



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA



**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES  
FUNCIONALIZADOS CON DERIVADOS DE HIDROXITIROSO**

M<sup>a</sup> Rosa Cert Trujillo

Sevilla, septiembre de 2017



# ÍNDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

## 2. ANTECEDENTES

- 2.1. ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSILO (AEHTy)
  - 2.1.1. Síntesis de éteres de hidroxitirosilo
  - 2.1.2. Propiedades antioxidantes
  - 2.1.3. Metabolismo
  - 2.1.4. Actividad biológica
- 2.2. ÉSTERES DE HIDROXITIROSILO
  - 2.2.1. Síntesis de ésteres de hidroxitirosilo
    - 2.2.1.1. *Síntesis de EGHTy por acilación del alcohol primario del HTy*
    - 2.2.1.2. *Síntesis de EGHTy a partir de otros compuestos fenólicos*
    - 2.2.1.3. *Síntesis de acetato de hidroxitirosilo (AcHTy)*
  - 2.2.2. Obtención de mezcla de ésteres grasos (EGHTy) por reacción *in situ* del HTy con los triacilglicerolos de los lípidos
  - 2.2.3. Propiedades antioxidantes
  - 2.2.4. Prevención del estrés oxidativo biológico
  - 2.2.5. Metabolismo
  - 2.2.6. Prevención de enfermedades cardiovasculares
  - 2.2.7. Efectos antiinflamatorios
  - 2.2.8. Otros efectos biológicos
- 2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DERIVADOS DE HTy
  - 2.3.1. Fenoles totales por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu
  - 2.3.2. Orto-difenoles totales. Método espectrofotométrico
  - 2.3.3. Cromatografía de gases
  - 2.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

## 3. OBJETIVOS

- 3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSILO (AEHTy) EN MATRICES LIPÍDICAS DE DIFERENTE INSATURACIÓN
  - 3.1.1. Capacidad antioxidante por el método Rancimat®
  - 3.1.2. Interacción con los tocoferoles
  - 3.1.3. Oxidación en recipiente abierto
- 3.2. OBTENCIÓN DE ACEITES QUE CONTENGAN ALTA CONCENTRACIÓN DE MEZCLA DE ÉSTERES GRASOS DE HIDROXITIROSILO (EGHTy)
  - 3.2.1. Obtención de EGHTy por reacción *in situ* del HTy con los triacilglicerolos del aceite. Optimización de las variables del proceso
  - 3.2.2. Caracterización de los aceites con alta concentración de EGHTy
- 3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACETATO DE HIDROXITIROSILO (AcHTy) EN ACEITES COMERCIALES

- 3.3.1. Actividad antioxidante del AcHTy
- 3.3.2. Estabilidad oxidativa de aceites fortificados con aceites que contienen alta concentración de EGHTy
- 3.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DERIVADOS DE HIDROXITIROSOLO (HTy)

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.1. MUESTRAS
  - 4.1.1. Aceites
  - 4.1.2. Matrices lipídicas purificadas
- 4.2. ANTIOXIDANTES ENSAYADOS
- 4.3. REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTANCIAS PATRÓN
- 4.4. EQUIPOS Y APARATOS
- 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS
  - 4.5.1. Método Rancimat®
  - 4.5.2. Estimación de la *vida útil* de aceites
  - 4.5.3. Determinación de la composición en ácidos grasos
  - 4.5.4. Índice de yodo. Método Wijs
  - 4.5.5. Índice de *p*-anisidina
  - 4.5.6. Índice de peróxidos
  - 4.5.7. Tocoferoles
- 4.6. OXIDACIÓN EN SISTEMA *OPEN CUP* A TEMPERATURA AMBIENTE
- 4.7. OXIDACIÓN ACELERADA A ALTA TEMPERATURA
- 4.8. DETERMINACIÓN DE FENOLES ANTIOXIDANTES.
  - 4.8.1. Alquil éteres de hidroxitiroso (AEHTy). Aislamiento mediante EFS-NH<sub>2</sub> y análisis por CLAE-UV
  - 4.8.2. Ésteres grasos de hidroxitiroso (EGHTy) en matrices y aceites que contengan alta concentración. Aislamiento mediante EFS-NH<sub>2</sub> y análisis por CLAE-UV
  - 4.8.3. Acetato de hidroxitiroso (AcHTy) en matrices purificadas y en aceites comerciales. Aislamiento mediante EFS-diol y análisis por CLAE-UV
- 4.9. PREPARACIÓN *IN SITU* DE ACEITE CON ALTA CONCENTRACIÓN DE EGHTy
- 4.10. CARACTERIZACIÓN DE MATRICES CON ALTA CONCENTRACIÓN DE EGHTy
  - 4.10.1. Composición en ácidos grasos mediante CG
  - 4.10.2. Perfil de EGHTy mediante CLAE-UV
  - 4.10.3. Composición de la fracción glicerídica y concentración de HTy y EGHTy
    - 4.10.3.1. *Cromatografía líquida de exclusión molecular del aceite*
    - 4.10.3.2. *Cromatografía de gases del aceite*

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 5.1. ÉTERES DE HIDROXITIROSOLO
  - 5.1.1. Influencia de la matriz y de la longitud de la cadena alquílica en la actividad antioxidante de los AEHTy
  - 5.1.2. Influencia del  $\alpha$ -tocoferol en la actividad de los AEHTy
  - 5.1.3. Oxidación por el sistema *open cup* de aceites comerciales de diferente insaturación sembrados con éteres de hidroxitiroso

- 5.1.3.1. *Evolución de los parámetros de calidad en aceites sembrados con AEHTy*
- 5.1.3.2. *Evolución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol*
- 5.1.3.3. *Evolución de la concentración de AEHTy*
- 5.2. ÉSTERES DE HIDROXITIROSILO
  - 5.2.1. Síntesis *in situ* de mezcla de ésteres grasos (EGHTy)
    - 5.2.1.1. *Síntesis in situ. Optimización del proceso de obtención:*
      - 5.2.1.1.1. Temperatura de la reacción
      - 5.2.1.1.2. Influencia de la enzima en la reacción de esterificación
      - 5.2.1.1.3. Relación HTy/aceite
      - 5.2.1.1.4. Soporte sólido del HTy
    - 5.2.1.2. *Síntesis en continuo de EGHTy*
  - 5.2.2. Caracterización de aceites con alta concentración de EGHTy
    - 5.2.2.1. *Composición en ácidos grasos*
    - 5.2.2.2. *Perfil de EGHTy*
    - 5.2.2.3. *Análisis del perfil glicerídico y de EGHTy por CLAE de exclusión molecular*
    - 5.2.2.4. *Análisis del perfil glicerídico y de EGHTy por CG*
  - 5.2.3. Capacidad antioxidante de ésteres de hidroxitirosilo
    - 5.2.3.1. *Oxidación open cup a 25 °C de matrices lipídicas*
      - 5.2.3.1.1. Oliva sembrada con  $\alpha$ -tocoferol
      - 5.2.3.1.2. Oliva sembrada con AcHTy
      - 5.2.3.1.3. Oliva sembrada con mezclas de  $\alpha$ -tocoferol y AcHTy
    - 5.2.3.2. *Oxidación acelerada en equipo Rancimat*
      - 5.2.3.2.1. Aceite de girasol alto oleico sin purificar sembrado con  $\alpha$ -tocoferol y AcHTy
      - 5.2.3.2.2. Estabilidad Rancimat a 100 °C de matrices glicerídicas sembradas con  $\alpha$ -tocoferol y AcHTy
    - 5.2.3.3. *Estabilidad Rancimat de aceites con diferente grado de insaturación sembrados con aceites con alta concentración de EGHTy*
    - 5.2.3.4. *Estimación de la vida útil de diferentes aceites comerciales enriquecidos con EGHTy contenido en aceites fortificados in situ*

## 6. CONCLUSIONES

## 7. BIBLIOGRAFÍA



## ABREVIATURAS

AcHTy	Acetato de hidroxitirosilo.
AEHTy	Alquiléteres de hidroxitirosilo
CCF	Cromatografía de capa fina
CG	Cromatografía de Gases
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficacia
DAD	Detector Diode-Array
EFS-diol	Extracción en fase sólida con cartuchos diol
EFS-NH <sub>2</sub>	Extracción en fase sólida con cartuchos amino
EGHTy	Ésteres Grasos de Hidroxitirosilo
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	Detector de ionización de llama
CLEM	Cromatografía líquida de exclusión molecular
HTy	Hidroxitirosol
IY	Índice de Yodo
$\lambda$	Longitud de onda
LHTy	Linoleato de hidroxitirosilo
LnHTy	Linolenato de hidroxitirosilo
mM	Concentración milimolar
mmol/kg	milimoles/kilogramo
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de Sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sodio
OHTy	Oleato de hidroxitirosilo
OSI	Índice de estabilidad oxidativa
ppm	Partes por millón
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PA	Palmitato de Ascorbilo
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
rpm	Revoluciones por minuto
SHTy	Estearato de hidroxitirosilo
TAG	Triacilglicerol
UV	Ultravioleta

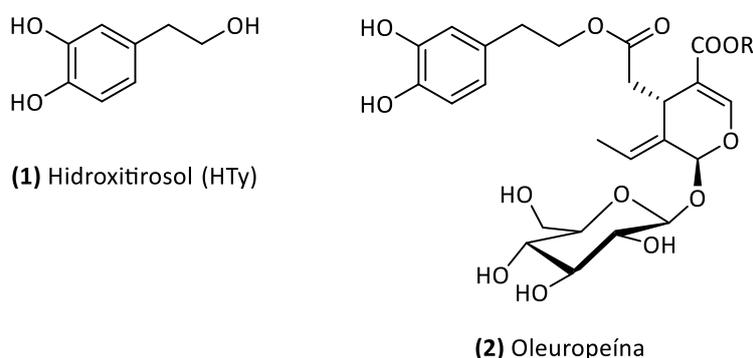


## 1. INTRODUCCIÓN

La principal alteración de los alimentos que contienen aceites o grasas se debe a la oxidación de los radicales de ácidos grasos de los compuestos glicerídicos para formar aldehídos, cetonas y ácidos volátiles que son los responsables del desagradable olor y sabor a rancio que produce rechazo en el consumidor con la consiguiente pérdida del producto (Frankel, 2005). Los aceites vegetales contienen antioxidantes naturales, principalmente tocoferoles, que retardan o evitan esta oxidación mientras que las grasas animales carecen de dichas sustancias por lo que su deterioro es más probable, en especial los aceites marinos que contienen ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos (tales como refinación de aceites, horneado, calentamiento, fritura o ebullición con agua en recipiente presurizado), disminuyen la cantidad de antioxidantes naturales resultando alimentos con vida útil muy corta (Brenes *et al.*, 2002). Por este motivo la adición de antioxidantes es a menudo necesaria para garantizar la calidad de los alimentos durante su procesado y comercialización.

Extractos de plantas, tocoferoles, derivados de antioxidantes naturales y compuestos sintéticos se utilizan comúnmente como aditivos para grasas y aceites (Aluyor y Ori-Jesu, 2008; Fan y Eskin, 2015). Sin embargo, los extractos de plantas suelen tener olores o sabores extraños, los tocoferoles muestran una eficiencia paradójica (Kamal-Eldin y Budilarto, 2015), el palmitato de ascorbilo (PA) presenta algunas dificultades de disolución en grasas, y los fenoles sintéticos galato de propilo (GP) (EFSA, 2014), *terc*-butilhidroxianisol (BHA) (EFSA, 2011a), *terc*-butilhidroxitolueno (BHT) (EFSA, 2012) y *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) (EFSA, 2004) han sido cuestionados por su posible toxicidad, aunque la European Food Safety Authority (EFSA) es de la opinión que su uso no es preocupante si se aplican adecuadamente. Sin embargo, la industria agroalimentaria demanda aditivos naturales más seguros que no tengan olor ni sabor y, que además de preservar de la oxidación, sean beneficiosos para la salud al darle al alimento características funcionales.

El 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol (hidroxitirosol, HTy,**1**) (Figura 1) es un *orto*-catecol que se encuentra en la hoja y el fruto del olivo en forma de oleuropeína (**2**), glucósido amargo del éster de hidroxitirosol con el ácido elenólico (Bendini *et al.*, 2007) que durante el proceso de obtención del aceite de oliva, por acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, pierde la molécula de hidrato de carbono dando lugar a una serie de compuestos denominados derivados secoiridoideos que por acción de enzimas esterasas liberan el HTy.



**Figura 1**  
Estructuras de hidroxitirosol y oleuropeína

La oleuropeína y una gran parte del HTy libre, por ser hidrosolubles, se eliminan en las aguas de vegetación mientras que los secoiridoideos, pasan al aceite en cantidad apreciable. En el aceite también se detecta acetato de hidroxitirosilo (AcHTy, **3**) (Bendini *et al.*, 2007) y pequeñas cantidades de otros derivados de HTy, tales como: 1-aril-6,7-dihidroxi-isocromanos (Bianco *et al.*, 2001) y ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy, **4**) (Lee *et al.*, 2016). También están presentes cantidades similares de derivados del 2-(3-hidroxifenil)etanol (tirosol, Ty), compuestos homólogos de los del HTy y que provienen del glucósido ligustrósido. Los derivados secoiridoideos del HTy que permanecen en el aceite son los principales responsables del amargor (Bendini *et al.*, 2007) y de su alta estabilidad oxidativa (Mateos *et al.*, 2003) ya que han mostrado mayor capacidad antioxidante que el tirosol y sus ésteres (Mateos *et al.*, 2014), tocoferoles, BHA y BHT (Chimi *et al.*, 1998; Mateos *et al.*, 2003; Fki *et al.*, 2005) aplicando el método de oxidación acelerada Rancimat<sup>®</sup>. En matrices oleosas obtenidas por purificación de aceites de oliva de distintas variedades se han encontrado buenas

relaciones entre el período de inducción (PI) Rancimat® y su composición en triacilglicerol y las concentraciones de HTy y  $\alpha$ -tocoferol, resultando que el HTy es el principal responsable de la alta estabilidad oxidativa que presenta este tipo de aceite (Mateos *et al.*, 2005a).

En los últimos 25 años se ha publicado una gran cantidad de trabajos describiendo los efectos saludables y de prevención de enfermedades del aceite de oliva, sus extractos fenólicos y el HTy, en los aspectos nutricionales, cardiovasculares, neurológicos, oxidativos, anticancerosos e inmunológicos (Bendini *et al.*, 2007; Granados-Principal *et al.*, 2010; Fernández-Bolaños *et al.*, 2012; Covas *et al.*, 2015; Ray *et al.*, 2015).

Con respecto a la toxicidad del HTy, una dosis oral aguda de hasta 2 g/kg de peso corporal administrada a ratas no mostró apreciable toxicidad (D'Angelo *et al.*, 2001) y se ha propuesto un índice NOAEL (No Observed Adverse Effects Level) de 500 mg/kg/día a partir de un estudio de larga duración y de experimentos *in vitro*, ya que no es genotóxico ni mutagénico a concentraciones muy superiores a las alcanzables después de la ingestión (Auñón *et al.*, 2013; Auñón-Calles *et al.*, 2013). Como resultado de las numerosas publicaciones sobre los efectos saludables del HTy y del aceite de oliva, la EFSA ha concluido que los compuestos fenólicos del aceite de oliva protegen las LDL sanguíneas (low-density proteins) contra el daño oxidativo (EFSA, 2011b) y en consecuencia se puede declarar en la etiqueta de un aceite de oliva la leyenda “Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo”, siempre que se informe al consumidor que el efecto se obtiene con una ingesta diaria de 20 g de aceite (UE, 2012).

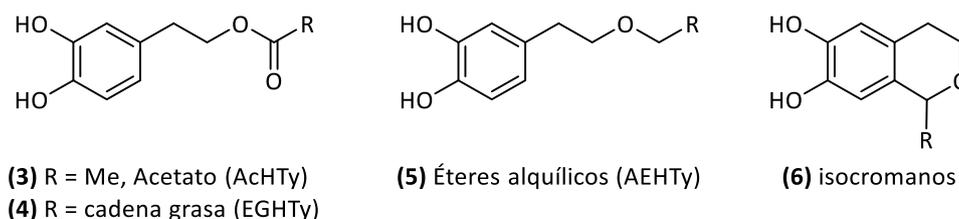
Se han solicitado numerosas patentes (Fernández-Bolaños *et al.*, 2005; Sabatini, 2010) para la obtención de HTy a partir de subproductos y aguas residuales de las industrias de obtención del aceite de oliva y de aderezo de aceitunas de mesa al estilo sevillano. También se ha descrito su síntesis a partir del tirosol, del ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético y de su éster metílico, así como de la oleuropeína de las hojas de olivo (Larrosa *et al.*, 2003; Fernández-Bolaños *et al.*, 2007; Gambacorta *et al.*, 2007;

Souilem *et al.*, 2017) y actualmente están en estudio procesos biotecnológicos industriales de obtención que permitan abaratar su coste (Achmon y Fishman, 2015).

Además, el uso como aditivo alimentario del HTy obtenido por síntesis ha sido recientemente autorizado por la Unión Europea (AECOSAN, 2015). Por estos motivos y porque no es amargo se ha ensayado su uso como aditivo funcional antioxidante en jugo de tomate (Larrosa *et al.*, 2003), en productos de la pesca (Pazos *et al.*, 2008) y también en galletas donde se ha comprobado una disminución de los niveles de LDL postprandiales (Mateos *et al.*, 2016).

Sin embargo el HTy es un compuesto muy polar, de baja solubilidad en lípidos (31 mg/g en aceite de *Cuphea* a 60 °C) (Laszlo *et al.*, 2013) e inestable en soluciones acuosas de las cuales se obtiene por liofilización como un sirupo de difícil manejo, por lo que se hace necesario disponer de derivados de hidroxitirosilo con un mejor balance hidrofílico/lipofílico, con objeto de obtener unos productos de fuerte carácter antioxidante, que al ser usados como aditivos para grasas y aceites, les confieran a estos productos un carácter funcional. En este contexto, hace algunos años se inició una serie de colaboraciones entre el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), el Departamento de Farmacología y Pediatría (Facultad de Medicina, Universidad de Málaga), el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla) y el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (CSIC, Madrid), para el estudio de la síntesis y de las propiedades antioxidantes y farmacológicas de derivados liposolubles del HTy.

Así, por reacción del alcohol primario del HTy, se han sintetizado el correspondiente acetato (AcHTy, **3**) y las series de ésteres de ácidos grasos de hidroxitirosilo (Trujillo *et al.*, 2006) (EGHTy, **4**), de alquil éteres de hidroxitirosilo (AEHTy, **5**) (Madrona *et al.*, 2009) y de 6,7-dihidroxi-isocromanos (**6**) (Mateos *et al.*, 2015), todas ellas con cadenas alquílicas lineales (Figura 2).

**Figura 2**

Estructuras de diversos derivados de hidroxitirosilo

Todos estos derivados mostraron una capacidad antioxidante similar a la del HTy libre que fue mayor que las del  $\alpha$ -tocoferol, PA y BHT, a concentraciones iguales en milimoles/kg (mmol/kg), cuando se midieron por el método Rancimat<sup>®</sup> en matrices oleosas (Mateos *et al.*, 2003; Trujillo *et al.*, 2006; Torres de Pinedo *et al.*, 2007; Pereira-Caro *et al.*, 2009; Mateos *et al.*, 2015). También se midió la capacidad antioxidante por los métodos FRAP, ABTS y ORAC que son más apropiados para medir la actividad en medios biológicos. Además, se estudió la influencia del grado de insaturación de la matriz oleosa en la actividad del AcHTy y de los EGHTy, en comparación con otros antioxidantes sintéticos, y también los efectos sinérgicos debidos a la presencia de tocoferoles (Romero-Segura, 2010) ya que los aceites vegetales contienen cantidades importantes de estas sustancias (FAO/WHO, 2009).

Desde el punto de vista metabólico, después de la digestión gástrica de HTy, AcHTy y AEHTy se produce una alta recuperación, y después de la digestión intestinal los AEHTy no sufren modificación mientras que el AcHTy se hidroliza a HTy en una gran extensión (Pereira-Caro *et al.*, 2012). Posteriormente, el HTy liberado se metaboliza a ácido 2-(3,4-dihroxifenil)acético (Gómez-Romero *et al.*, 2012). Una revisión del metabolismo y significación biológica del HTy y del tirosol ha sido publicada recientemente (Rodríguez-Morató *et al.*, 2016). Por tanto, los éteres mantienen su carácter liposoluble mientras que los ésteres se hidrolizan a HTy, de carácter hidrosoluble, y en consecuencia la absorción intestinal es distinta.

Se han publicado revisiones y monografías sobre las propiedades biológicas y farmacológicas de los derivados de HTy (Fernández-Bolaños *et al.*, 2007; Fernández-

Bolaños *et al.*, 2012; Bernini *et al.*, 2015), que en muchos casos mejoran a las del HTy libre.

Finalmente con el objetivo de aumentar el arsenal de compuestos con posible acción frente a la enfermedad de Parkinson, nuestro grupo ha sintetizado dos series de ésteres (**8**) y éteres (**9**) derivadas del 2-(3,4-dihidroxi-6-nitrofenil)etanol (nitrohidroxitirosol, **7**) (Figura 3), que son homólogas de los ésteres y éteres de HTy, ya que diversos compuestos con una unidad de nitrocatecol en su estructura muestran capacidad para inhibir la actividad de la COMT (catecol *O*-metil transferasa), enzima que influye en la biodisponibilidad de la L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (Nissinen, 2010).



**Figura 3.** Estructuras de nitrohidroxitirosol y diversos derivados

Se ha comprobado que estos nuevos compuestos sintetizados mantienen su carácter antioxidante (Trujillo *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2016), producen una inhibición de la COMT (Gallardo *et al.*, 2014) y afectan al metabolismo cerebral de la dopamina (Gallardo *et al.*, 2015).

Dentro de la línea de investigación sobre los derivados del HTy, uno de los objetivos de nuestro grupo ha sido el estudio de la acción antioxidante sobre materias grasas de los éteres y ésteres de hidroxitirosilo y la mejora de los métodos de síntesis con el fin de que puedan ser utilizados como aditivos antioxidantes en grasas alimentarias, ya que poseen una elevada capacidad antioxidante y presentan actividad biológica que puede conferir a las grasas carácter funcional.

La síntesis de los AEHTy requiere de un proceso en tres pasos (Madróna *et al.*, 2009) que resulta largo y costoso, por el que se obtienen los productos con unos rendimientos que decrecen conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica. En

cambio, para la preparación del AcHTy y los EGHTy se utilizó un método sencillo por reacción del HTy con acetato de etilo y ésteres metílicos o etílicos de los ácidos grasos respectivamente, utilizando ácido *p*-toluenosulfónico (Trujillo *et al.*, 2006) o la lipasa comercial procedente de *Candida antarctica* (Mateos *et al.*, 2008) como catalizador. En ambos casos se requiere el aislamiento y la purificación del producto de la reacción para que pueda ser utilizado como aditivo alimentario, por lo que se realizaron ensayos preliminares de la reacción *in situ* de los triacilglicerolés del aceite con el HTy libre sin utilización de disolvente, mediante un procedimiento enzimático muy sencillo, económico, ya que sólo utiliza la agitación y filtración como técnicas preparativas (Romero-Segura, 2010).

Este procedimiento de obtención *in situ* de los EGHTy permitiría su utilización directa en las categorías comerciales denominadas “aceite de oliva refinado” (aceite sometido a procesos físico-químicos de purificación) y “aceite de oliva” (mezcla de oliva virgen con refinado) con objeto de suplementar la pérdida en polifenoles que sufren éstos por efecto de la refinación. Los aceites de “oliva refinado” y de “oliva” constituyen una parte muy importante de la producción total de aceite de oliva en España, que en la cosecha 2013-2014 fue estimada en un 38,3% según el Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de 2014, aunque un estudio de la Universidad Complutense (Martín-Cerdeño, 2015) cifra su consumo en los hogares españoles durante el 2014 en el 54,1%. Es cierto que el consumo de aceites de oliva que contengan refinado ha venido disminuyendo en los últimos años (en 2005-2006 fue del 48,4%) pero es evidente que, por razones climatológicas, económicas o problemas en la elaboración, siempre habrá un porcentaje alto de aceite de oliva que por su inferior calidad no podrá comercializarse como aceite de oliva virgen y deberá destinarse a refinación. Un suplemento de fenoles añadido a estos aceites de oliva refinados puede suponer un valor añadido que les permita competir con ventaja con otros aceites de semillas de similar composición glicerídica y mucho menor coste de producción.

Por otra parte, la reacción con aceite de pescado y con concentrados de los ácidos  $\omega$ -3 (EPA y DHA) daría lugar a la formación de concentrados de los correspondientes ésteres de HTy que por las propiedades que ambos componentes

presentan por separado, pueden tener gran interés desde el punto de vista farmacológico y nutricional.

La acción antioxidante de los ésteres de hidroxitirosilo sobre matrices grasas de diferente insaturación ya fue estudiada (Romero-Segura, 2010) en comparación con la de otros antioxidantes, pero quedó pendiente investigar su comportamiento en la oxidación a baja temperatura. Debido a que los AEHTy no son hidrolizables, es conveniente estudiar su capacidad antioxidante en matrices de diferente insaturación ya que pudieran tener actividad algo diferente a la de los EGHTy.

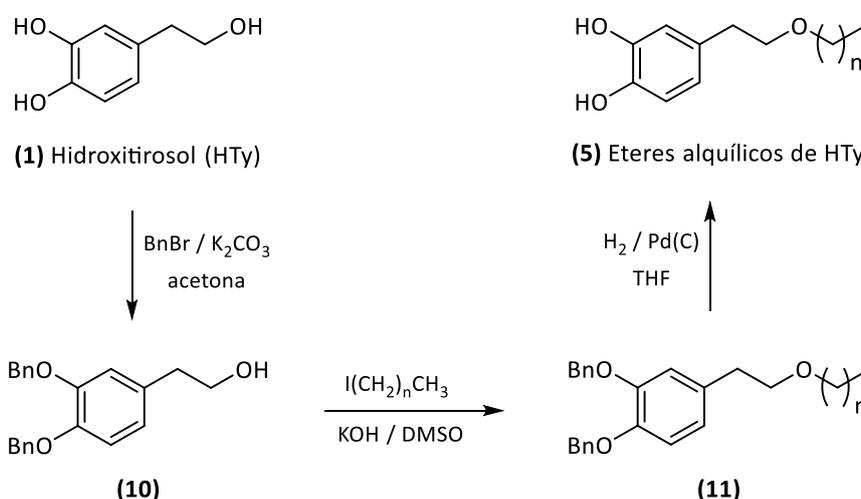
El estudio de la preparación de los derivados lipídicos del HTy y de su acción antioxidante sobre grasas de elevado grado de insaturación puede facilitar el aprovechamiento del HTy contenido en los diferentes subproductos de la obtención del aceite de oliva (hojas, aguas de vegetación) y de la preparación de las aceitunas de mesa (salmueras) aportando un nuevo valor a los desechos de las industrias relacionada con el olivo, de gran impacto social y económico en España y particularmente en Andalucía.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSILO (AEHTy)

#### 2.1.1. Síntesis de éteres de hidroxitirosilo

Los AEHTy han sido sintetizados en un proceso de tres pasos (Madrona *et al.*, 2009). El primero consiste en la transformación del HTy (**1**) en su derivado dibencilado (**10**) por reacción con bromuro de bencilo y carbonato de potasio en acetona. A continuación, se hace reaccionar el alcohol primario con yoduro de alquilo para dar un compuesto intermedio (**11**) que pierde los grupos bencilo por hidrogenolisis para dar los correspondientes AEHTy (**5**) (Figura 4). De esta forma se ha descrito la preparación de los éteres de metilo, etilo, propilo, hexilo, octilo, dodecilo y octadecilo.



**Figura 4**

Esquema sintético de preparación de alquiléteres de HTy (Madrona *et al.*, 2009)

Otros derivados similares, con cadena lateral olefínica (oleilo y linoleilo) (Almeida *et al.*, 2012) o aromática (Tassano *et al.*, 2015) se han preparado posteriormente partiendo del ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético.

### **2.1.2. Propiedades antioxidantes**

La capacidad antioxidante de los AEHTy en medios hidrofílicos ha sido evaluada mediante los métodos FRAP, ABTS y DPPH, y en una matriz oleosa por el método Rancimat®, en comparación con HTy, BHT y  $\alpha$ -tocoferol. En todos los casos la actividad fue similar a la del HTy libre, aunque ligeramente más baja en el medio lipofílico para los AEHTy de cadena alquílica larga (Pereira-Caro *et al.*, 2009), de acuerdo con lo que se conoce como *paradoja polar*.

### **2.1.3. Metabolismo**

Los AETHy se absorben rápidamente a través del tracto intestinal y son parcialmente metabolizadas por monocapas de células Caco-2/TC7, manteniendo su naturaleza lipofílica (Pereira-Caro *et al.*, 2012a). Por otra parte, estudios con células HepG2 de hepatoma humano indican que los éteres se metabolizan extensivamente en el hígado, siendo más rápido el proceso en los compuestos más lipofílicos (Pereira-Caro *et al.*, 2012b).

### **2.1.4. Actividad biológica**

Los AETHy producen un efecto protector contra el estrés oxidativo en células hepáticas HepG2 (Pereira-Caro *et al.*, 2011). También inhiben la agregación plaquetaria en forma dependiente de la concentración, aunque no se encuentra relación entre este efecto y la longitud de la cadena alquílica. Los efectos fueron mayores que los del HTy libre con un máximo en el rango C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> (Muñoz-Marín *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2013). Además, los AEHTY mostraron efectos neuroprotectores, citoprotectores y antioxidantes en láminas de cerebro de rata sometidas a un modelo de hipoxia-reoxigenación, siendo también el efecto máximo en el rango C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> de la cadena alquílica (Guerrero *et al.*, 2012; Muñoz-Marín *et al.*, 2013). Finalmente se ha investigado la actividad citotóxica selectiva del HTy y de los AEHTy en células pulmonares cancerosas A549 y fibroblastos no malignos de pulmón MRC5, resultando que el éter con cadena C<sub>12</sub> fue el más selectivo en comparación con el HTy libre (Calderón-Montaño *et al.*, 2013).

En los diferentes estudios de comparación realizados en tejido cerebral de ratas entre las actividades neuroprotectoras y antioxidantes del éter etílico de hidroxitirosol, el éter etílico de tirosol y el éter etílico de 3,4-di-O-metilidén-hidroxitirosol se observan mejores resultados en relación directa con el número de hidroxilos fenólicos libres (De la Cruz, *et al.*, 2015a, 2015b) confirmando que los derivados de HTy son los más activos.

En ratas hipercolesterolémicas se apreció un efecto beneficioso del éter etílico de hidroxitirosilo (Taberner *et al.*, 2014). Igualmente, en ratas se comprobó que los éteres de oleílo y linoleílo abren un nuevo camino para mejorar el impacto negativo derivado de la LDL oxidada y que tienen efecto hipofágico comparable al de la oleoiletanolamina (Almeida *et al.*, 2012).

Por otra parte, tanto los éteres de HTy como los de Ty mostraron ser agentes antitripanosomales y antileishmaniales más activos que el HTy y el Ty libres, presentando los elementos C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> de la cadena alquílica el máximo de actividad (Belmonte-Reche *et al.*, 2016).

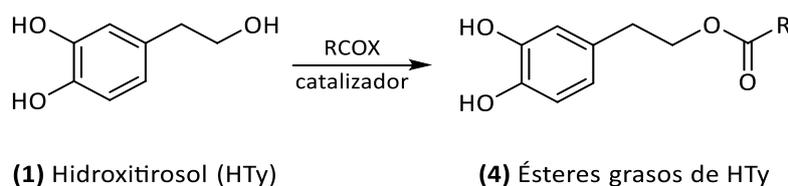
## 2.2. ÉSTERES DE HIDROXITIROSILO

### 2.2.1. Síntesis de ésteres de hidroxitirosilo

El HTy se obtiene como un sirupo pastoso de carácter hidrofílico que se mezcla con bastante dificultad con los reactivos acilantes. En todos los procedimientos de síntesis que se describen a continuación, suele ser necesario utilizar un disolvente polar que disuelva el HTy para que pueda entrar en contacto con el reactivo acilante. Por otra parte, para obtener los productos de la reacción con la pureza necesaria para su utilización como aditivo alimentario, es necesario eliminar disolvente, catalizador y exceso del reactivo, mediante la purificación por técnicas cromatográficas, que son poco económicas y lentas.

## 2.2.1.1. Síntesis de EGHTy por acilación del alcohol primario del HTy

Los EGHTy (**4**) se pueden obtener por reacción del HTy (**1**) con diversos compuestos acílicos empleando algún tipo de catalizador en un procedimiento regioselectivo en el que sólo se esterifica el grupo alcohólico primario (Figura 5).



**Figura 5**

Esquema general para la síntesis regioselectiva de ésteres grasos de HTy

Cuando el procedimiento no es selectivo hay que proteger previamente los OH fenólicos y desprotegerlos al término de la reacción. El primer método publicado fue la reacción con el ácido octanoico disuelto en hexano y con la enzima *Candida antarctica* como catalizador (Buisman *et al.*, 1998).

Con ácidos grasos libres se consiguió la esterificación regioselectiva con el reactivo de Mitsunobu (Appendino *et al.*, 2002) o mediante catálisis enzimática (Buisman *et al.*, 1998; Bouallagui *et al.*, 2011). La simple reacción con cloruros de acilo (Torregiani *et al.*, 2005; Tofani *et al.*, 2010; Procopio *et al.*, 2011) o anhídridos de ácido (Dalpozzo *et al.*, 2006) no es selectiva y da lugar a una mezcla de derivados mono, di y triacilados (Puleva, 2003), por lo que requiere la presencia de sales de lantánidos – Ce(III) (Torregiani *et al.*, 2005) ó Er(III) (Dalpozzo *et al.*, 2006) – o una protección química previa de los hidroxilos fenólicos con ortoformiato de metilo (Tofani *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito la reacción del acetónido del HTy con los cloruros de ácido en la interfase aceite/agua sin necesidad de catalizador (Oliverio *et al.*, 2016).

