



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN OXIDATIVA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN: COMPUESTOS FENÓLICOS

María Barbero López





UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica

Grado en Farmacia

**ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN OXIDATIVA
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN:
COMPUESTOS FENÓLICOS**

Trabajo Fin de Grado

Trabajo Experimental

Autora: María Barbero López

Tutoras: María Teresa Morales Millán y María Teresa Montaña González

Sevilla, a 3 de Julio de 2017

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Definición y categorización del aceite de oliva	3
1.2. Composición	5
1.3. Compuestos fenólicos	5
1.4. Proceso de degradación: oxidación del aceite de oliva	8
1.5. Métodos de análisis	11
1.5.1. Técnicas de extracción	11
1.5.2. Técnicas de separación analítica y caracterización	12
1.6. Aceite de oliva virgen y plantas aromáticas	13
2. Objetivos	14
3. Metodología	15
3.1. Muestras	15
3.2. Reactivos y materiales	15
3.3. Aparatos e instrumentos	16
3.4. Procedimiento analítico	17
3.4.1. Preparación del patrón interno	17
3.4.2. Extracción en fase sólida	17
3.4.3. Separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	18
3.5. Tratamiento de datos	19
4. Resultados y discusión	21
4.1. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	21
4.2. Precisión de los patrones internos	23
4.3. Evolución de compuestos fenólicos durante el almacenamiento	24
4.4. Comparación con las muestras aderezadas	27
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30

RESUMEN

El aceite de oliva virgen contiene compuestos fenólicos cuyo contenido varía dependiendo de la zona de cultivo, el clima, la variedad y maduración de la aceituna. Estos compuestos son los que producen las notas sensoriales de amargo y picante y aportan al aceite cierta estabilidad gracias a su destacada capacidad antioxidante. A pesar de esto, el aceite de oliva virgen puede sufrir un proceso de rancidez afectando a su vida útil, valor nutricional y características organolépticas, y cambiando el perfil de los compuestos fenólicos.

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tras una extracción en fase sólida, permite evaluar la presencia y variación de los compuestos fenólicos a lo largo del tiempo, y utilizarlos como indicadores del proceso oxidativo.

El estudio de la alteración oxidativa del aceite de oliva virgen se ha realizado almacenándolo durante 8 meses en condiciones ambientales de temperatura y luz, y realizando un análisis mensual por duplicado. Para ello, se llevó a cabo la preparación de la muestra mediante extracción en fase sólida en fase diol, como técnica de preconcentración de fenoles, para posteriormente ser reconstituidos y analizados mediante HPLC.

Paralelamente, se añadieron plantas aromáticas, romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) y albahaca (*Ocimum basilicum*, L.), al aceite de oliva virgen para estudiar el efecto que producían sobre la variación de la vida útil. Dichas plantas son ricas en volátiles y en compuestos antioxidantes. A lo largo del proceso de almacenamiento, se produce una migración de los compuestos antioxidantes de las plantas hacia el aceite, observándose que el proceso oxidativo se retrasa.

Palabras clave: compuestos fenólicos, aceite de oliva virgen, plantas aromáticas, alteración oxidativa, cromatografía líquida de alta resolución.

ABSTRACT

Virgin olive oil contains phenolic compounds whose content varies depending on the area of cultivation, the climate, the variety and the maturation of the olives. These compounds are responsible of bitter and pungent sensory notes and contribute to the stability of the oil, thanks to its outstanding antioxidant capacity. In spite of this, virgin olive oil can undergo a rancidity process affecting its shelf-life, nutritional value and organoleptic characteristics, and changing the profile of the phenolic compounds.

The analysis by means of high performance liquid chromatography (HPLC), after a solid phase extraction, allows to evaluate the presence and variation of the phenolic compounds over time, and to use them as indicators of the oxidative process.

