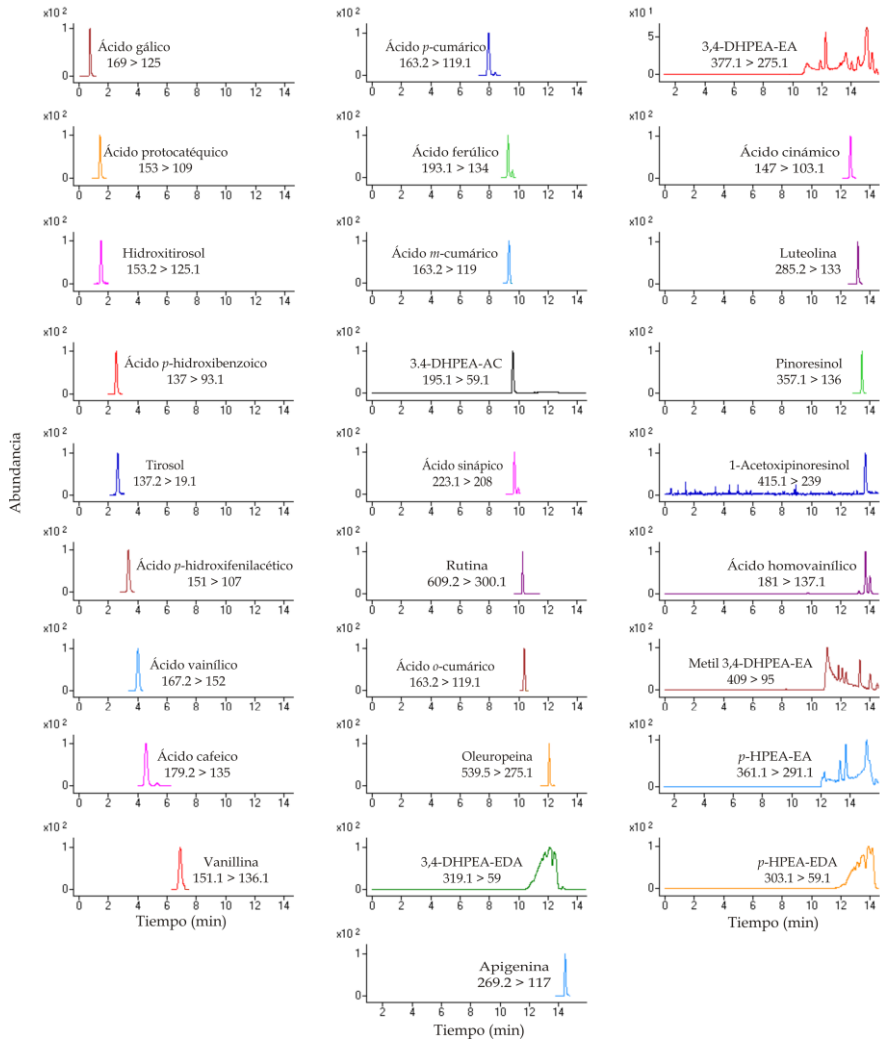


Figura 4.2. Cromatogramas de los iones extraídos en modo DMRM de los compuestos fenólicos identificados en AORD y muestras de AOVE de la variedad Picual.

Como se muestra en la tabla 4.3 y en la figura 4.3, los valores de %RSD para la repetitividad fueron sistemáticamente inferiores al 6% (con la única excepción de la vainillina, 9.7%), mientras que los valores de %RSD para la reproducibilidad estuvieron fundamentalmente en el intervalo del 5-13%.

La linealidad del método se estudió mediante la inyección de soluciones estándar a diez niveles de concentración. Todos los compuestos necesitaron dos curvas de calibración para el rango de concentración estudiado. El intervalo lineal ($\mu\text{g}/\text{mL}$), el coeficiente de correlación (r^2), las ecuaciones de la recta, los valores de la repetitividad y la reproducibilidad, y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada compuesto fenólico se detallan en la tabla 4.3. Los límites de detección y cuantificación se calcularon como tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar relativa de los valores analíticos del blanco obtenidos a partir de la curva de calibración.

Los límites de detección fueron consistentemente por debajo de $0.006 \mu\text{g}/\text{mL}$ para la mayor parte de los compuestos fenólicos, que van desde 0.0001 hasta $0.0199 \mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que los límites de cuantificación fueron de 0.0167 a $0.2874 \mu\text{g}/\text{ml}$, estando la mayoría de sus valores por debajo de $0.032 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Linealidad, ecuación de la recta, %RSD, LOD y LOQ en solución estándar.

Compuesto fenólico	Linealidad		Ecuación de la recta	RSD(%, 15 µg/mL)		LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
	Rango lineal (µg/mL)	r ²		r ^a	R ^b		
Ácido gálico	0.016 - 0.526	0.997	$y = 245493x - 7748$	5.5	7.1	0.0008	0.0167
	0.526 - 16.84	0.986	$y = 148077x + 215767$				
Ácido protocatéquico	0.018 - 0.593	0.998	$y = 439908x - 9655$	4.7	6.4	0.0007	0.0195
	0.593 - 18.97	0.989	$y = 223815x + 454313$				
Hidroxitirosol	0.023 - 0.759	0.996	$y = 1435x + 21$	3.5	8.6	0.0199	0.0516
	0.759 - 28.29	0.969	$y = 348x + 2369$				
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.019 - 0.637	0.996	$y = 468410x - 10384$	3.0	6.1	0.0123	0.0411
	0.637 - 20.39	0.986	$y = 262478x + 545336$				
Tirosol	0.018 - 0.608	0.997	$y = 4333x - 7$	5.3	6.4	0.0162	0.2874
	0.608 - 19.44	0.976	$y = 1568x + 5652$				
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	0.018 - 0.6	0.996	$y = 23450x - 459$	2.5	8.3	0.0055	0.0183
	0.6 - 19.2	0.982	$y = 13197x + 26410$				
Ácido vanílico	0.016 - 0.532	0.998	$y = 82299x - 1307$	1.9	9.3	0.0059	0.0197
	0.532 - 17.01	0.984	$y = 46437x + 77393$				
Ácido cafeico	0.016 - 0.536	0.989	$y = 396565x - 17088$	3.5	6.5	0.0007	0.0185
	0.536 - 17.14	0.985	$y = 218662x + 364789$				
Vainillina	0.016 - 0.534	0.998	$y = 362194x - 8657$	9.7	10.8	0.0065	0.0219
	0.534 - 17.1	0.988	$y = 204531x + 287204$				
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.017 - 0.546	0.997	$y = 591153x - 18198$	3.0	5.7	0.0008	0.0197
	0.546 - 17.47	0.985	$y = 297810x + 574661$				

a $n = 5$ b $n = 3$; días = 5

Tabla 4.3 (continuación). Linealidad, ecuación de la recta, % RSD, LOD y LOQ en soluciones estándar.