Sin embargo, la transesterificación del HTy con ésteres metílicos (Trujillo *et al.*, 2006), etílicos (Alcudia *et al.*, 2004; Torres de Pinedo *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2006; Bouallagui *et al.*, 2011) o vinílicos (Grasso *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2009) de los ácidos grasos, en presencia de un catalizador, es la forma más práctica de obtener los

EGHTy con aceptables o buenos rendimientos. Como catalizadores se han utilizado ácidos fuertes como el *p*-toluenosulfónico (Trujillo *et al.*, 2006) o lipasas (Torres de Pinedo *et al.*, 2005; Grasso *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2009; Bouallagui *et al.*, 2011). Numerosas lipasas han sido ensayadas y la procedente de *Candida antarctica* fue la que ha dado mejores resultados (Grasso *et al.*, 2007).

#### 2.2.1.2. Síntesis de EGHTy a partir de otros compuestos fenólicos

Se ha propuesto la síntesis de los EGHTy a partir de diferentes sustratos de partida:

- a) tirosol o del alcohol homovanílico, mediante la acilación con los cloruros de ácido, seguida de oxidación (Bernini *et al.*, 2008a; 2008b).
- b) éster metílico del ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético (Gambacorta *et al.*, 2007).
- c) 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol (Lee *et al.*, 2016).

#### 2.2.1.3. Síntesis del acetato de hidroxitirosilo (AcHTy)

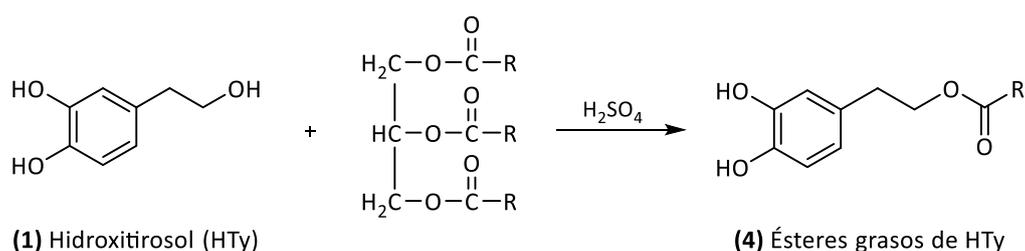
Mediante los procedimientos de transesterificación del HTy descritos en el apartado 3.2.1.1, utilizando acetato de etilo como reactivo y disolvente, se obtiene el AcHTy (**3**) que cristaliza fácilmente (p.f. 81-83 °C). También se pueden obtener por los procedimientos descritos en 3.2.1.2, utilizando cloruro de acetilo como agente acilante.

Otros procedimientos más complejos consisten en la protección de los OH fenólicos del HTy (**1**) con bromuro de bencilo, acetilación posterior del alcohol primario libre con ácido acético en piridina para dar el éster protegido y a continuación eliminación de los grupos protectores por hidrogenación sobre paladio para dar el AcHTy (**3**) (Gordon *et al.*, 2001).

Para el caso de no disponer de HTy, se ha descrito otro procedimiento a partir del 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol (Baraldi *et al.*, 1983).

### 2.2.2. Obtención de mezcla de ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy) por reacción *in situ* del HTy con los triacilgliceroles de los lípidos

Nuestro grupo de investigación en una patente describió hace algunos años la reacción de los triacilgliceroles del aceite de oliva con HTy (**1**) utilizando ácido sulfúrico, obteniéndose un aceite del que se aisló una mezcla de EGHTy (Alcudia *et al.*, 2004) (Figura 6).



**Figura 6**

Preparación *in situ* de ésteres grasos de HTy (Alcudia *et al.*, 2004)

En sintonía con lo anterior se ha descrito la síntesis del decanoato de hidroxitirosilo por reacción del aceite de *Cuphea* con HTy en presencia de enzima inmovilizada *Candida antarctica*, utilizando un procedimiento muy complejo en el que se realiza la reacción en un disolvente (2-metil-2-butanol) a 60 °C durante 6 horas. En la mezcla de reacción resultante se evapora el disolvente en rotavapor a vacío durante varias horas y luego se mantiene en un horno de vacío a 23 °C durante 16 horas. Una vez evaporado el disolvente, se añade una mezcla fresca de sustrato, se continúa la reacción durante 6 horas y finalmente se obtiene un aceite conteniendo el decanoato con pequeñas cantidades de otros ésteres grasos (Laszlo *et al.*, 2013).

Con anterioridad (Romero-Segura, 2010) nuestro grupo investigó las condiciones de reacción para que los aceites conteniendo altas concentraciones de EGHTy, producidos por reacción del HTy con los triacilgliceroles tuviesen las características de pureza requeridas para ser utilizados como aditivos alimentarios. Se rechazó el uso de disolventes y de los catalizadores ácidos ya que los residuos son de muy difícil eliminación, y se iniciaron ensayos de reacción con la enzima lipasa *Candida antarctica*, sin disolventes y utilizando HTy dispersado sobre tierra de diatomeas. Agitando dicha

mezcla con la enzima en polvo y con el aceite, y filtrando los sólidos al cabo de un tiempo, se logró un aceite que contenía una mezcla de los ésteres de los ácidos mayoritarios del aceite y restos de HTy libre en concentraciones no muy elevadas. La reacción se llevó a cabo en aceites de girasol y pescado sin que se alteraran las características de calidad de los aceites y los productos resultantes mostraron una buena estabilidad oxidativa.

### **2.2.3. Propiedades antioxidantes**

Las capacidades antioxidantes del AcHTy y de los EGHTy medidas por el método Rancimat® son similares a la del HTy y mayores que las del  $\alpha$ -tocoferol y del BHT en matrices de aceite de oliva, sin apreciarse diferencias significativas entre acetato, palmitato, estearato, oleato y linoleato (Trujillo *et al.*, 2006; Torres de Pinedo *et al.*, 2007). Sin embargo, en una matriz de aceite de girasol, con mayor grado de insaturación, se aprecia una actividad ligeramente menor de los EGHTy que del HTy y del AcHTy (Romero-Segura, 2010), lo que sugiere influencia de la composición de la matriz en la capacidad antioxidante efectiva de los antioxidantes. Este hecho fue corroborado por experiencias con otros antioxidantes (GP, TBHQ, PA) que vieron alterados sus efectos relativos según las composiciones de la matriz (girasol, soja, pescado) y del antioxidante (AcHTy, PHTy, TBHQ, GP, PA y  $\alpha$ -tocoferol) (Romero-Segura, 2010). En todos los casos la actividad antioxidante con respecto a la concentración sigue una curva sigmoideal, casi lineal a concentraciones bajas y tendiendo a un valor constante con el aumento de concentración.

La presencia de  $\alpha$ -tocoferol ejerce un efecto sinérgico positivo o negativo sobre la acción antioxidante de los ésteres de hidroxitirosilo que depende de las concentraciones de ambos, de la relación entre ellas y de las naturalezas de la matriz y del antioxidante (Romero-Segura, 2010).

Los métodos de medida en medios hidrofílicos (ABTS, DPPH, FRAP) confirmaron que los EGHTy tienen mayor capacidad antioxidante que los ésteres de tirosilo,  $\alpha$ -tocoferol, BHA, BHT, tirosol y alcohol homovanílico, indicando que los *orto*-difenoles son más efectivos que los fenoles simples y que los ésteres lo son más que los fenoles

libres (Torres de Pinedo *et al.*, 2007; Grasso *et al.*, 2007; Mateos *et al.*, 2008; Bouallagui *et al.*, 2011).

En relación con la longitud de la cadena de los EGHTy, parece que los derivados C4-C9 son los que presentan mayor actividad (Medina *et al.*, 2009; Tofani *et al.*, 2010). En emulsiones aceite de oliva-agua la actividad antioxidante mostró una dependencia parabólica con la longitud de la cadena alquílica siendo el máximo para C8 (Almeida *et al.*, 2016).

#### **2.2.4. Prevención del estrés oxidativo biológico**

El AcHTy y los EGHTy protegen a las proteínas y lípidos de un homogeneizado de cerebro contra la oxidación radicalaria (Trujillo *et al.*, 2006), así como a células musculares de ratas sometidas al ensayo fluorimétrico con diclorodihidrofluoresceína (Tofani *et al.*, 2010), en ambos casos con mayor efectividad que el HTy. En células cervicales humanas (HeLa cells), los ésteres previenen el estrés oxidativo inducido por hierro según el protocolo TBARS (Bouallagui *et al.*, 2011).

El test Comet sobre células de sangre total se aplicó a ésteres de hidroxitirosilo para verificar su capacidad de contrarrestar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el ADN y mostró una protección similar de HTy, AcHTy y propanoato que va decreciendo conforme aumenta la longitud de la cadena (Grasso *et al.*, 2007).

#### **2.2.5. Metabolismo**

La incubación con células de hepatoma humano HepG2 mostró que el AcHTy se hidroliza en gran extensión a HTy, que a continuación se metaboliza a alcohol homovanílico, aunque también se detecta el glucurónido del acetato (Mateos *et al.*, 2005b). El transporte del AcHTy a través de una monocapa de células intestinales CaCo-2 indica que la acetilación incrementa grandemente el transporte de HTy a través del epitelio intestinal (Mateos *et al.*, 2011).

#### **2.2.6. Prevención de enfermedades cardiovasculares**

Mediante estudios *in vivo* de administración oral a ratas (González-Correa *et al.*, 2008a) e *in vitro* con sangre humana total y plasma enriquecido en plaquetas

(González-Correa *et al.*, 2009) se ha observado que el AcHTy inhibe la agregación plaquetaria más eficientemente que el HTy e igual que el ácido acetilsalicílico.

### **2.2.7. Efectos antiinflamatorios**

La ingesta de AcHTy modula la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales de muridos (Aparicio-Soto *et al.*, 2014). La ingesta de HTy y AcHTy retorna a niveles basales la expresión pro inflamatoria de las proteínas en ratas con artritis inducida por colágeno (Rosillo *et al.*, 2015). Recientemente se ha publicado que la ingesta diaria de suplementos de HTy o de AcHTy previene el lupus eritematoso sistémico inducido por pristano en ratas (Aparicio-Soto *et al.*, 2017).

### **2.2.8. Otros efectos biológicos**

En láminas de cerebro de ratas sometidas a hipoxia-reoxigenación, HTy y AcHTy mostraron actividad neuroprotectora (González-Correa *et al.*, 2008b). En ratas hipercolesterolémicas, HTy, AcHTy y éter etílico de hidroxitirosilo tuvieron un efecto beneficioso que fue mayor con el acetato (Taberner *et al.*, 2014). Por otra parte, los EGHTy han mostrado actividad antiapoptótica en células humanas U937 (Buratini *et al.*, 2013). Los EGHTy de cadena C10-C12 mostraron una actividad mayor que la del HTy contra el *Trypanosoma brucei* (Belmonte-Recha *et al.*, 2016).

## **2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DERIVADOS DE HTy**

En los procedimientos para la determinación de HTy y sus derivados hay que distinguir el aislamiento de los fenoles de la matriz oleosa y el método analítico final.

Para el caso del aceite de oliva que contiene un conjunto de fenoles muy complejo, se han publicado procedimientos de extracción líquido-líquido y fase sólida (ELL y EFS, respectivamente) y se han aplicado numerosas técnicas instrumentales para la identificación y cuantificación de las especies, tales como espectrofotometría, GC, GC-EM y CLAE-EM con diferentes técnicas de ionización, evaporative light-scattering (ELSD), electroforesis capilar y CLAE-UV (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Bendini *et al.*,

2007; Laszlo *et al.*, 2013). La ELL del aceite disuelto en hexano con metanol-agua (60:40) es el método tradicional, aunque presenta la dificultad de evaporar el extracto en metanol-agua. La EFS en fase diol es más efectiva que en fase C18, pero presenta selectividad con respecto a algunos componentes de la fracción fenólica del aceite de oliva (Hrncirik y Fritsche, 2004).

Con respecto al método analítico, la técnica tradicional para medir fenoles totales ha sido la espectrofotometría por el método Folín-Ciocalteu, aunque ahora se tiende a usar la CLAE en fase inversa con detector UV, puesto que suministra información sobre las especies fenólicas, que pueden diferir según la variedad del aceite. Se ha comparado la ELL con análisis por el método Folín-Ciocalteu con un procedimiento por EFS-diol seguida de CLAE-UV *diode array* (Mateos *et al.*, 2001). Los resultados mostraron una fuerte correlación sugiriendo que el método colorimétrico es válido para evaluar el contenido fenólico total (Hrncirik y Fritsche, 2004).

### **2.3.1. Fenoles totales por el método espectrofotométrico de Folín-Ciocalteu**

Este método determina el conjunto de todos los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, tales como derivados de HTy y tirosol, lignanos, flavonas y otros fenoles simples. Se basa en el poder reductor de los fenoles sobre una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (Reactivo Folín) en medio básico, originándose una mezcla de óxidos de color azul que presenta un máximo de absorción a 725 nm. Se cuantifica con respecto a una recta de calibrado obtenida con disoluciones de ácido cafeico en metanol-agua (Vazquez-Roncero *et al.*, 1973) y el resultado se expresa en mg/kg de ácido cafeico. También se ha utilizado la calibración con ácido gálico. Aunque es un método ampliamente usado para el extracto obtenido con metanol-agua, no refleja exactamente las concentraciones puesto que los coeficientes de absorción molar varían de mono a *orto*-difenoles (tirosol e HTy, respectivamente) y el reactivo puede reaccionar con otros compuestos reductores.

### **2.3.2. *orto*-Difenoles totales. Método espectrofotométrico**

Se basa en el quelato de color amarillo que se forma entre los *orto*-difenoles y el molibdeno con un máximo a 370 nm, sin interferencias de monofenoles (Vazquez-

Roncero *et al.* 1971). Para HTy y AcHTy se ha puesto a punto un método por EFS-diol seguido del análisis de *orto*-difenoles con una recta de calibrado expresada en mmol/ml que es casi idéntica para catecol, HTy y AcHTy por lo que puede construirse con catecol si se carece del HTy o AcHTy patrón (Romero-Segura, 2010).

$$C \text{ (mmol/ml)} = (-0,170 + 8,236 \times \text{ABS}) \times 10^{-4}$$

Los resultados se expresan en mmol/kg. En la metodología antigua los resultados se expresaban en mg/kg de ácido cafeico o gálico según el patrón utilizado para construir la recta de calibrado.

### **2.3.3. Cromatografía de gases (CG)**

El análisis de fenoles en aceite de oliva por CG requiere formación de derivados, por lo que hay riesgo de formación de artefactos debidos a la temperatura y se obtienen unos perfiles muy complejos, y por tanto esta técnica se ha usado preferentemente para comparar perfiles (Liberatore *et al.*, 2001) y combinada con espectrometría de masas para identificar componentes (Angerosa *et al.*, 1996).

### **2.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)**

Para el caso de la cuantificación de EGHTy en matrices purificadas o con alto contenido fenólico se utilizó EFS-diol y el análisis final se llevó a cabo por CLAE-UV. Los resultados se expresan en mmol/kg de aceite porque permite una mejor comparación de las capacidades antioxidantes que la expresión en mg/kg, ya que la actividad se debe al grupo *o*-catecol (Romero-Segura, 2010).



### 3. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se continúa con la investigación de las propiedades antioxidantes de los alquil éteres y ésteres de hidroxitirosilo, derivados liposolubles del hidroxitirosol, en matrices y aceites de diferente grado de insaturación, iniciadas por el grupo desde hace varios años con el fin de que puedan ser utilizados como aditivos de alta capacidad antioxidante para grasas y aceites, puesto que tienen propiedades farmacológicas y nutricionales que pueden conferir a los alimentos carácter funcional.

En lo que respecta a la síntesis de estos derivados se ha profundizado en la obtención *in situ* de los ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy), obteniéndose aceites conteniendo una alta concentración de una mezcla de ellos que puede utilizarse directamente como aditivo antioxidante en todo tipo de aceites, puesto que la alta capacidad de los ésteres por separado, en comparación con los antioxidantes sintéticos, ya ha sido puesta de manifiesto.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se aplicará el método de oxidación acelerada Rancimat® en matrices oleosas fortificadas con los antioxidantes, método que permite comparar actividades y obtener resultados en tiempos razonables. Además, se estudiará el proceso de oxidación de aceites enriquecidos con antioxidantes, expuestos al aire a bajas temperaturas (sistema *open cup*).

Para la evaluación de los contenidos en derivados de HTy en los distintos experimentos, se han puesto a punto las metodologías analíticas necesarias.

Los puntos concretos que constituyen los objetivos del presente trabajo son:

### **3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSILO (AEHTy) EN MATRICES LIPÍDICAS DE DIFERENTE INSATURACIÓN**

#### **3.1.1. Capacidad antioxidante en el equipo Rancimat®**

En primer lugar, se estudia la capacidad antioxidante a alta temperatura de los AEHTy en matrices lipídicas de diverso grado de insaturación debido a que estos éteres no son hidrolizables y presentan acciones biológicas más intensas que los EGHTy.

#### **3.1.2. Interacción con los tocoferoles**

También se estudiará la interacción con los tocoferoles, ya que estos compuestos están presentes en los aceites vegetales donde se pretende utilizar los AEHTy como aditivos antioxidantes.

#### **3.1.3. Oxidación en recipiente abierto a baja temperatura**

Además, se estudiará la oxidación de los aceites fortificados utilizando el método de recipiente abierto *open cup* a temperatura de 50°C, siguiéndose la evolución de la calidad de los aceites y los cambios en las concentraciones de AEHTy y del tocoferol a lo largo de todo el proceso.

### **3.2. OBTENCIÓN DE ACEITES CON ALTO CONTENIDO DE MEZCLA DE ÉSTERES GRASOS DE HIDROXITIROSILO (EGHTy)**

Dado que se ha demostrado que los EGHTy presentan también buena capacidad antioxidante y que la síntesis de los AEHTy es complicada y costosa, se ha considerado muy interesante proseguir los estudios de la obtención de aceites que contengan una alta concentración de EGHTy, con objeto de que el aceite resultante pueda ser utilizado como aditivo antioxidante y de carácter funcional para alimentos grasos.

### **3.2.1. Obtención de EGHTy por reacción *in situ* del HTy con los triacilgliceroles del aceite. Optimización de las variables del proceso**

Se pretende la obtención de un aceite conteniendo alta concentración de una mezcla de EGHTy partiendo de la reacción *in situ* del HTy disperso sobre un soporte sólido con los triacilgliceroles de los aceites en presencia de enzimas inmovilizadas, sin utilización de disolventes y sin necesidad de aislar el producto final, mediante un método rápido, sencillo y económico de fácil implantación en la industria de refinación de aceites. Para ello, se optimizarán las variables siguientes: temperatura, cantidad de soporte sólido y enzima, relación HTy/aceite y tiempo de reacción. También se ensayará la posibilidad de fortificar aceite con ésteres por el simple paso a través de una columna que contenga una mezcla del HTy disperso en el soporte sólido con el catalizador.

### **3.2.2. Caracterización de los aceites con alta concentración de EGHTy**

En el caso de los aceites con teniendo alta concentración de una mezcla de EGHTy, se determinará la composición en ácidos grasos, los perfiles glicerídicos y de EGHTy y la concentración de EGHTY+HTy.

## **3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ÉSTERES DE HIDROXITIROSILO**

Si el método de obtención de ésteres de hidroxitirosilo presenta indicios de viabilidad, se profundizará en el estudio de las propiedades antioxidantes del AcHTy y del aceite que contiene alta concentración de la mezcla de ésteres grasos. Se utilizará AcHTy, obtenido por reacción del HTy con acetato de etilo, como representante de la familia de esterres grasos de hidroxitirosilo ya que su actividad es similar a la de los EGHTy y económica su preparación.

### **3.3.1. Actividad antioxidante del AcHTy**

Se estudiará la acción antioxidante del AcHTy en matrices de aceite de oliva, en comparación con la del  $\alpha$ -tocoferol en experimentos de oxidación a temperatura ambiente en sistema *open cup* y a alta temperatura en Rancimat®. Se investigará el efecto que produce la presencia de  $\alpha$ -T en la actividad del AcHTy.

### **3.3.2. Estabilidad oxidativa de aceites fortificados con aceites que contiene alta concentración de EGHTy.**

Matrices purificadas de aceites de diferente grado de insaturación sembradas con diferentes cantidades de aceites que contengan alta concentración de mezcla de EGHTy se someterán a oxidación en el equipo Rancimat® para verificar que su comportamiento es similar al de los ésteres individuales. Así mismo se realizará una estimación de la *vida útil* de aceites comerciales de distintos tipos enriquecidos con pequeñas cantidades de los aceites que contienen alta concentración de EGHTy.

## **3.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DERIVADOS DE HIDROXITIRO SOL**

Finalmente, se pondrán apunto métodos analíticos para determinar AEHTy, EGHTy y AcHTy en los diferentes tipos de matrices lipídicas empleadas en los estudios mediante extracción en fase sólida (EFS) seguida de análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) con detector de diodos UV (*diode array*). Para la caracterización de aceites con alto contenido en EGHTy, se ensayarán procedimientos de análisis directo del aceite por CLAE de exclusión molecular y por cromatografía de gases.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MUESTRAS

#### 4.1.1. Aceites

Se han utilizado aceites refinados comestibles de oliva, girasol normal (alto contenido en ácido linoleico) y soja suministrados por una industria local, aceite de pescado (*Menhaden oil*) adquirido a Sigma (Madrid, España) y aceite de Sacha inchi (*Plukenetia avulubilis* L.) virgen adquirido en una tienda especializada. Las composiciones en ácidos grasos de dichos aceites se muestran en la Tabla 1.

#### 4.1.2. Matrices lipídicas purificadas

Para la preparación de las matrices purificadas se ha partido de los aceites indicados en el apartado anterior y se ha seguido el procedimiento *free solvent* que permite obtener la matriz exenta de restos de disolvente y de los estabilizantes que ésta contenga (Yoshida *et al.*, 1992).

##### *Procedimiento:*

Se pesan 200 g de aceite y se introducen a través de una columna de vidrio (45 cm longitud x 3 cm d.i.) rellena de alúmina neutra (100 g) previamente activada durante 3 horas a 200 °C. La salida de la columna se conecta a un matraz kitasato al que se aplica vacío y se eluye hasta que el nivel de aceite alcanza la parte superior del relleno. Tanto la columna como el matraz de recogida se mantienen al abrigo de la luz, para proteger de la oxidación al aceite. A la matriz obtenida se le determinan los tocoferoles, comprobándose la ausencia de éstos. Las composiciones en ácidos grasos de dichas matrices purificadas se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 1**  
Composición en ácidos grasos (%) de aceites refinados de oliva, girasol normal, soja, sachá inchi y pescado

Ácido graso	ACEITES							
	Oliva 1	Girasol 1	Girasol 2	Soja 1	Soja 2	Sacha inchi	Pescado 1	Pescado 2
C14:0	n.d.	n.d.	0,1±0,0	n.d.	0,1±0,0	n.d.	8,3±0,1	9,4±0,1
C16:0	11,1±0,1	5,8±0,1	6,3±0,2	10,8±0,1	11,2±0,2	5,2±0,2	19,3±0,3	19,2±0,3
C16:1	1,2±0,2	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,0	12,1±0,2	12,8±0,1
C16:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2±0,0
C18:0	3,1±0,1	3,7±0,1	4,5±0,2	4,2±0,1	3,2±0,3	2,5±0,1	3,6±0,1	3,4±0,0
C18:1(*)	74,8±0,5	27,9±0,5	30,4±0,6	27,3±0,5	29,1±0,4	13,8±0,2	10,3±0,2	10,0±0,3
C18:2	8,7±0,2	62,4±0,7	58,4±0,5	51,7±0,7	51,1±0,3	30,0±0,7	1,7±0,0	1,7±0,0
C18:3	1,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	5,9±0,1	5,3±0,2	48,2±0,5	1,8±0,1	2,0±0,1
C18:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,9±0,1	3,5±0,2
C20:4(**)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9±0,0	2,9±0,0
C20:5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,5±0,3	16,0±0,2
C22:5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,7±0,1	3,3±0,1
C22:6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,2±0,3	14,6±0,2
IY	83,4±3,4	132,4±2,1	128,4±2,8	128,6±3,2	127,5±3,7	190,2±5,0	160,1±4,0	158,1±4,0

(\*) C18:1. Suma de los isómeros n-7 + n-9

(\*\*) C20:4. Suma de los isómeros n-3 + n-6

n.d.: no detectado

Los datos se expresan como la media de las medidas y su desviación estándar (n=3)

**Tabla 2**

Composición en ácidos grasos (%) de matrices purificadas de aceites refinados de oliva, girasol normal, soja, sachá inchi y pescado

Ácido graso	MATRICES								
	Oliva 1	Oliva 2	Girasol 1	Girasol 2	Soja 1	Soja 2	Sachá inchi	Pescado 1	Pescado 2
C14:0	n.d.	n.d.	n.d.	0,1±0,0	n.d.	0,1±0,0	n.d.	8,4±0,1	9,4±0,2
C16:0	11,2±0,1	18,0±0,3	5,8±0,1	6,1±0,3	10,8±0,1	11,1±0,1	5,5±0,1	19,2±0,4	19,3±0,2
C16:1	0,9±0,2	2,5±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,4±0,0	11,9±0,3	13,0±0,2
C16:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2±0,1
C18:0	3,2±0,3	1,8±0,1	3,7±0,1	4,4±0,1	4,2±0,1	3,3±0,2	2,8±0,1	3,6±0,2	3,4±0,0
C18:1(*)	75,3±0,5	57,0±0,6	27,9±0,5	30,5±0,4	27,3±0,5	29,2±0,3	14,0±0,1	10,5±0,3	10,2±0,2
C18:2	8,4±0,2	17,8±0,4	62,4±0,7	58,7±0,7	51,7±0,7	51,0±0,5	28,4±0,5	1,8±0,0	1,8±0,0
C18:3	1,1±0,0	0,8±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	5,9±0,1	5,3±0,1	48,9±0,5	1,9±0,0	2,0±0,0
C18:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,9±0,1	3,6±0,1
C20:4(**)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9±0,0	2,9±0,0
C20:5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,3±0,3	15,8±0,1
C22:5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,8±0,1	3,2±0,2
C22:6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,8±0,5	14,2±0,3
IY	83,0±3,2	99,0 ±4,2	130,9±3,5	127,7±3,7	127,3±4,1	127,4±3,9	189,5±5,1	158,1±4,2	156,3±4,2

(\*) C18:1. Suma de los isómeros n-7 + n-9

(\*\*) C20:4. Suma de los isómeros n-3 + n-6

n.d.: no detectado

Los datos se expresan como la media de las medidas y su desviación estándar (n=3)

## 4.2. ANTIOXIDANTES ENSAYADOS

- **Hidroxitirosol (HTy)** obtenido de dos fuentes. Para el estudio de los éteres derivados se utilizó un extracto del 95% en HTy, recuperado del alpechín por un procedimiento bajo patente (Fernández-Bolaños *et al.*, 2005), mientras que para el estudio de formación de ésteres *in situ* se ha utilizado hidroxitirosol adquirido a Seprox Biotech (Murcia, España).
- **Alquil éteres de hidroxitirosilo (AEHTy)**. Los éteres etílico y octílico de HTy fueron obtenidos a partir del 3,4-dibencilderivado de hidroxitirosilo mediante alquilación del grupo alcohólico libre con yoduros de etilo y octilo respectivamente, y posteriormente transformados en los correspondientes éteres libres por eliminación de los grupos bencilos protectores (Madrona *et al.*, 2009).
- **Ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy)**. Los EGHTy fueron obtenidos puros a partir de HTy según un procedimiento descrito previamente por nuestro grupo (Trujillo *et al.*, 2006) utilizando los correspondientes ésteres de etilo o de metilo como reactivos acilantes en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico como catalizador. En el caso de los ésteres de HTy de los ácidos C20:5 y C22:6, característicos del aceite de pescado, se obtuvieron como mezcla utilizando como agente acilante los correspondientes ésteres etílicos contenidos en cápsulas comerciales OMACOR®.
- **Acetato de hidroxitirosilo (AcHTy)**. Obtenido por cristalización del producto de la reacción del HTy con acetato de etilo.
- **Alfa-tocoferol ( $\alpha$ -T)**. Comercial (97%), adquirido a Aldrich (Madrid, España).

## 4.3. REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTANCIAS PATRÓN

- Acetonitrilo (far-UV), acetato de etilo, isopropanol, acetona, *n*-hexano, *n*-heptano, diclorometano, isooctano, tetrahidrofurano, metanol y etanol de calidad CLAE (Romil, Cambridge, GB).

- Cloroformo, almidón soluble, disolución de tiosulfato sódico 0,1N, yoduro potásico, disolución 2N de hidróxido potásico en metanol, éter dietílico, hidróxido sódico, indicador de fenoltaleína, y etanol 96%, de calidad PA (Panreac, Montcada i Reixac, España).
- Acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y ácido clorhídrico 37% de calidad PA (Merck, Darmstad, Alemania).
- 3-(4-Hidroxifenil)-1-propanol 99% (Aldrich, Steinheim, Alemania); ácidos o-cumárico 97% y p-hidroxifenilacético 98% (Sigma, St. Louis MO, USA).
- Miristato de etilo (FlukaAG, Buchs, Suiza) y octanoato, palmitato, palmitoleato, estearato, oleato, linoleato, linolenato de metilo (Sigma, St. Louis MO, USA).
- Yoduros de metilo y octilo (Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Enzima lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada, Novozym® 435 (actividad 5 U/mg) (Sigma, St. Louis MO, USA).
- Coadyuvante de filtración, tierra de diatomeas (Celite® 545), suministrada por una envasadora local de aceite.
- Cartuchos de EFS fase diol y amino de 3 mL de capacidad (Supelco, Bellefonte, USA).
- Alúmina neutra para cromatografía con tamaño de grano 0,05-0,15 mm, Actividad Brockmann I (ref. 06300), (Fluka AG, Buchs, Suiza).
- *p*-Anisidina 98%, (Fluka AG, Buchs, Suiza).
- Agua de grado Milli-Q, purificada mediante un sistema de cartuchos de purificación (Millipore).
- Los gases para cromatografía de gases (hidrógeno y nitrógeno) fueron suministrados por Air Liquide. El aire purificado fue obtenido en un equipo Alphagaz Air Flo.
- 1,3-Dipalmitina y 1-monopalmitoil-rac-glicerol (Sigma, St. Louis MO, USA).
- Ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (Fluka AG, Buchs, Suiza).
- Reactivos de silanización: bistrimetilsililfluoroacetamida (BSTFA) y bistrimetilsililacetamida (BSA) + trimetilclorosilano (TMCS) 99:1, mezclado en proporción 1:1 con piridina (Supelco, España).
- Cápsulas blandas de ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 (Omacor® 1000 mg), adquiridas en una farmacia.

#### 4.4. EQUIPOS Y APARATOS

- Columnas de vidrio para cromatografía de 45 cm de longitud x 3 cm d.i. utilizada para la purificación de los aceites.
- Para las reacciones del HTy con el aceite se utilizó un agitador magnético con control automático de temperatura Fisher Scientific, Heidolph, modelo Lab-Mix 20.
- Para las determinaciones de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP-5890) equipado con un sistema de inyección split/splitless, columna capilar de sílice fundida de cianopropilsilicona (SP 2380), detector de ionización de llama (FID) y Chem Station para el registro y tratamiento de datos. Para la caracterización de aceites con alta concentración de EGHTy se utilizó el mismo equipo con inyección *on column* y columna capilar de sílice fundida 5%-fenilmetilsilicona (HP-5)
- La determinación de tocoferoles se realizó en un equipo de CLAE Perkin Elmer (serie 400) con sistema de inyección manual Rheodyne® y detector de fluorescencia (Shimadzu, RF-535). Para el análisis de cromatografía líquida de exclusión molecular se utilizó el mismo equipo, pero conectado a un detector de índice de refracción (Refractómetro ABBE, Modelo 98, Hilger& Watts Ltd., London, UK).
- La estabilidad oxidativa se determinó con un equipo 679 Rancimat®, (Metrohm, Suiza).
- Para el análisis de los derivados fenólicos mediante CLAE se utilizó un cromatógrafo líquido Hewlett Packard (HP-serie 1100) equipado con bomba binaria, sistema de inyección manual Rheodyne®, detector UV diode-array y sistema computarizado para el registro y tratamiento de datos.
- Las determinaciones del índice de *p*-anisidina se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-vis Beckman, modelo DU-640, equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (ultravioleta).
- El registro del espectro de <sup>1</sup>H-RMN se realizó en un espectrómetro BRUKER Avance III, operando a 700 MHz, equipado con un sistema de cromatografía líquida Hitachi LaChrom Elite (con bomba cuaternaria modelo L-2130, sistema de inyección

automático modelo L-2200 y detector UV diode-array, modelo L-2455 con rango de detección entre 190 y 900nm), acoplado a un sistema de concentración mediante captura selectiva de picos a través de un equipo de extracción en fase sólida (EFS) modelo Prospekt-2 y de un accesorio para la criosonda de RMN CryoFit para trabajo "on flow".