The study of the oxidative alteration of the virgin olive oil was carried out for 8 months under ambient conditions of temperature and light and performing a monthly analysis in duplicate. For this purpose, the preparation of the sample was carried out by solid phase extraction using diol phase, as a technique for the preconcentration of phenols, to be reconstituted and analyzed by HPLC.

In parallel, aromatic plants, rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) and basil (*Ocimum basilicum*, L.), were added to the virgin olive oil to study the effect they had on the variation of the shelf-life. These plants are rich in volatiles and antioxidant compounds. Throughout the storage process, there is a migration of the antioxidant compounds from the plants to the oil, showing that the oxidative process is delayed.

Keywords: phenolic compounds, virgin olive oil, aromatic plants, oxidation, high performance liquid chromatography.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y categorización del aceite de oliva

El aceite de oliva es un alimento fundamental en la dieta mediterránea, siendo su principal fuente de grasas (Suárez, 2010; Douzane y cols., 2013; Peyrol y cols., 2017).

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2016), se considera aceite de oliva al procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea*, L.), con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes o procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Éste en función del proceso de obtención y sus características engloba las siguientes denominaciones (figura 1):

- Aceite de oliva virgen (AOV): obtenido únicamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Entre los aptos para el consumo en la forma en que se obtienen se encuentran:
 - Aceite de oliva virgen extra: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 g por 100 g.
 - Aceite de oliva virgen: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2,0 g por 100 g.
 - Aceite de oliva virgen corriente: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 g por 100 g.

Por otro lado, hay un aceite de oliva virgen no apto para el consumo en la forma en que se obtiene y que se destina al refinado con vistas al consumo humano o a usos técnicos:

- Aceite de oliva virgen lampante: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 3,3 g por 100 g.
- Aceite de oliva refinado: obtenido por refinación de aceites de oliva vírgenes, sin que se hayan producido alteraciones en la estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 g por 100 g.
- Aceite de oliva: constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 g por 100 g.



Figura 1. Clasificación del aceite de oliva.

Sus propiedades sobre la salud han sido ampliamente estudiadas, poniendo de manifiesto sus beneficios en relación a la prevención y/o reducción de hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión, obesidad, diabetes tipo 2, estrés oxidativo, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y cáncer (Moreno y Lezcano, 2015; Parkinson y Cicerale, 2016). Estos efectos beneficiosos se asocian a su composición, en la cual destaca un elevado porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados frente a ácidos grasos saturados, como se muestra en la figura 2. Por otro lado, se ha comprobado que entre los compuestos minoritarios del aceite de oliva se encuentran los compuestos fenólicos, que también contribuyen a su carácter protector. En conjunto, aportan una importante capacidad antioxidante (Carrasco, 2006; Suárez, 2010; Douzane y cols., 2013; Peyrol y cols., 2017).

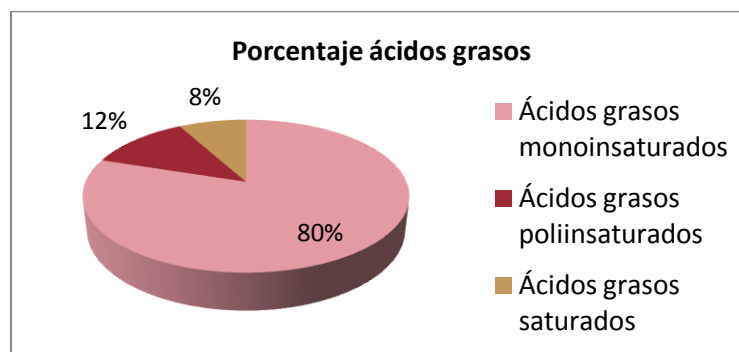


Figura 2. Clasificación porcentual de los ácidos grasos en el aceite de oliva.

1.2. Composición

Químicamente, el aceite de oliva se divide en una fracción saponificable y otra insaponificable (tabla 1). La fracción saponificable es la mayoritaria, representando entre el 98% y el 99% del aceite de oliva, y en su mayoría está constituida por triacilgliceroles. Esta fracción también contiene ácidos grasos libres en proporción y composición variable, que aportan al aceite de oliva el grado de acidez (Carrasco, 2006).