Compuesto fenólico	Linealidad		Ecuación de la recta	RSD (%), 15 µg/mL		LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
	Rango lineal (µg/mL)	r ²		r ^a	R ^b		
Ácido férulico	0.018 - 0.6	0.997	y = 176668x - 5451	4.0	7.1	0.0009	0.0182
Ácido m-cumárico	0.6 - 19.2	0.985	y = 71203x + 204237	4.2	8.3	0.0011	0.0219
	0.018 - 0.602	0.997	y = 362194x - 8657				
Ácido sinápico	0.602 - 19.28	0.987	y = 143353x + 418528	3.1	10.2	0.0006	0.0222
	0.018 - 0.595	0.991	y = 218849x - 9804				
Rutina	0.595 - 19.05	0.985	y = 85587x + 250584	3.7	11.1	0.0005	0.0310
	0.017 - 0.554	0.997	y = 399231x - 9808				
Ácido o-cumárico	0.554 - 17.72	0.961	y = 135268x + 507476	4.6	7.5	0.0011	0.0177
	0.016 - 0.528	0.997	y = 3949833x - 10116				
Oleuropeína	0.528 - 18.97	0.989	y = 181389x + 313347	2.6	9.3	0.0001	0.0233
	0.016 - 0.536	0.994	y = 390181x - 10749				
Ácido cinámico	0.536 - 17.14	0.980	y = 141111x + 434986	1.1	12.8	0.0022	0.0194
	0.018 - 0.603	0.988	y = 206490x - 6724				
Luteolina	0.603 - 19.29	0.991	y = 94258x + 223360	5.0	10.1	0.0137	0.0457
	0.016 - 0.525	0.997	y = 914438x - 16197				
Pinoresinol	0.525 - 16.8	0.989	y = 400764x + 872417	2.8	13.1	0.0151	0.0837
	0.018 - 0.6	0.997	y = 92238x - 2666				
Apigenina	0.6 - 19.2	0.993	y = 48518x + 80444	4.7	8.0	0.0113	0.0379
	0.016 - 0.525	0.999	y = 926395x + 564				
	0.525 - 16.8	0.986	y = 319824x + 965296				

^a n = 5

^b n = 3, días = 5

4.3.3. Análisis de muestras de aceite

4.3.3.1. Efecto matriz, porcentaje de recuperación y eficiencia del proceso

El sistema de ionización ESI en LC-MS/MS es propenso a presentar efectos de supresión/incremento del ión debido a la coelución de los picos de la matriz, a pesar de que los iones rara vez interfieren en MS/MS (*Hajšlová y Zrostlíková, 2003; Tang y Kebarle, 1993*). Debido a esto, la respuesta de la señal obtenida en el LC-MS/MS a partir de estándares y de muestras con matriz se espera que difieran significativamente. Sin embargo, estas variaciones también pueden ser el resultado de una extracción ineficiente de los compuestos fenólicos (*Taylor, 2005; Cunha et al., 2007*). En este estudio sobre la matriz del aceite de oliva, vamos a demostrar realmente a qué se deben las variaciones mencionadas.

Como ya se ha demostrado en estudios previos a esta investigación, la matriz aceite de oliva tiene un efecto determinante en el electrospray del MS, alterando la ionización de los compuestos (*Nováková et al., 2006; Burham et al., 1996*). Basándonos en la literatura encontrada, sabemos que este efecto matriz se ha estudiado en la presencia de residuos de pesticidas en el aceite de oliva. Teniendo en cuenta sus resultados, se decidió estudiar el efecto matriz de compuestos fenólicos en el aceite de oliva.

En un esfuerzo para evaluar estos dos procesos independientemente, se llevaron a cabo tres ensayos específicos que se detallan a continuación. Para estudiar el efecto matriz (EM)

causado por la matriz del aceite de oliva, se prepararon 3 muestras (S1, S2 y S3). S1 fue una solución multiestándar con 4 µg/ml de cada compuesto fenólico. S2 se obtuvo mediante la adición de 70 µl de una solución multiestándar en MeOH 24% a una muestra de AOR previamente extraída utilizando el método de extracción MELL descrito en la Sección 4.2.2. S3 es el extracto obtenido directamente de una muestra de AOR (blanco). El efecto matriz se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EM(\%) = (Ax_{S2} - Ax_{S3} / Ax_{S1}) \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Donde Ax_{S1} , Ax_{S2} y Ax_{S3} corresponden a las abundancias obtenidas para los compuestos fenólicos x utilizando la preparación de la muestra necesaria para obtener S1, S2 y S3, respectivamente. Este enfoque permite estudiar el efecto de la matriz sin la influencia de los errores atribuidos al proceso de extracción. Como muestra la Tabla 4.4, la mayoría de los compuestos fenólicos tienen valores mayores de 100%, lo que significa que han experimentado un incremento en la señal de ión al estar el compuesto en la matriz del aceite en lugar de en la solución multiestándar. Por el contrario, valores inferiores al 100% se obtuvieron para el ácido ferúlico y ácido sinápico, lo que indica que han sufrido una supresión en la señal del ión. Por esta razón, la calibración se llevó a cabo utilizando un AORD en lugar de la solución multiestándar.

Para estudiar adecuadamente la recuperación de los compuestos fenólicos tras el proceso de extracción (Re), se

utilizaron 3 muestras fueron (S2, S3 y S4). S2 y S3 son las mismas muestras mencionadas anteriormente; S4 corresponde al extracto obtenido a partir de un AORD con 15 µg/g de cada compuesto fenólico. La ecuación aplicada para calcular el porcentaje de recuperación fue:

$$\text{Re}(\%) = (Ax_{S4} - Ax_{S3} / Ax_{S2}) \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

Donde Ax_{S2} , Ax_{S3} y Ax_{S4} corresponden a las abundancias obtenidas para el compuesto fenólico x usando la preparación de la muestra necesaria para obtener S1, S2 y S3, respectivamente. Haciendo uso esta fórmula, el valor del porcentaje de recuperación obtenido está libre de cualquier efecto matriz. Los resultados que se muestran en la Tabla 4.4, proporcionan la evidencia de que el método consigue aceptables recuperaciones cuantitativas para la mayoría de los compuestos fenólicos (70-114%) con RSD <14% (Tabla 4.5), cuando se analizaron éstos mediante la combinación de MELL y UHPLC-MS/MS. Resulta importante señalar los valores extremos y fuera de rango mostrados por la rutina (18%) y oleuropeína (23%). Se puede sugerir, que el comportamiento de estos fenoles es diferente debido a las diferencias en las propiedades físicas del analito hidrófilo en una matriz lipófila, las cuáles no permiten una partición completa de estos compuestos durante el procedimiento de extracción (*Perri et al., 1999*).