## 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1. Método Rancimat

La medida de la estabilidad oxidativa de las matrices lipídicas se ha llevado a cabo en un equipo Rancimat®, donde una oxidación acelerada tiene lugar con saturación de aire y a una temperatura que dé lugar a que se alcance la oxidación secundaria de la matriz lipídica en un tiempo relativamente corto (menor de 24 h). La determinación está basada en la medida de la conductividad del agua por donde borbotean los productos de descomposición del aceite, principalmente ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOCS, 1998, actualmente norma ISO 6886:2016). El aparato consta de dos unidades interconectadas: Una contiene un bloque calefactor con capacidad para seis tubos en los que se coloca el aceite, que permite establecer temperaturas de oxidación comprendidas entre 50 y 150 °C, y las células de conductividad; la segunda unidad controla los parámetros, procesa las señales e imprime el registro. Un flujo controlado de aire se hace pasar por la muestra calentada y, a la vez que la oxida, arrastra los volátiles formados que se recogen en un frasco de borboteo que contiene agua desionizada (75 mL) y la célula que mide continuamente la conductividad del agua. Cuando se inicia la oxidación secundaria, se desprenden los primeros compuestos volátiles, mayoritariamente ácido fórmico, que son retenidos en el agua desionizada y da lugar a un aumento brusco de la conductividad. El punto de inflexión de la curva de conductividad determina el final del periodo de inducción y su valor se calcula por la intersección de la línea base con la tangente a la curva trazada cuando aumenta bruscamente la conductividad. El tiempo transcurrido desde el inicio hasta el punto de

inflexión es el periodo de inducción (PI) y se mide en horas.

*Procedimiento analítico:*

Se preparan disoluciones etanólicas de los distintos antioxidantes a ensayar. En cada tubo Rancimat se pesan 2,5 g de matriz oleosa y a continuación se añaden cantidades crecientes de dichas disoluciones. Los tubos se colocan en el bloque calefactor y se conectan al surtidor de aire con un flujo de 4 L/h, calentándose así el aceite y evaporándose el disolvente. Cuando se alcanza la temperatura establecida, se conectan las salidas de los tubos a los frascos borboteadores que contienen el agua y los electrodos. Se aumenta el flujo de aire a 20 L/h y se registra la conductividad de forma continua frente al tiempo. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

**4.5.2. Estimación de la vida útil de aceites**

Utilizando los resultados de la aplicación del método Rancimat a distintas temperaturas, se ha estimado la *vida útil* de aceites de oliva 1, girasol 2, soja 1, sachá inchi y pescado 2 (Tabla 1) de acuerdo con lo sugerido por Nakatani *et al.*, (2001) y Rodríguez *et al.*, (2015). Para ello, se ha partido de cuatro alícuotas de cada aceite sembradas con cuatro concentraciones distintas de ésteres de HTy (0, 100, 200 y 400 ppm). Cabe destacar que se han utilizado aceites comerciales dopados con unas cantidades del aceite con alta concentración de EGHTy dentro del intervalo 75-500 ppm que es el permitido para aditivos según Codex-Stan 192-1995 (FAO/WHO, 1995). Alícuotas de cada aceite con cada concentración de antioxidante se sometieron a la oxidación en el Rancimat® a cuatro temperaturas distintas (70, 80, 90, 100 °C). Para cada concentración de antioxidante, se determinan los periodos de inducción Rancimat a cada una de las temperaturas indicadas y con los resultados se realizan extrapolaciones logarítmicas a 25 °C, obteniéndose una estimación de la *vida útil* proporcionada por cada concentración de oxidante a cada tipo de aceite a 25 °C, que es la temperatura media que se considera habitual durante la comercialización de los aceites.

#### 4.5.3. Determinación de la composición en ácidos grasos

La composición en ácidos grasos fue determinada mediante cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, obtenidos por transesterificación de los triacilgliceroles a temperatura ambiente.

*Procedimiento analítico:*

1. Preparación de los ésteres metílicos. El método seguido está basado en la transesterificación de los triacilgliceroles disueltos en heptano por la acción de potasa metanólica a temperatura ambiente (IOC, 2001a), Se pesan 100 mg de muestra en un vial provisto de un tapón roscado, se añaden 2 mL de heptano y 250 µL de potasa metanólica 2 N. El vial se cierra y se agita vigorosamente durante 20 segundos. La mezcla se deja decantar durante unos minutos y 1 µL del sobrenadante se inyecta en el cromatógrafo de gases.

2. Análisis cromatográfico. El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo en columna capilar (60 m x 0,25 mm d.i.) impregnada con una película de fase cianopropilsilicona (SP-2380, Supelco) de 0,2 µm de espesor, utilizando detector de ionización de llama e hidrógeno como gas portador (COI, 2015)

El contenido en cada ácido graso ( $C_x$ ) expresado en porcentaje sobre la muestra total, viene dado por:

$$\% C_x = \frac{\text{Área } C_x}{\text{Área Total}}$$

#### 4.5.4. Índice de yodo. Método Wijs

El índice de yodo se define como los gramos de yodo absorbidos por 100 g de grasa o aceite. Constituye una medida del grado de insaturación (ISO 3961:2013)

*Procedimiento analítico:*

Se disuelve el aceite en una mezcla de ciclohexano-ácido acético glacial (1:1) y se hace reaccionar con el reactivo de Wijs (monocloruro de yodo en ácido acético). Tras un

tiempo determinado, se añaden 20 mL de yoduro potásico 100g/L y 150 mL de agua, y el yodo liberado se valora con tiosulfato sódico, utilizando almidón como indicador. La cantidad de aceite a pesar, el volumen de disolvente a añadir, y el tiempo que debe transcurrir hasta proceder a valorar, vienen definidos en una tabla en la norma atendiendo al valor de índice de yodo esperado. Se realiza un blanco aplicando el mismo procedimiento operativo, pero sin añadir muestra.

El índice de Yodo (IY) expresado en g por 100 g de grasa, viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Yodo (IY)} = \frac{12,69 \cdot C \cdot (v_1 - v_2)}{m}$$

Donde:

- C Concentración (moles/L) de la disolución de tiosulfato sódico
- V<sub>1</sub> Volumen consumido (mL) de tiosulfato en el ensayo en blanco
- V<sub>2</sub> Volumen consumido (mL) de tiosulfato en la muestra
- m Masa (g) de la muestra

#### **4.5.5. Índice de *p*-anisidina**

El índice de *p*-anisidina constituye una determinación del contenido en aldehídos insaturados de la materia grasa analizada, principalmente los 2-alquenes. Está basada en la medida de la absorbancia a 350 nm del producto obtenido por reacción entre los compuestos aldehídicos presentes en la muestra y la *p*-anisidina (ISO 6885: 2006).

*Procedimiento analítico:*

1. Preparación de la solución de *p*-anisidina. Se disuelven 0,25 g de *p*-anisidina en 100 mL de ácido acético glacial. Esta disolución no deberá tener una absorbancia superior a 0,2 medida a 350 nm en una cubeta de 1 cm de paso, frente a hexano.

2. Preparación de la muestra. Esta determinación se lleva a cabo sobre la muestra filtrada a través de papel de filtro.

3. Procedimiento. En un matraz aforado de 25 mL se pesan, con exactitud del miligramo, de 0,5 a 4,0 g de la muestra. La cantidad pesada debe ser la necesaria para

que la absorbancia medida en el espectrofotómetro esté comprendida entre 0,2 y 0,8. La muestra se disuelve en hexano y se enrasa con el mismo disolvente. Se mide en el espectrofotómetro la absorbancia de la solución ( $A_b$ ) a 350 nm, utilizando como comparación una cubeta pareada con el mismo disolvente. A continuación, por medio de una pipeta aforada, se toman 5 mL de la disolución de la muestra que se depositan en un tubo de ensayo y, en otro tubo de ensayo, se introducen 5 mL de disolvente. Con ayuda de una pipeta se agrega a cada tubo de ensayo 1 mL de la solución de *p*-anisidina y se agita. Después de transcurridos 10 minutos exactamente, se mide la absorbancia a 350 nm de la disolución contenida en el tubo de ensayo con la muestra ( $A_s$ ), utilizando como comparación el contenido del otro tubo de ensayo.

El índice de *p*-anisidina viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{Índice de } p\text{-anisidina} = \frac{25 \cdot (1,2 \cdot A_s - A_b)}{m}$$

Donde:

- $A_s$  Absorbancia de la disolución de materia grasa después de reaccionar con la *p*-anisidina
- $A_b$  Absorbancia de la disolución de la materia grasa
- $m$  Masa, en gramos, de la muestra pesada

#### **4.5.6. Índice de Peróxidos**

Se denomina índice de peróxidos (IP) a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de materia grasa ensayada (meqO<sub>2</sub>/kg), obtenidos a partir del yodo liberado en la oxidación de yoduro potásico, operando en las condiciones que se indica en la metodología propuesta en la norma indicada. Su determinación tiene lugar por volumetría de oxidación-reducción utilizando tiosulfato sódico como agente de valoración del yodo (EU, Reglamento CEE 2568/91).

*Procedimiento analítico:*

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL provisto de boca y tapón de vidrio esmerilado se pesa la muestra de aceite que se desea ensayar. El peso de la muestra ensayada se

selecciona según el índice de peróxidos aproximadamente esperado y que viene tabulado en la misma norma. Se agregan 10 mL de cloroformo, en el cual se disuelve rápidamente la grasa por agitación, y por último se añaden 15 mL de ácido acético glacial y 1 mL de solución acuosa saturada de yoduro potásico. Se cierra el matraz y se mantiene en agitación durante un minuto, conservándolo después en la oscuridad durante cinco minutos más. Al cabo de este tiempo se agregan 75 mL de agua, se agita vigorosamente y se valora el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico 0,002N, para aceites con índices inferiores o igual a 20, y de tiosulfato 0,01 N para aceites con índices más elevados.

El índice de peróxidos se calcula según la siguiente expresión:

$$IP = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{m}$$

Donde:

V Volumen de tiosulfato expresado en mL que son consumidos

N Normalidad de la disolución de tiosulfato

m Gramos de grasa tomados para la determinación

#### **4.5.7. Tocoferoles**

Para la determinación de los tocoferoles se siguió el método IUPAC 2.432 (actualizado como ISO 9936:2016) que está dirigido a la determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales y grasas. El aceite o la grasa se disuelve en hexano y la disolución se inyecta directamente en un equipo CLAE con detector de fluorescencia. Para su cuantificación se utilizan rectas de calibrado con cantidades conocidas del patrón puro.

*Procedimiento analítico:*

En un matraz aforado de 10 mL se pesan aproximadamente 0,1 g de muestra, con la exactitud del miligramo, se disuelve en hexano y se enrasa. Se inyectan 20 µL de esta disolución en el cromatógrafo líquido operado en régimen isocrático bajo las siguientes condiciones:

Columna:	Sílice (25 cm x 4 mm d.i.) demicropartículas de 5 µm de tamaño medio (Lichrospher 100, Lichrocart®)
Bomba:	Perkin-Elmer (Serie 400)
Fase móvil:	Hexano/Isopropanol(99:1, v/v)
Detector:	Fluorescencia (Shimadzu RF-535) $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$ , $\lambda_{em} = 330 \text{ nm}$
Inyección:	Válvula Reodhyne (loop 20 µL)
Flujo:	1 mL/min
T análisis:	15 minutos

*Realización de las rectas de calibrado:*

En un matraz aforado de 100 mL, se pesan 10 mg de tocoferol, con exactitud del miligramo, y se enrasa con hexano. A continuación, 10 mL de esta disolución se llevan a sequedad y se redisuelven en 10 mL de metanol. Esta disolución se introduce en una cubeta de espectrofotometría y se determina la absorbancia a 292 nm. La concentración exacta de la disolución de tocoferol así preparada se determina mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A_{292}}{0,0076}$$

Donde:

C Concentración de tocoferol (µg/mL)

$A_{292}$  Absorbancia a 292 nm

A continuación, se preparan soluciones diluidas a partir de esta disolución madre que se inyectan en el cromatógrafo líquido antes de analizar cada tanda de muestras. Para el cálculo de la concentración en µmol/kg, se toman los valores de la solución patrón con concentración similar a la de la muestra y se aplica la fórmula siguiente:

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_p \cdot V_s \cdot 10^6}{A_p \cdot P_x \cdot 430,7}$$

Donde:

$C_x$  Concentración de tocoferol en la muestra (µmol/kg)

$C_p$  Concentración de patrón (µg/mL)

- Ax Área de la muestra
- Ap Área del patrón
- Vs Volumen de la solución de la muestra (mL)
- Px Peso de la muestra en mg

#### 4.6. OXIDACIÓN EN SISTEMA *OPEN CUP* A BAJA TEMPERATURA

Para los estudios de oxidación se han utilizado aceites refinados de girasol, soja, pescado y matrices de aceite de oliva. Las muestras dopadas se prepararon por adición de cantidades adecuadas de disoluciones de AEHTy y AcHTy en metanol y de tocoferoles en hexano. Los disolventes se evaporaron a vacío en un rotavapor a temperatura ambiente. Alícuotas (2,5 g) de cada lote se metieron en una estufa de aire forzado en viales de vidrio de 3,5 mL abiertos, y se mantuvieron en la oscuridad a  $50$  o  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  según los casos. Los recipientes se fueron tomando a diferentes intervalos de tiempo para ser analizados.

En concreto, los ensayos con éteres se han realizado a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ , utilizando los aceites refinados girasol 1, soja 1 y pescado 1 (ver tabla 1, apartado 4.1.1). Los ensayos con AcHTy se han realizado a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , utilizando la matriz purificada de aceite de oliva 2 (ver tabla 2, apartado 4.1.2).

#### 4.7. OXIDACIÓN A ALTA TEMPERATURA EN EL EQUIPO RANCIMAT®

Para el estudio de la capacidad antioxidante de los éteres, se ha procedido de dos maneras:

- A) Matrices lipídicas purificadas de aceite girasol, soja y pescado se han sembrado a concentraciones de 0,5 mmol/kg de HTy libre, ésteres de hidroxitirosilo (acetato y octanoato) y éteres de hidroxitirosilo (etilo y octilo). Las muestras con matrices de

girasol y soja se sometieron a una oxidación acelerada en un equipo Rancimat® a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las muestras conteniendo aceite de pescado se sometieron a temperaturas de  $80 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  dado que a  $100^\circ\text{C}$  se alteraban en un corto período de tiempo ( $<1\text{h}$ ), lo que hacía imposible determinar diferencias entre los tratamientos.

B) Se preparó un conjunto de muestras fortificando las matrices purificadas de aceite de girasol, soja y pescado con cantidades crecientes de etil y octil éteres, con y sin adición de 600 ppm (1,39 mmol/kg) de  $\alpha$ -tocoferol. Las muestras se sometieron a la acción del aire a las temperaturas indicadas en el epígrafe 4.7.A. Estas muestras se han comparado con matrices fortificadas solamente con  $\alpha$ -tocoferol.

Para el estudio de la capacidad antioxidante de los ésteres se preparó un conjunto de muestras fortificando las matrices purificadas de aceite de oliva, girasol, soja, sachá inchi y pescado con cantidades crecientes de aceites que contenían alta concentración de antioxidante. Las muestras con matrices de oliva, girasol, soja y sachá inchi se sometieron a una oxidación acelerada en un equipo Rancimat a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las muestras conteniendo aceite de pescado se sometieron a temperaturas de  $80 \pm 1^\circ\text{C}$  por las razones expuestas anteriormente (4.7.A) y se compararon con aceite de sachá inchi sometido también a  $80 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para la estimación de la *vida útil* de aceites con distintas concentraciones de EGHTy + HTy se utilizaron aceites refinados comerciales de oliva, girasol, soja, sachá inchi y pescado y se determinaron los periodos de inducción a diferentes temperaturas entre 50 y  $120^\circ\text{C}$  según el tipo de aceite y la concentración de antioxidante.

Para estudiar la interacción de los ésteres con el  $\alpha$ -tocoferol se utilizó aceite de girasol alto oleico sembrado con diferentes cantidades de AcHTy.

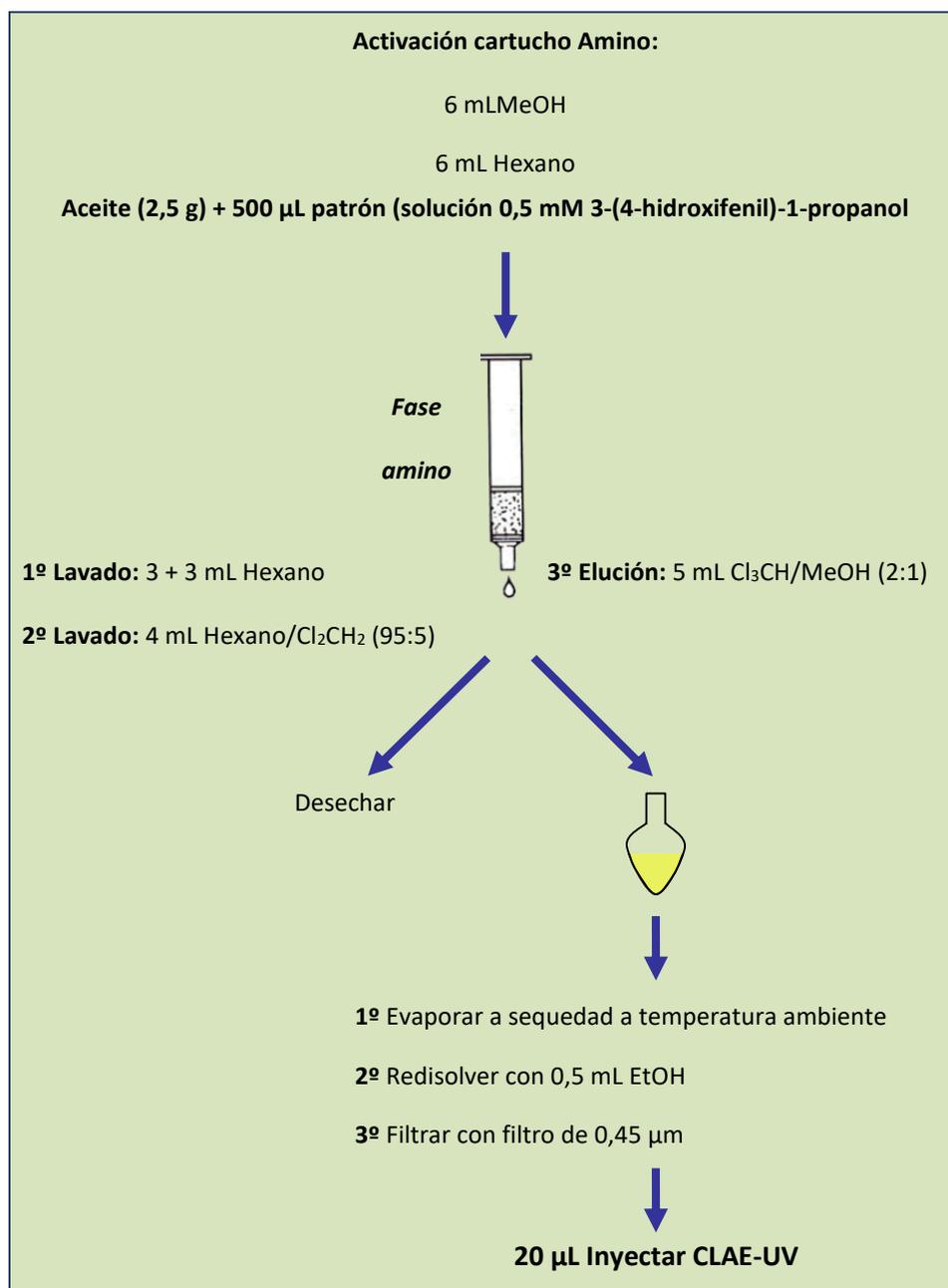
## 4.8. DETERMINACIÓN DE FENOLES ANTIOXIDANTES

### 4.8.1. Alquil éteres de hidroxitirosilo (AEHTy). Aislamiento mediante EFS-NH<sub>2</sub> y análisis por CLAE-UV

Para la determinación de la evolución de AEHTy en aceites comestibles sometidos a sistema de oxidación *open cup*, se ha realizado un aislamiento previo del extracto fenólico mediante extracción en fase sólida con cartuchos amino y análisis posterior mediante CLAE con detector UV. El procedimiento analítico para la determinación de AEHTy se describe a continuación (Figura 7).

#### *Procedimiento:*

Se pesan 2,5 g de aceite, con exactitud del miligramo, en un matraz cónico de 25 mL, se añaden 0,5 mL de la disolución patrón de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol (0,5 mM) y se evapora el disolvente en rotavapor a presión reducida. El residuo se disuelve en 6 mL de hexano y la solución se vierte en el cartucho de EFS-NH<sub>2</sub>, previamente activado con 6 mL de metanol y 6 mL de hexano. El matraz que contenía la muestra se lava con dos porciones de 3 mL de hexano, que también se vierten en el cartucho, limpiando así de aquellos componentes más apolares que hayan quedado retenidos. Una vez que la solución de muestra y los lavados se han introducido en el cartucho con la ayuda de vacío, el matraz se lava con 4 mL de la mezcla hexano/diclorometano 95:5 (v/v) y con dos porciones de 6 mL de hexano/éter etílico 70:30 (v/v). Con estos lavados se eluyen los compuestos más apolares tales como triacilgliceroles oxidados, esteroides y diacilgliceroles que se descartan. A continuación, se coloca un matraz de 25 mL y el cartucho se eluye con 5 mL de cloroformo/metanol 2:1 (v/v). La solución obtenida, que contiene los éteres de hidroxitirosilo, se evapora en rotavapor a temperatura ambiente hasta sequedad. El residuo se disuelve en 0,5 mL de etanol. Se filtra mediante un filtro de 0,45 µm y se inyectan 20 µL en el cromatógrafo de líquidos.

**Figura 7**

Esquema de la extracción de los éteres de hidroxitiroso (AEHTy) por EFS-NH<sub>2</sub>, en aceites refinados comestibles

### *Análisis CLAE-UV*

La cuantificación se realiza mediante CLAE utilizando como fase móvil una mezcla binaria de agua con 0,5 % de ácido fosfórico y metanol, aplicando gradiente para obtener una buena separación de los éteres de etilo y octilo. La disolución del residuo conteniendo los éteres se inyecta en el sistema CLAE bajo las condiciones siguientes:

Columna:	Fase inversa (C18) Lichrospher 100RP-18 (4,0 mm de d.i. x 250 mm) con micropartícula de 5 µm (Merck)
Fase móvil:	A: agua/ácido fosfórico (99,5:0,5, v/v) B: metanol
Detector:	UV diode-array
Longitud de onda:	280 nm
Inyección:	Válvula Rheodyne® con loop de 20 µL
Flujo:	0,8 mL/min
Temperatura:	30 °C
Tiempo de análisis:	35 min
Gradiente elución:	Se describe en la Tabla 3

**Tabla 3**

Gradiente de elución de la CLAE.  
A: agua/ácido fosfórico (99,5:0,5, v/v)  
B: metanol

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
5	50	50
10	25	75
15	20	80
20	5	95
25	0	100

La cuantificación de los éteres de hidroxitirosilo se ha realizado a 280 nm utilizando el 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol como patrón interno. Para el cálculo de las rectas de calibrado, se prepararon soluciones de cada uno de los éteres en etanol a las concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5 y 1,0 mM, conteniendo cada una el patrón interno a una concentración de 0,5 mM.

Se inyectan en el cromatógrafo 20 µL de cada solución y se miden las áreas de los picos correspondientes a los éteres ( $A_x$ ) y al patrón ( $A_{Pi}$ ). A continuación, para cada éter, se representa la relación  $A_x/A_{Pi}$  en función de las concentraciones mM y se calcula la pendiente de la recta (b).

La concentración de un éter en el aceite ( $C_x$ ) en mmol/kg se calcula aplicando la fórmula siguiente:

$$C_x(\text{mM}) = \frac{A_x \cdot b_x \cdot 0,5}{A_{pi} \cdot P_m}$$

Donde:

$C_x$  Concentración de éter de hidroxitirosilo (mmol/kg)

$A_x$  Área del pico cromatográfico del éter de hidroxitirosilo

$b_x$  Pendiente de la recta de calibración del éter

$A_{pi}$  Área del pico cromatográfico del patrón interno (3-(4-hidroxifenil)-1-propanol)

$P_m$  Peso de la muestra en gramos

Para el cálculo de las recuperaciones, matrices de aceite de girasol conteniendo 0,2, 0,5, 1,0, y 5 mmol/kg de los éteres se analizaron por triplicado siguiendo el método antes citado. Todos los resultados se expresan con el valor medio  $\pm$  su desviación estándar.

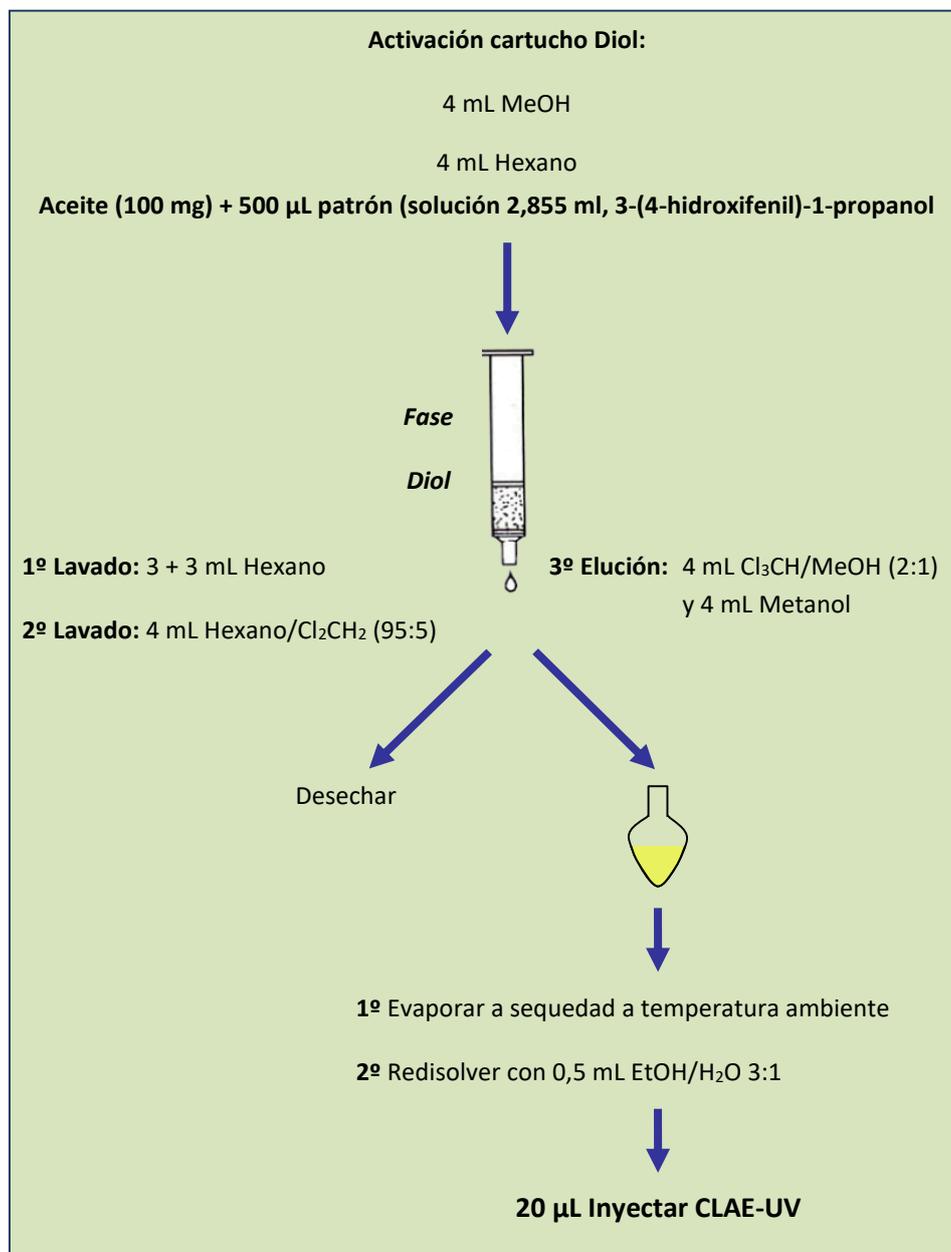
#### **4.8.2. Ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy) en matrices y aceites que contengan alta concentración de fenoles. Aislamiento mediante EFS-diol y análisis por CLAE-UV**

Para la determinación de EGHTy en aceites con alta concentración se siguió el método de aislamiento por EFS-diol y subsiguiente análisis por CLAE-UV descrito para los ésteres de HTy (Romero-Segura, 2010) utilizando una menor cantidad de muestra de aceite (Figura 8).

##### *Procedimiento:*

Se pesan  $100 \pm 0,1$  mg de muestra, en un matraz cónico de 25 mL, se añaden 0,5 mL de la disolución patrón de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol (2,855 mg/ml) y se evapora el disolvente en rotavapor a presión reducida. El residuo se disuelve en 1mL de hexano y la solución se vierte en el cartucho de EFS-diol, previamente activado con 4 mL de metanol y 4 mL de hexano. El matraz que contenía la muestra se lava con dos porciones

de 1 mL de hexano, que también se vierten en el cartucho.



**Figura 8**

Esquema de la extracción de los ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy) por EFS-diol, en matrices y aceites

Una vez que la solución de muestra y los lavados se han introducido en el cartucho con la ayuda de vacío, el matraz se lava con 6 mL de hexano y a continuación con 4 mL de hexano/diclorometano 95:5 (v/v), desechándose los eluidos. A continuación, se coloca un matraz de 25 mL y el cartucho se eluye con 4 mL de cloroformo/metanol 2:1

(v/v) y 4 mL de metanol. La solución obtenida que contiene los EGHTy se evapora en rotavapor a temperatura ambiente hasta sequedad. El residuo se disuelve en 0,5 mL de etanol/H<sub>2</sub>O (3:1). Se filtra mediante un filtro de 0,45 µm y se inyectan 20 µL en el cromatógrafo de líquidos.

#### Análisis CLAE-UV:

La disolución del residuo conteniendo los ésteres de hidroxitirosilo se inyecta en el sistema CLAE bajo las condiciones siguientes:

Columna:	Fase inversa (C18) Lichrospher 100RP-18 (4,0 mm de d.i. x 250 mm) con micropartícula de 5 µm (Merck)
Fase móvil:	A: agua/ácido fosfórico (99,5:0,5, v/v) B: Acetonitrilo/metanol (1:1, v/v)
Detector:	UV <i>diode-array</i>
Longitud de onda:	280 nm
Inyección:	Válvula Rheodyne® con loop de 20 µL
Flujo:	1mL/min
Temperatura:	30 °C
Tiempo de análisis:	35 min
Gradiente elución:	Se describe en la Tabla 4

**Tabla 4**

Gradiente de elución de la CLAE.  
A: agua/ácido fosfórico (99,5: 0,5, v/v)  
B: acetonitrilo/metanol (1:1, v/v)

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
5	75	25
10	20	80
15	5	95
20	0	100

La concentración de un éster en el aceite (C<sub>x</sub>) en mmol/kg se calcula aplicando la fórmula siguiente:

$$C_x = \frac{F_R \cdot P_{IS} \cdot A_x \cdot 10^6}{A_{IS} \cdot P_a \cdot PM_x}$$

Donde:

$C_x$  Concentración de la sustancia problema (mmol/kg)

$F_R$  Factor de respuesta de los ésteres:  $1,48 \pm 0,05$

$P_{IS}$  Peso del patrón interno añadido (mg)

$A_x$  Área del pico cromatográfico de la sustancia problema

$A_{IS}$  Área del pico cromatográfico del patrón interno

$P_a$  Peso del aceite

$PM_x$  Peso molecular sustancia problema

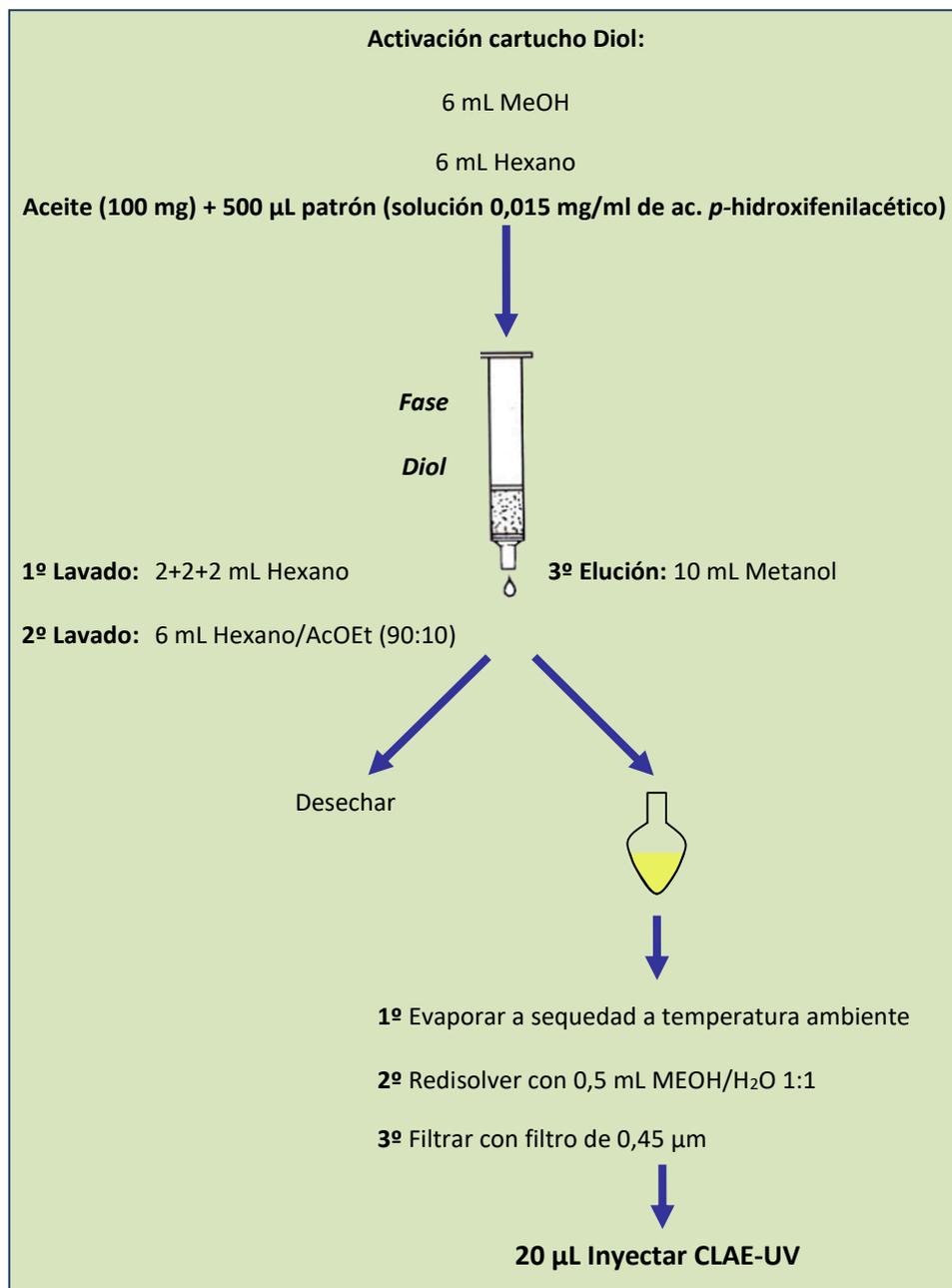
#### **4.8.3. Acetato de hidroxitirosilo (AcHTy) en matrices purificadas y en aceites comerciales. Aislamiento mediante EFS-diol y análisis CLAE-UV**

Para la determinación de AcHTy en matrices purificadas y en aceites comestibles se ha realizado un aislamiento previo del extracto fenólico mediante EFS con cartuchos diol y análisis posterior mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta. El procedimiento analítico para la determinación de AcHTy se describe a continuación (Figura 9).