Los constituyentes menores que conforman la fracción insaponificable del aceite de oliva (1-2%) actúan como indicadores de autenticidad y le confieren propiedades sensoriales y biológicas (Barjol, 2013).

Tabla 1. Composición química del aceite de oliva virgen.

Fracción saponificable	Fracción insaponificable
Ácidos grasos	Hidrocarburos
Triacilgliceroles	Esteroles
Monoacilgliceroles	Tocoferoles
Diacilgliceroles	Pigmentos
Ceras	Alcoholes grasos
Fosfolípidos	Compuestos volátiles
	Compuestos fenólicos

1.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio y variado grupo de moléculas que poseen como mínimo un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Presentan una elevada solubilidad en agua, aun así forman parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva (Suárez, 2010).

El porcentaje que representa este grupo de compuestos en el AOV es muy variable, se ve afectado por múltiples factores tales como la zona de cultivo, el clima y la variedad y maduración de la aceituna (Tripoli y cols., 2005).

Cada uno de los compuestos de la fracción fenólica posee diversas propiedades que condicionan la calidad del aceite de oliva (Carrasco, 2006). En el AOV se han descrito más de 36 compuestos fenólicos con estructuras diferentes (Bajoub y cols., 2015). Éstos se pueden agrupar en: ácidos fenólicos, fenoles simples, derivados de oleuropeína, flavonoides, lignanos e hidroxí-isocromonas (tabla 2) (Boskou, 2015; Romero, 2015). Estos compuestos fenólicos

están presentes en diversas familias de frutas y verduras, a excepción de los derivados de oleuropeína que se encuentran únicamente en la familia Oleaceae (Tripoli y cols., 2005).

Tabla 2. Compuestos fenólicos del AOV.

Ácidos fenólicos	Fenoles simples	Derivados de oleuropeína
Ácido siríngico	Hidroxitirosol	Forma dialdehídica de aglicona de oleuropeína (3,4-DPHEA-EA)
Ácido vainílico	Acetato de hidroxitirosol	
Ácido p-cumárico	Tirosol	Forma hidroxílica oxidada de aglicona de oleuropeína (3,4-DHPEA-EDA)
Ácido o-cumárico	Acetato de tirosol	
Ácido gálico	Vainillina	
Ácido cafeico	Lignanos	Forma dialdehídica de
Ácido protocatecuico	(+)-1-Acetoxipinorresinol	descarboximetil aglicona de
Ácido ferúlico	(+)-Pinorresinol	ligustrósido (p-HPEA-EA)
Ácido p-hidroxibenzoico	Flavonoides	Forma hidroxílica oxidada de aglicona de ligustrósido (p-HPEA-EDA)
Ácido cinámico	Apigenina	
Ácido benzoico	Luteolina	Ácido elenólico

La ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos (figura 3) comienza en la ruta del ácido shikímico que tiene como sustratos el fosfoenolpiruvato, proveniente de la glucólisis, y la eritrosa-4-fosfato, de la vía de las pentosas fosfato. Como producto se obtiene la fenilalanina, que entra en la ruta de los fenilpropanoides. En esta ruta actúan tres enzimas (fenilalanina amino liasa, cinamato-4-hidroxilasa y p-cumaril-CoA ligasa) que catalizan a partir de la fenilalanina la formación en cadena del ácido cinámico, ácido p-cumárico y ácido p-cumaril-CoA; a partir de este último se desarrollan rutas complejas que forman ácidos fenólicos y dos tipos de compuestos: los monolignoles, que son los precursores de los lignanos cuya estructura base es el pinorresinol, y los flavonoides, que son derivados de la calcona.