Finalmente, la eficiencia del método total (EMT) se obtuvo empleando las muestras S3, S4 y S1. En este paso, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{EMT}(\%) = (Ax_{s4} - Ax_{s3} / Ax_{s1}) \times 100 \quad (\text{ec. 3})$$

Existe una tendencia a utilizar la ecuación 3 para calcular el porcentaje de recuperación, sin embargo, no es correcto hacerlo así debido a que pues la supresión/incremento del ion no se tiene en cuenta. Los resultados para estos parámetros se muestran en la Tabla 4.4. La eficiencia del método desarrollado mostró valores >80% para la mayoría de los compuestos estudiados, excepto para la rutina y oleuropeína; no obstante, no es un inconveniente a tener en cuenta ya que estos dos compuestos no suelen aparecer o aparecen en forma de compuestos traza en el aceite de oliva virgen y aceite de oliva virgen extra.

4.3.3.2. Validación y aplicación del método en muestras de aceite

Para evaluar la eficacia del método propuesto, se analizó un AORD. La exactitud se calculó utilizando el porcentaje de recuperación discutido en la Sección 4.3.3.1. La metodología utilizada en el UHPLC-MS/MS fue validada utilizando un AORD y la cuantificación del mismo se llevó a cabo utilizando curvas de calibración. Los datos de las curvas de calibración, rango lineal, límites de detección y cuantificación, repetitividad y reproducibilidad (%RSD) se detallan en la Tabla 4.5. Las curvas de calibración fueron lineales en todo el intervalo de estudio y el coeficiente de correlación (r^2) fue superior a 0.994 para todos los compuestos fenólicos (Tabla 4.5).

Tabla 4.4. Efecto matriz, porcentaje de recuperación y eficiencia del proceso en un AORD con 4 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto fenólico.

Compuesto fenólico	Efecto matriz (%)	Recuperación (%)	Eficiencia del proceso (%)
Ácido gálico	109.4	73.8	80.7
Ácido protocatéquico	111.5	101.8	113.5
Hidroxitirosol	105	101	106
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	109	108.8	118.6
Tirosol	110	110.5	121.5
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	110	74.9	82.4
Ácido vanílico	109.3	112.1	122.6
Ácido cafeico	106.9	107	114.4
Vainillina	109.1	80.1	87.4
Ácido <i>p</i> -cumárico	107.6	107.3	115.5
Ácido ferúlico	99.3	108.7	107.9
Ácido <i>m</i> -cumárico	105.5	97.5	102.8
Ácido sinápico	98.4	115	113.1
Rutina	108.3	18	19.4
Ácido <i>o</i> -cumárico	105.9	114.2	120.9
Oleuropeína	102.9	22.9	23.6
Ácido cinámico	106.2	81.4	86.5
Luteolina	108.1	70.7	76.4
Pinosinol	110.3	92.6	102.1
Apigenina	106.4	76.8	81.6

La repetitividad y reproducibilidad se evaluaron a niveles de concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$. Se lograron excelentes datos de %RSD, presentando valores que van desde 0.8 hasta 6.5 para la repetitividad, y <10 para la reproducibilidad, a excepción del tirosol, rutina y oleuropeína (Tabla 4.5 y Figura 4.3). Teniendo en cuenta las posibles interferencias provocadas por el efecto matriz,

los LODs y LOQs se obtuvieron realizando un método empírico (Long y Winefordner, 1983; Armbruster et al., 1994; Tang y Kebarle, 1993) basado en las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = 3 \times S_b / m \quad (\text{eq. 4})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_b / m \quad (\text{eq. 5})$$

Donde S_b corresponde a la desviación estándar de diez blancos de muestras de matriz (AOR) y m representa la pendiente de la curva de calibrado. Los valores de los LOD estuvieron por debajo de 0.02 $\mu\text{g/g}$ para la mayoría de los compuestos fenólicos (entre 0.0006 a 0.0756 $\mu\text{g/g}$), mientras que los LOQ estuvieron comúnmente por debajo de 0.08 $\mu\text{g/g}$ (el rango fue de 0.0601 hasta 0.9695 $\mu\text{g/g}$).

Es de destacar que el uso de esta calibración compensa la supresión/incremento en la señal de ion de los compuestos estudiados. También se observó cómo los %RSDs y los coeficientes de correlación (r^2) fueron consistentemente mejores que los valores generados utilizando soluciones estándar (Figura 4.3 y Tabla 4.5). Además, el uso de una sola curva de calibración minimiza los errores y optimiza el tiempo requerido para el análisis.

Tabla 4. 5. Linealidad, recta de calibrado, %RSD, LOD y LOQ en AORD.

Compuesto fenólico	Linealidad		Recta de calibrado	%RSD, 10 µg/g		LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
	Rango lineal (µg/g)	r ²		r ^a	R ^b		
Ácido gálico	0.06 - 12.24	0.998	$y = 117915x - 17030$	4.2	8.5	0.0016	0.0756
Ácido protocatéquico	0.06 - 12.06	0.997	$y = 263213x + 56608$	2.1	6.3	0.0012	0.0642
Hidroxitirosol	0.08 - 15.44	0.997	$y = 504x + 909$	4.0	7.0	0.0756	0.3854
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.06 - 12.97	0.999	$y = 307588x + 77247$	1.4	6.4	0.0188	0.0627
Tirosol	0.06 - 12.36	0.999	$y = 1235x + 1274$	6.5	11.8	0.0508	0.9695
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	0.06 - 12.21	0.998	$y = 15619x + 1909$	1.3	9.4	0.0082	0.0774
Ácido vanílico	0.06 - 12.36	0.998	$y = 53099x + 6069$	1.0	7.6	0.0090	0.0601
Ácido cafeico	0.06 - 12.45	0.999	$y = 388002x + 86044$	0.8	4.6	0.0006	0.0853
Vainillina	0.06 - 12.41	0.998	$y = 188539x + 3531$	6.5	8.7	0.0126	0.0723
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.06 - 12.70	0.999	$y = 352984x + 65097$	1.3	5.5	0.0043	0.0944

^a *n* = 5^b *n* = 3; días = 5

Tabla 4. 5 (continuación). Linealidad, recta de calibrado, %RSD, LOD y LOQ enAORD.

Compuesto fenólico	Linealidad		Recta de calibrado	%RSD, 10 µg/g		LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
	Rango lineal (µg/g)	r ²		r ^a	R ^b		
Ácido ferúlico	0.06 – 12.21	0.997	$y = 94146x + 33481$	0.8	7.2	0.0038	0.0827
Ácido <i>m</i> -cumárico	0.06 – 12.26	0.999	$y = 166498x + 192388$	1.1	5.6	0.0012	0.1039
Ácido sinápico	0.06 – 12.11	0.997	$y = 196979x + 60062$	1.3	4.1	0.0008	0.0629
Rutina	0.06 – 12.88	0.994	$y = 19818x - 368$	0.4	17.8	0.0512	0.1176
Ácido <i>o</i> -cumárico	0.06 – 12.27	0.998	$y = 237227x - 1398$	1.8	6.2	0.0017	0.0856
Oleuropeína	0.06 – 12.45	0.998	$y = 11500x + 1567$	1.8	15.8	0.0035	0.0916
Ácido cinámico	0.06 – 12.27	0.999	$y = 100476x + 11757$	2.8	8.7	0.0046	0.0752
Luteolina	0.06 – 12.21	0.995	$y = 265858x + 93113$	1.7	6.5	0.0463	0.1542
Pinoresinol	0.05 – 10.17	0.998	$y = 56760x + 9815$	2.3	7.7	0.0408	0.1362
Apigenina	0.05 – 10.17	0.997	$y = 281413x + 46541$	2.1	5.4	0.0382	0.1274