##### *Procedimiento:*

Se pesan 100 mg de muestra (con exactitud del miligramo) en un matraz con forma de corazón de 25 mL, se añaden 500  $\mu$ L de disolución patrón de ácido *p*-hidroxifenilacético en metanol (0,015 mg/mL) y se evapora el disolvente en rotavapor a presión reducida. El residuo se disuelve en 1 mL de hexano y la solución se vierte en la columna de EFS-diol, previamente activada con 6 mL de metanol y 6 mL de hexano. El matraz que contenía la muestra se lava con tres porciones de 2 mL de hexano que se vierten también en la columna. Una vez que la solución de muestra y los lavados se han introducido en la columna con la ayuda de vacío, el matraz se lava con 6 mL de la mezcla hexano/acetato de etilo 90:10 y los lavados se utilizan para eluir la columna. A continuación, se recoge la siguiente fracción eluyendo con 10 mL de metanol. La fracción obtenida, que contiene los fenoles, se evapora en rotavapor hasta sequedad. El residuo

se disuelve en 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla metanol/agua (1:1) y se inyectan 20  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de líquidos.



**Figura 9**

Esquema de la extracción del acetato de hidroxitirosilo (AcHTy) por EFS-diol en matrices

**Análisis CLAE-UV:**

La disolución del residuo se inyecta en el sistema CLAE bajo las condiciones siguientes:

Columna:	Fase inversa (C18) Lichrospher 100RP-18 (4,0 mm d.i. x 250mm) con micropartícula de 5 µm (Merck)
Fase móvil:	A: agua/ácido fosfórico (99,5:0,5, v/v) B: metanol/acetonitrilo (1:1, v/v)
Detector:	UV <i>diode-array</i>
Longitud de onda:	280 nm
Inyección:	Válvula Rheodyne® con loop de 20 µL
Flujo:	1 mL/min
Temperatura:	30 °C
Tiempo de análisis:	35 min
Gradiente de elución	Se describe en la Tabla 5

**Tabla 5**

Gradiente de elución de la CLAE.  
A: agua/ácido fosfórico (99,5: 0,5, v/v)  
B: acetonitrilo/metanol (1:1, v/v)

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
25	70	30
30	0	100
35	95	5
20	0	100

La cuantificación del AcHTy se ha realizado a 280 nm utilizando el ácido *p*-hidroxifenilacético como patrón interno. El factor de respuesta del acetato de hidroxitirosilo se ha calculado a partir de los análisis por cuadruplicado de disoluciones preparadas conteniendo ácido *p*-hidroxifenilacético y AcHTy en el mismo rango de concentraciones en que aparecen en las muestras a medir, y se define por la fórmula:

$$F_R = \frac{(P_x \cdot A_{PI})}{(P_{PI} \cdot A_x)}$$

Donde:

$F_R$  Factor de respuesta respecto al patrón utilizado

$P_X$  Peso de acetato de hidroxitirosilo (mg)

$P_{PI}$  Peso del patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético (mg)

$A_X$  Área del pico cromatográfico del acetato de hidroxitirosilo

$A_{PI}$  Área del pico cromatográfico del patrón ácido *p*-hidroxifenilacético

El resultado, expresado en  $\mu\text{moles/kg}$  de aceite, se obtiene aplicando la ecuación siguiente:

$$C_x = \frac{(F_R \cdot P_{IS} \cdot A_x \cdot 10^6)}{(196 \cdot A_{IS} \cdot P_m)}$$

Donde:

$C_X$  Concentración de acetato de hidroxitirosilo ( $\mu\text{moles/kg}$ )

$P_{IS}$  Peso del patrón interno añadido ácido *p*-hidroxifenilacético (mg)

$A_x$  Área del pico cromatográfico del acetato de hidroxitirosilo

$A_{IS}$  Área del pico cromatográfico del patrón interno ác. *p*-hidroxifenilacético

$F_R$  Factor de respuesta del acetato de hidroxitirosilo ( $F_{R0,60}$ )

$P_m$  Peso de la matriz (g)

Para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método, alícuotas (100 mg) de la matriz glicerídica se sembraron con volúmenes conocidos de una solución de AcHTy.

Las muestras se evaporaron en el rotavapor y los residuos se analizaron siguiendo el método antes descrito. Cada concentración ensayada se analizó por triplicado.

#### 4.9. PREPARACIÓN DE ACEITES CON ALTA CONCENTRACIÓN DE EGHTy POR REACCIÓN *IN SITU*

El método llevado a cabo para la obtención de aceites funcionalizados conteniendo ésteres grasos de hidroxitirosilo, se basa en la reacción directa de los aceites comestibles con HTy, utilizando la lipasa procedente de *Candida antarctica* como catalizador (Romero-Segura, 2010).

##### *Procedimiento analítico:*

En un tubo de vidrio de 6x2 cm se pesan 300 mg de Celite® 545 y se mezcla bien con  $385 \pm 1$  mg de HTy con la ayuda de una espátula se añade más Celite hasta que la mezcla quede en forma de polvo suelto. A continuación se añaden  $7,5 \pm 0,1$  g de la muestra de aceite y se agita con agitador magnético para homogeneizar. Finalmente, manteniendo la agitación, se añaden 250 mg de la enzima *Candida antarctica*, se inicia la calefacción y a los 30 min se toma la primera muestra. A partir de entonces se muestrea cada hora hasta pasadas 8 horas, dejándose a continuación con agitación hasta las 24 horas, cuando se efectúa el último desmuestre. Las muestras tomadas a las horas indicadas (aproximadamente 150  $\mu$ L) son centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm. La parte superior es un aceite transparente, libre de Celita y enzima, que es pesado con exactitud del mg para su posterior análisis.

Los ensayos de síntesis se realizaron con aceites de oliva, girasol, soja, sachá inchi y pescado. Para la optimización del proceso de obtención de ésteres se realizaron diversas experiencias variando las condiciones de temperatura, enzima, y relación HTy/aceite. En la Tabla 6 se resumen los ensayos llevados a cabo.



## **4.10. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES CON ALTA CONCENTRACIÓN DE EGHTy**

Las matrices obtenidas de aceites purificados conteniendo altas concentraciones de EGHTy y restos de HTy libre, han sido caracterizadas mediante su composición en ácidos grasos, el perfil de los ésteres grasos de hidroxitirosilo y la composición de la fracción glicerídica junto con la concentración de HTy y EGHTy.

### **4.10.1. Composición en ácidos grasos mediante CG**

Se determinaron las composiciones en ácidos grasos de los aceites de oliva 1, girasol 2, soja 2, sachá inchi y pescado 2, tanto antes como después de la funcionalización, mediante el análisis por CG de los ésteres metílicos obtenidos por transesterificación de la muestra de aceite con potasa metanólica a temperatura ambiente (ver apartado 4.5.3).

### **4.10.2. Perfil de EGHTy mediante CLAE-UV**

El perfil de HTy y EGHTy se obtiene aplicando el procedimiento de determinación de los ésteres de hidroxitirosilo, descrito en el apartado 4.8.2, consistente en aislamiento por EFS en fase diol y análisis por CLAE-UV.

### **4.10.3. Composición de la fracción glicerídica y concentración de HTy y EGHTy**

La composición en tri-, di- y mono-acilgliceroles, ácidos grasos libres, HTy y EGHTy se puede obtener por análisis directo del aceite que contiene alta concentración de ésteres de hidroxitirosilo, mediante CLAE de exclusión molecular o cromatografía de gases.

#### **4.10.3.1. Cromatografía líquida de exclusión molecular del aceite**

La cromatografía de exclusión molecular es un tipo de cromatografía líquida donde la separación de los componentes tiene lugar en función del tamaño de las moléculas, obteniéndose cromatogramas con un perfil de picos que corresponden a la abundancia de las sustancias en una secuencia de mayor a menor tamaño molecular. Como detector

se suele usar el de índice de refracción para detectar sustancias que no presentan absorción UV-vis como los glicéridos (IUPAC 2.507, 1987).

Se toma una porción de muestra y se disuelve en tetrahidrofurano. Se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de esta disolución en el cromatógrafo líquido operado en régimen isocrático bajo las siguientes condiciones:

Columna: Pl gel rellena de micropartículas de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño medio y 100 Å de tamaño de poro, 300 mm long. x 7,5 mm d.i, (Agilent, Ref. PL 1110-6520)

Fase móvil: Tetrahidrofurano

Bomba: Perkin-Elmer (Serie 400)

Detector: Refractómetro a 20 °C (ABBE, Modelo 98, Hilger& Watts Ltd.)

Inyección: Válvula Reodhyne® (loop 20  $\mu\text{L}$ )

Flujo: 1 mL/min

$t_{\text{análisis}}$ : 15 minutos

El contenido en cada compuesto ( $C_x$ ) expresado en porcentaje sobre la muestra total, viene dado por:

$$\% C_x = \frac{\text{Área } C_x}{\text{Área Total}}$$

#### 4.10.3.2. Cromatografía de gases del aceite

El análisis de aceite que contiene alta concentración de EGHTy aplicando un método de análisis de compuestos glicéricos (IOC, 2006), permite determinar el contenido de ácidos grasos libres, mono-, di- y tri-acilgliceroles, así como HTy y EGHTy. El aceite se trata con un reactivo silanzante y se inyecta directamente en el cromatógrafo de gases mediante inyección *on column*.

Se pesan 100 mg de muestra y se disuelven en 1 mL de éter. Se toman 100  $\mu\text{L}$  de la solución y se evaporan con corriente de nitrógeno. Al residuo se le añaden 200  $\mu\text{L}$  de reactivo silanzante y se deja reaccionar unos 20 minutos. Se añaden 5 mL de *n*-hexano y se inyecta 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo mediante el sistema *on column*.

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo en columna capilar (12 m x 0,32 mm d.i.) impregnada con una película de fase de 5%-fenilmetilsilicona (HP-5, Agilent) de 0,2 µm de espesor, 0,25 micras utilizando detector de ionización de llama e hidrógeno como gas portador. La temperatura del horno se programa tal como se indica en el método.

El contenido en cada compuesto ( $C_x$ ) expresado en porcentaje sobre la muestra total, viene dado por:

$$\% C_x = \frac{\text{Área } C_x}{\text{Área Total}}$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. ÉTERES DE HIDROXITIROSILO (AEHTy)

#### 5.1.1. Influencia de la matriz y de la longitud de la cadena alquílica en la actividad antioxidante de los AEHTy

Para estudiar el efecto de la insaturación, matrices purificadas de aceites de girasol, soja y pescado se sembraron con concentraciones 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo (**5**) y se compararon con los homólogos acetato y octanoato de hidroxitirosilo (**4**), con hidroxitirosol libre (**1**) y con las matrices sin sembrar. Las muestras se sometieron a oxidación a alta temperatura en un equipo Rancimat®. Como se esperaba, en cada tipo de matriz sometida a oxidación, todos los derivados de HTy mostraron una actividad antioxidante parecida por mmol de sustancia (Tabla 7) ya que la actividad antioxidante se debe a la presencia del grupo *orto*-difenoil en todos ellos, aunque los éteres presentaron una actividad ligeramente mayor que los ésteres homólogos. Asimismo, los derivados con cadena alquílica C2 mostraron una actividad ligeramente mayor que los de cadena C8, lo cual está de acuerdo con la *paradoja polar* que postula que en matrices apolares son más activos los antioxidantes más polares (Porter *et al.*, 1989).

**Tabla 7**

Periodos de inducción (horas) de matrices glicerídicas sembradas con 0,5 mmol/kg de HTy y sus derivados, obtenidos por el método Rancimat\*

Matrices purificadas	Girasol	Soja	Pescado	Pescado
Temperatura	100 °C	100 °C	80 °C	50 °C
Sin fenol	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,1	6,4 ± 0,1
Hidroxitirosol	13,1 ± 0,3	9,4 ± 0,2	3,1 ± 0,1	36,0 ± 0,4
Acetato de HTy	12,1 ± 0,2	8,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	35,2 ± 0,4
Octanoato de HTy	11,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	35,5 ± 0,1
Etil Éter de HTy	14,3 ± 0,3	10,0 ± 0,1	3,6 ± 0,1	41,7 ± 0,4
Octil Éter de HTy	13,5 ± 0,2	8,9 ± 0,1	3,4 ± 0,1	39,1 ± 0,3

\* Los datos están expresados como la media de las medidas y su desviación estándar (n=3)

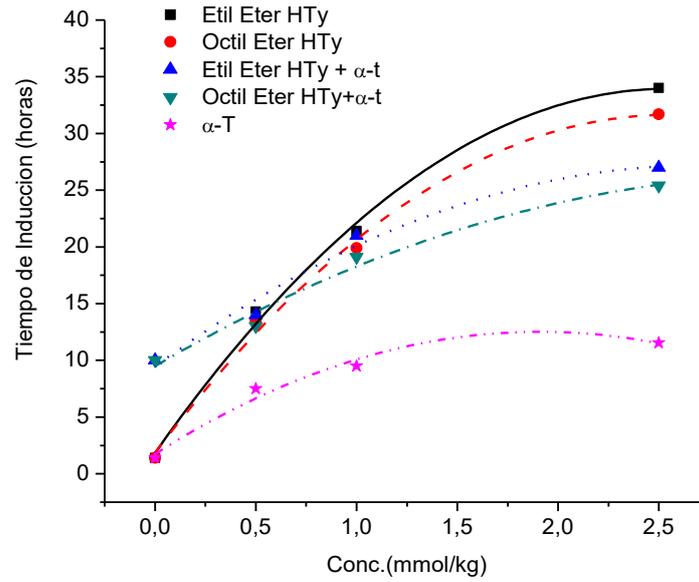
### **5.1.2. Influencia de la presencia de $\alpha$ -tocoferol en la actividad de los AEHTy**

Matrices de aceites de girasol 1, soja 1 y pescado 1 se sembraron con cantidades crecientes de etil y octil éteres de hidroxitirosilo y algunas alícuotas de éstas se enriquecieron además con 600 ppm de  $\alpha$ -tocoferol (1,39 mmol/kg). Los resultados se compararon con los de matrices que contenían sólo  $\alpha$ -tocoferol.

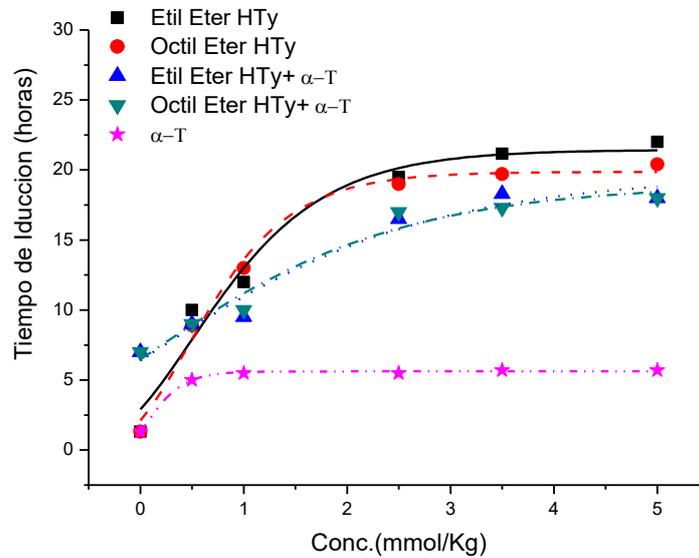
Se puede observar (Figuras 10–12) que el efecto antioxidante de los AEHTy tiene un comportamiento sigmoideal con el incremento de la concentración tal y como se había observado previamente en aceite de girasol (Pereira-Caro *et al.*, 2009). Sin embargo, la máxima actividad antioxidante se alcanza a diferente concentración en cada matriz. Así, los valores son 2,5 mmol/kg en girasol, 4 mmol/kg en soja y 15 mmol/kg en pescado. Estos resultados indican que el efecto antioxidante no solo depende del grado de insaturación global de la matriz glicerídica sino que también está influenciado por la naturaleza de los ácidos grasos. En todos los casos la actividad de los AEHTy es mayor que la del  $\alpha$ -tocoferol a cualquier concentración, confirmándose también en este ensayo una capacidad antioxidante ligeramente mayor en los éteres de cadena alquílica más corta.

Como los aceites vegetales refinados disponibles comercialmente contienen tocoferoles, también se ha estudiado su efecto sobre la actividad antioxidante de los AEHTy en matrices sembradas con 600 ppm (1,39 mmol/kg) de  $\alpha$ -tocoferol junto con los fenoles. Los resultados (Figuras 10–12) muestran efectos opuestos dependiendo de la concentración de fenol. Así, se observa un incremento de estabilidad a bajas concentraciones de fenol, mientras que a altas concentraciones encontramos que hay un descenso, en comparación con el fenol solo. Efectos similares se observaron en aceite de oliva sembrado con HTy (Mateos *et al.*, 2003).

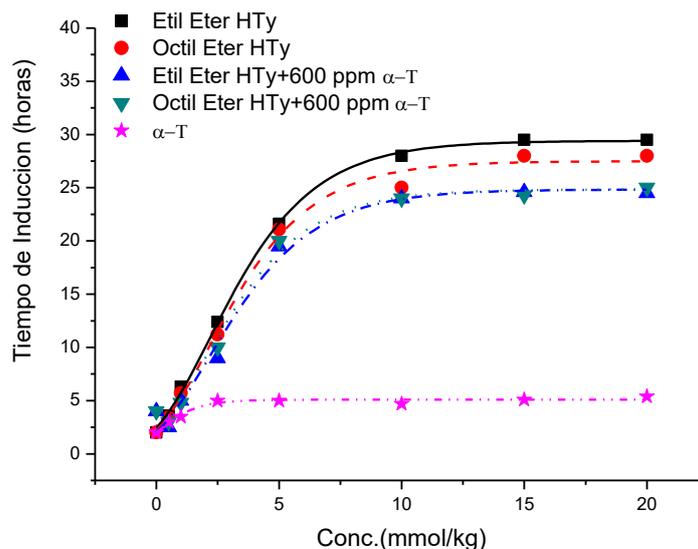
El efecto negativo del  $\alpha$ -tocoferol ocurre a partir de aproximadamente 0,7, 0,7 y 1,0 mmol/kg de fenol para aceites de girasol, soja y pescado, respectivamente. En consecuencia, aunque el efecto antioxidante de la adición de AEHTy a aceites comerciales es siempre positivo, su magnitud dependerá de la concentración relativa de ambos antioxidantes y del nivel de insaturación de la matriz lipídica.

**Figura 10**

Periodos de inducción (horas) de matrices de aceite de girasol sembradas con alquil éteres de hidroxitirosilo, con y sin la adición de 600 ppm de  $\alpha$ -tocoferol, determinados por método Rancimat a 100 °C

**Figura 11**

Periodos de inducción (horas) de matrices de aceite de soja sembradas con alquil éteres de hidroxitirosilo, con y sin la adición de 600 ppm de  $\alpha$ -tocoferol, determinados por método Rancimat a 100 °C



**Figura 12**

Periodos de inducción (horas) de matrices de aceite de pescado sembradas con alquil éteres de hidroxitirosilo, con y sin 600 ppm  $\alpha$ -tocoferol, determinados por método Rancimat a 80 °C

### 5.1.3. Oxidación por el sistema *open cup* de aceites comerciales de diferente grado de insaturación sembrados con éteres de hidroxitirosilo

Aceites refinados comerciales de girasol 1 y soja 1 (Tabla 1) han sido sembrados con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo y se han sometido a la oxidación en recipientes abiertos *open cup* a 50 °C, al abrigo de la luz y se ha seguido la evolución de diversos parámetros hasta alcanzar el enranciamiento. El aceite de girasol contiene 869 y 44 ppm de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferoles, respectivamente y el de soja 145, 842, y 252 ppm de  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -tocoferoles. Por otra parte, el aceite de pescado (*Menhaden*) se ha sembrado con 1 mmol/kg de etil éter y con 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -T.

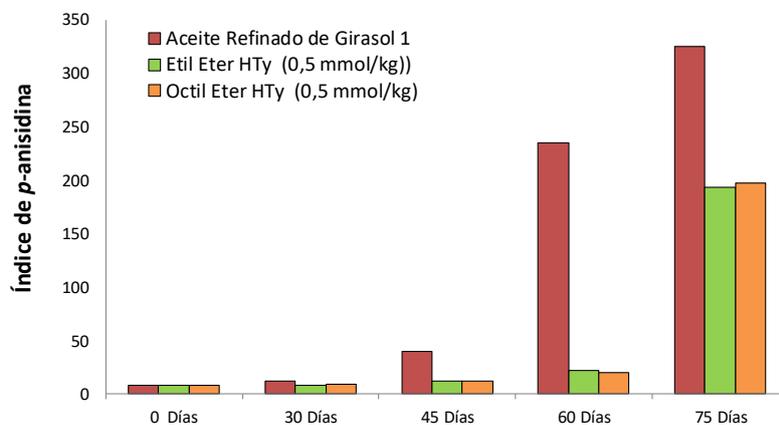
#### 5.1.3.1. Evolución de los parámetros de calidad en aceites sembrados con AEHTy

Para evaluar el periodo de inducción de los aceites se ha empleado el índice de *p*-anisidina, que aumenta rápidamente cuando se producen 2-alquenas como consecuencia del inicio de la oxidación secundaria de los ácidos grasos y el consiguiente enranciamiento.

En el aceite refinado de girasol se observa un ligero incremento del índice de *p*-anisidina a los 45 días de almacenamiento y una acusada subida a los 60 días (Figura 13).

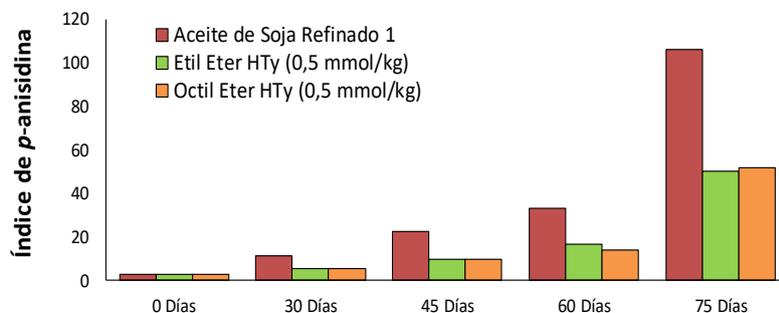
Sin embargo, la presencia de 0,5 mmol/kg de AEHTy mantiene un bajo nivel de oxidación hasta los 60 días y aumenta a los 75 días.

Igualmente, en el aceite de soja, el ligero incremento del índice de *p*-anisidina se observa hasta los 60 días de almacenamiento y la fuerte subida ocurre a los 75 días, mientras que la presencia de 0,5 mmol/kg de AEHTy mantiene el bajo nivel de oxidación hasta los 60 días (Figura 14). Los valores del índice de *p*-anisidina más bajos en el aceite de soja que en el aceite de girasol se podrían atribuir a la mayor concentración de tocoferoles y a la mayor actividad de las formas  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol (Mukai *et al.*, 2005). El comportamiento del etil y octil éteres de hidroxitirosilo fue similar en ambos aceites.



**Figura 13**

Evolución del índice de *p*-anisidina de aceite refinado de girasol (conteniendo 869 ppm de  $\alpha$ - y 44 ppm de  $\gamma$ -tocoferol) sembrado con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo, mantenidos a 50 °C en oxidación *open cup*

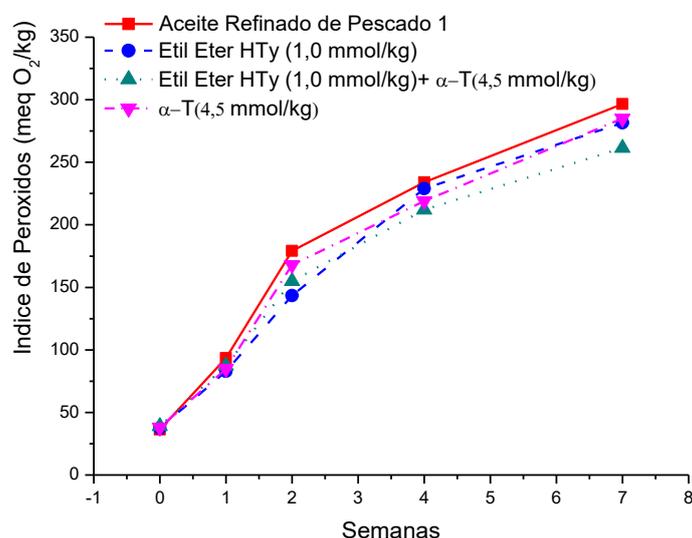


**Figura 14**

Evolución del índice de *p*-anisidina de aceite refinado de soja (conteniendo 842 ppm de  $\gamma$ -, 252 ppm de  $\delta$ - y 145 ppm de  $\alpha$ -tocoferol) sembrado con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo, mantenidos a 50 °C en oxidación *open cup*.

De la Figura 12 se deduce que son necesarias altas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol (4,5 mmol/kg) para producir un apreciable efecto antioxidante en aceites de pescado, similar al que origina 1 mmol/kg de éteres de hidroxitirosilo. Por consiguiente, aceite refinado de pescado sembrado con estos antioxidantes y la mezcla de ambos se ha oxidado por el método *open cup* a 50 °C y se han evaluado los parámetros de oxidación en comparación con el aceite sin sembrar.

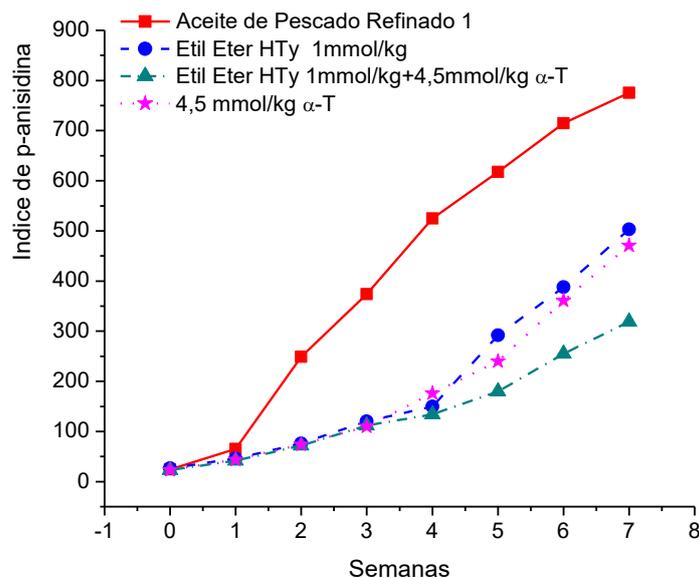
Desde la primera semana el índice de peróxidos mostró un gran incremento en todas las muestras, y las diferencias entre ellos en cada período de tiempo fueron pequeñas (Figura 15). Estos resultados indican que la oxidación primaria apenas se afecta por la presencia de antioxidantes en estas concentraciones.



**Figura 15**

Evolución del índice de peróxidos en matrices de aceite de pescado sembradas con 1 mmol/kg de etil éter de hidroxitirosilo, 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol, y la mezcla de ambos, mantenidas a 50 °C en sistema *open cup*

Por otra parte, en el aceite desprotegido, el índice de *p*-anisidina incrementa rápidamente a partir de la primera semana, mientras que la adición de 1 mmol/kg de etil éter de hidroxitirosilo o de 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol permite mantener bajos niveles hasta la cuarta semana (Figura 16).



**Figura 16**

Evolución del índice de *p*-anisidina en matrices de aceite de pescado sembradas con 1 mmol/kg de etil éter de hidroxitirosilo, 4,5 mmol/kg  $\alpha$ -tocoferol, y la mezcla de ambos, mantenidas a 50 °C en sistema *open cup*

La adición conjunta de ambos antioxidantes al aceite de pescado tiene un efecto positivo adicional sobre el índice de *p*-anisidina desde la quinta semana. Estos hechos podrían sugerir que bajas concentraciones de AEHTy previenen la oxidación secundaria del mismo modo que altas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, y la mezcla de ambos antioxidantes es ligeramente más efectiva sólo después de largos períodos de conservación.

La composición en ácidos grasos del aceite de pescado solo y sembrado con antioxidantes a lo largo del período de inducción se muestra en la Tabla 8. Después de 30 días de oxidación, el aceite de pescado muestra un descenso significativo de los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente C20:5 (EPA) y C22:6 (DHA), mientras que en todas las matrices sembradas con antioxidante sólo se observa un pequeño descenso. Después de 45 días, todos los aceites mostraron una disminución en ácidos grasos poliinsaturados que es similar en las tres matrices sembradas y menor que en el aceite desprotegido. Estos resultados están de acuerdo con los del índice de *p*-anisidina puesto que bajas concentraciones de AEHTy tienen el mismo efecto que altas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol.

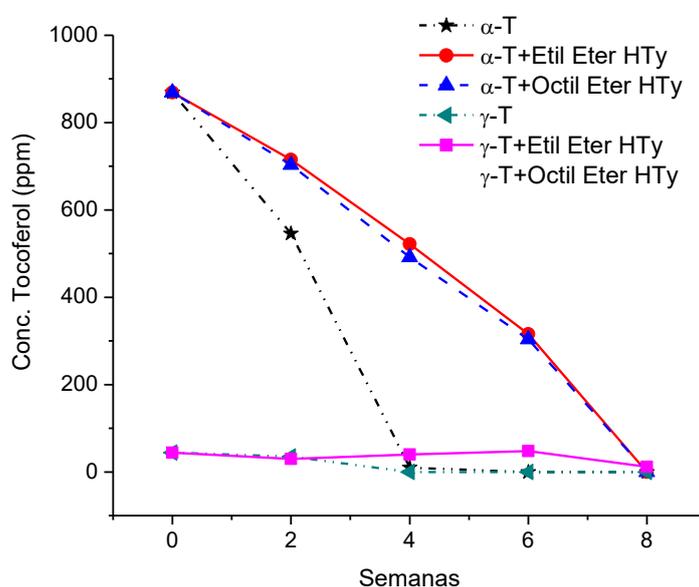
**Tabla 8**

Evolución de la composición en ácidos grasos del aceite de pescado 1, sembrado con 1 mmol/kg de éter de hidroxitirosilo, 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T) y la mezcla de ambos después de 30 y 45 días de almacenamiento a 50 °C en sistema *open cup*

		Aceite de Pescado Inicial	Aceite de Pescado		Pescado + Etil Éter (1 mmol/kg)		Pescado + $\alpha$ -T (4,5 mmol/kg)		Pescado + Etil éter (1 mmol/kg) + $\alpha$ -T (4,5 mmol/kg)	
Tiempo de Almacenamiento (Días)		0	30	45	30	45	30	45	30	45
Composición en ácidos grasos (%)	14:0	8,4 ± 0,1	10,1 ± 0,1	11,2 ± 0,1	8,6 ± 0,1	9,7 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,9 ± 0,1	10,1 ± 0,1
	16:0	19,2 ± 0,4	22,0 ± 0,3	25,2 ± 0,4	19,9 ± 0,1	23,1 ± 0,2	20,0 ± 0,1	19,0 ± 0,4	19,8 ± 0,2	23,2 ± 0,3
	16:1	11,9 ± 0,3	13,7 ± 0,2	15,0 ± 0,2	12,4 ± 0,1	13,9 ± 0,2	12,4 ± 0,4	11,4 ± 0,1	12,5 ± 0,1	13,9 ± 0,1
	18:0	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,7 ± 0,1	3,7 ± 0,1	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1
	18:1	10,5 ± 0,3	12,2 ± 0,2	13,3 ± 0,2	10,6 ± 0,1	12,3 ± 0,1	10,3 ± 0,1	10,3 ± 0,2	10,5 ± 0,1	12,3 ± 0,1
	18:2	1,8 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0
	18:3	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,7 ± 0,0
	18:4	3,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,01	3,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1
	20:4	1,9 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0
	20:5	16,3 ± 0,3	12,4 ± 0,1	10,7 ± 0,1	15,8 ± 0,1	12,7 ± 0,0	15,8 ± 0,1	10,3 ± 0,1	15,9 ± 0,0	12,6 ± 0,1
	22:5	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,7 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,0
22:6	17,8 ± 0,5	14,1 ± 0,3	9,9 ± 0,1	17,2 ± 0,3	12,9 ± 0,1	17,6 ± 0,4	10,6 ± 0,1	16,8 ± 0,2	12,8 ± 0,1	

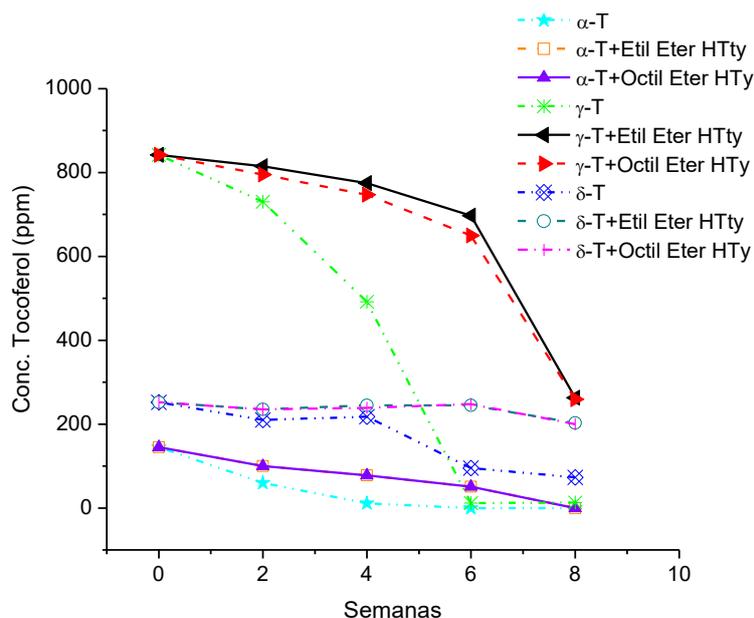
5.1.3.2. Evolución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol

La evolución de los tocoferoles en los aceites refinados comerciales se ve afectada por la presencia de éteres de hidroxitirosilo durante la oxidación en el sistema *open cup* a 50 °C. En el aceite refinado de girasol y soja sembrado con 0,5 mmol/kg de éteres de hidroxitirosilo, la concentración de tocoferoles decrece más lentamente que en los aceites sin sembrar. Así, después de 8 semanas,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferoles desaparecen en el aceite de girasol (Figura 17), mientras que en el aceite de soja, el  $\alpha$ -tocoferol desaparece, el  $\gamma$ -T disminuye y el  $\delta$ -T permanece casi intacto (Figura 18). No se aprecian diferencias entre los efectos del etil y octil éter.