Sin embargo, también requiere de la ruta del ácido mevalónico. Los compuestos secoiridoides que se encuentran en mayor cantidad en la aceituna son la oleuropeína y el ligustrósido. Éstos son biosintetizados por una compleja ruta actualmente no descrita al completo. Varios estudios han propuesto que, partiendo del ácido mevalónico, se dan una serie de conversiones directas seguidas de una esterificación con tirosol para la formación del ligustrósido, y formar la oleuropeína por una hidroxilación final. La concentración de oleuropeína en el fruto aumenta durante su crecimiento y disminuye en la maduración cuando entra en contacto con la β -glucosidasa que produce su hidrólisis. En las fases de elaboración

del aceite este proceso se ve incrementado, de manera que se obtienen derivados de la oleuropeína que son los que pasan al aceite (Casanovas, 2012; Romero, 2015).

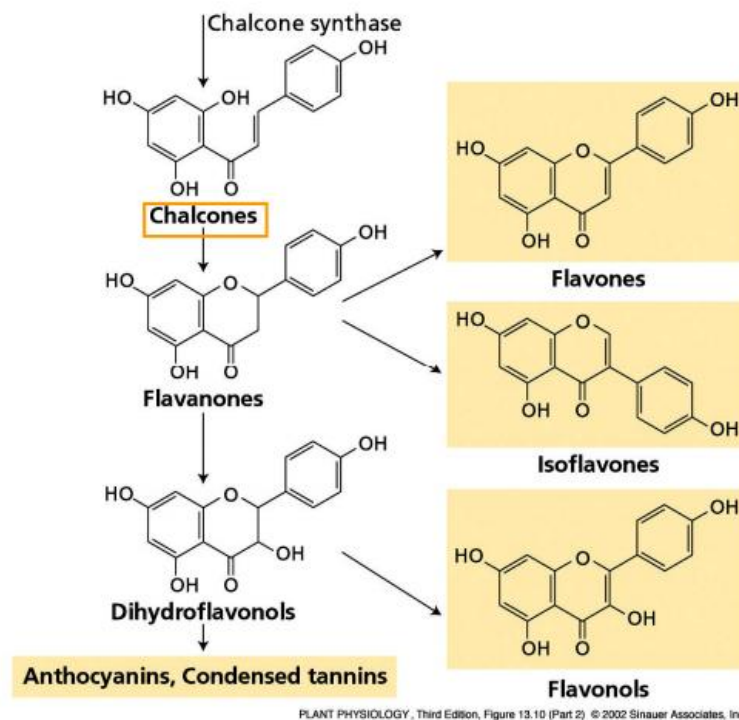
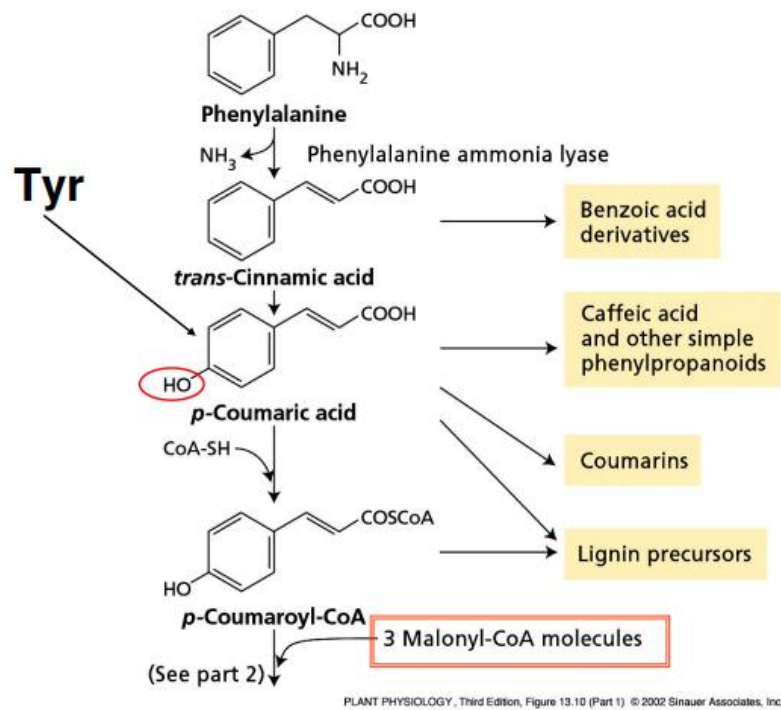


Figura 3. Ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2002).