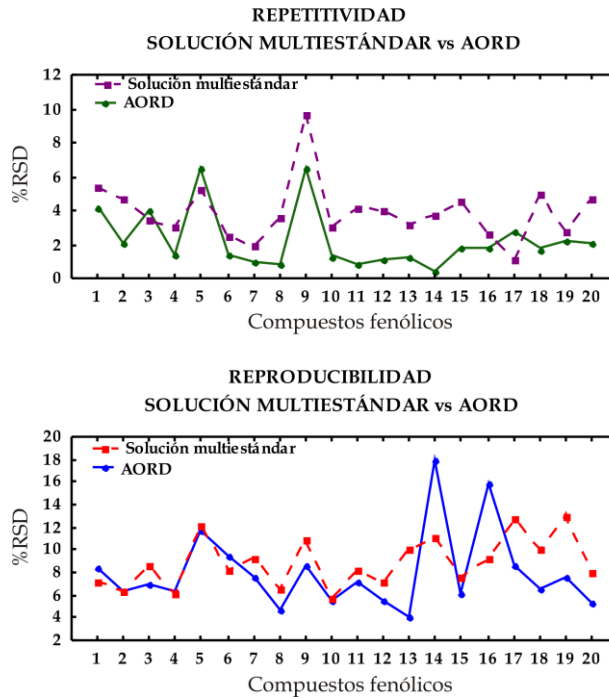


Figura 4.3. Comparación entre la repetitividad y la reproducibilidad del método en una solución multiestándar (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en aceite de oliva refinado dopado (AORD) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La designación de los números fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéuico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido *p*-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido *p*-hidroxifenilacético, (7) ácido vainílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido *p*-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido *m*-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido *o*-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinoresinol, (20) apigenina.

Una vez que la metodología analítica ha sido validada, ésta se aplicó para calcular la concentración de 28 compuestos fenólicos en muestras de AOVE. Tres muestras de AOVE de diferentes variedades (Arbequina, Picual y Hojiblanca) fueron testadas con el método propuesto. Los resultados obtenidos (Tabla 4.6) están de acuerdo con los valores mostrados por estudios anteriores a esta investigación (Herrero *et al*, 2011; Alarcón *et al.*, 2012).

Tabla 4.6. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/kg) presentes en tres variedades de AOVE.

Compuesto fenólico	Arbequina	Picual	Hojiblanca
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido protocatéquico	n.d.	n.d.	n.d.
Hidroxitirosol	42.19	35.30	25.54
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	n.d.	n.d.	n.d.
Tirosol	7.02	7.46	6.65
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido vanílico	0.20	0.32	0.11
Ácido cafeico	n.d.	n.d.	n.d.
Vainillina	0.03	0.21	0.22
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.28	3.77	5.07
Ácido ferúlico	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido <i>m</i> -cumárico	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-DHPEA-AC	n.q.	n.q.	n.q.
Ácido sinápico	n.d.	n.d.	n.d.
Rutina	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido <i>o</i> -cumárico	0.08	0.08	0.08
Oleuropeína	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-DHPEA-EDA	89.52	72.83	24.70
3,4-DHPEA-EA	5.44	67.36	10.61
Ácido cinámico	n.d.	0.08	n.d.
Luteolina	3.12	1.86	0.79
Pinoresinol	2.56	1.00	0.38
1-Acetoxipinoresinol	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido homovanílico	0.45	3.70	1.18
Metil 3,4-DHPEA-EA	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -HPEA-EA	n.q.	n.q.	n.q.
<i>p</i> -HPEA-EDA	n.d.	n.d.	n.d.
Apigenina	1.04	0.72	0.48

n.d.: no detectado, n.q.: no cuantificado.

^a Cuantificado con la curva de calibración de la oleuropeína.

^b Cuantificado con la curva de calibración del pinoresinol.

^c Cuantificado con la curva de calibración del ácido vanílico.

4.4. CONCLUSIONES

Con este trabajo, se ha diseñado un método rápido, eficiente y sensible para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en muestras de aceite de oliva.

El método de micro extracción líquido-líquido empleado en este estudio es capaz de combinar una alta recuperación de compuestos fenólicos (típicamente superior al 80%) con una reducción en el tiempo de extracción, cantidad de muestra, reactivos empleados y desechos generados.

Este método de extracción fue combinado con una potente técnica analítica (UHPLC-ESI-MS/MS). El uso del MS/MS en el modo MRM dinámico permite una correcta y fiable identificación y una cuantificación reproducible en una amplia gama de concentraciones de estos compuestos presentes en el AOV.

Se realizó también una evaluación cuidadosa del efecto matriz y la supresión/incremento de la señal del ion para asegurar una plataforma analítica robusta. El efecto supresión/incremento del ion fue casi insignificante para la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados. Nuestros resultados apoyan el uso de AORD en lugar de soluciones multiestándar para generar las curvas de calibración para cuantificar compuestos fenólicos. El método propuesto permite una identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en 15 minutos. Por lo tanto, este método es un perfecto candidato para convertirse en un método analítico rutinario en laboratorios industriales y científicos que estudian los

compuestos fenólicos en el aceite de oliva, así como en otras matrices, lo cual se ha demostrado en las tres muestras de diferentes variedades analizadas.

Capítulo 5

General conclusions



The results and discussions offered along the different sections of this study will be synthesized in this concluding chapter. To that end, the main contributions of this thesis will be highlighted.

The first research study discussed (chapter 2), aimed to determine the antioxidant reactivity of the most typical phenolic compounds appearing in virgin olive oil (VOO). A novel fluorescence spectroscopy technique, based on the use of fluorescence probe, n, π^* singlet excited state of 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-ene (DBO), was utilized. To test the feasibility of this innovative approach as an alternative to other more conventional spectrophotometric methods, the antioxidant reactivity of the samples was also analyzed using the 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) method.

The great resemblance between the results obtained using both methods support the use of the DBO method as an alternative method to measure the antioxidant reactivity of phenolic compounds. This method showed fixed values, k_q , for each of them, in contrast with the percentage value, Q , obtained with DPPH• method. In addition, both approaches showed a clear correlation between the structure and the antioxidant reactivity of every phenolic compound studied.

Four different groups, comprised by phenols sharing the same structural basic units, were established (A, B, C, and D).

Group A is formed by gallic, protocatechuic, syringic, vanillic, and *p*-hydroxybenzoic acids which are characterized by the presence of a benzene ring bonded to an acid group as basic structure and different numbers of hydroxyl (-OH) and methoxy (-OCH₃) group as radicals.

Group B is comprised by Tyrosol and hydroxytyrosol which have a benzene ring attached to a side chain with a hydroxyl group as common basic structure and also, one or two hydroxyl group as radicals, respectively.