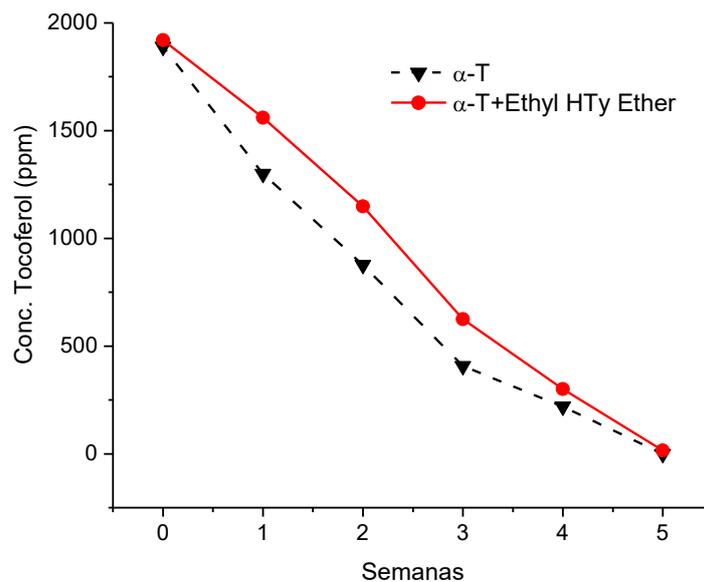
**Figura 17**

Evolución de tocoferoles en aceite refinado de girasol (conteniendo 869 ppm de  $\alpha$ - y 44 ppm de  $\gamma$ -tocoferol) sembrados con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo, mantenidos a 50 °C en sistema *open cup*

**Figura 18**

Evolución de tocoferoles en aceite refinado de soja (conteniendo 145, 842 y 252 ppm de  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol, respectivamente) sembrado con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo, mantenidos a 50 °C en sistema *open cup*

La evolución del  $\alpha$ -tocoferol en dos muestras de aceite de pescado, una sembrada con 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol, y otra con la mezcla de  $\alpha$ -tocoferol (4,5 mmol/kg) con etil éter de hidroxitirosilo (1 mmol/kg), resulta en una disminución más rápida en la muestra que contiene solo  $\alpha$ -tocoferol durante la primera semana. Durante la segunda y tercera semana se produce un decrecimiento, similar en ambas muestras, hasta que desaparecen las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol al mismo tiempo en los dos ensayos (Figura 19). Por tanto, en todas las matrices, los AEHTy ejercen un efecto protector en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 19**

Evolución de los tocoferoles en aceite refinado de pescado sembrado con 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol y la mezcla de 1 mmol/kg de etil éter de hidroxitirosilo y 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol, mantenidos a 50 °C en sistema *open cup*

### 5.1.3.3. Evolución de la concentración de AEHTy

Para determinar las concentraciones de AEHTy en los aceites, se ha desarrollado el método analítico descrito en el punto 4.8.1. Dicho método está basado en la determinación de compuestos fenólicos en el aceite de oliva mediante EFS y CLAE-UV en fase inversa (Mateos *et al.*, 2001).

Los AEHTy son menos polares que los derivados de HTy presentes en el aceite de oliva, por lo que los cartuchos de fase diol se ha sustituido por fase amino. De este modo los éteres quedan más retenidos y se pueden eliminar con los lavados compuestos más polares como esteroides, alcoholes, fosfolípidos y diacilgliceroles que pueden interferir en el cromatograma CLAE. Se ha utilizado como patrón interno 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol en lugar de ácido 3,4-dihidroxifenilacético puesto que éste último se queda parcialmente retenido en el cartucho amino. La fracción de AEHTy se redissuelve en etanol al ser más apolar que la mezcla metanol/H<sub>2</sub>O 1:1. Aplicando este procedimiento se han obtenido recuperaciones mayores del 85% y buenas separaciones cromatográficas de los AEHTy.

Respecto a la evolución de las concentraciones de AEHTy, se observa que en aceites refinados de girasol y soja sembrados con 0,5 mmol/kg de etil y octil éteres de hidroxitirosilo, mantenidos a 50 °C, las concentraciones de AEHTy van decreciendo con el tiempo hasta desaparecer a los 60 días (8 semanas). En este tiempo, el girasol pierde los tocoferoles (Figura 17) y el índice de *p*-anisidina se incrementa rápidamente (Figura 13). En aceite de soja, cantidades significativas de tocoferoles permanecen (Figura 18) y el valor del índice de *p*-anisidina se incrementa más lentamente (Figura 14). En aceite refinado de pescado sembrado con 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol y con la mezcla de 1 mmol/kg de etil éter de hidroxitirosilo y 4,5 mmol/kg de  $\alpha$ -tocoferol, la concentración de fenol decrece de forma similar en ambos casos durante 30 días a 50 °C. A este tiempo, cantidades significativas de  $\alpha$ -tocoferol permanecen en el aceite sembrado con la mezcla (Figura 19), justificando la diferencia de los valores de índice de *p*-anisidina entre la muestra conteniendo la mezcla y la que contiene solo etil éter de hidroxitirosilo (Figura 16).

Resumiendo, los éteres de hidroxitirosilo muestran una alta actividad antioxidante cuando se añaden a aceites comerciales y la concentración necesaria para obtener el máximo efecto depende del nivel de insaturación de la matriz, tipo de ácido graso poliinsaturado y contenido en tocoferoles de la matriz lipídica. Pequeñas cantidades de AEHTy ejercen un efecto protector sobre el contenido en tocoferoles y permiten prolongar la vida útil de los aceites durante su comercialización. En el caso del aceite de pescado, la adición de bajas concentraciones de AEHTy con altas concentraciones de tocoferol origina únicamente un ligero aumento de estabilidad comparado con el fenol solo.

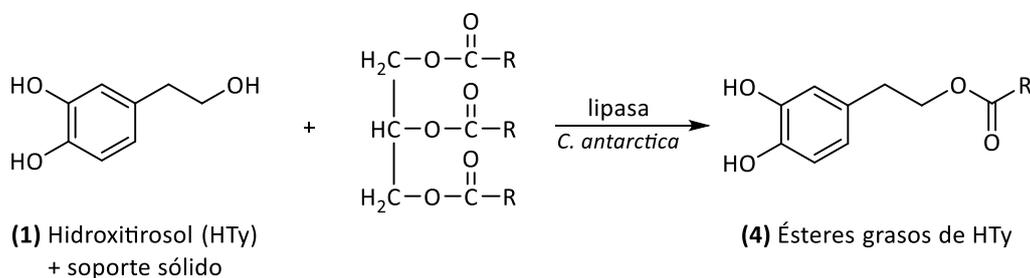
## 5.2. ÉSTERES DE HIDROXITIROSILO

### 5.2.1. Síntesis *in situ* de mezcla de ésteres grasos (EGHTy)

Se han descrito métodos de síntesis de los EGHTy a partir del tirosol, alcohol homovanílico (Bernini *et al.*, 2008a y 2008b), ácido 2-(3,4-dihroxifenil)acético

(Gambacorta *et al.*, 2007), 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol (Lee *et al.*, 2016), así como numerosos procedimientos a partir del hidroxitirosol. De todos ellos, los que producen mejores rendimientos y son de más fácil ejecución son los que parten del HTy y utilizan los ésteres metílicos o etílicos de los correspondientes ácidos carboxílicos como agente acilante, en presencia de catalizadores ácidos o enzimáticos (Figura 5). Los EGHTy que se obtienen deben someterse a una eficaz purificación para eliminar el disolvente, el catalizador y los restos del agente acilante, puesto que el producto está destinado a la alimentación. Esta purificación en la mayoría de los casos se realiza por un proceso cromatográfico a través de columnas de gel de sílice. Por otra parte, los ésteres alquílicos de los ácidos grasos son productos de síntesis que tienen un coste apreciable.

En el procedimiento de síntesis *in situ* desarrollado en esta Tesis, el agente acilante es un aceite vegetal o animal que reacciona con el hidroxitirosol disperso en tierra de diatomeas en presencia de lipasa inmovilizada *Candida antarctica* mediante agitación a una temperatura entre 30 y 60 °C (Figura 20). Al final del proceso, el catalizador y la tierra se eliminan por filtración o centrifugación, obteniéndose un aceite con alta concentración de una mezcla de EGHTy y con un resto de HTy solubilizado que puede usarse tal cual como aditivo antioxidante para alimentos grasos. En este proceso, el aceite acilante y la tierra de diatomeas son de bajo coste y las operaciones de calentamiento a 30-60 °C, agitación y filtración o centrifugación son económicas, fáciles de realizar y se llevan a cabo habitualmente en la industria de refinación de aceites comestibles.



**Figura 20**

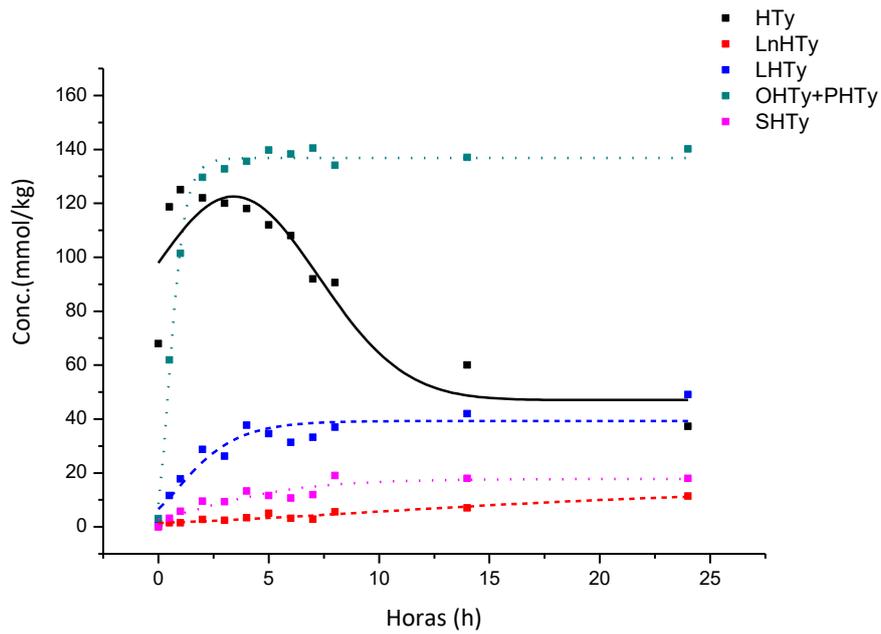
Síntesis de EGHTy por reacción *in situ* de los triacilglicerol con el HTy disperso en soporte sólido en presencia de la lipasa de *Candida antarctica* como catalizador

#### 5.2.1.1. Síntesis *in situ*. Optimización del proceso de obtención

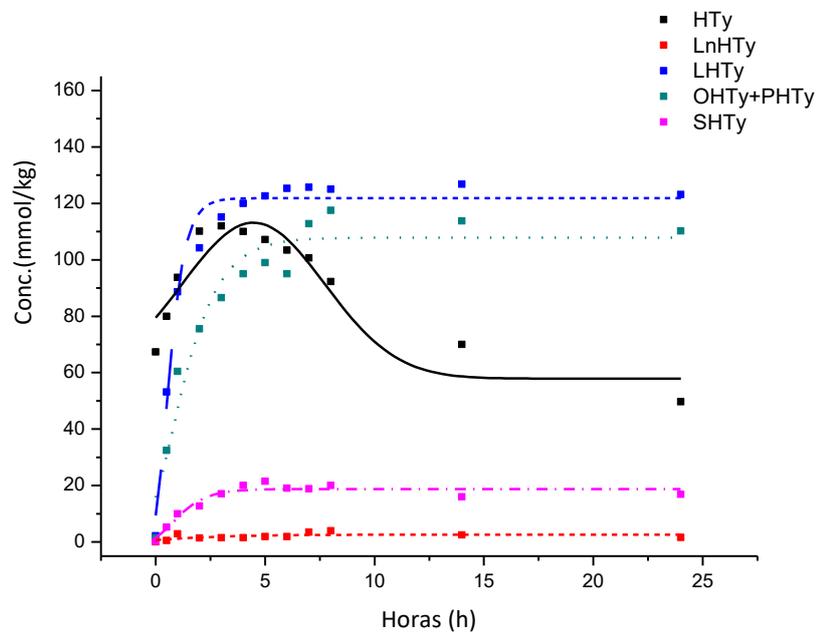
En primer lugar se ha ensayado la síntesis *in situ* para la obtención de EGHTy a 60 °C, con aceites purificados de oliva 1, girasol 2, soja 2, sachá inchi y pescado 2, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.9 (Ensayos nº 12, 13, 14, 15 y 16 de la Tabla 6). Se escogió como catalizador la lipasa procedente de *Candida antarctica* porque nuestra experiencia anterior (Romero-Segura, 2010) y los antecedentes bibliográficos indicaron que es la enzima idónea para llevar a cabo este proceso de transesterificación. Asimismo, se verificó que la mezcla de HTy con la tierra de diatomeas resulta imprescindible para que la reacción tenga lugar con buenos rendimientos (Romero-Segura, 2010).

En todos los casos se produce la formación de los ésteres de HTy mayoritarios en proporción parecida a la proporción de los ácidos grasos del aceite ensayado (Figuras 21–25).

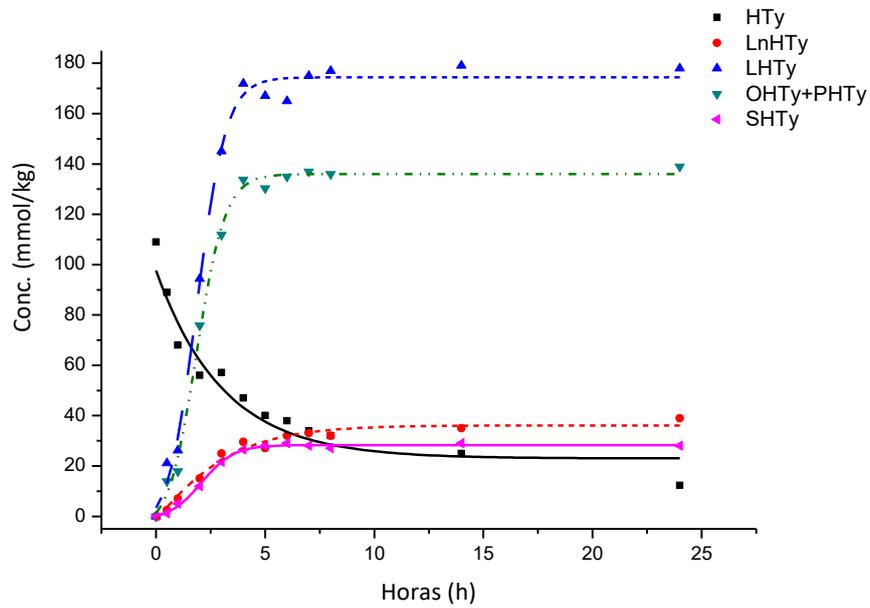
La concentración de HTy libre en todos los aceites aumenta desde los primeros minutos de los ensayos, ya que las condiciones experimentales seleccionadas, fundamentalmente la presencia de la tierra de diatomeas y la agitación, permiten una buena solubilización. Dicha concentración alcanza un máximo, aproximadamente, en la primera hora de los ensayos, para ir posteriormente disminuyendo de forma paulatina al ir reaccionando con los triacilgliceroles y formando los correspondientes ésteres. Este comportamiento es similar en el caso de los aceites de oliva, girasol y sachá inchi, con concentraciones máximas de HTy de 125, 110 y 115 mm/kg respectivamente en la primera hora. En el caso de los aceites de soja y pescado, las cantidades de HTy libre máximas, 110 y 140 mM respectivamente, las encontramos en los 30 primeros minutos, por lo que deducimos que, para ambos aceites, la reacción de formación de los EGHTy es más rápida que la solubilización del HTy.

**Figura 21**

Ensayo nº12. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 60°C

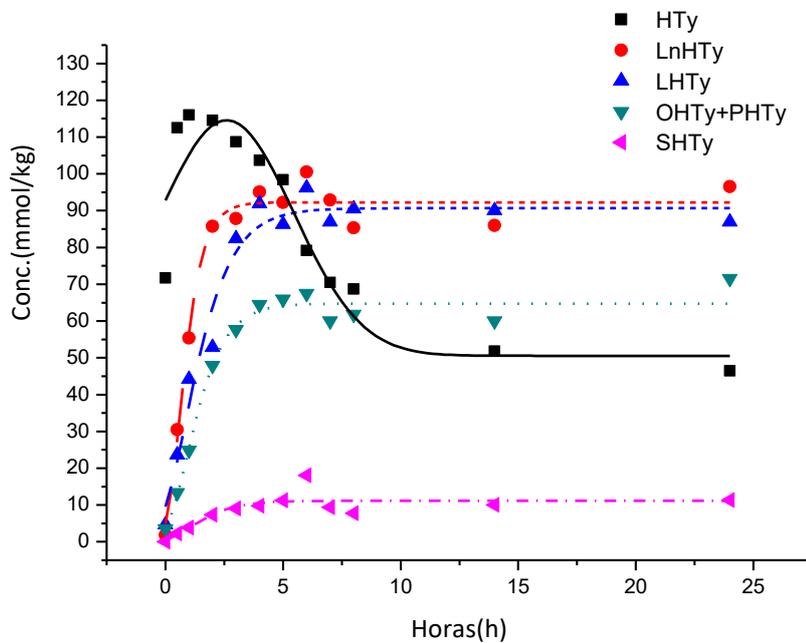
**Figura 22**

Ensayo nº13. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de girasol a 60°C



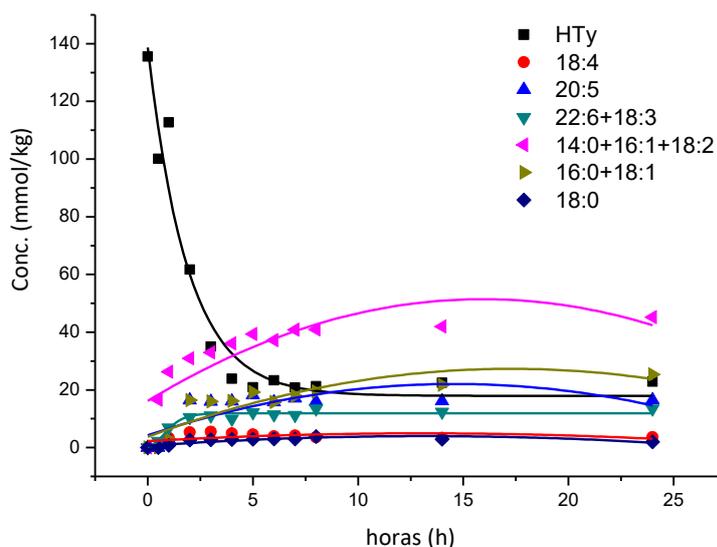
**Figura 23**

Ensayo nº14. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de soja a 60°C



**Figura 24**

Ensayo nº15. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de sachá inchi a 60°C



**Figura 25**

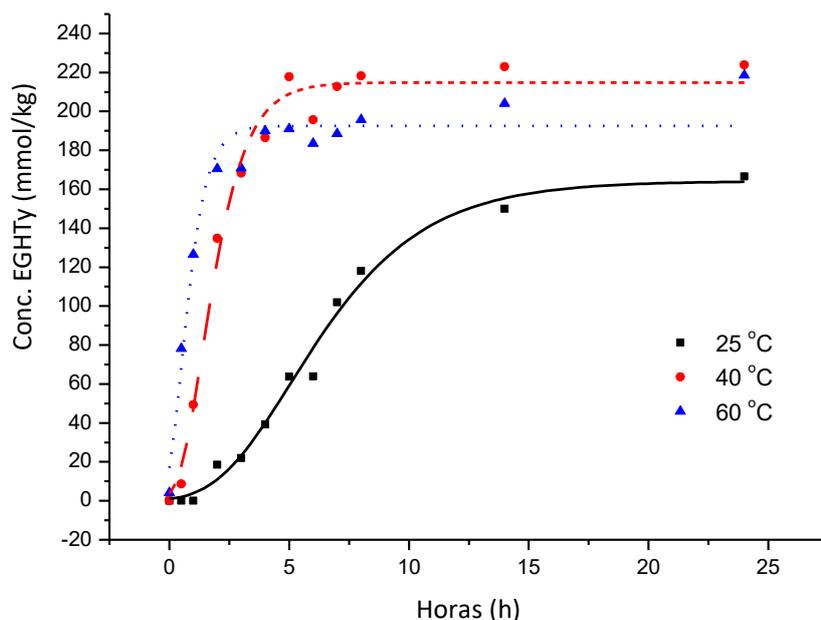
Ensayo nº 16. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de pescado a 60°C

Se observa en todos los ensayos, que aproximadamente a partir de las 7 horas, no se forman más EGHTy y que hay una concentración mínima de HTy (20-50 mmol/kg) solubilizado en los aceites que permanece prácticamente constante.

A partir de estos resultados, se ha procedido a realizar un estudio de optimización de las condiciones de reacción: temperatura, enzima y relación HTy/Aceite, y soporte sólido.

#### 5.2.1.1.1. Temperatura de la reacción

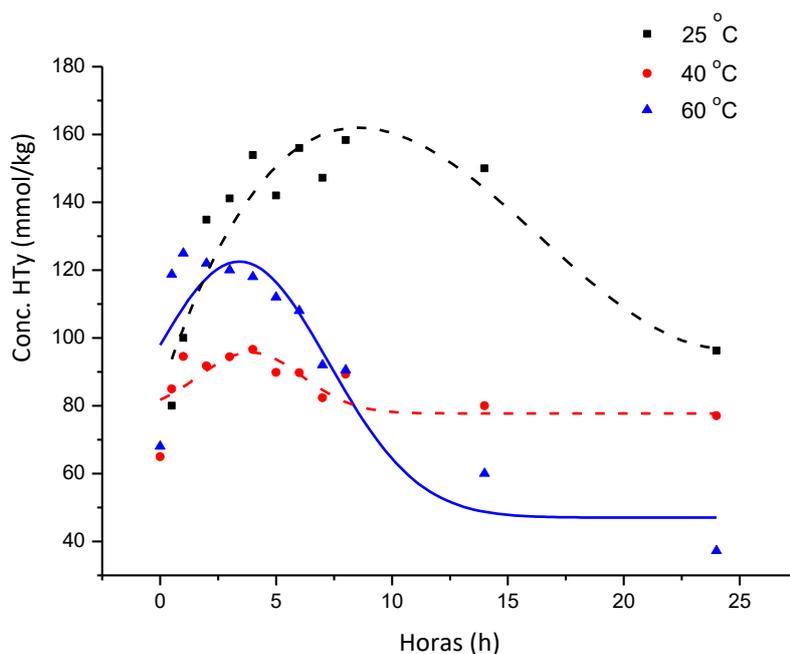
Para verificar el efecto de la temperatura se ha realizado la síntesis *in situ* para la obtención de EGHTy con aceite purificado de oliva 1, aplicando las condiciones indicadas en el apartado 4.9, a las temperaturas de 25, 40 y 60°C (Ensayos 1, 6 y 12 de la Tabla 6). Si comparamos la formación de EGHTy (Figura 26), observamos que a medida que la temperatura del ensayo aumenta, la formación de ésteres es más rápida, de modo que al cabo de 7 horas a 60°C prácticamente se han sintetizado todos los ésteres, mientras que a 40°C, tarda algunas horas más en llegar a la misma concentración. A 25°C, además de ir la reacción mucho más lenta (más de 15 horas) se alcanza una concentración inferior de EGHTy.

**Figura 26**

Ensayos nº1, 6 y 12. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a temperaturas de 25, 40 y 60 °C

Si representamos la concentración de HTy residual en el aceite de estas mismas experiencias (Figura 27), se observa que a 60 °C queda menos concentración del fenol libre que a 25 °C. Ello es una consecuencia del equilibrio entre las velocidades de reacción y de solubilización ya que a temperatura alta la primera es mayor que la segunda.

Teniendo en cuenta que a 40 y 60 °C y se obtienen rendimientos similares en tiempos parecidos (5–10 horas) (Figura 26) se tomó el intervalo 40–60 °C como temperatura idónea para llevar a cabo la reacción.

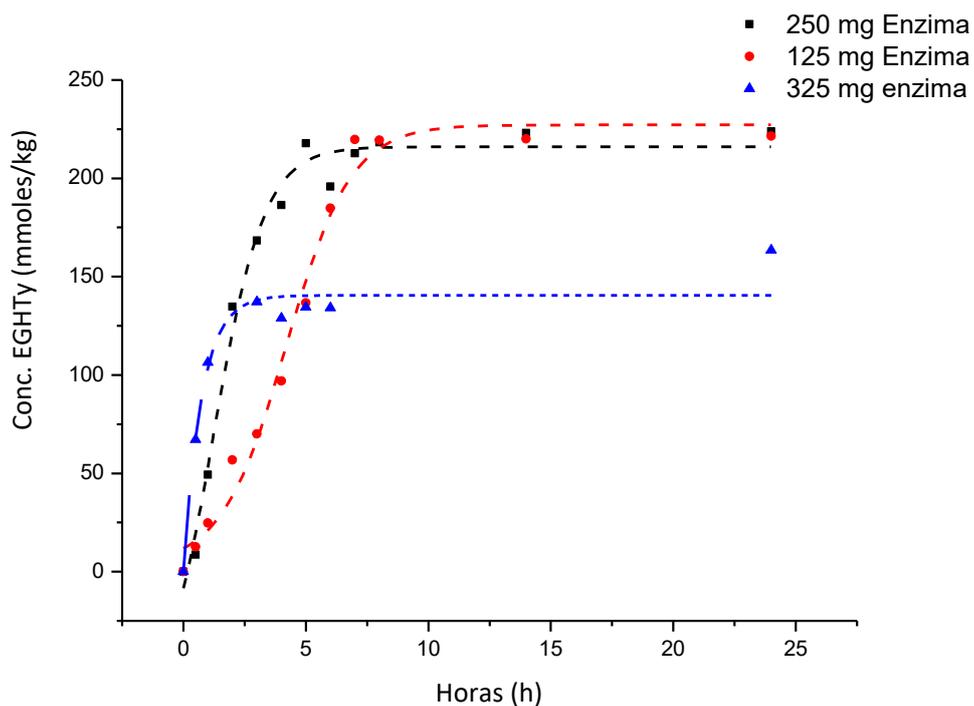
**Figura 27**

Ensayos nº 1, 6 y 12. HTy residual tras la formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 25, 40 y 60 °C

#### 5.2.1.1.2. Influencia de la enzima en la reacción de esterificación

Según antecedentes bibliográficos y experiencias anteriores (Romero-Segura, 2010), la lipasa de *Candida antarctica* es la enzima más adecuada para este tipo de reacciones.

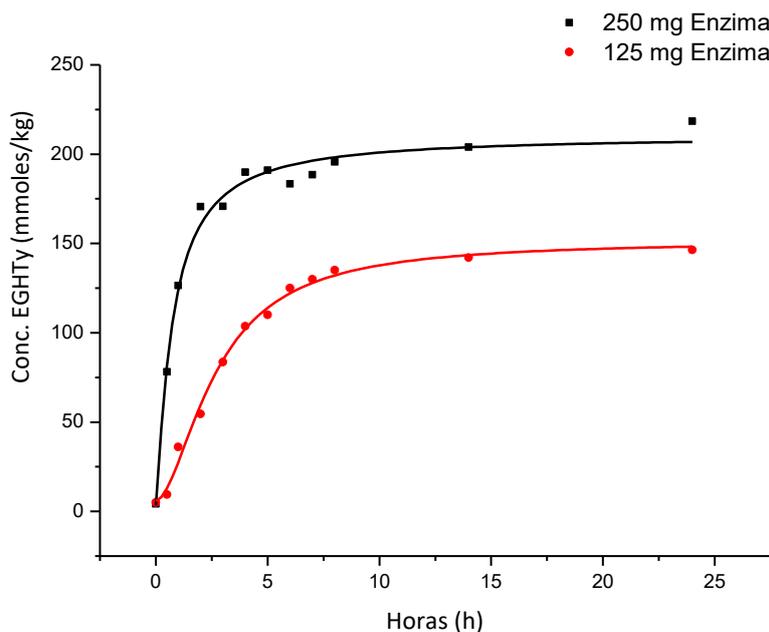
Se escogió la lipasa *Candida antarctica* inmovilizada Novozym® 435 porque es comercial y se usa industrialmente. Para optimizar la cantidad de enzima, se realizó la síntesis en las condiciones especificadas en el apartado 4.9 utilizando cantidades crecientes (125, 250 y 325 mg) de enzima en la matriz de aceite de oliva purificado (Tabla 6, ensayos nº 4, 6 y 8).

**Figura 28**

Ensayos nº 4, 6 y 8. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 40 °C con 125, 250 y 325 mg de enzima

En la Figura 28 se observa cómo se obtiene un rendimiento similar con 125 y 250 mg de enzima, mientras que con 325 mg no solo no mejora, sino que el rendimiento baja significativamente. Este efecto se atribuye a que una mayor cantidad de enzima disminuye la cantidad de aceite disponible en el medio de reacción dificultando el contacto con la mezcla HTy/celita.

Estos ensayos con 125 y 250 mg de enzima se repitieron a 60 °C comprobándose que a la temperatura más alta si se aprecia una diferencia notable de rendimiento de los EGHTy (Figura 29), de lo que se deduce que 250 mg de enzima es la cantidad más adecuada en el intervalo 40–60 °C.

**Figura 29**

Ensayos nº 11 y 12. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 60 °C con 125 y 250 mg de enzima

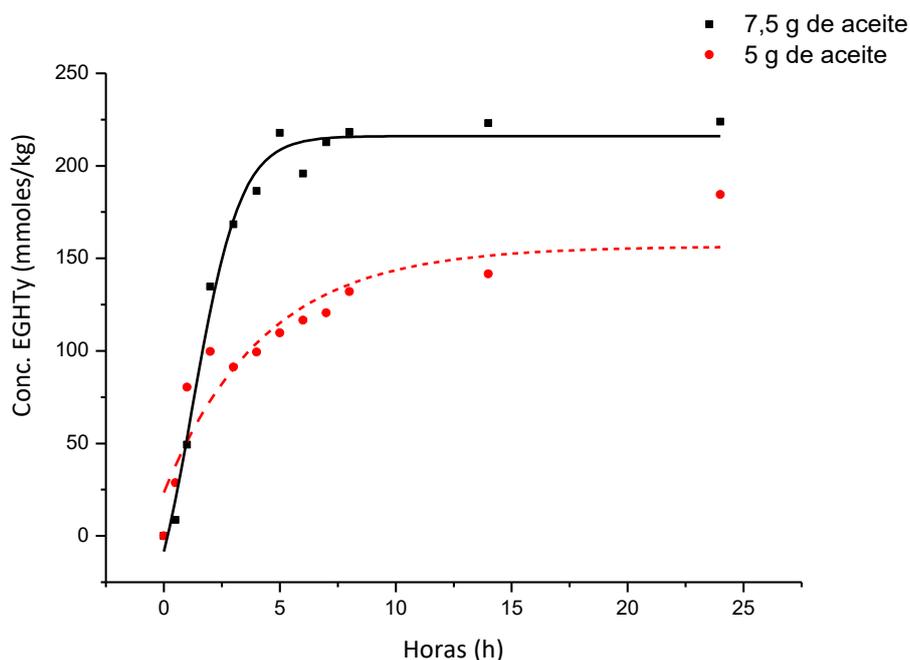
En relación a la experiencia realizada sin enzima, en el ensayo llevado a cabo a 60 °C (Tabla 6, ensayos nº 2 y 10) se comprueba que el HTy no se esterifica, al no detectarse la presencia de los ésteres grasos. La concentración máxima solubilizada de HTy en el aceite ha sido en este caso de 107 mmol/kg.