Los compuestos fenólicos participan en gran medida en el sabor del aceite, concretamente en las notas sensoriales amargo y picante. La intensidad de estos atributos

sensoriales, junto con las notas sensoriales de aroma, son usadas por paneles de catadores para evaluar la calidad del aceite. Por otro lado, es de importancia tener en cuenta el grado de amargor y pungencia de los aceites desde el punto de vista del consumidor, ya que a la mayoría no les agradan los aceites muy amargos y/o muy picantes (Vitaglione y cols., 2013). Se ha relacionado la presencia de derivados de la hidrólisis de oleuropeína con el grado de amargor del AOV (Gutiérrez-Rosales y cols., 2003).

La característica química más destacada de estos compuestos es su capacidad antioxidante, los compuestos fenólicos actúan, junto con ciertas vitaminas, como agentes antioxidantes exógenos. Pueden llevar a cabo esta actividad de diversas maneras, formando quelatos con los iones metálicos que participan en sistemas oxidativos o interfiriendo en la cadena de reacciones desencadenada por los radicales libres (Tripoli y cols., 2005). Hay estudios que respaldan el aporte de protección por parte de los fenoles frente a la autoxidación del aceite, lo que aumenta su estabilidad (Bajoub y cols., 2015; Moreno y Lezcano, 2015).

Estas mismas propiedades antioxidantes les otorgan un papel fundamental entre los atributos saludables del AOV debido al aporte de compuestos bioactivos a la dieta, como se recoge en la alegación de salud del AOV de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que permite la declaración de aquellos aceites con una concentración superior a 250 mg/kg como beneficiosos para la salud (EFSA, 2011).

1.4. Proceso de degradación: oxidación del aceite de oliva

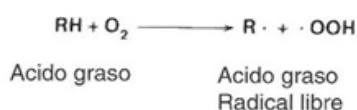
Los dos procesos que generan la degradación de los lípidos del aceite de oliva son la lipólisis o rancidez hidrolítica y la oxidación o rancidez oxidativa (Kiritsakis, 1992).

La lipólisis comienza en el fruto, cuando por acción de la enzima lipasa, tanto endógena como de origen microbiano, se da la hidrólisis de los glicéridos liberando ácidos grasos. Este proceso se traduce en un aumento de la acidez total y cambios en el sabor. Hasta cierto punto, la rancidez hidrolítica puede ser deseable debido a la gran importancia del grado de acidez en la calidad del aceite de oliva. Los principales factores que favorecen la rancidez hidrolítica son la temperatura y la presencia de agua; la temperatura óptima para la actividad de la lipasa es de 45°C, mientras que el agua facilita la acción de la lipasa y potencia el crecimiento microbiano (Kiritsakis, 1992; Morales y Przybylski, 2013).

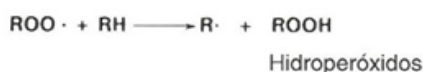
A pesar de la estabilidad que le da la presencia de ácidos grasos monoinsaturados en un alto porcentaje y de antioxidantes como el tocoferol y los compuestos fenólicos, el AOV es susceptible a la oxidación (Morales y cols., 1997; Esposto y cols., 2017), que comienza tras la