Due to the number of hydroxyl and methoxy groups present in A and B, it was decided to study the effect of them in the antioxidant reactivity values. It was observed how an increase on the number of hydroxyl and methoxy groups in the benzene ring involves greater antioxidant reactivity. This happens because -OH is involved in the transfer of hydrogen atoms (HAT), and -OCH₃ takes part in the proton transfer mechanism coupled to electrons (PECT).

Group C included two different types of coumaric acids (*p*-coumaric and *o*-coumaric acids). Therefore, the influence of the *orto* position was evaluated. It was demonstrated that the existence of a hydroxyl group in the *orto* position induces higher antioxidant reactivity.

Group D embrace phenols with a benzene ring attached to a radical hydroxyl group and a changeable side chain (tyrosol, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxyphenilacetic acid, and *p*-coumaric

acid). The effect of the side chain was tested taking into account the values of k_q and Q obtained. The results obtained support the idea that, the greater number of unsaturations the compounds have in their side chain, the higher antioxidant reactivity they show.

The results obtained in this study not only present the DBO method as an efficient and fast alternative to study phenolic compounds, but also shows how the use of this novel method overcome the limitations on the use of solvents typically suffered by the more traditional DPPH• method.

The next research covered (chapter 3) was devoted to the comparison between three different methods for the extraction of total phenols in olive oil and the optimization of an HPLC-DAD analytical method to determine individual phenols in spiked refined olive oil (SROO).

Based on their common and widespread use, two methods were selected: Liquid-Liquid Ultrasound assisted extraction (LLUSE) and Liquid-liquid extraction (LLE). In addition, a Liquid-liquid micro extraction (LLME) was proposed. The main goal of this study was to select the cheapest, fastest and most effective extraction method among the three methods tested.

All the tested extraction methods showed a reasonable reproducibility and repeatability (<10%). It is important to point out that the LLE method extracted a lower amount of total polyphenols comparing with both the LLUSE and LLME methods. The total polyphenols results obtained for the latter two methods

were submitted to a statistical analysis using the least squares differences test (LSD) and any significant statistical different was observed.

The selection of the best extraction method to study individual phenols in olive oil was based on a previous work published in collaboration with Dr. Pizarro at the University of Huelva (*Pizarro et al., 2013*). This study compared LLME and LLUSE methods as well as a solid-phase extraction method. The results obtained on this study placed the LLME extraction method as the most efficient among the three extraction methods tested. Using these observations and the results obtained in the present study for the extraction of total phenols in olive oil, it was decided to select the LLME method as the common initial extraction step to analyze both total and individual phenols. The LLME method was improved by the incorporation of some minor changes. Among others, it is important to point out the reduction to a half of the reagents consumption and concomitantly the reduction in the method cost and in the amount of residue generated.

As previously mentioned, the last part of this study consisted on the optimization of a chromatographic method to analyze individual phenolic compounds. To this end, SROO was studied using a high performance liquid chromatography equipped with a diode-array detector (HPLC-DAD). This analytical method allowed the identification and quantification of 13 of the most common phenolic compounds in olive oil although only 8 of these

compounds were finally present at the real olive oil samples studied.

Additionally, the use of SROO allowed generating a recovery value (%) for each phenolic compound as a quality control parameter of the extraction method. This parameter was consistently higher than 80% for most of the compounds analyzed.

The last study included in this thesis research (chapter 4) covered the design and optimization of an innovative, fast and sensitive analytical method for the unequivocal identification and quantification of phenolic compounds in olive oil. To achieve these goals, an ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) technique coupled to an electrospray ionization source (ESI) and tandem mass spectrometry (MS/MS) was employed.

The UHPLC method has advantages over the conventional HPLC in terms of time and solvent savings, performance, and efficiency that result in higher sample throughput, less solvent consumption, and less sample injection volume. The selection of MS as the detection method allows achieving a very high sensitivity even to levels pg/L for certain conditions and samples, due to its high specificity.

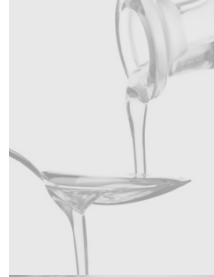
Thus, coupling these powerful analytical techniques enables not only to increase the number of phenolic compounds observed but also provides a more detailed information of the individual compounds present in the sample.

The use of MS/MS in Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) mode allows an unequivocal identification and a reproducible quantification in a wide range of concentrations of phenolic compounds in virgin olive oil. A careful assessment of matrix effect and the concomitant ion suppression/enhancement effect (I-S/E) was obtained to ensure a robust analytical platform. The I-S/E effect was almost negligible for most of the studied phenolic compounds.

Our results support the use of spiked refined olive oil instead of standard solutions to generate the calibration curves to quantify phenolic compounds. The method proposed is significantly improved if compared with the HPLC-DAD method, allowing the reliable identification and quantification of 28 phenolic compounds in 15 minutes.

The reliability and versatility of the state-of-the-art analytical technique employed and the analytical method designed was proved using three samples of extra virgin olive oil belonging to the varieties Picual, Arbequina and Hojiblanca. Despite the complexity typically exhibit by real samples, 14 different phenolic compounds were determined and quantify. Therefore, this method is a perfect candidate to become a routine analytical method in industrial and scientific laboratories studying phenolic compounds in olive oil as well as in other matrixes.

Bibliografía



A

Adam, W., Nikolaus, A. (1998). Fluorescence quenching of ester-substituted DBO-type azoalkanes by olefins and arenes: Electronic and steric effects, exciplex formation and hydrogen abstraction, *European Journal of Organic Chemistry* (10), 2177-2179.

Alarcón, M. I., Romero-González, R., Garrido, A., Martínez, J. L. (2012). Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 134, 2465-2472.

Amiot, M. J., Fleuriet, A. and Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olives during growth and maturation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34, 823-826.

Anbzhagan, V., Kandavelu, V., Kathiravan, A., Renganathan, R. (2008a). Investigation on the fluorescence quenching of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene (DBO) by certain estrogens and catechols, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 193, 204-212.

Anbzhagan, V., Kalaiselvan, A., Jaccob, M., Venuvanalingam, P., Renganathan, R. (2008b). Investigations on the fluorescence quenching of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene by certain flavonoids, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 91, 143-150.

Anbazzhagan, V., Renganathan, R. (2009). Investigation of the fluorescence quenching of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene(DBO) by certain substituted uracils, *Journal of Luminescence* 129, 382-388.

Anderson, D. J. (1989). Determination of the lower limit of detection [letter], *Clinical Chemistry* 35, 2152-2153.

Andreoni, N., Fiorentini, R. (1995). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil, *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 72, 163-164.

Andrewes, P., Busch, J. L., De Joode, T., Groenewegen, A., Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency, *Food Chemistry* 51, 1415-1420.

Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds, *Food Chemistry* 68, 283-287.

Antolovich, M., Bedgood J. D. R., Bishop, A. G., Jardine, D., Prenzler, P. D., Robards, K. (2004). LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 962-971.