Para estudiar la posibilidad de reutilización de la enzima en una nueva reacción, los sólidos provenientes de una experiencia con 250 mg de enzima se separaron por filtración y se utilizaron para una nueva reacción a 60 °C con nueva cantidad de aceite y de HTy/Celita, encontrándose a las 24 h de reacción concentraciones 68 y 130 mg/kg de EGHTY e HTy solubilizado, respectivamente, que representan rendimientos de 20,4 % de ésteres y 59,5 % de ésteres + HTy frente a 65,6 y 76,8 % de la reacción con la enzima intacta. Estos resultados indican que la enzima conserva una actividad residual susceptible de aprovechamiento.

#### 5.2.1.1.3. Relación HTy/Aceite

Otra variable a optimizar es la relación milimolar entre el HTy y el aceite. Hasta ahora las experiencias se han realizado guardando una relación de HTy/aceite de 1:3 (Tabla 6, ensayo nº 5), pero se ha ensayado disminuir la cantidad de aceite de 7,5 g a 5

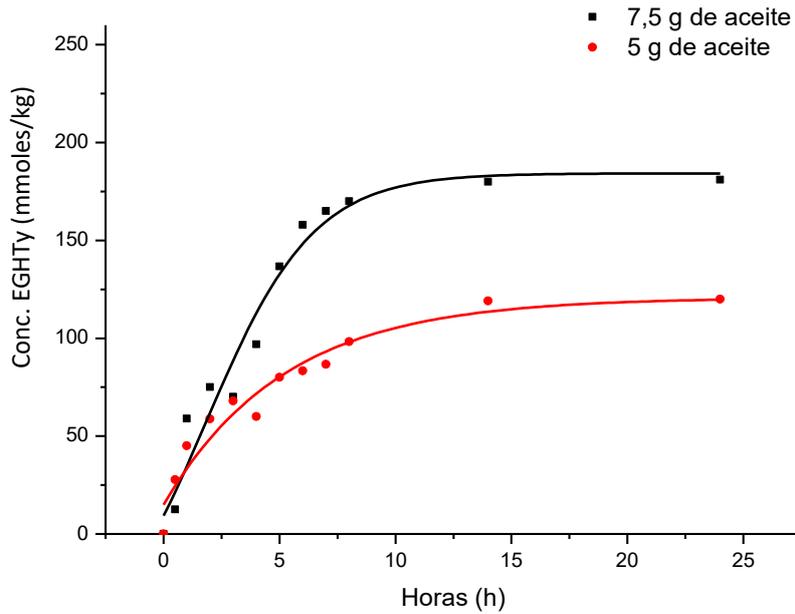
g manteniendo fija la cantidad de HTy, de modo que la relación HTy/aceite sea 1:2 (Tabla 6, ensayo nº 6). En ambos casos se ha utilizado la matriz de aceite de oliva a 40°C, en las condiciones indicadas en el apartado 4.9. En la Figura 30, donde se comparan ambas relaciones, se observa que la reacción funciona más rápidamente y se alcanza una concentración final mayor al usar 7,5 g de aceite como consecuencia de que hay mayor proporción de reactivo acilante con respecto al HTy/Celita y la enzima.



**Figura 30**

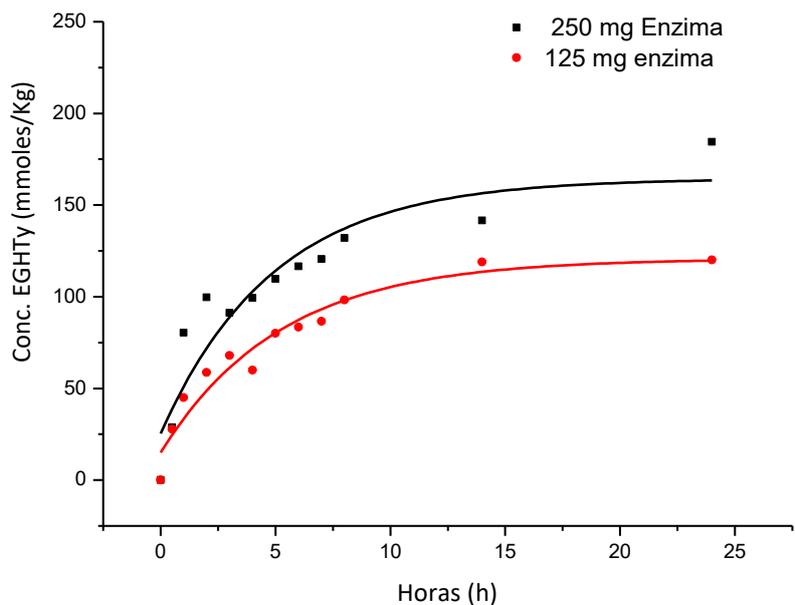
Ensayos nº 5 y 6. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 40 °C con 250 mg de enzima, 385 mg de HTy y con 5 y 7,5 g de aceite

Se han repetido las experiencias de la relación HTy/aceite 1:3 y 1:2 a 40 °C pero con menor cantidad de enzima (125 mg), resultando también que la relación 1:3 es la más adecuada (Figura 31, Tabla 6, ensayos nº 3 y 4).

**Figura 31**

Ensayos nº 3 y 4. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 40 °C con 125 mg de enzima, 385 mg de HTy y con 5 y 7,5 g de aceite

Si representamos en otra gráfica la formación de EGHTy a 40°C, partiendo de 5 g de aceite y variando la cantidad de enzima (125 y 250 mg, Figura 32), se confirma que la cantidad óptima de catalizador sigue siendo 250 mg, independientemente de la relación HTy/aceite.

**Figura 32**

Ensayos nº 3 y 5. Formación *in situ* de EGHTy con una matriz de oliva a 40 °C 5 g de aceite, con 125 y 250 mg de enzima

#### 5.2.1.1.4. Soporte sólido del HTy

El HTy tiene consistencia siruposa, es de difícil manejo y cuando se agita con la enzima en el aceite apenas entra en contacto por lo que la reacción ocurre en muy pequeña proporción y muy lentamente. El soporte sólido para el HTy es un elemento crítico puesto que al eliminarse su consistencia siruposa y tornarse pulverulento entra en contacto con el aceite facilitando su disolución y en consecuencia la reacción con el mismo.

La celita es una tierra de diatomeas con partículas de SiO<sub>2</sub> de tamaño muy pequeño que se usa en la industria del aceite de oliva como coadyuvante para la filtración de aceites vírgenes y refinados ya que no tiene actividad química, retiene partículas sólidas muy pequeñas y elimina la humedad dejando el aceite totalmente transparente.

La cantidad de soporte utilizada debe ser la suficiente para que se forme un sólido pulverulento, que permita un buen contacto entre el HTy y el aceite. Es por ello que para 385 mg de HTy se parte de 300 mg de Celita que se va mezclando con una espátula. Como el HTy de distintos proveedores o lotes contiene diferente grado de humedad, se va añadiendo Celita hasta que quede como un polvo totalmente suelto.

#### 5.2.1.2. Síntesis en continuo de EGHTy

Pensando en la aplicación industrial del proceso de síntesis, un modo operativo relativamente simple y económico, sería introduciendo en un filtro prensa la mezcla de soporte y enzima y filtrando el aceite a vacío a través del mismo de forma que se sinteticen los EGHTy en continuo.

A escala de laboratorio se ha ensayado la síntesis en continuo mediante una columna de vidrio (0,8 cm d.i. x 10 cm long.) rellena con la mezcla de HTy/celita y enzima en las mismas proporciones que en los ensayos previos y manteniendo todo el sistema a una temperatura controlada de 40 °C. En un reservorio dispuesto en la cabeza de la columna se sitúa una muestra de 7,5 g de aceite de oliva 1 que va eluyendo por gravedad, tomándose muestras del aceite que sale de la columna. El paso del aceite a través de la columna es muy lento puesto que al cabo de una hora sólo se recogieron

unos mg de aceite que contenían 109 mmol/kg de HTy, pero no ésteres. Al cabo de 4 horas ya se detectan ésteres y cuando eluyó todo el aceite se determinó una concentración total de 146 mmol/kg de éstos. A continuación, se añadieron 3 g adicionales de aceite que, a la salida, contenían 422 mmol/kg de ésteres + HTy y posteriormente otros 3 g adicionales resultaron con un contenido de 195 mmol/kg. Estos resultados indican que el enriquecimiento de un aceite con ésteres + HTy puede llevarse a cabo en la operación de filtración del aceite, utilizando como sólido filtrante la mezcla HTy/Celita mezclada con la enzima y regulando la velocidad de paso del aceite mediante presión en cabeza.

### **5.2.2. Caracterización de aceites con alta concentración de EGHTy**

Los aceites con alta concentración de EGHTy obtenidos por reacción *in situ* con HTy se caracterizan mediante su composición en ácidos grasos, que nos indica el tipo de aceite de procedencia. Así mismo, la concentración total de EGHTy + HTy expresada en mmol/kg indicará la proporción de aceite con alta concentración de ésteres que debe añadirse a otro aceite o grasa para enriquecerlo al nivel requerido. Adicionalmente el aceite se caracterizará por el contenido en tri-, di- y mono-acilglicerol, la concentración de HTy solubilizado en el aceite y los ácidos grasos libres. Para ello se utilizan las técnicas instrumentales que se exponen a continuación.

#### **5.2.2.1. Composición en ácidos grasos**

La composición en ácidos grasos se determinó mediante el análisis por CG de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos por transesterificación con KOH/metanol a temperatura ambiente (apartado 4.5.3). En la Tabla 9 se muestran las composiciones en ácidos grasos de las matrices oleosas iniciales y de la fracción apolar (F1) de los aceites funcionalizados, que contiene únicamente triacilglicerol, y que se obtiene mediante separación del concentrado por EFS en cartucho diol eluyendo con hexano. Se observa que apenas hay diferencias entre la composición de dicha fracción F1 y la inicial lo que sugiere que la transesterificación de los diferentes triacilglicerol es aleatoria.

**Tabla 9**

Composición en ácidos grasos (%) de las diferentes matrices antes y después de la funcionalización

Composición en ácidos grasos (%)	Oliva 1		Girasol 2		Soja 2		Sacha Inchi		Pescado 2	
	Matriz Inicial	F1 Matriz Funcionalizada								
C14:0	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	n.d.	n.d.	9,4 ± 0,2	9,6 ± 0,1
C16:0	11,2 ± 0,1	11,2 ± 0,1	6,1 ± 0,3	6,19 ± 0,2	11,1 ± 0,1	10,7 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,1	19,3 ± 0,2	20,6 ± 0,2
C16:1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	13,0 ± 0,2	13,3 ± 0,2
C16:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0
C18:0	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,0	3,7 ± 0,1
C18:1(*)	75,3 ± 0,5	76,3 ± 0,4	30,5 ± 0,4	30,0 ± 0,3	29,2 ± 0,3	30,8 ± 0,3	14,0 ± 0,1	12,4 ± 0,2	10,2 ± 0,2	11,0 ± 0,2
C18:2	8,4 ± 0,2	7,7 ± 0,2	58,7 ± 0,7	59,1 ± 0,5	51,0 ± 0,5	49,9 ± 0,6	28,4 ± 0,5	31,8 ± 0,3	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0
C18:3	1,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	5,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	48,9 ± 0,5	47,6 ± 0,4	2,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0
C18:4	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	3,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1
C20:4(**)	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	2,9 ± 0,0	2,8 ± 0,0
C20:5	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	15,8 ± 0,1	14,8 ± 0,2
C22:5	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,1
C22:6	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	n,d	n.d.	14,2 ± 0,3	13,0 ± 0,2
<b>Saturados</b>	14,3	14,4	10,6	10,7	14,4	14,2	7,8	7,9	32,1	33,9
<b>Monoinsaturados</b>	76,2	77,2	30,7	30,2	29,3	31,1	14,0	12,6	23,2	24,3
<b>Polinsaturados</b>	9,5	8,4	58,8	59,2	56,3	54,7	78,2	79,5	44,7	41,8

(\*) C18:1 Suma de los isómeros n-7 + n-9

(\*\*) C20:4 Suma de los isómeros n-3+ n-6

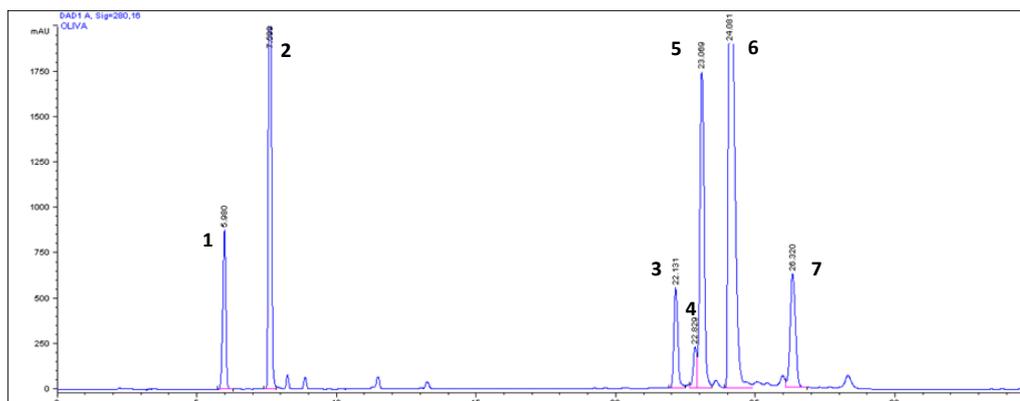
n.d.: no detectado.

Los datos se expresan como la media de las medidas y su desviación estándar (n=3).

## 5.2.2.2. Perfil de EGHTy

Para la determinación del perfil de aceites con alta concentración de EGHTy, se ha aplicado el procedimiento descrito en el apartado 4.8.2, basado en un método desarrollado anteriormente por este grupo para la cuantificación de los ésteres de hidroxitirosilo en matrices glicéridicas purificadas, sembradas con compuestos fenólicos, consistente también en EFS-diol y detección CLAE-UV en fase inversa (Romero-Segura, 2010). Se ha modificado para adaptarlo a extractos de EGHTy mucho más concentrados utilizando una cantidad de muestra del orden de 100 mg. Se ha elegido la fase diol, puesto que la fase amino pudiera romper los enlaces ésteres, como ocurre con los derivados secoiridoideos presentes en el aceite de oliva (Mateos *et al.*, 2001).

En las siguientes Figuras 33–37, se presentan los cromatogramas de EGHTy obtenidos de diferentes tipos de aceites fortificados *in situ*.



**Figura 33**

Perfil de EGHTy en una matriz de aceite de Oliva purificado, fortificada *in situ*. 1, HTy; 2, patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético; 3, LnHTy; 4, PoHTy; 5, LHTy; 6, OHTy+PHTy; 7, SHTy

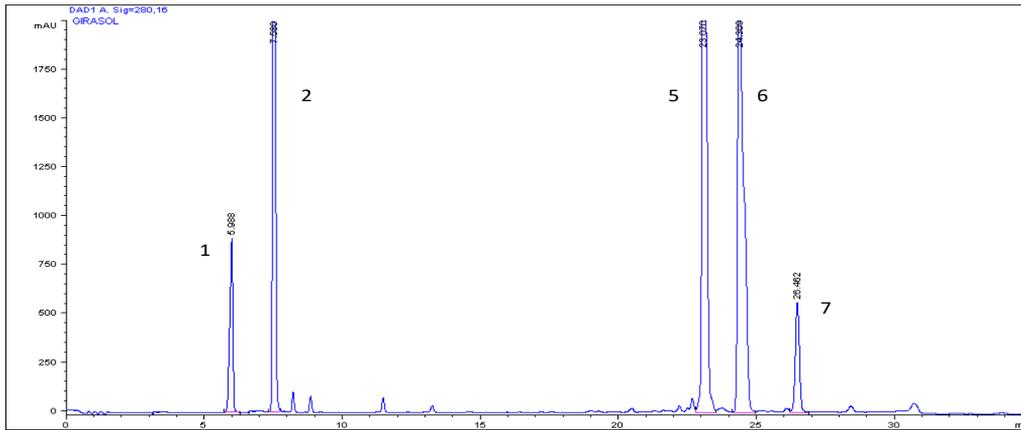


Figura 34

Perfil de EGHTy obtenidos de una matriz de aceite de Girasol normal purificado, fortificada *in situ*. 1, HTy; 2, patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético; 5, LHTy; 6, OHTy+PHTy; 7, SHTy

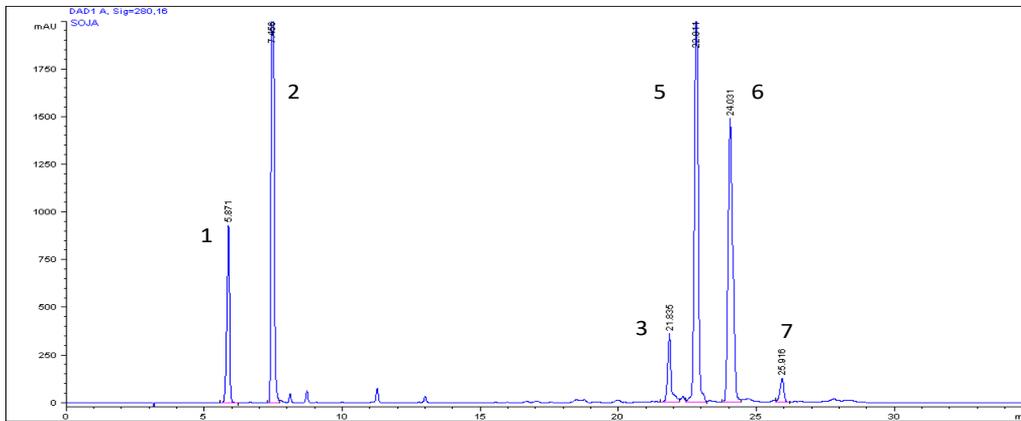


Figura 35

Perfil de EGHTy obtenidos de una matriz de aceite de Soja purificado, fortificada *in situ*. 1, HTy; 2, patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético; 3, LnHTy; 5, LHTy; 6, OHTy+PHTy; 7, SHTy

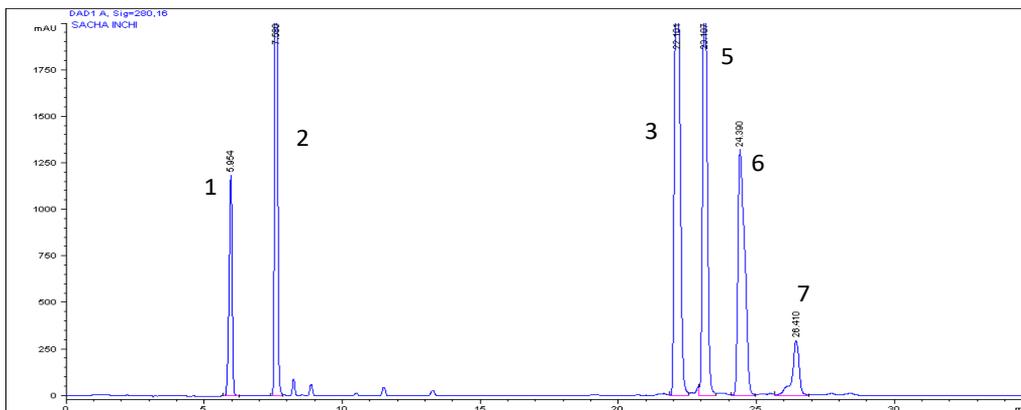
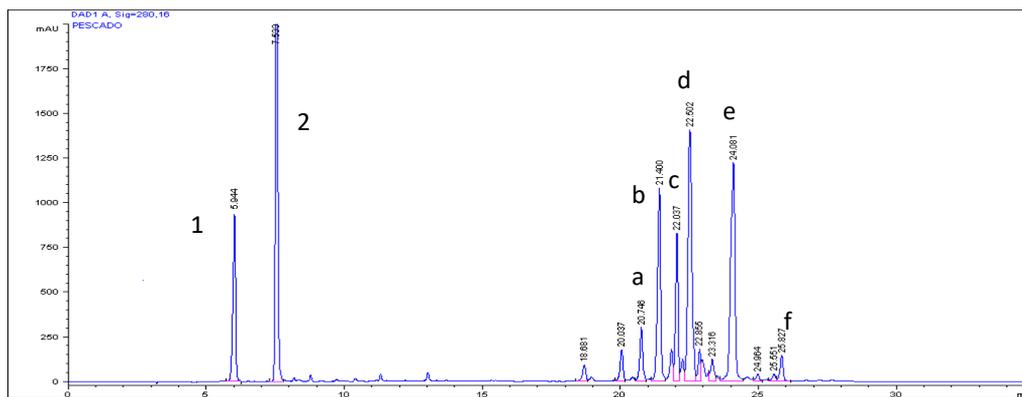


Figura 36

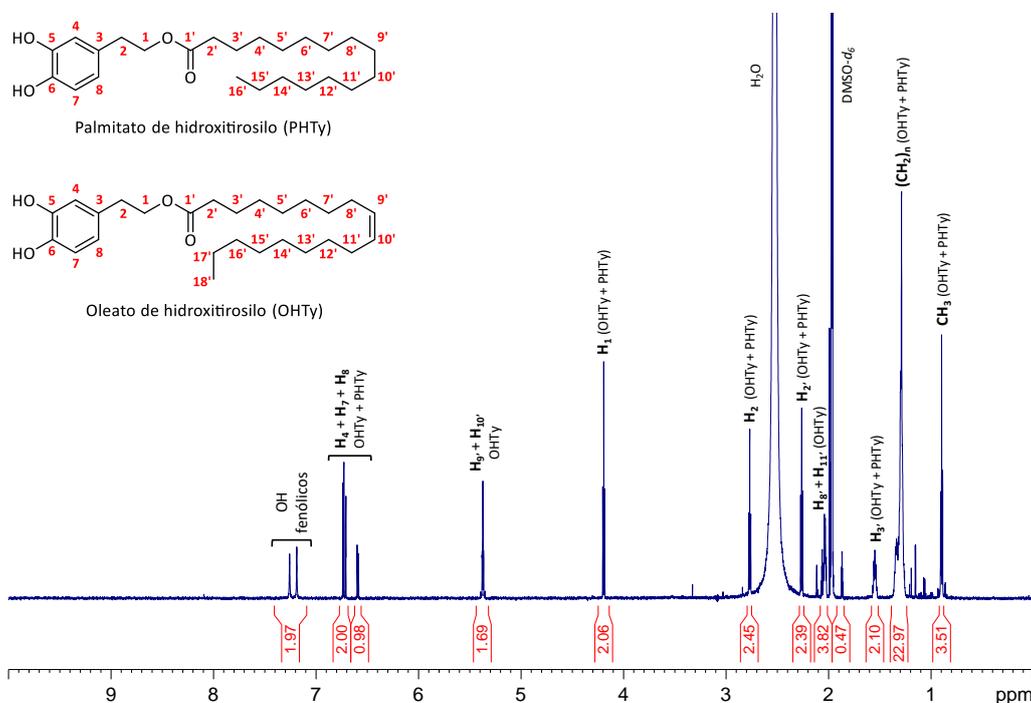
Perfil de EGHTy obtenidos de una matriz de aceite de Sacha inchi purificado, fortificada *in situ*. 1, HTy; 2, patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético; 3, LnHTy; 5, LHTy; 6, OHTy+PHTy; 7, SHTy



**Figura 37**

Perfil de EGHTy obtenidos de una matriz de aceite de Pescado purificado, fortificada *in situ*. 1, HTy; 2, patrón interno ácido *p*-hidroxifenilacético; a, C18:4HTy; b, C20:5HTy; c, C22:6HTy + C18:3HTy; d, C14:0 + C16:1HTy + C18:2HTy; e, C16:0HTy + C18:1HTy; f, C18:0HTy

En las condiciones ensayadas no es posible separar oleato (O) y palmitato (P) de HTy, que aparecen como un único pico en todos los cromatogramas. No obstante, en el caso del aceite de oliva funcionalizado a 60 °C durante 24 horas, el extracto fenólico se ha examinado mediante CLAE-RMN, y el espectro  $^1\text{H}$  resultante (Figura 38) del pico mayoritario (pico 6, Figura 33), permite confirmar que la proporción OHTy/PHTy es 85/15, similar a la del aceite de oliva de partida (87/13, véase Tabla 9).

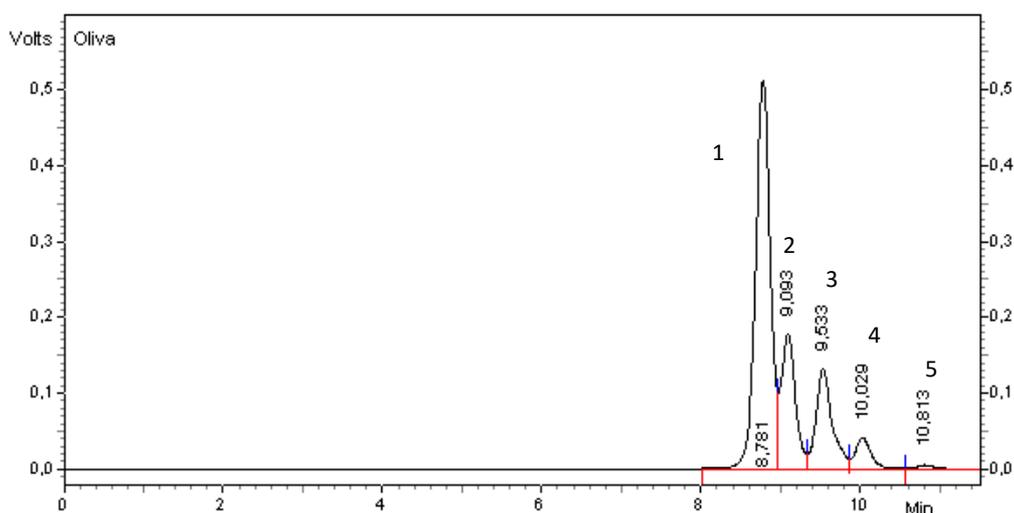


**Figura 38**

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del pico 6 (Figura 33) que contiene una mezcla 85/15 de OHTy + PHTy, tras separación mediante CLAE + EFS

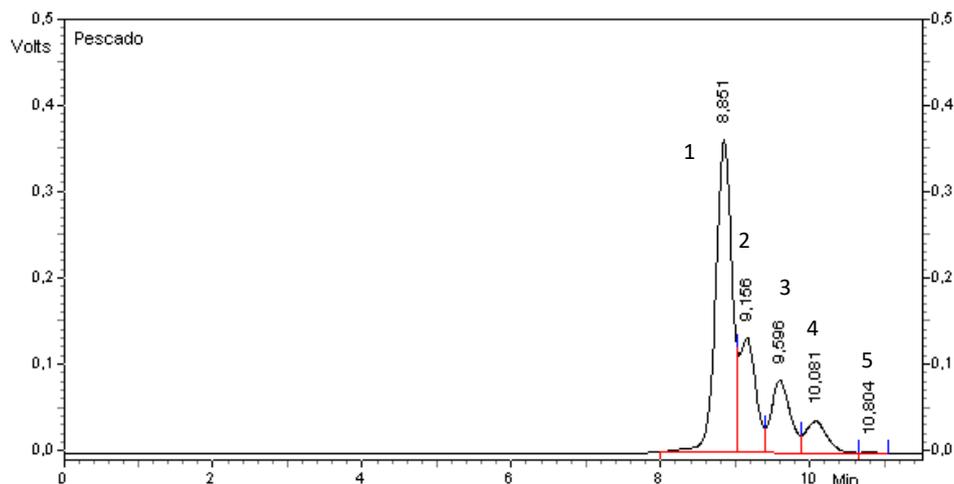
### 5.2.2.3. Análisis del perfil glicérico y de EGHTy por CLAE de exclusión molecular

Aunque la concentración de derivados de HTy puede determinarse a partir del análisis por CLAE-UV aplicando los factores de respuesta, dado que la concentración de EGHTy es muy elevada, se ha ensayado también el cálculo mediante el análisis directo por CLAE de exclusión molecular, procedimiento que es más sencillo porque se elimina la separación por EFS y aporta información sobre la cantidad de glicéridos, EGHTy, y HTy. En el cromatograma CLAE primero aparecen los triacilglicéridos como componentes de mayor peso y a continuación la secuencia diacilglicéridos, monoacilglicéridos junto con EGHTy, ácidos grasos e HTy libres. Mediante esta técnica se puede evaluar de forma rápida y aproximada el contenido de EGHTy en el aceite. En las Figuras 39 y 40 se exponen los cromatogramas de aceites de oliva y pescado.



**Figura 39**

Cromatograma del perfil glicérico junto con EGHTy e HTy de un aceite de Oliva conteniendo alta concentración de EGHTy. 1, Triacilglicéridos; 2, Diacilglicéridos; 3, EGHTy + Monoacilglicéridos; 4, ácidos grasos libres; 5, HTy libre



**Figura 40**

Cromatograma del perfil glicérico junto con EGHTy, HTy de un aceite de Pescado conteniendo alta concentración de EGHTy. 1, Triacilgliceroles; 2, Diacilgliceroles; 3, EGHTy + Monoacilgliceroles; 4, ácidos grasos libres; 5, HTy libre

A continuación, en la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para cada aceite, a 60 °C, con 250 mg de enzima, 385 mg de HTy y 7 g de aceite.

**Tabla 10**

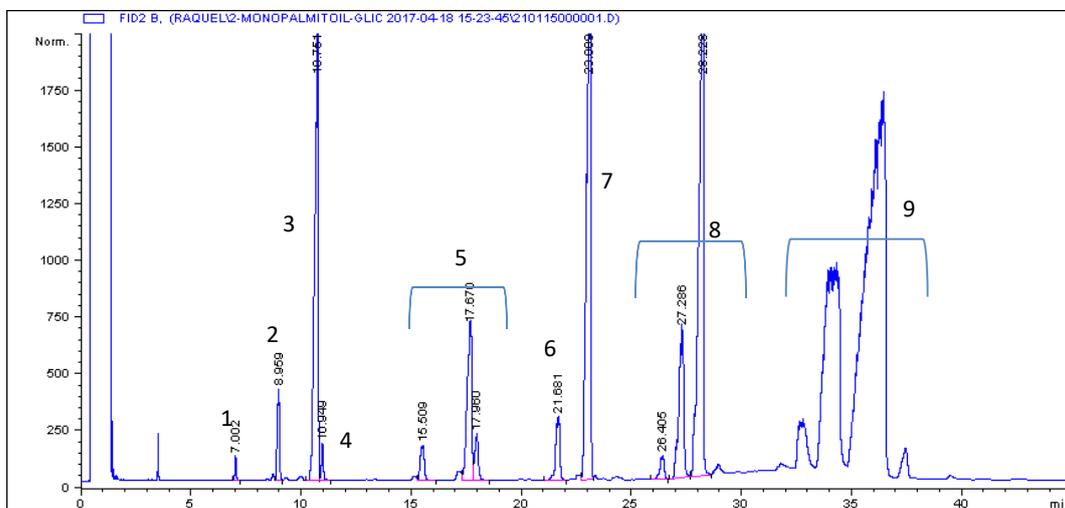
(%) Composición Glicérica, EGHTy y HTy de los aceites con alta concentración de ésteres determinada por CLAE de exclusión molecular, sobre el aceite total

	Oliva 1	Girasol 2	Soja 2	Sacha inchi	Pescado 2
Triglicéridos	58,5	73,3	52,1	56,2	55,6
Diglicéridos	19,4	8,3	24,0	20,3	21,5
EGHTy + Monoglicéridos	16,5	15,0	18,0	16,5	15,1
Ácidos grasos libres	5,0	3,0	4,2	6,9	7,7
HTy libre	0,6	0,4	1,7	0,1	0,1

#### 5.2.2.4. Análisis del perfil glicérico, EGHTy y HTy por CG

Mediante análisis directo por CG de los aceites silanzados se han determinado los perfiles de las familias glicéricas y fenólicas que componen un aceite fortificado *in situ* con alta concentración de EGHTy, con el fin de caracterizarlo. En la Figura 41 se muestra el cromatograma de aceite de oliva y donde pueden verse las zonas siguientes: HTy,

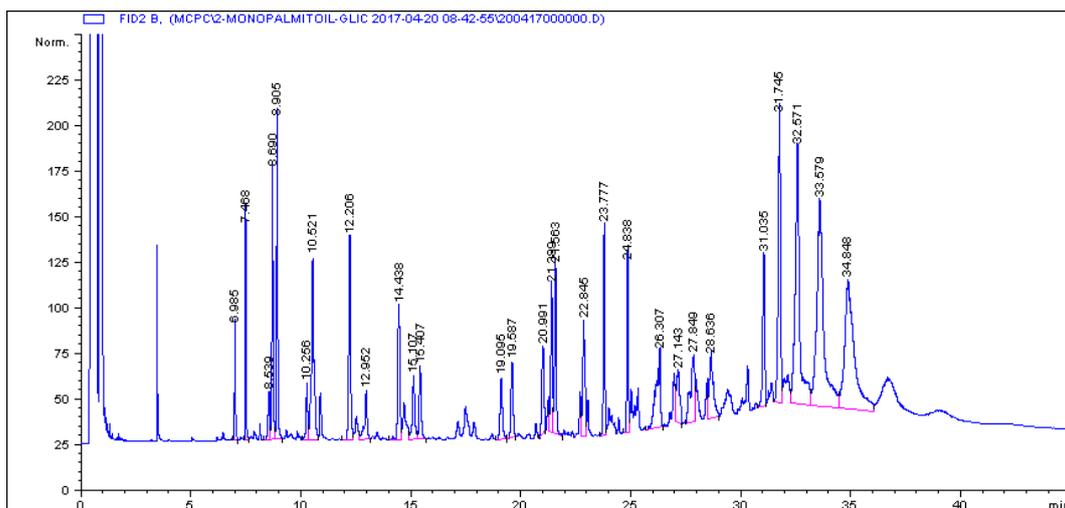
ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, ésteres de HTy, diacilgliceroles y triacilgliceroles.