extracción del aceite y principalmente durante su almacenamiento (Kiritsakis, 1992; Montañó y cols., 2016), tanto en ausencia de luz (auto-oxidación) como en presencia de la misma (foto-oxidación) (Morales y Przybylski, 2013). La auto-oxidación consta de tres etapas: iniciación, propagación y finalización, detalladas en la figura 4. Lo primero que ocurre es la formación de peróxidos inestables por reacción de un radical libre con una molécula de oxígeno, este primer paso requiere una energía de activación muy elevada. Seguidamente, los peróxidos van a romperse dando lugar a más reacciones y a la formación de hidroperóxidos, hasta que finalmente los mismos radicales libres se inactivan entre sí, este paso se ve acelerado por los antioxidantes ya que no es muy probable que se dé (Kiritsakis, 1992). Por otro lado, la presencia de fotosensibilizadores naturales (clorofila, porfirinas, flavinas) en el aceite puede producir la formación de hidroperóxidos al exponerse a la luz. Los fotosensibilizadores absorben la luz y se excitan, cediendo el exceso de energía a moléculas de oxígeno que reaccionarán con radicales libres. Este mecanismo de oxidación no se ve retardado por la acción de los antioxidantes, pero sí por secuestradores de oxígeno simple como son los quelatos de níquel, el β -caroteno y los tocoferoles (Boskou, 1998; Morales y Przybylski, 2013).

1. Iniciación



2. Propagación



3. Finalización



Figura 4. Mecanismo de auto-oxidación de lípidos.

Los hidroperóxidos, que son productos primarios muy inestables resultantes de la degradación del aceite de oliva, son susceptibles de ser descompuestos en productos secundarios, ciertos compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes, que son los responsables del flavor y aroma desagradables del aceite oxidado. Además, el sabor

amargo del aceite se ve intensificado por la descomposición de compuestos no volátiles (Morales y Przybylski, 2013).

Según varios autores las reacciones de oxidación generan la aparición de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, la degradación de compuestos antioxidantes y la acumulación de radicales libres, los cuales son tóxicos (Esposito y cols., 2017).

Este proceso afecta tanto a la calidad y vida útil del aceite como a su valor nutricional (Krichene y cols., 2015), por ello es de especial interés evitar la exposición a factores que favorezcan la oxidación como son el oxígeno, la temperatura, la luz, los metales y las clorofilas (Esposito y cols., 2017), durante el periodo de almacenamiento. Estudios sobre la estabilidad de los aceites de oliva durante el almacenamiento han establecido que éste no debe prolongarse más de 12-18 meses desde el embotellado hasta el consumo, y que debe llevarse a cabo en condiciones de oscuridad y a temperaturas inferiores a 25°C, con el fin de ralentizar los mecanismos de degradación y prolongar la vida útil. Además, un espacio de cabeza reducido o ausente evitará la oxidación por la limitación de oxígeno (Baiano y cols., 2014; Krichene y cols., 2015).

Al estudiar la degradación de los compuestos fenólicos en diferentes condiciones de almacenamiento se ha comprobado que es mayor cuando es almacenado en envases abiertos y a temperaturas elevadas, concretamente a 50°C aumenta bastante la degradación de estos componentes minoritarios del aceite de oliva (Kichene y cols., 2015).

Para controlar la calidad del aceite de oliva en base al nivel de oxidación se emplean una serie de métodos basados en la medida de productos involucrados en este proceso. Dichos métodos pueden dividirse en dos grupos: los que miden el oxígeno como causa inicial y los productos primarios:

- Consumo de oxígeno, medido mediante cromatografía de gases directamente en el espacio de cabeza.
- Dienos y trienos conjugados, formados durante la formación de radicales peroxidados e hidroperóxidos y permiten hacer una estimación indirecta.
- Índice de peróxidos (IP), que permite calcular el contenido de hidroperóxidos por la metodología basada en el índice de yodo.

Y los que miden los productos secundarios:

- Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA), basada en la reacción del TBA con el malondialdehído que forma un complejo coloreado.