Armbruster, D. A., Tillman, M. D., Hubbs, L. M. (1994). Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): Comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs, *Clinical Chemistry* 40, 1233-1238.

Askani, R. (1965). Zur Reaction von Cyclohexadien-(1,3) mit Azodicarbonsäure-diäthylester, *Chemische Berichte* 98, 2551-2555.

B

Barceló-Barrachina, E., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M. T. (2004). Evaluation of reversed-phase columns for the analysis of heterocyclic aromatic amines by liquid chromatography-Electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 802, 45-59.

Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C. H., Smith, A. B., Breslin, P. A. S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil, *Nature* 437, 45-46.

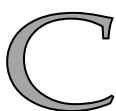
Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade, *Molecules* 12, 1679-1719.

Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J. J., Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3535-3540.

Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A. (2000). Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by

means of a coulometric electrode array system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5178–5183.

Burham, D. L., Price, P. I., Rudewicz, P. J. (1996). Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 7, 1099-1105.



Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A., De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (4), 622-629.

Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils, *Journal of Separation Science* 28, 837–858.

Choi, B. K., Hercules, D. M., Gusev, A. I. (2001). Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression, *Journal of Chromatography A* 907, 337–342.

Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., Keast, R. S. J. (2008). Chemistry and health of olive oil phenolics, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 218-236.

Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil, *International Journal of Molecular Science* 11, 458-479.

Cicerale, S., Lucas, L. J., Keast, R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil, *Current Opinion in Biotechnology* 23, 129-135.

Cunha, S. C., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Fernandes, J. O., Oliveira, M. P. P. (2007). Evaluation of the QuECHERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives, *Journal of Separation Science* 30, 620-632.

E

Escarpa A., González M. C. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds in food. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 57-139.

F

Favati, F., Caporale, G., Bertuccioli, M. (1994). Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil, *Grasas y Aceites* 45, 68-70.

Favati, F., Carporale, G., Monteleone, E., Bertuccioli, M. (1995). Food flavors: generation, analysis and process influence. *Charalamous G (ed), Elsevier, Amsterdam* 429-438

Fernández Gutiérrez, A., Segura Carretero, A. (2010). El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. Ed. Servicio de publicaciones de la fundación Unicaja, Málaga.

Ferrer, C., Gómez, M. J., García-Reyes, J. F., Ferrer, I., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1069, 183-194.

Fitó, M., Covas, M. I., Lamuela-Raventós, R. M., Vila, J., Torrents, J., De la Torre, C., Marrugat, J. (2000). Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation, *Lipids* 35 (6), 633-638.

Foti, M. C., Daquino, C. (2006). Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the dpph• radical, *Chemical Communications*, 3252-3254.

Foti, M. C., Daquino, C., DiLabio, G. A., Ingold, K. U. (2011). Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•), *Organic letters* 13, 4826-4829.

Fu, I., Woolf, E. J., Matuszewski, B. K. (1998). Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18, 347-357.

G

Gallina-Toschi, T., Cerretani, L., Bendini, A., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G. (2005). Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques, *Journal of Separation Science* 28, 859-870.

García-González, D., Aparicio, R. (2010). Research in olive oil: challenges for the near future, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12569-12577.

García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 416-429.

Goor, A. (1966), Place of olive in holy land and its history through ages, *Economic Botany* 20, 223-&.

Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58, 966-968.

Gutierrez, F., Jiménez, B., Albi, M. A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different component involved, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 121-127.

Gutiérrez-Rosales, F., Perdiguero, S., Gutiérrez, R., Olías, J.M., (1992). Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69 (4), 394-395.

Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J.J., Gómez-Rey, M.L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6021-6025.

H

Hajšlová, J., Zrostlíková, J. (2003). Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *Journal of Chromatography A* 1000, 181-197.

Harborne, J.B., Dey P.M. (1989). *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, London.

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A. F., Meléndez-Martínez, A., Heredia, F. (2008). Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid-liquid extractions to determine the volatile compounds of wine, *Talanta* 76, 929-935.

Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibáñez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products, *Journal of Chromatography A* 1218, 7511-7520.

J

Jerman, T., Trebše, P., MozetičVodopivec, B. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds, *Food Chemistry* 123, 175-182.

K

Kiritsakis, A.K., Christie, W.W. (2000). Handbook of olive oil analysis and properties: analysis of edible oils. In: Harwood, J., Aparicio, R. (eds), *Aspen Publishers Inc.*, Gaithersburg, MA 129-158.

Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D. (2005). Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile

compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8054–8062.

L

Lavelli, V., Bondesan, L. (2005). Secoiridoids, tocopherols, and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils extracted from destoned fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1102–1107.

Leenen, R., Roodenburg, A. J. C., Vissers, M. N., Schuurbijs, J. A. E., Van Putte, K. P.A. M., Wiseman, S. A., Van de Put, F. H. M. M. (2002). Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: Influence on LDL oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1290–1297.

Long, G. L., Winefordner, J. D. (1983). Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry* 55, 712–724.

Lucarini, M., Pedulli, G. F. (1994). Bond dissociation enthalpy of α -tocopherol and other phenolic antioxidants, *Journal of Organic Chemistry* 59, 5063–5070.

Lundgren, C. V., Koner, A. L., Tinkl, M., Pischel, U., Nau, W. M. (2006). Reaction of singlet-excited 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene and tert-butoxyl radicals with aryl-substituted benzofuranones, *Journal of Organic Chemistry* 71, 1977–1983.

M

Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection, *Journal of Organic Chemistry* 49, 2185–2192.

Marsella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., Matarrese, P., Malorni, W., Scaccocchio, B., Giovannini, C. (2004). Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes, *Journal of Nutrition* 134 (4), 785-791.

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Analytical Chemistry* 75, 3019-3030.

Méndez A. I., Falqué E. (2007) Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil, *Food Control* 18, 521–529.

Montedoro, G.F., Servili, M., Baldioli, M., and Miniati, E. (1992). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separations and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1571–1576.

Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction, *Food Chemistry* 85, 357-364.

Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M., Katzogiannos, E. (2004). Analysis of minor components in olive oil, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 61, 155-160.

N

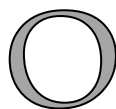
Nau, W. M. (1998). A fluorescent prob for antioxidants, *Journal of the American Chemical Society* 120, 12614-12618.

Nau, W. M., Greiner, G., Rau, H., Wall, J., Olivucci, M., Scaiano, J. C. (1999). Fluorescence of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene revisited: Solvent-induced quenching of the n,π^* -excited state by an aborted hydrogen atom transfer, *Journal of Physical Chemistry A* 103, 1579-1584.

Nenadis, N., Boyle, S., Bakalbassis, E. G., Tsimidou, M. (2003). An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, 451-458.

Ninfali, P., Aluigi, G., Bacchiocca, M., Magnani, M. (2001). Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *Journal of the American Chemical Society* 78, 243-247.

Nováková, L., Matysová, L., Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta* 68, 908-918.