**Figura 41**

Perfil por CG de aceite de oliva fortificado. 1, HTy; 2, ácido graso libre C16:0; 3, ácidos grasos libres C18:1+ C18:2; 4, ácido graso libre C18:0; 5, monoglicéridos; 6, ésteres C16:0 de HTy; 7, ésteres C18:0 + C18:1 + C18:2 de HTy; 8, diglicéridos; 9, triglicéridos

En el caso del aceite de pescado (Figura 42) el perfil cromatográfico es mucho más complejo debido al gran número de ácidos grasos que componen este aceite.



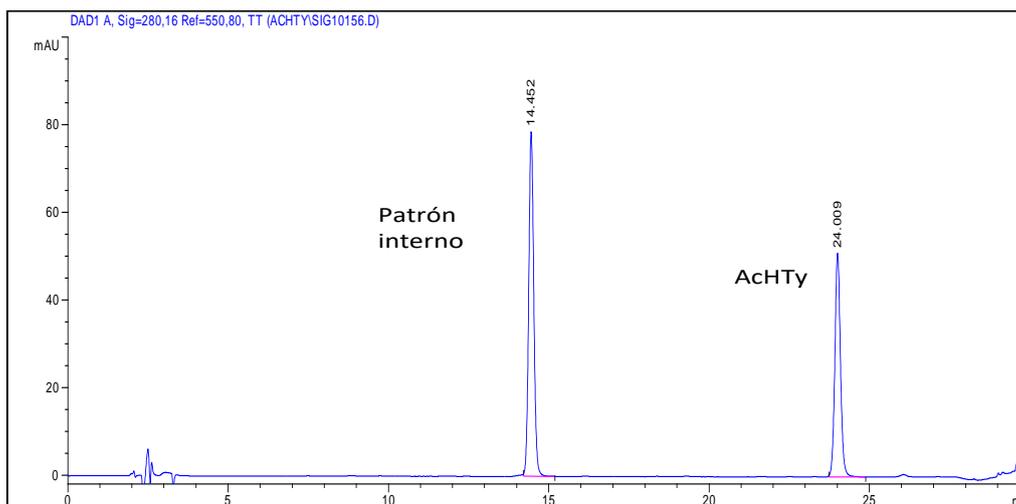
**Figura 42**

Perfil por CG de aceite de pescado fortificado

### 5.2.3. Capacidad antioxidante de ésteres de hidroxitirosilo

Estudios anteriores realizados por el método Rancimat® con AcHTy y diversos EGHTy en matrices purificadas obtenidas de diferentes aceites mostraron que sus capacidades antioxidantes eran equiparables entre si y que la actividad desarrollada en la matriz dependía de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol (Romero-Segura, 2010), componente habitual de los aceites vegetales. En el presente trabajo se exponen experimentos de oxidación por el procedimiento *open cup* a 25 °C y Rancimat® a 100 °C para corroborar los resultados antes obtenidos. Debido a que el AcHTy es el éster de más fácil y económica obtención y que tiene un comportamiento antioxidante similar al de los EGHTy, se ha optado por realizar los ensayos con dicho compuesto.

Para la determinación de AcHTy se ha aplicado el método descrito en el apartado 4.8.1. que es una adaptación del descrito para derivados de HTy en aceites de oliva consistente en EFS-diol y detección CLAE-UV en fase inversa (Mateos *et al.*, 2001). Básicamente se ha reducido la cantidad de muestra, así como la cantidad de patrón interno, a la vez que se han simplificado los lavados en la EFS y se ha modificado el gradiente de elución en la CLAE de modo que sólo eluyan los compuestos fenólicos sencillos como el AcHTy y el patrón interno (Figura 43).



**Figura 43**

Cromatograma CLAE de la fracción fenólica de una muestra de matriz de aceite de oliva purificada a  $\lambda = 280$  nm; Ácido *p*-hidroxifenilacético (patrón interno) = 14,4 min; Acetato de hidroxitirosilo = 24,0 min

Se ha procedido a determinar la exactitud y repetibilidad del método modificado. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11**  
Exactitud y repetibilidad del método de determinación de [AChTy] por EFS-diol y CLAE-UV

Muestra	Nominal (mmol/kg)	Media <sup>a</sup> (mmol/kg)	CV <sub>r</sub> (%) <sup>b</sup>	E (%) <sup>c</sup>
1	100	105	8,0	5,0
2	200	210	6,9	5,0
3	500	526	6,7	5,2
4	900	934	5,7	3,8

a) n=3

b) CV<sub>r</sub>= coeficiente de variación de la repetibilidad

c) E= exactitud

#### 5.2.3.1. Oxidación *open cup* a 25 °C de matrices lipídicas

Matrices de aceite de oliva purificado (oliva 2) se sembraron con AChTy,  $\alpha$ -T y la mezcla de ambos y se sometieron a oxidación por el sistema *open cup* a 25 °C y al abrigo de la luz, para comparar su capacidad antioxidante y comprobar el efecto que los tocoferoles, propios de los aceites vegetales, tienen sobre la actividad de los ésteres de hidroxitirosilo.

##### 5.2.3.1.1. Oliva sembrada con $\alpha$ -tocoferol

En las matrices de aceite de oliva purificado sembradas con 0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mmol/kg de  $\alpha$ -T se observó que el índice de peróxidos (IP) aumentaba de forma continua desde el principio hasta la semana 25 sin que la diferencia de concentraciones fuera relevante (Figura 44). Únicamente se apreció un incremento brusco del IP con las concentraciones menores (0,1 y 0,2 mmol/kg) que coincidió con la total desaparición del  $\alpha$ -T (Figura 45), mientras que el incremento en las concentraciones 0,5 y 0,9 mmol/kg fue mucho menos acusado porque todavía quedaba  $\alpha$ -T. La matriz libre de antioxidantes mostró un PI de 12,6 horas y las sembradas con 0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mmol/kg fueron 26, 32, 35 y 36 semanas respectivamente, lo que indica un fuerte efecto del  $\alpha$ -T sobre la generación de peróxidos.

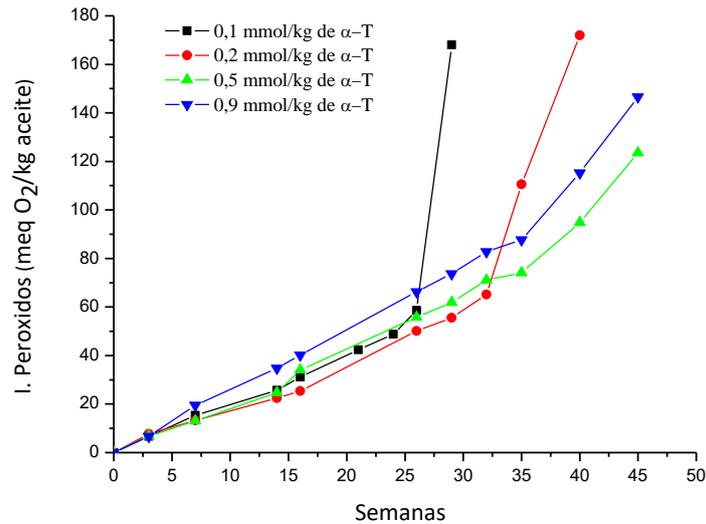


Figura 44

Influencia de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol sobre el índice de peróxidos durante la oxidación de una matriz de aceite de oliva purificado a 25 °C en recipiente abierto *open cup*

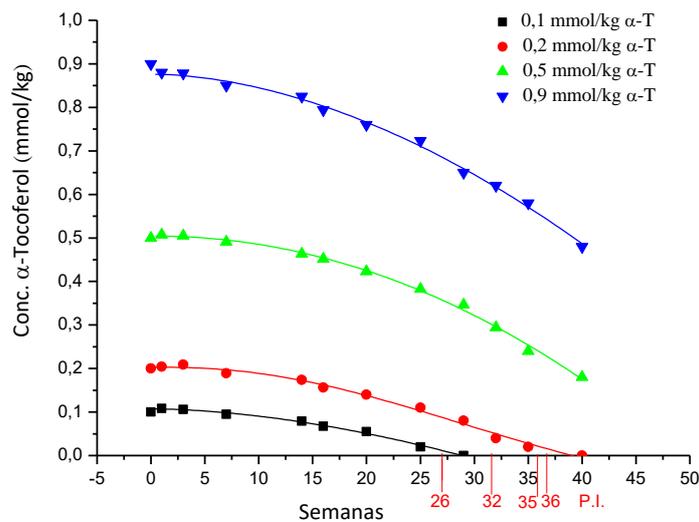


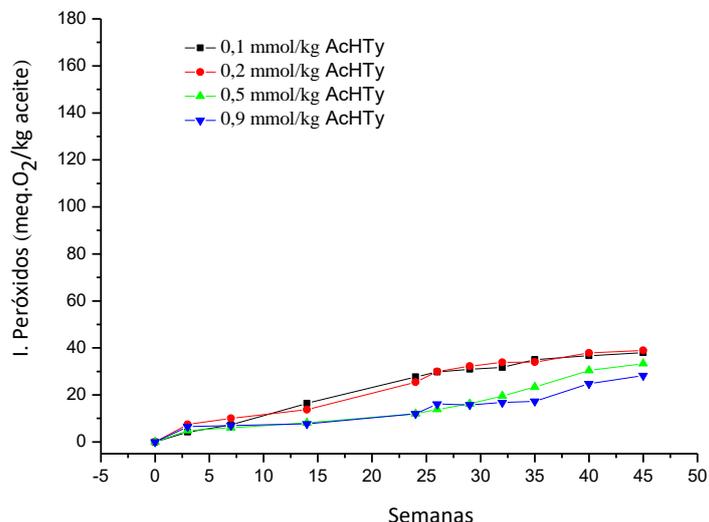
Figura 45

Evolución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol durante la oxidación de una matriz de aceite de oliva purificado a 25 °C en recipiente abierto

### 5.2.3.1.2. Oliva sembrada con AcHTy

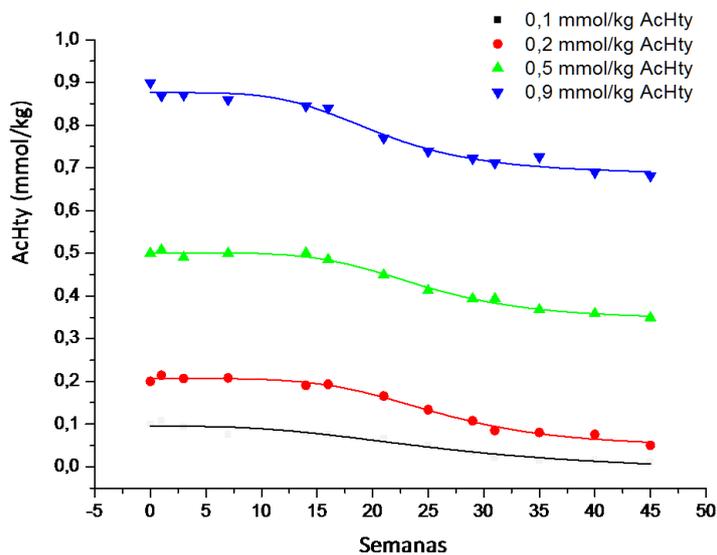
Los experimentos de oxidación *open cup* a 25 °C de la matriz purificada de aceite de oliva expuestos en el punto anterior se repitieron usando AcHTy en vez de  $\alpha$ -T. Comparando los resultados (Figura 46) con los del  $\alpha$ -T (Figura 44) se aprecia claramente que el AcHTy ejerce un efecto mucho mayor que el  $\alpha$ -T, puesto que al cabo de 45 semanas no se observa el final del periodo de inducción, incluso para la concentración

más baja (0,1 mmol/kg) debido a que queda AcHTy (Figura 46). Tanto con AcHTy como con  $\alpha$ -tocoferol, la concentración de antioxidante influyó poco en la cantidad de peróxidos formados.



**Figura 46**

Influencia de la concentración de AcHTy sobre el índice de peróxidos durante la oxidación de una matriz de aceite de oliva purificado a 25 °C en recipiente abierto

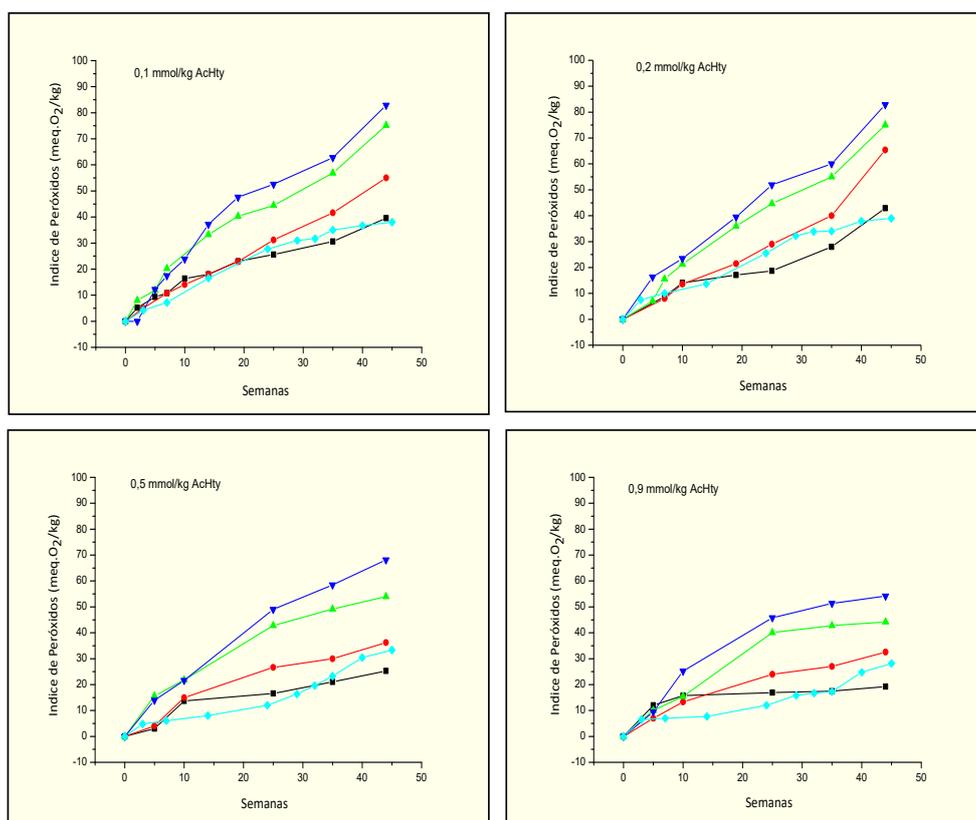


**Figura 47**

Disminución de las concentraciones de acetato de hidroxitirosilo en matrices de aceite de oliva purificado conteniendo AcHTy, durante el proceso de oxidación en recipiente abierto a 25 °C

5.2.3.1.3. Oliva sembrada con las mezclas de  $\alpha$ -tocoferol y AcHTy

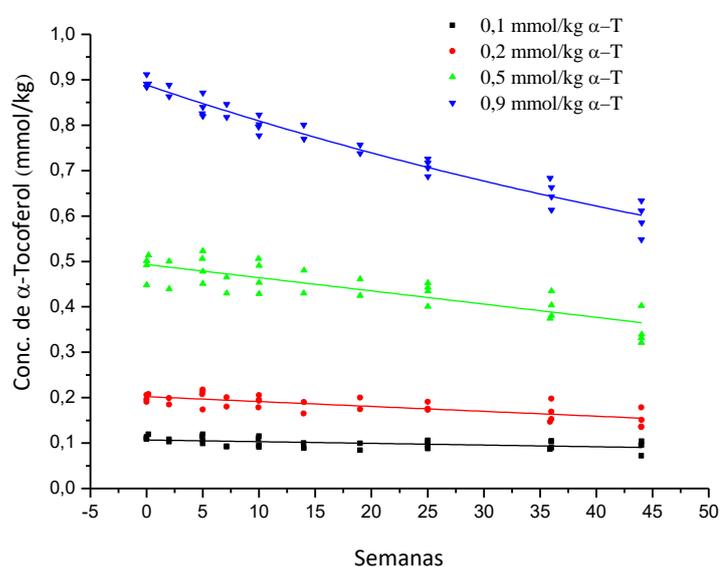
Las matrices de aceite de oliva purificado que contienen mezclas de  $\alpha$ -tocoferol y acetato de hidroxitirosilo muestran índices de peróxidos más elevados que las que sólo contienen el antioxidante fenólico, excepto los casos en que la cantidad de tocoferol es baja (0,1 mmol/kg) que presentan valores relativamente cercanos (Figura 48). El aumento del índice de peróxidos es más elevado cuanto mayor es la cantidad de tocoferol presente. Por el contrario, la presencia del fenol reduce el índice de peróxidos con respecto al que se observa en las matrices que sólo contienen tocoferol a un mismo tiempo de oxidación (Figura 44). Por tanto la adición de acetato de hidroxitirosilo a un aceite que contiene  $\alpha$ -tocoferol reduce el aumento del índice de peróxidos durante la oxidación. Por otra parte, la elevación gradual del índice de peróxidos no ha permitido determinar el periodo de inducción. Sensorialmente no se han detectado indicios de rancidez en las muestras.



**Figura 48**

Evolución del índice de peróxidos en matrices de aceite de oliva purificado conteniendo mezclas de  $\alpha$ -tocoferol y 0,1, 0,2, 0,50 y 0,9 mg/kg de acetato de hidroxitirosilo durante su oxidación en recipiente abierto a 25 °C. ■- 0,1 mmol/kg  $\alpha$ -T; ●- 0,2 mmol/kg  $\alpha$ -T; ▲- 0,5 mmol/kg  $\alpha$ -T; ▼- 0,9 mmol/kg  $\alpha$ -T; ◆- sin  $\alpha$ -tocoferol (sólo AcHTy)

La disminución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en las matrices de aceite de oliva purificado conteniendo ambos antioxidantes es mayor cuanto mayor es la concentración inicial, excepto a baja concentración (0,1 mmol/kg) que permanece prácticamente constante (Figura 49). Esta disminución es mucho menor que la observada en matrices que sólo contienen  $\alpha$ -tocoferol (Figura 45). Debe destacarse el hecho de que la concentración de AcHTy tiene poca influencia en la magnitud de la pérdida de  $\alpha$ -T puesto que los valores para cada concentración y tiempo son similares para todas las concentraciones de AcHTy (0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mmol/kg). Por tanto, la presencia del AcHTy protege de la oxidación al  $\alpha$ -tocoferol, reduciendo su disminución.

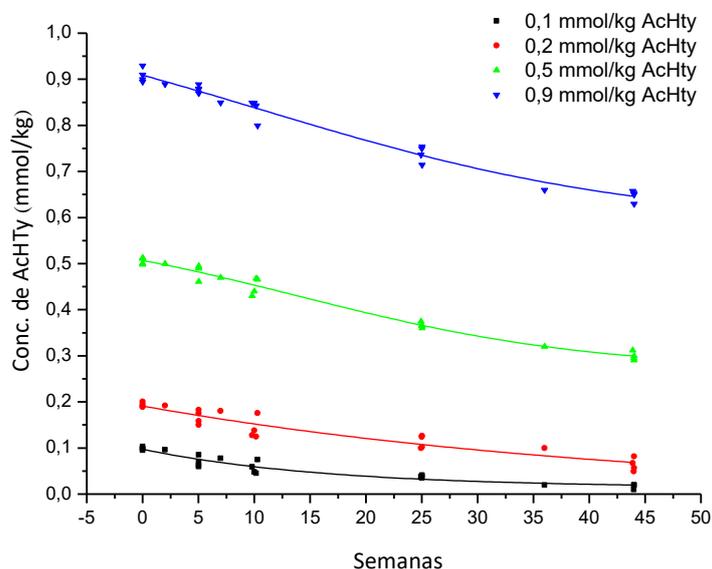


**Figura 49**

Disminución de las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en matrices de aceite de oliva purificado conteniendo  $\alpha$ -tocoferol y acetato de hidroxitirosilo (0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mmol/kg) durante el proceso de oxidación en recipiente abierto a 25°C

De forma similar a lo que ocurre con el  $\alpha$ -tocoferol, la disminución de la concentración de AcHTy es mayor cuanto mayor es la concentración inicial, aunque también se observa disminución en la concentración más baja (0,1 mmol/kg) (Figura 50). Comparando estos resultados con los de las matrices que sólo contienen AcHTy (Figura 47), se observa que la disminución es mayor en el caso de altas concentraciones (0,5 y 0,9 mmol/kg) de antioxidante fenólico, mientras que a concentraciones más bajas (0,1 y 0,2 mmol/kg) la disminución es similar o ligeramente inferior. En la disminución de compuesto fenólico tiene poca influencia la concentración de  $\alpha$ -tocoferol puesto que los valores para cada concentración y tiempo son similares para las diferentes

concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol (0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mmol/kg). Estos resultados sugieren que el  $\alpha$ -T actúa como prooxidante cuando en el medio existen concentraciones mayores de 0,2 mmol/kg de acetato de hidroxitirosilo.



**Figura 50**

Disminución de las concentraciones de acetato de hidroxitirosilo (AcHTy) en matrices de aceite de oliva purificado conteniendo diferentes concentraciones de AcHTy y  $\alpha$ -tocoferol (0,1, 0,2, 0,5 y 0,9 mol/kg), durante el proceso de oxidación en recipiente abierto a 25 °C

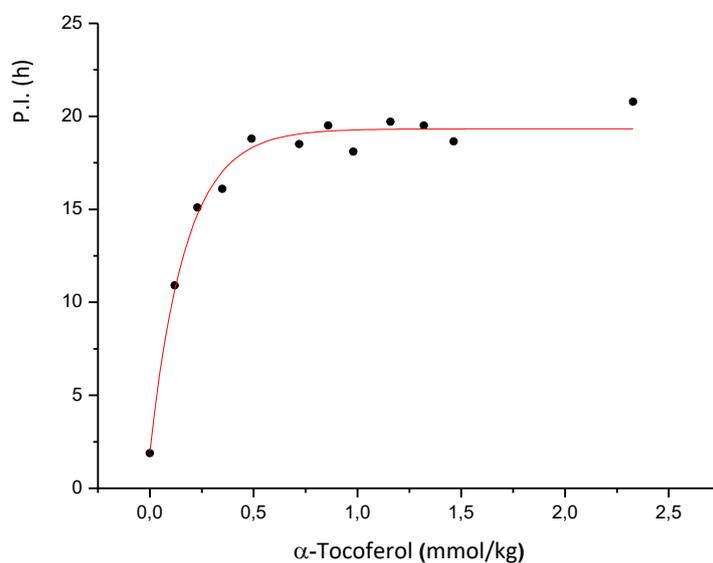
### 5.2.3.2. Oxidación acelerada en equipo Rancimat®

#### 5.2.3.2.1. Aceite de girasol alto oleico sin purificar sembrado con $\alpha$ -T y AcHTy

En muchos aceites vegetales comestibles es práctica habitual la adición de antioxidantes para aumentar su estabilidad y por tanto su vida útil. Sin embargo en trabajos anteriores realizados por este grupo de investigación con matrices glicerídicas sembradas con  $\alpha$ -tocoferol e hidroxitirosol, se observó que la estabilidad Rancimat alcanza un valor máximo a partir de determinadas concentraciones de antioxidantes y que este valor máximo dependía del tipo de antioxidantes, de las concentraciones relativas entre ellos y de la composición glicerídica de la matriz (Mateos R., 2002), por lo que se realizaron experimentos con  $\alpha$ -T, AcHTy y la mezcla de ambos.

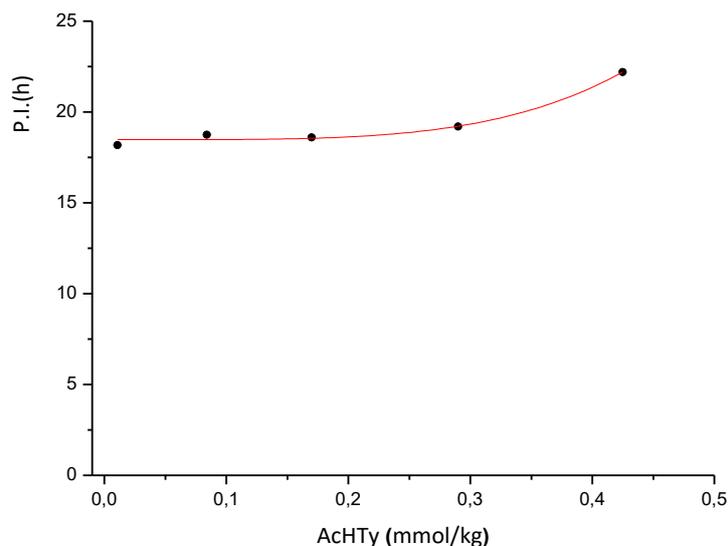
Para efectuar los ensayos se eligió aceite un de girasol alto oleico porque tenía una composición en ácidos grasos similar a la del aceite de oliva, un contenido de 1,47 mmol/kg (630 ppm) de  $\alpha$ -tocoferol y carecía de compuestos fenólicos, lo que permitió

utilizarlo sin purificar conservando todos sus componentes menores. Se prepararon varias muestras por mezcla de dicho aceite con distintas cantidades del mismo aceite purificado (sin  $\alpha$ -tocoferol) así como una muestra por adición de  $\alpha$ -tocoferol. El análisis de las muestras (Figura 51) mostró que a concentraciones de  $\alpha$ -T mayores que 0,6 mmol/kg (250 ppm), el periodo de inducción permaneció prácticamente constante (18 horas), confirmando que la estabilidad Rancimat a 100 °C no aumenta por adición de  $\alpha$ -T a partir de una determinada concentración ( $\approx$ 200 ppm). La adición de diversas cantidades de acetato de hidroxitirosilo a dicho aceite de girasol mostró que sólo a partir de concentraciones mayores de 0,3 mmol/kg (130 ppm) se observa un leve incremento del periodo de inducción (Figura 52).



**Figura 51**

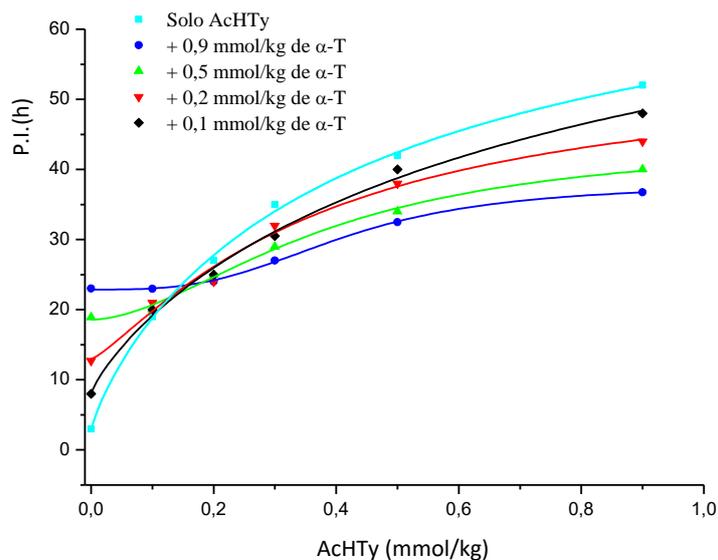
Periodos de inducción (PI) de aceite de girasol alto oleico conteniendo diversas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en equipo Rancimat® a 100 °C

**Figura 52**

Periodos de inducción (PI) a de aceite de girasol alto oleico conteniendo 624 ppm de  $\alpha$ -tocoferol y diversas concentraciones de AcHTy en equipo Rancimat® a 100°C

#### 5.2.3.2.2. Estabilidad Rancimat a 100 °C de matrices glicerídicas sembradas con $\alpha$ -tocoferol y AcHTy

Para ello se prepararon matrices glicerídicas de aceite de oliva virgen purificado sembradas con  $\alpha$ -T y AcHTy en diversas proporciones y se determinaron sus estabildades en un aparato Rancimat a 100 °C. Los periodos de inducción de las diferentes muestras se indican en la Figura 53. Cuando la matriz no contiene antioxidantes su estabilidad son 3 horas y a medida que se añaden cantidades crecientes de  $\alpha$ -tocoferol, el periodo de inducción aumenta, hasta alcanzar 7,5 veces la inicial. Este mismo efecto se observa cuando a la matriz purificada se le añaden cantidades crecientes de AcHTy, aunque en este caso el aumento es de 17 veces, lo que nos indica que el AcHTy es mucho más activo que el  $\alpha$ -tocoferol.

**Figura 53**

Periodos de inducción (PI) de matrices glicéridicas sembradas con acetato de hidroxitirosilo y  $\alpha$ -tocoferol

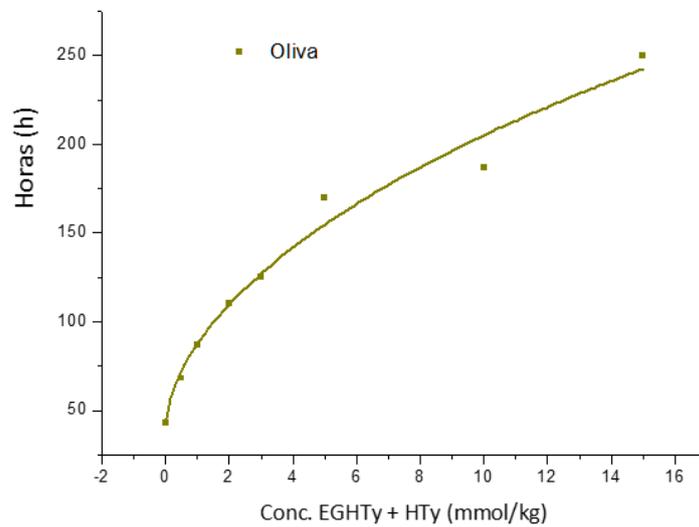
Cuando ambos compuestos están presentes, el efecto antioxidante depende de la concentración relativa entre ambos. Así, para una concentración baja de AcHTy (<0,1 mmol/kg) cantidades crecientes de  $\alpha$ -T aumentan la estabilidad, aunque no de forma proporcional a las cantidades añadidas. A una concentración alrededor de 0,15 mmol/kg de AcHTy, la presencia de  $\alpha$ -T apenas afecta a la estabilidad. Sin embargo, a partir de una concentración de 0,2 mmol/kg de AcHTy, cualquier cantidad de  $\alpha$ -T no sólo no aporta mayor estabilidad a la muestra sino que al contrario disminuye la efectividad conseguida con el AcHTy. La disminución es mayor cuanto mayor es la cantidad de tocoferol.

#### 5.2.3.3. Estabilidad Rancimat de aceites con diferente grado de insaturación sembrados con aceite de alta concentración de EGHTy

Para evitar interferencias de los EGHTy a ensayar con los propios antioxidantes naturales de los aceites, se ha realizado una primera experiencia utilizando matrices purificadas de aceite de oliva 1, girasol 2, soja 2, sachá inchi y pescado 2, a las que se le han añadido cantidades crecientes de aceite fortificado con alta concentración de EGHTy + HTy obtenido por síntesis *in situ* con aceite de oliva purificado, resultando concentraciones de compuestos fenólicos de 0,0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, y 15 mmol/kg. Se ha procedido a estudiar la estabilidad Rancimat a 100 °C de las matrices de oliva, girasol,

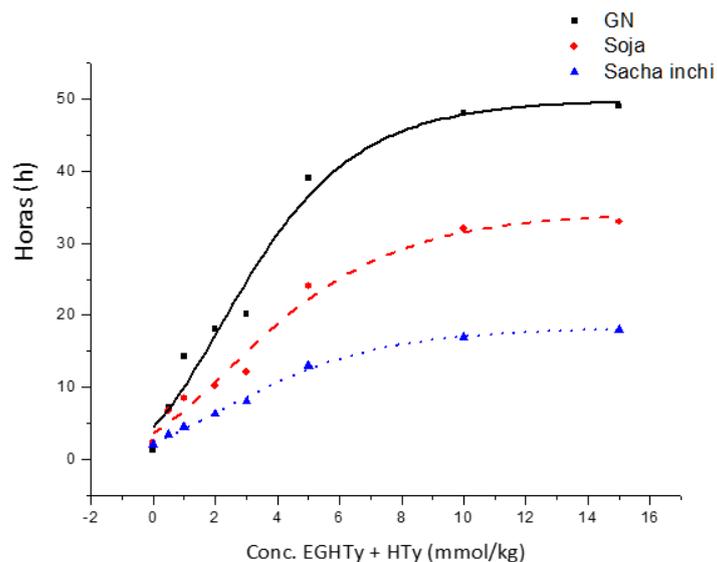
soja y sachá inchi (Figuras 55 y 55) y también a 80 °C de sachá inchi y pescado (Figura 56), matrices que tienen muy diferente grado de insaturación.

Como era de esperar se observa un aumento de la estabilidad con la concentración de EGHTy + HTy, siendo mayor la cantidad de antioxidante necesaria añadir para alcanzar la misma estabilidad a mayor nivel de insaturación de la matriz excepto en el caso del aceite de pescado que mostró menor estabilidad que el sachá inchi que es más insaturado. Este resultado sugiere que en la estabilidad aparte del grado de insaturación también tiene influencia la estructura de los ácidos grasos y que los poliinsaturados son especialmente sensibles a la oxidación.