- Compuestos carbonílicos, son los principales responsables del flavor desagradable y se miden colorimétricamente.
- Índice de anisidina (AV), mide por espectrofotometría el producto de la reacción de la *p*-anisidina con compuestos carbonílicos insaturados. Para los aceites de oliva recién refinados se recomienda un AV inferior a 10.
- Análisis de volátiles por cromatografía de gases (Morales y Przybylski, 2013).

1.5. Métodos de análisis

Para permitir un correcto análisis de los compuestos fenólicos del AOV hay que recurrir a un conjunto de técnicas de extracción, separación analítica y caracterización cualitativa y cuantitativa (Bakhouché y cols., 2015).

1.5.1. Técnicas de extracción

Hay estudios que tratan de evaluar la efectividad en el uso de dos métodos de extracción de la fracción fenólica del AOV: extracción en fase sólida (SPE) y extracción líquido-líquido (LLE), en los que se experimentan procesos de extracción empleando diferentes fases sólidas y líquidas con el fin de encontrar el mejor resultado (Bendini y cols., 2003). Este paso es fundamental para separar la fracción fenólica del resto de compuestos del aceite que interfieren en el análisis.

La extracción de compuestos fenólicos puede verse afectada por múltiples factores:

- Tipo de disolvente: debido a la naturaleza hidrofílica de los compuestos fenólicos se consigue una mejor extracción usando mezclas hidroalcohólicas del 70-80% que disolventes orgánicos puros (metanol, etanol, acetona, etc.).
- pH del medio de extracción, en relación a que determina el grado de solubilidad de los fenoles en el disolvente.
- Temperatura de extracción: el uso de temperaturas elevadas (25-30°C), sin llegar a temperaturas que degraden los fenoles, mejora el proceso de extracción.
- Número de veces que se realiza la extracción y volumen de disolvente: se obtienen mejores resultados fraccionando el proceso de extracción y el volumen total de disolvente a usar.
- Tamaño de partícula y forma, ya que determina la superficie de contacto (Suárez, 2010).

1.5.2. Técnicas de separación analítica y caracterización

Durante años se han ido desarrollando métodos analíticos que permitieran la caracterización de los compuestos fenólicos. La prueba colorimétrica de Folin-Ciocalteu ha sido ampliamente utilizada para determinar el contenido fenólico total, además da una buena indicación de la resistencia del AOV a la oxidación (Tsimidou, 2013). Sin embargo, tiene la desventaja de su baja especificidad (Gilbert-López y cols., 2014).

La separación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva se ha conseguido con la aplicación de diversas técnicas cromatográficas acopladas a uno o más detectores, son técnicas muy sensibles y que permiten el análisis individual de los compuestos fenólicos (Suárez, 2010). Entre los diversos procedimientos analíticos se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE), aunque esta última presenta una sensibilidad baja (Carrasco-Pancorbo y cols., 2005; Tsimidou, 2013; Gilbert- López y cols., 2014). De los diferentes detectores, los más usados son los de absorbancia, refractometría, fluorescencia y espectrometría de masas (MS) (Suárez, 2010). Por otro lado, técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR) han sido propuestas para la caracterización e identificación de estos compuestos (Carrasco-Pancorbo y cols., 2005).

La capacidad de la técnica HPLC para separar compuestos fenólicos es bien conocida (Almela y cols., 2006). Es uno de los métodos más utilizados por ser muy sensible y específica, sin embargo requiere un tiempo de aproximadamente una hora para llevar a cabo el análisis completo de una muestra (Tripoli y cols., 2005).

Más recientemente, se ha empleado la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) para el análisis de los compuestos fenólicos obteniéndose mejor relación señal-ruido, mejor resolución y acortando el tiempo de análisis a aproximadamente 18 minutos (Tsimidou, 2013; Gilbert-López y cols., 2014).

Existen ciertas discrepancias en los valores de concentración de los compuestos fenólicos que forman parte del aceite de oliva debido a los diversos factores que afectan a la composición fenólica, a la variedad de técnicas de separación y métodos de cuantificación y a la forma de expresar los resultados (Carrasco-Pancorbo y cols., 2005; Tripoli y cols., 2005; Carrasco, 2016).