Oliveras López, M.J. (2005). Calidad de aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y Función Biológica. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Jank, M., Berwird, S. J. (2002). Bioactive substances of plant origin in food-impact on genomics, *Reproduction Nutrition Development* 42, 461-477.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncology* 1, 107-112.

Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., et al. (2000a). Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology* 38, 647-659.

Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsh, H. (2000b). Phenolic and lipid components of olive oils: identification of lignans as major components of the phenolic fraction of olive oil, *Clinical Chemistry* 46, 976-988.

Owen, R. W., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2004). Olives and olive oil in cancer prevention, *European Journal of Cancer Prevention* 13, 319-326.

P

Perri, E., Raffaelli, A., Sindona, G. (1999). Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry-selected reaction monitoring *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4156-4160.

Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., Beltrán, R. (2013). Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil, *Food Analytical Methods* 6, 123-132.

Perona, J. S., Cabello-Moruno, R., Ruíz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function, *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 429.

Pischel, U., Nau, W. M. (2000) Quenching of n,p*-excited azoalkanes by amines: Structural and electronic effects on charge transfer, *Journal of Physical Organic Chemistry* 13, 640-647.

Pischel, U., Patra, D., Koner, A. L., Nau, W. M. (2006). Investigation of Polar and Stereoelectronic Effects on Pure Excited-state Hydrogen Atom Abstractions from Phenols and Alkylbenzenes, *Photochemistry and Photobiology* 82, 310-317.

Pischel, U., Zhang, X., Hellrung, B., Haselbach, E., Muller, P. A., Nau, W. M. (2000) Fluorescence quenching of n,p*-excited azoalkanes by amines: what is a sterically hindered amine?, *Journal of the American Chemical Society* 122, 2027-2034.

R

Rice-Evans, A. C., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933-956.

Rodrigues, S., Pinto, G. (2007). Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder, *Journal of Food Engineering* 80, 869-872.

Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 964-967.

Ryan, D., Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives, *Analyst* 123, 31-44.

S

Savarese, M., De Marco, E., Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by

electrospray ionization mass spectrometry, *Food Chemistry* 105, 761-770.

Servili, M., Montedoro, G. F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 602-613.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Machioni, A., Montedoro, G. F. (1999). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-nuclear magnetic resonance characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 873-882.

Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., Montedoro, G. F. (1996). Antioxidant Activity of New Phenolic Compounds Extracted from Virgin Olive Oil and Their Interaction with α -Tocopherol and β -Carotene, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 55-59.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chemistry* 89, 191-198.

Suárez, M., Macià, A., Romero, M. P., Motilva, M. J. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil, *Journal of Chromatography A* 1214, 90-99.

Suárez, M., Romero, M. P., Macià, A., Valls, R. M., Fernández, S., Solà, R. Motilva, M. J. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 877, 4097-4106.

Saura-Calixto, F., Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet, *Food Chemistry* 94, 442-447.

T

Tang, L., Kebarle, P. (1993). Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution, *Analytical Chemistry* 65, 3654-3668.

Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clinical Biochemistry* 38, 328-334.

Torres de Pinedo, A., Peñalver, P., Morales, J. C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship, *Food Chemistry* 103 55-61.

Tovar, M. J., Motilva, M. J., Romero, M. P. (2001). Changes in the Phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5502-5508.

Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D., Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europea* L.) and correlations with oxidative stability, *Scientia Horticulturae* 112, 108–119.



Valgimigli, L., Ingold, K. U., Luszyk, J. (1996). Solvent effects on the reactivity and free spin distribution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals, *Journal of Organic Chemistry* 61, 7947-7950.

Vázquez Roncero, A., Janer Del Valle, C., Janer Del Valle, M. L. (1973). Determinación de polifenoles totales en el aceite de oliva, *Grasas y Aceites* 24, 350–357.

Vázquez Roncero, A. (1978). Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile, *Revue Française des Corps Gras* 25, 21–26.

Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin *Food Chemistry* 89, 561–568.

Visioli, F., Galli, C. (1999). Free radical scavenging actions of olive oil phenolics, *Lipids* 34 (6), S315.

Anexos



ANEXO 1: Índice de tablas

Tabla 1.1. Superficie utilizada y producción de aceite de oliva de los países del mundo.	4
Tabla 2.1. Valores de k_q para los compuestos antioxidantes en agua y en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	37
Tabla 2.2. Valores de Q para los compuestos antioxidantes disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	42
Tabla 2.3. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo A disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	45
Tabla 2.4. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo B disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	46
Tabla 2.5. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo C disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	46
Tabla 2.6. Valores de k_q y Q para los compuestos antioxidantes del grupo C disueltos en la mezcla agua/metanol (76:24, v/v).	47
Tabla 3.1. Diseño experimental del proceso de extracción.	68
Tabla 3.2. Gradiente de fases móviles del HPLC-DAD.	70
Tabla 3.3. Repetitividad, reproducibilidad y valor medio de los métodos de extracción de fenoles totales.	72

Tabla 3.4. Linealidad, ecuación de la recta, LOD y LOQ en soluciones estándar.	77
Tabla 3.5. Porcentajes de recuperación del diseño experimental en un aceite refinado dopado (%).	78
Tabla 3.6. Repetitividad, reproducibilidad y porcentajes de recuperación del método completo de determinación de compuestos fenólicos individuales.	85
Tabla 3.7. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/kg) presentes en dos variedades de AOVE.	87
Tabla 4.1. Gradiente de fases móviles del UHPLC-ESI-MS/MS.	103
Tabla 4.2. Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos.	108
Tabla 4.2 (continuación). Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos.	109
Tabla 4.3. Linealidad, ecuación de la recta, %RSD, LOD y LOQ en solución estándar.	113
Tabla 4.3 (continuación). Linealidad, ecuación de la recta, %RSD, LOD y LOQ en solución estándar.	114
Tabla 4.4. Efecto matriz, porcentaje de recuperación y eficiencia del proceso en un AORD con 4 µg/mL de cada compuesto fenólico.	119
Tabla 4.5. Linealidad, ecuación de la recta, %RSD, LOD y LOQ en AORD.	121
Tabla 4.5 (continuación). Linealidad, ecuación de la recta, %RSD, LOD y LOQ en AORD.	122

Tabla 4.6. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/kg) presentes en tres variedades de AOVE.	124
--	------------

ANEXO 2: Índice de figuras

Figura 1.1. Porcentajes de los principales países productores de aceite de oliva.	5
Figura 1.2. Aceitunas de la variedad Picual.	8
Figura 1.3. Aceitunas de la variedad Arbequina.	9
Figura 1.4. Aceitunas de la variedad Hojiblanca.	10
Figura 1.5. Esquema de la composición química del aceite de oliva virgen.	11
Figura 2.1. Mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes. AH: antioxidante, A•: radical estable, RH: sustrato, R•: radical libre, ROOH: hidroperóxido, ROO• : radical peroxilo.	26
Figura 2.2. Estructura molecular del 2,3-diazabicyclo [2.2.2] oct-2-eno (DBO).	28
Figura 2.3. Estructuras de los compuestos fenólicos.	29
Figura 2.4. Estructura del DPPH antes y después de reaccionar con un antioxidante (AH).	33
Figura 2.5. Espectro del quenching de la fluorescencia del DBO en agua al interactuar con diferentes concentraciones de ácido gálico.	36
Figura 2.6. Representación de los datos del quenching según la ecuación de Stern-Volmer para los antioxidantes: ácido p-hidroxibenzoico (1), ácido protocatéquico (2), ácido gálico (3) y tirosol (7).	38