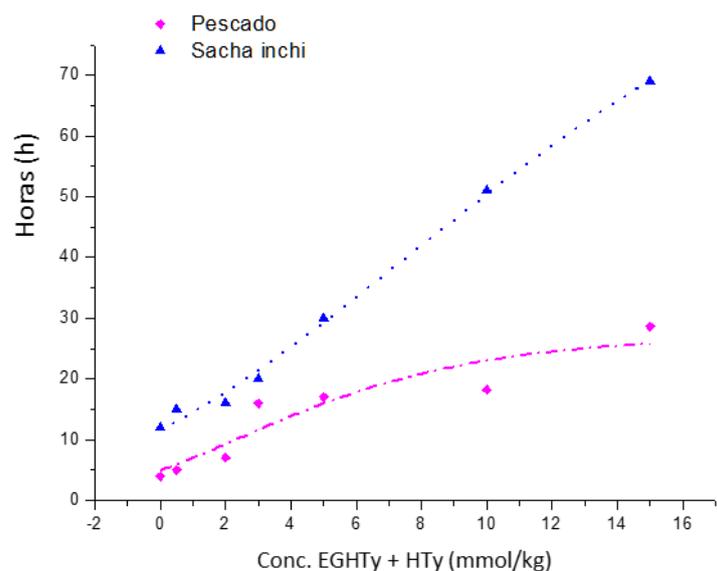
**Figura 54**

Estabilidad Rancimat a 100 °C de matriz de aceite de oliva purificado, fortificado con aceite de alta concentración de EGHTy + HTy



**Figura 55**

Estabilidad Rancimat a 100 °C de matrices de aceites de girasol normal (GN) soja y sachá inchi purificados, fortificados con aceite de alta concentración de EGHTy+HTY



**Figura 56**

Estabilidad Rancimat a 80 °C de matrices de aceites de sachá inchi y pescado purificados, fortificados con aceite de alta concentración de EGHTy + HTY

#### 5.2.3.4. Estimación de la vida útil de diferentes aceites comerciales enriquecidos con EGHTy contenidos en aceites fortificados *in situ*

Se ha estimado la *vida útil* de los aceites comerciales de oliva 1, girasol 2, soja 2, sachá inchi y pescado 2 a los que se le han añadido concentraciones de 100, 200 y 400 ppm de EGHTy + HTy contenidos en aceites fortificados *in situ*.

El contenido en tocoferoles de los diferentes aceites se muestra a continuación en la Tabla 12.

**Tabla 12**  
Contenido en tocoferoles de los diferentes aceites comerciales

Aceite comercial	$\alpha$ -Tocoferol	$\beta$ -Tocoferol	$\gamma$ -Tocoferol	$\delta$ -Tocoferol	TOTAL
Oliva 1	88	3	18	< 2	109
Girasol 2	361	42	10	< 2	413
Soja 2	323	40	312	125	800
Sacha inchi	< 2	< 2	1100	843	1943
Pescado 2	53	< 2	< 2	< 2	53

En las Tablas 13-15 se muestra el número de horas de la estabilidad Rancimat de los aceites dopados con las diferentes concentraciones de antioxidantes obtenidas a distintas temperaturas. A partir de los datos recogidos en dichas tablas se han construido la gráfica donde se han extrapolado logarítmicamente las rectas hasta temperaturas inferiores a 25 °C, con el objetivo de estimar la *vida útil* de los aceites si éstos estuvieran almacenados a una temperatura de 25 °C (Figura 57).

**Tabla 13**  
Estabilidad Rancimat de aceite de girasol, soja y sacha inchi con concentraciones de EGHTy + HTy de 0, 100, 200 y 400 ppm, a diferentes temperaturas para el cálculo estimado de la *vida útil* a 25 °C

[EGHTy + HTy]	SACHA INCHI				SOJA				GIRASOL			
	0	100	200	400	0	100	200	400	0	100	200	400
70 °C	42,5	43,1	50,2	60,3	127,3	145	165	175,9	108,7	124,2	138,7	163
80 °C	18,5	19,2	25,2	28,8	60,2	66,9	76,6	92,1	49,1	56,1	60,0	70,0
90 °C	7,8	8,1	10,6	12,1	27,7	27,6	36,5	41,3	22,9	25,0	28,5	30,6
100 °C	4,0	4,1	5,1	5,8	13,6	14,2	17,4	21,9	11,2	12,1	13,1	15,2
meses, 25 °C	2,1	2,1	2,3	3,0	5,1	6,9	6,6	6,0	4,5	5,7	6,4	7,9

**Tabla 14**

Estabilidad Rancimat de aceite de oliva con concentraciones de EGHTy + HTy de 0, 100, 200 y 400 ppm, a diferentes temperaturas para el cálculo estimado de la *vida útil* a 25 °C

[EGHTy + HTy]	OLIVA			
	0	100	200	400
90 °C	67,7	93,4	102,0	132,5
100 °C	29,5	45,7	52,8	59,8
110 °C	13,9	19,1	22,3	25,4
120 °C	5,9	9,5	9,9	12,1
meses, 25 °C	17,9	20,3	25,5	34,3

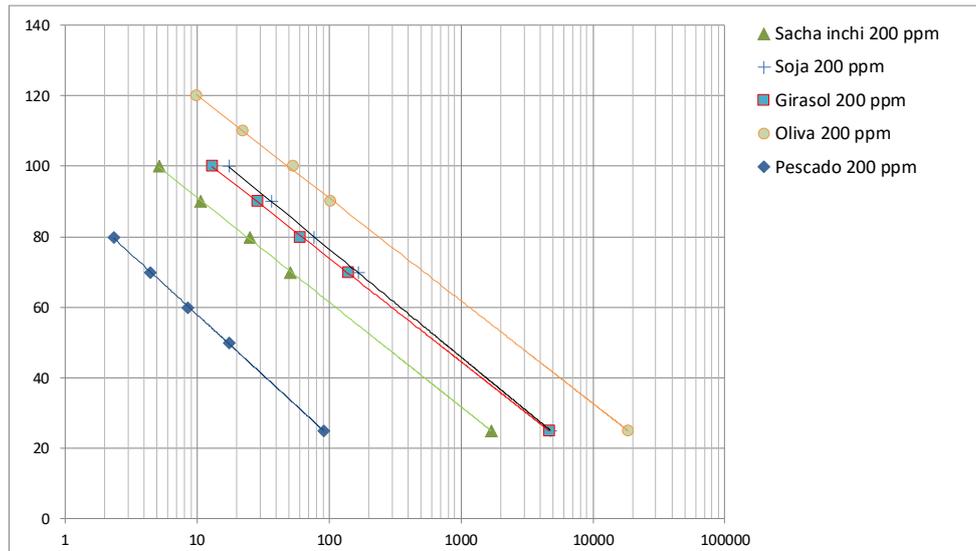
**Tabla 15**

Estabilidad Rancimat de aceite de pescado con concentraciones de EGHTy + HTy de 0, 100, 200 y 400 ppm, a diferentes temperaturas para el cálculo estimado de la *vida útil* a 25 °C

[EGHTy + HTy]	PESCADO			
	0	100	200	400
50 °C	15,4	15,7	17,4	21,1
60 °C	7,37	8,27	8,4	10,6
70 °C	3,66	4,1	4,42	5,68
80 °C	1,83	2,15	2,32	3
días, 25 °C	3,7	3,5	3,8	4,4

En el caso del pescado la *vida útil* es muy corta (sólo días) lo que indica que para obtener una buena estabilidad es necesaria una mayor concentración de antioxidante.

Se puede observar que el incremento en la concentración del antioxidante en general alarga la *vida útil* de los aceites excepto en el caso del aceite de soja en el que ocurre que concentraciones de antioxidante fenólico mayores de 100 ppm no aumentan la *vida útil*, en contradicción con un aumento del periodo de inducción a todas las temperaturas en las que se ha determinado (Tabla 13).



**Figura 57**  
Representación logarítmica de la estimación de la *vida útil*  
de aceites de oliva, girasol, soja, sachá inchi y pescado

Este hecho puede ser debido a la acción de los diferentes tocoferoles que contiene este aceite o, más probablemente, a que la hipótesis que relaciona la vida útil a 25 °C con la estabilidad Rancimat a temperaturas elevadas es sólo una aproximación que puede tener sus desviaciones.



## 6. CONCLUSIONES

- 1<sup>a</sup>. Las actividades antioxidantes de los alquil éteres de hidroxitirosilo (AEHTy) en matrices lipídicas con diferente grado de insaturación son muy superiores a la del  $\alpha$ -tocoferol y ligeramente mayores que las de los ésteres grasos de hidroxitirosilo (EGHTy), presentando una capacidad levemente superior los elementos con cadena alquílica de mediana longitud.
- 2<sup>a</sup>. Las acciones antioxidantes tanto de los AEHTy como del acetato de hidroxitirosilo (AcHTy) se ven afectadas por la presencia de  $\alpha$ -tocoferol, de forma que a bajas concentraciones de fenol la presencia del tocoferol produce un aumento de la actividad, mientras que a altas concentraciones del mismo se produce una disminución. La concentración de derivado de HTy a la cual se produce la inversión del efecto es mayor cuanto más alto es el grado de insaturación del aceite.
- 3<sup>a</sup>. Tanto los AEHTy como el AcHTy muestran una alta actividad antioxidante cuando se añaden a aceites comerciales, que dependerá de su concentración y la de  $\alpha$ -tocoferol, así como del grado de insaturación y tipo de ácido graso poliinsaturado de la matriz lipídica.
- 4<sup>a</sup>. Pequeñas cantidades tanto de AEHTy como de AcHTy ejercen un efecto protector sobre el contenido en tocoferoles y permiten prolongar la vida útil de los aceites durante su comercialización
- 5<sup>a</sup>. Se ha investigado la obtención de aceites con una alta concentración de EGHTy por reacción *in situ* de los triacilglicerolos con el HTy disperso en un soporte sólido, en presencia de la lipasa *Candida antarctica* como catalizador. Se han estudiado las condiciones óptimas de las variables de la reacción, tales como temperatura, cantidad de enzima, relación HTy/aceite y soporte sólido, consiguiéndose un método rápido, sencillo, económico y de fácil implantación en la industria

- 6<sup>a</sup>. Se han caracterizado los aceites con alta concentración de EGHTy obtenidos por dicho proceso, mediante su composición en ácidos grasos, perfiles de glicéridos y de EGHTy, así como contenido total en EGHTy e HTy solubilizado.
- 7<sup>a</sup>. El aceite resultante puede ser utilizado tal cual como aditivo antioxidante con carácter funcional para alimentos grasos comprobándose que mejora la *vida útil* de aceites comerciales con diferente grado de insaturación.
- 8<sup>a</sup>. Finalmente, se han puesto a punto métodos analíticos para determinar HTy, AEHTy, EGHTy, AcHTy y compuestos glicéricos en los diferentes tipos de aceites y matrices lipídicas empleadas en los estudios mediante la aplicación de la extracción en fase sólida y el análisis por CLAE-UV, CLAE de exclusión molecular y cromatografía de gases.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achmon, Y.; Fishman, A. The antioxidant hydroxytyrosol: biotechnological production challenges and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1119-1130.
- AECOSAN **2015-001**. Report of the scientific committee of the Spanish agency for consumer affairs, food, safety and nutrition (AECOSAN) on a request for initial assessment for marketing of synthetic hydroxytyrosol under Regulation (EC) No 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients. Seprox Biotech S. L.
- Alcudia, F.; Cert, A.; Espartero, J.L.; Mateos, R.; Trujillo, M. Process for the preparation of hydroxytyrosol esters for use as additives in food, cosmetics and pharmaceutical compositions. *PCT Int. Appl. WO2004005237*, **2004**.
- Almeida, B.; Joglar, J.; Rojas, M.J.L.; Decara, J.M.; Macías-González, M.; Romero, M.; Fitó, M.; Muñoz-Aguayo, D.; Covas, M.I.; Farré M.; Rodríguez, F.; de la Torre, R. Unsaturated fatty alcohol derivatives of olive oil phenolic compounds with potential low-density lipoprotein (LDL) antioxidant and antiobesity properties. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1067-1074.
- Almeida, J.; Losada-Barreiro, S.; Costa, M.; Paiva-Martins, F.; Bravo-Díaz, C.; Romsted, L.S. Interfacial concentrations of hydroxytyrosol and lipophilic esters in intact olive oil-in-water emulsions: Effects of antioxidant hydrophobicity, surfactant concentration, and the oil-to-water ratio on the oxidative stability of the emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5274-5283.
- Aluyor, E. O.; Ori-Jesu, M. The use of antioxidants in vegetable oils – A review. *Afr. J. Biotechnol* **2008**, *7*, 4836-4842.

American Oil Chemist's Society (AOCS). Method Cd 12b-92. Oil Stability Index. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society, **1998**, 5<sup>th</sup> Ed. AOCS, Champaign, IL.

Ammendola, s.; Giusti, A.M.; Masci, A.; Mosca, L.; Saso, L.; Bovicelli, P. Antioxidant properties of hydroxytyrosyl acetate compared with hydroxytyrosol and their protective capacity against oxidative stress in human neuroblastoma cells. *J. Sci. Ind. Res.* **2011**, *70*, 929-937.

Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Corona, F.; Mellerio, G. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1996**, *736*, 195-203.

Aparicio-Soto, M.; Sánchez-Hidalgo, S.; González-Benjumea, A.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G.; Alarcón de la Lastra, C. Naturally occurring hydroxytyrosol derivatives: Hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenylglycol modulate inflammatory response in murine peritoneal macrophages. Potential utility as new dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *63*, 836-846.

Aparicio-Soto, M.; Sánchez-Hidalgo, S.; Cárdeno, A.; González-Benjumea, A.; Fernández-Bolaños, J.G.; Alarcón de la Lastra, C. Dietary hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl acetate supplementation prevent pristane-induced systemic lupus erythematosus in mice. *J. Func. Foods*, **2017**, *29*, 84-92.

Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G. C. Chemoselective esterification of phenolic acids and alcohols. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3839-3841.

Auñón, D.; Canut, L.; Visioli, F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 498-504.

Auñón-Calles, D.; Giordano, E.; Bohnenberger, S.; Visioli, F. Hydroxytyrosol is not genotoxic in vitro. *Pharmacol. Res.* **2013**, *74*, 87-93.

- Baraldi, P.G.; Simoni, D.; Manfredini, S.; Menziani, E. Preparation of 3',4'-dihydroxy-1-benzeneethanol: a reinvestigation, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 684-686.
- Belmonte-Reche, E.; Martínez-García, M.; Peñalver, P.; Gómez-Pérez, V.; Lucas, R.; Gamarro, F.; Pérez-Victoria, J.M. Tyrosol and hydroxytyrosolderivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 132-140.
- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. 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* **2007**, *12*, 1679-1719.
- Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 8897-8904.
- Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. **2008b**, Method for preparing hydroxytyrosol and hydroxytyrosol derivatives. PCT/IB2008/000598.
- Bernini, R.; Guillardini, M.S.; Merendino, N.; Romani, A., Velotti, F. Hydroxytyrosol-derived compounds: A basis for the creation of new pharmacological agents for cancer prevention and therapy. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9089-9107.
- Bianco, A.; Coccioli, F.; Guiso, M.; Marra, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chem.* **2001**, *77*, 405-411.
- Bouallagui, Z.; Bouaziz, M.; Lassoued, S.; Engasser, J.M.; Ghoul, M.; Sayadi, S. Hydroxytyrosol acyl esters: Biosynthesis and activities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 592-599.
- Brenes, M.; García, P.; Garrido, A. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5178-5183.

- Brenes, M.; García, A.; Dobarganes, M.C.; Velasco, J.; Romero, R. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5962-5967.
- Buisman, G.J.H.; Helteren, C.T.W.; Kramer, G.F.H.; Veldsink, J.W.; Derksen, J.T.P.; Cuperus, F.P. Enzymatic esterification of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol.Lett.* **1998**, *20*, 131-136.
- Burattini, S.; Salucci, S.; Baldassarri, V.; Accorsi, A.; Piatti, E.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Candiracci, M.; Zappia, G.; Falcieri, E. Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 248-256.
- Calderon-Montaña, J.M.; Madrona, A.; Burgos-Moron, E.; Orta, M.L.; Mateos, S.; Espartero, J.L.; and Lopez-Lazaro, M. Selective cytotoxic activity of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5046-5053.
- Carrasco-Pancorbo, A.; Cerretani, R.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Gallina-Toschi, T.; Fernández-Gutiérrez, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.*, **2005**, *28*, 837-858.
- Caruso, D.; Colombo, R.; Patelli, R.; Giavarini, F., Galli, G. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1182-1185.
- Chimi, H.; Sadik, A.; Le Tutour, B.; Rahmani, M. Comparative study of antioxidant abilities of tyrosol, hydroxytyrosol, caffeic acid, oleuropein and BHT in olive oil. *Rev. Fr. Corps Gras.* **1998**, *35*, 339-344.
- Covas, M.I.; Fitó, M.; De la Torre, M. Minor bioactive oils components and health: Key data for their role in providing health benefits in humans. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, Boskou, D. Ed. AOCS Press, Urbana, IL, USA, **2015**, pp 31-52.

- D'Angelo, S.; Manna, C.; Migliardi, V.; Mazzoni, O.; Miorrica, P.; Capasso, G.; Pontoni, G.; Galletti, P.; Zappia, V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism Disp.* **2001**, *29*, 1492-1498.
- Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Oliverio, M.; Procopio, A.; Russo, B.; Tocci, A. Erbium(III) chloride: a very active acylation catalyst. *Austr. J. Chem.* **2006**, *60*, 75-79.
- De la Cruz, J.P.; Ruíz-Moreno, M.I.; Guerrero, A; Reyes, J.J.; Benítez-Guerrero, A.; Espartero, J.L.; González-Correa, J.A. Differences in the neuroprotective effect of orally administered virgin olive oil (*Olea europaea*) polyphenols tyrosol and hydroxytyrosol in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2015a**, *63*, 5957-5963.
- De la Cruz, J.P.; Ruíz-Moreno, M.I.; Guerrero, A; López-Villodres, J.A.; Reyes, J.J.; Espartero, J.L.; Labajos, M.T.; González-Correa, J.A. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J. Nutr. Biochem.* **2015b**, *26*, 549-555.
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ). *EFSA J.* **2004**, *84*, 1-50.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. *EFSA J.* **2011a**, *9*, 2392-2440.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. *EFSA J.* **2011b**, *9*, 2033-2058.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2588-2630.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3642-3687.

European Union. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods. *Off. J. Eur. Commun.* **2012**, *L136*, 1-3, 24.

European Union. Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 relative to characteristics of olive oil and olive pomace oil and on its analytical methods. Annex III, Determination of peroxide value, *Off. J. Eur. Commun.* **1991**, *L248*, 27-28

Fan, L.; Eskin, N.A.M. The use of antioxidants in the preservation of edible oils. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Shaidi, F. Ed. Woodhead Pu., Cambridge, U.K. **2015**, pp 373-388.

FAO/WHO. Codex-Stan 192-**1995**. Norma general para los aditivos alimentarios, Última revisión 2016.

FAO/WHO. Codex-Stan 210-**1999**. Standard for specified vegetable oils. Revision 2009, Amended 2013.

Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R. Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree. *US 6849770 B2*, **2005**.

Fernandez-Bolaños, J.G.; Fernández-Bolaños, J.; Rodriguez-Gutierrez, G. Hydroxytyrosol and Derivatives: Isolation, Synthesis, and Biological Properties. *Current Org. Chem.* **2007**, *12*, 442-463.

Fernández-Bolaños, J.G.; López, O.; López-García, M.A.; Maset, A. Biological properties of hydroxytyrosol and derivatives. In *Olive oil-constituents, quality, health properties and bioconversions*. Boskou, D. Ed. **2012**, In Tech Europe, Rijeka, Croatia.

- Fki, I.; Alloche, N.; Sayadi, S. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: A potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem.* **2005**, *93*, 197-204.
- Frankel, E. N. *Lipid oxidation*. **2005**, 2<sup>nd</sup> Ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Gallardo, E.; Madrona, A.; Palma-Valdés, R. Trujillo, M.; Espartero, J.L.; Santiago, M. The effect of hydroxytyrosol and its nitroderivatives on catechol-*O*-methyl transferase activity in rat striatal tissue. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 61086-61091.
- Gallardo, E.; Madrona, A.; Palma-Valdés, R.; Espartero, J.L.; Santiago, M. Effect of intracerebral hydroxytyrosol and its nitroderivatives on striatal dopamine metabolism: A study in vivo microdialysis. *Life Sci.* **2015**, *134*, 30-35.
- Gallardo, E.; Palma-Valdés, R.; Sarriá, B.; Gallardo, I.; de la Cruz, J.P.; Bravo, L.; Mateos, R.; Espartero, J.L. Synthesis and antioxidant activity of alkyl nitroderivatives of hydroxytyrosol. *Molecules*, **2016**, *21*, 656-668.
- Gambacorta, A.; Tofani, D.; Bernini, R.; Migliorini, A. High-yielding preparation of a stable precursor of hydroxytyrosol by total synthesis and from the natural glycoside oleuropein. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3386-3391.
- Gómez-Romero, M.; García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Metabolism and bioavailability of olive oil polyphenols. In *Olive oil constituents, quality, health properties and bioconversions*. **2012**, Boskou, D. Ed., In Tech Europe, Rijeka, Croatia.
- González-Correa, J.A.; Navas, M.D.; Muñoz-Marín, J.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; De la Cruz, J.P. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetyl salicylic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 7872-7876.

- González-Correa, J.A.; Navas, M.D.; López-Villodres, J.A.; Trujillo, M.; Espartero, J.L.; De la Cruz, J.P. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neur. Lett.* **2008b**, *446*, 143-146.
- González-Correa, J.A.; López-Villodres, J.A.; Asensi, R.; Espartero, J.L.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; De la Cruz, J.P. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Brit. J. Nutr.* **2009**, *101*, 1157- 1164.
- Gordon, M. H.; Paiva-Martins, Almeida, M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2480.
- Granados-Principal, S.; Quiles, J.L.; Ramírez-Tortosa, C.L.; Sanchez-Rovira, P.; Ramírez-Tortosa, M.C. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr.Rev.* **2010**, *68*, 191-206.
- Grasso, S.; Siracusa, L.; Spatafora, C.; Renis, M.; Tringali, C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 137-152
- Guerrero, A.; De La Cruz, J.P.; Munoz-Marin, J.; Lopez-Villodres, J.A.; Madrona,A.; Espartero, J.L.; Gonzalez-Correa, J.A. Neuroprotective effect of alkylhydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chem.* **2012**, *134*, 2176–2183.
- Hrncirik, K. and Fritsche, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 540-549.
- International Olive Council (IOC). Preparation of fatty acid methyl esters, COI/T.20/Doc. N<sup>o</sup> 24, Method A, **2001**.

International Olive Council (IOC). Determination of fatty acid trans isomers by gas chromatography. COI/T20/Doc N° 17, Rev1, Method B, **2001**.

International Olive Council (IOC). Determination of 2-glyceryl monopalmitate by gas chromatography. COI/T.20/Doc. N° 23, **2006**.

International Olive Council (IOC). Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography, COI/T.20/Doc. N° 33, **2015**.

Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), (**1992**). Método 2.432 Determination of tocopherols in vegetable oils by HPLC. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 1st supplement to 7th Ed., Pergamon, Oxford.

Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), (**1987**). Standard Method 2.507: Determination of polar compounds in frying fats. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th ed. (ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford).

International Organization for Standardization. ISO 3961:**2013**. Determination of iodine value.

International Organization for Standardization. ISO 6885:**2006**. Revised 2016. Animal and vegetable fats and oils. Determination of anisidine value.

International Organization for Standardization. ISO 6886:**2016**. Animal and vegetable fats and oils. Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test).

International Organization for Standardization. ISO 9936:**2016**. Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.

- Kamal-Eldin, A.; Budilarto, E. Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Shaidi, F. Ed. Woodhead Pu., Cambridge, U.K. **2015**, pp 141-159.
- Larrosa, M.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Antioxidant capacity of tomato juice functionalized with enzymatically synthesized hydroxytyrosol. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 658-666.
- Laszlo, J.A.; Cermak, S.C.; Evans, K.O.; Compton, D.L.; Evangelista, R.; Berhow, M.A. Medium-chain alkyl esters of tyrosol and hydroxytyrosol antioxidants by cuphea oil transesterification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 363-371.
- Lee, Y.Y.; Crauste, C.; Wang, H.; Leung, H.H.; Vercauteren, J., Galano, J.M.; Oger, C.; Durand, T.; Man-Fan Wan J.; Chung-Yung Lee, J. Extra virgin olive oil reduced polyunsaturated fatty acid and cholesterol oxidation in rodent liver: Is this accounted for hydroxytyrosol-fatty acid conjugation? *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1689-1698.
- Liberatore, L.; Procida, G.; D'Alexandro N.; Cichelli, A. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chem.* **2001**, *73*, 119-124.
- Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodríguez, G.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; Espartero, J.L. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules* **2009**, *14*, 1762- 1772.
- Martin Cerdeño, V.J. Consumo de aceite de oliva. Universidad Complutense. En *Distribución y consumo*. **2015**, vol. 5, pag. 28-34, Mercasa Ed. Madrid.
- Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Ríos, J.J.; Leon, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2185-2192.

- Mateos, R. Caracterización de componentes fenólicos del aceite de oliva. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Junio **2002**
- Mateos, R.; Dominguez, M.; Espartero, J.L.; Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds,  $\alpha$ -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7170-7175.
- Mateos, R.; Trujillo, M.; Pérez-Camino, M.C.; Moreda, W.; Cert, A. Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, *53*, 5766-5771.
- Mateos, R.; Goya, Luís; Bravo, L. Metabolism of the olive oil phenols hydroxytyrosol, tyrosol, and hydroxytyrosyl acetate by human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005b**, *53*, 9897-9905.
- Mateos, R.; Trujillo, M.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Cert, A.; Espartero, J.L. New lipophylic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10960-10966.
- Mateos, R.; Pereira-Caro, G.; Saha, S.; Cert, R.; Redondo-Horcajo, M.; Bravo, L.; Kroon, P.A. Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayers. *Food Chem.* **2011**, *125*, 865–872.
- Mateos, R.; Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Domínguez, V.; Cert, R.M.; Parrado, J.; Sarriá, B.; Bravo, L.; Espartero, J.L. Synthesis and antioxidant evaluation of isochroman-derivatives of hydroxytyrosol: Structure-activity relationship. *Food Chem.* **2015**, *173*, 313-320.
- Mateos, R.; Martínez-López, S.; Baeza-Arévalo, G.; Amigo-Benavent, M.; Sarriá, B., Bravo, L. Hydroxytyrosol in functional hydroxytyrosol-enriched biscuits is highly bioavailable and decreases oxidized low density protein level in humans. *Food Chem.* **2016**, *205*, 248-256.

- Mukai, K.; Noborio, S.; Nagaoka, S. Why is the order reversal? Peroxyl-scavenging activity and fat-and-oils protecting activity of vitamin E. *Int. J. Chem. Kinetics* **2005**, *37*, 605-610.
- Medina, I.; Lois, S.; Alcántara, D.; Lucas, R.; Morales, J.C. Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9773-9779.
- Mukai, K.; Noborio, S.; Nagaoka, S. Why is the order reversal? Peroxyl-scavenging activity and fat-and-oils protecting activity of vitamin E. *Int. J. Chem. Kinetics* **2005**, *37*, 605-610.
- Muñoz-Marin, J.; De La Cruz, J.P.; Guerrero, A.; Lopez-Leiva, I.; Lopez-Villodres, J.A.; Reyes, J.J.; Espartero, J.L.; Madrona, A.; Labajos, M.T.; Gonzalez-Correa, J.A. Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7659–7664.
- Munoz-Marin, J.; De La Cruz, J.P.; Reyes, J.J.; Lopez-Villodres, J.A.; Guerrero, A.; Lopez-Leiva, I.; Espartero, J.L.; Labajos, M.T.; Gonzalez-Correa, J.A. Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *58*, 295–300.
- Nakatania, N.; Tachibanab, Y.; Kikuzaki, H. Establishment of a Model Substrate Oil for Antioxidant Activity Assessment by Oil Stability Index Method. *JAOCs.* **2001**, *78*, 19-22.
- Nissinen E. *Basic aspects of Catechol-O-methyltransferase and the clinical applications of its inhibitors*. 1st Ed., **2010**, Academic Press, New York.
- Oliverio, M.; Narde, M.; Cariati, L.; Vitale, E.; Bonacci, S.; Procopio, A. “On water” MW-assisted synthesis of hydroxytyrosol fatty esters. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 661-665.

- Pazos, M.; Alonso, A.; Sánchez, I.; Medina, I. Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3334-3340.
- Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J.L.; Alcudia, F.; Cert, A.; Mateos, R. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosyl derivatives. *Food Chem.* **2009**, *115*, 86-91.
- Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Saha, S.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Bravo, L.; Kroon, P.A. Transepithelial transport and metabolism of new lipophilic ether derivatives of hydroxytyrosol by enterocyte-like Caco-2/TC7 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010a**, *58*, 11501–11509.
- Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madona A.; Espartero, J.L., Mateos, R., Uptake and metabolism of new synthetic lipophilic derivatives, hydroxytyrosyl ethers, by human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010b**, *58*, 798-906.
- Pereira-Caro, G.; Sarriá, B.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Goya, L.; Bravo, L. *et al.* Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5964–5976.
- Pereira-Caro, G.; Sarriá, B.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Escudero M.E.; Mateos, R. Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl hydroxytyrosyl ethers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**, *63*, 703-707.
- Porter, W.L.; Black, E.D.; Drolet, A.M. Use of polyamide oxidative fluorescent test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 615-624.
- Procopio, A.; Celia, Ch.; Nardi, M.; Oliverio, M.; Paolino, D.; Sindona, G. Lipophilic hydroxytyrosol esters: Fatty acid conjugates for potential topical administration. *Int. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2377-2381.
- Puleva Biotech S.A. 09/10/**2003**, WO03082792 A1.

- Ray, N.B.; Lam, N.T.; Luc, R.; Bonvino, N.P.; Karagiannis, C. Cellular and molecular effects of bioactive phenolic compounds in olives and olive oil. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, Boskou, D., Ed. AOCS Press, Urbana, IL, USA, **2015**, pp 53-92.
- Reyes, J.J.; De la Cruz, J.P.; Munoz-Marin, J.; Guerrero, A.; Lopez-Villodres, J.A.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Gonzalez-Correa, J.A. Antiplatelet effect of new lipophylic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 591–599.
- Rodríguez, G.; Villanueva, E.; Glorio, P.; Baq, M. Estabilidad oxidativa y estimación de la vida útil del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Scientia Agropecuaria.* **2015**, *6* (3): 155 – 163.
- Rodríguez-Morató, J.; Boronat, A.; Kotronoulas, A.; Pujadas, M.; Pastor, A.; Olesti, E.; Pérez-Maña, C.; Khymenets, O.; Fitó, M.; Farré, M.; de la Torre, R. Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metab. Rev.* **2016**, *48*, 218-236.
- Romero-Segura, A. Caracterización y estabilidad de aceites funcionalizados con esteres de hidroxitirosilo. **2010**, *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla.
- Rosillo, M.A.; Sánchez-Hidalgo, M.; González-Benjumea, A.; Fernández-Bolaños, J.M.; Lubberts, E.; Alarcón de la Lastra, C. Preventive effects of dietary hydroxy tyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol, in murine collagen-induced arthritis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 2537-2546.
- Sabatini, N. Recent Patents in Olive Oil Industry: New Technologies for the Recovery of Phenols Compounds from Olive Oil, Olive Oil Industrial by-Products and Waste Waters. *Recent Pat Food Nutr. Agric.* **2010**, *2*, 154-159.
- Souilem, S.; Fki, I.; Kobayashi, I.; Khalid, N.; Neves, M.A.; Isoda, H.; Savadi, S.; Nakajima, M. Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and

their applications in food/feed industries. *Food Bioprocess Technol.* **2017**, *10*, 229-248.

Tabernero, M.; Sarriá, B.; Largo, C.; Martínez-Lopez, S.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Bravo, L.; Mateos, R. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesteremic rats. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1556-1563.

Tassano, E.; Alama, A.; Basso, A.; Dondo, G.; Galatini, A.; Riva, R.; Banfi, L. Conjugation of hydroxytyrosol with other natural phenolic fragments: From waste to antioxidants and antitumour compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6710-6726.

Tofani, D.; Balducci, V.; Gasperi, T.; Incerpi, S.; Gambacorta, A. Fatty acid hydroxytyrosyl esters: Structure/antioxidant activity relationship by ABTS and in cell-culture DCF assays. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5292-5299.

Torregiani, E.; Seu, G.; Minassi, A.; Appendino, G. Cerium(III) chloride-promoted chemoselective esterification of phenolic alcohols. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2193-2196.

Torres de Pinedo, A.; Peñalver, P.; Rondón, D.; Morales J.C. Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7654-7660.

Torres de Pinedo, A.; Peñalver, P.; Pérez-Victoria, I.; Rondón, D.; Morales J.C. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food Chem.* **2007**, *105*, 657-665.

Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes de Terán, L.; Espartero, J.L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcludia, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779-3785.

Trujillo, M.; Gallardo, E.; Madrona, A.; Bravo, L.; Sarriá, B.; González-Correa, J.A.; Mateos, R.; Espartero, J.L. Synthesis and antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol and its acyl derivatives. *J. Agri. Food Chem.* **2014**, *62*, 10297-10303.

Vazquez-Roncero, A.; Maestro-Durán, R.; Graciani-Constante, E. Polyphenol changes in olive fruits during ripeness. *Grasas y Aceites* **1971**, *22*, 366-370.

Vazquez-Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M.L.; Determination of total polyphenols in olive oil. *Grasas y Aceites* **1973**, *24*, 350-357.

Yoshida, H.; Kondo, I.; Kajimoto, G. (1992). Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**. *69*, 1136-1140.