Figura 2.7. Espectros de la absorbancia del DPPH• en ausencia del antioxidante Tirosol ,y en presencia de éste en los minutos 0 y 5.	41
Figura 3.1. Esquema del método de extracción líquido-líquido con embudo de decantación.	63
Figura 3.2. Esquema del método de micro extracción líquido-líquido.	64
Figura 3.3. Esquema del método de extracción líquido-líquido con sonda de ultrasonido.	66
Figura 3.4. Esquema del método de micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales.	69
Figura 3.5. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una disolución estándar a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 1: ácido gálico; 2: hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 5: ácido cafeico; 6: vainillina; 7: ácido p-cumárico; 8: ácido sinapico; 9: ácido o-cumárico; 10: rutina; 11: oleuropeína; 12: luteolina; 13: apigenina.	74
Figura 3.6. Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (µL), respectivamente.	79
Figura 3.6. (continuación) Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (µL), respectivamente.	80
Figura 3.6. (continuación) Gráficos de Pareto. Los números 1 y 2 equivalen al peso de la muestra (mg) y al volumen de extractante (µL), respectivamente.	81

Figura 3.7. Gráficos de superficies de isorrespuesta de los porcentajes de recuperación de los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides y fenoles totales. 83

Figura 3.8. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una muestra de aceite de la variedad Arbequina a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 2: hidroxitirosol; 2': derivado del hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 6: vainillina; 7: ácido p-cumárico; 12: luteolina; 13: apigenina. 88

Figura 3.9. Perfil de elución de los compuestos fenólicos en una muestra de aceite de la variedad Arbequina a 280 nm (a), 320 nm (b) y 360 nm (c). 2: hidroxitirosol; 2': derivado del hidroxitirosol; 3: tirosol, 4: ácido vanílico, 6: vainillina; 7: ácido p-cumárico; 12: luteolina; 13: apigenina. 89

Figura 4.1. Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en modo DMRM en el análisis UHPLC-MS/MS de compuestos fenólicos en la solución multiestándar. La designación de los picos fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido p-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido p-hidroxifenilacético, (7) ácido vanílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido p-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido m-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido o-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinosresinol, (20) apigenina. 106

- Figura 4.2.** Cromatogramas de los iones extraídos en modo DMRM de los compuestos fenólicos identificados en AORD y muestras de AOVE de la variedad Picual. **111**
- Figura 4.3.** Comparación entre la repetitibilidad y la reproducibilidad del método en una solución multiestándar (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en aceite de oliva refinado dopado (AORD) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La designación de los números fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido p-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido p-hidroxifenilacético, (7) ácido vainílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido p-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido m-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido o-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinoresinol, (20) apigenina. **123**

ANEXO 3: Relación de artículos publicados relacionados con la temática de la Tesis.

M. Luz Pizarro, Mercedes Becerra, Ana Sayago, María Beltrán and Rafael Beltrán. (2013). Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil, *Food Analytical Methods* 6,123-132.

Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil

M. Luz Pizarro · Mercedes Becerra · Ana Sayago ·
María Beltrán · Rafael Beltrán

Received: 10 February 2012 / Accepted: 10 April 2012 / Published online: 28 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract A comparison between different extraction methods has been performed in order to assess their effectiveness for the analysis of total phenols (liquid–liquid extraction (LLE), liquid–liquid micro extraction (LLME), and ultrasound liquid–liquid extraction (USE)) and individual phenols (LLME, USE, and solid-phase extraction (SPE)) from virgin olive oil (VOO). Statistical analysis of the analytical data obtained for the total phenol content of a VOO, showed that LLME and USE can represent a reliable alternative to the traditional procedure based on LLE that needs more amount of sample, generates more wastes, and is more time consuming. When an olive oil spiked with phenols was used to test the efficiency of LLME, USE, and SPE methods, the statistical analysis of the data obtained for each individual phenol, again proved LLME and USE methods to be the most suitable, in terms of precision and recoveries, for this purpose. The analysis of real samples (Arbequina and Picual cultivars) confirmed the results obtained for the spiked oil.

Keywords Phenols · Liquid–liquid extraction · Liquid–liquid micro extraction · Ultrasound liquid–liquid extraction · Solid-phase extraction

Introduction

Virgin olive oil (VOO) is the main edible oil of Mediterranean diet. It is directly obtained from ripe olive fruits without any

further refining process. Among the other vegetable oils, VOO provides beneficial effects to human health because of its antioxidant capacity (due to its content of phenols, tocopherols, carotenoids, and other constituents) and its excellent organoleptic and nutritional qualities (Méndez and Falqué 2007; Kiritsakis and Christie 2000).

The possible correlation between the antioxidant activity and the quantity of phenolic compounds has been established (Servili and Montedoro 2002; Ninfali et al. 2001). These compounds contribute to the stability of VOO and prolong its shelf-life compared to other vegetable oils (Angerosa et al. 2000; Toschi et al. 2005). Besides, these antioxidant species give virgin olive oil an important role towards treatment and prevention of chronic diseases associated to generation of oxidants, such as atherosclerosis, neurodegeneration, and other normal process of aging. Phenolic compounds are also related to the organoleptic characteristics affecting flavor and taste (bitterness and astringency), and also to the nutritional qualities of virgin olive oil (Andrewes et al. 2003; Gutiérrez-Rosales et al. 2003).

Polyphenols is a broad term used to define substances that possess a benzene ring bearing one or more hydroxyl groups, including functional derivative (Harborne and Dey 1989). The main structural feature responsible for the anti-oxidative and free radical-scavenging activity of phenolic derivatives is the phenolic hydroxyl group. Phenols are able to donate the hydrogen atom of the phenolic OH to the free radicals, interrupting the propagation of the oxidation process.

The phenolic fraction of VOO consists of a heterogeneous mixture of compounds, such as phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic derivatives), phenylethyl alcohols (tyrosol and hydroxytyrosol), secoiridoids (aglyconic derivatives of oleuropein), and lignans. The concentration of these species is influenced by many factors (García-González et al. 2010) such as the area of production (Tura et al. 2007; Vinha et al. 2005), climate (Kalua et al. 2005), cultivars (Tura et al. 2007), cultivation techniques

M. L. Pizarro · M. Becerra · A. Sayago (✉) · M. Beltrán · R. Beltrán

Department of Chemistry and Science of Materials,
Area of Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences,
University of Huelva,
Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3),
Avd. Tres de Marzo S/N. 21071,
Huelva, Spain
e-mail: ana.sayago@dqcm.uhu.es