1.6. Aceite de oliva virgen y plantas aromáticas

Las plantas aromáticas han sido utilizadas en alimentación desde tiempos antiguos. Éstas mantienen el valor nutricional, mejoran la conservación y prolongan la vida útil de los alimentos, además enriquecen el sabor y el aroma (Ayadi y cols., 2009).

Tienen importantes propiedades antimicrobianas y antioxidantes que se atribuyen principalmente a su composición (Baiano y cols., 2009). Cada vez se utiliza más esta fuente natural de antioxidantes (Gonçalvez y cols., 2017).

Al procesar aceites de oliva con plantas aromáticas se obtienen aceites de oliva aromatizados (Baiano y cols., 2009). El enriquecimiento con plantas aromáticas mejora las propiedades organolépticas del aceite, siempre manteniéndolas dentro de niveles aceptados por el consumidor, y le aporta una importante actividad antioxidante que refuerza la estabilidad frente a la degradación oxidativa, lo que modifica la calidad y vida útil del aceite (Sousa y cols., 2015; Perestrelo y cols., 2017).

Varios estudios han demostrado en los aceites aromatizados una mayor estabilidad frente a la oxidación que en los no aromatizados, encontrando a su vez en los primeros un contenido en compuestos fenólicos mayor (Baiano y cols., 2009).

Concretamente, dos plantas aromáticas muy utilizadas por sus propiedades antioxidantes son el romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) y la albahaca (*Ocimum basilicum*, L.) (figura 5). Los ácidos fenólicos identificados en el romero que principalmente contribuyen a la capacidad antioxidante son el ácido rosmarínico y rosmanol y el ácido carnósico y carnosol (Almela y cols., 2006; D'Evoli y cols., 2006). Por otro lado, los ácidos fenólicos detectados en altas concentraciones en la albahaca y que aportan en mayor grado las propiedades antioxidantes son el ácido rosmarínico, el ácido chicorico, el ácido cafeico y el ácido caftárico (Flanigan y Niemeyer, 2014).



Figura 5. Imagen del romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) y la albahaca (*Ocimum basilicum*, L.).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado consiste en evaluar la alteración oxidativa del AOV y del AOV aderezado a través del análisis de compuestos fenólicos en muestras almacenadas durante un periodo de 8 meses.

Este objetivo se alcanzará mediante una serie de objetivos parciales:

- Identificar y cuantificar el contenido de compuestos fenólicos en la muestra de AOV a lo largo del almacenamiento aplicando la técnica HPLC.
- Determinar la variación en el tiempo de los compuestos fenólicos presentes en las muestras de AOV.
- Evaluar la capacidad de plantas aromáticas, tales como el romero y la albahaca, para disminuir la degradación oxidativa del AOV comparando la degradación oxidativa sufrida por el AOV y el AOV aderezado con plantas aromáticas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestras

El aceite con el que se trabajó para llevar a cabo este estudio fue una muestra comercial de AOV de la variedad Manzanilla, de la campaña 2015/2016. Este aceite se filtró con papel de filtro plegado 1320 y se dividió en recipientes de cristal transparente cerrados de 100 ml, obteniéndose 24 muestras. Las muestras se repartieron en 3 grupos: 8 recipientes que contenían sólo AOV, 8 que contenían AOV junto con hojas de romero secas al 5% p/p y otros 8 que contenían AOV junto con hojas de albahaca secas al 5% p/p (figura 6). Las hojas de las plantas aromáticas que se utilizaron fueron previamente secadas en estufa a 60 °C durante 10 horas.



Figura 6. Muestras de aceite y aceite aderezado con romero y albahaca en envases transparentes (izquierda) y todas las muestras almacenadas en estantería (derecha).

Durante la preparación se intentó que en los recipientes quedase siempre el mismo espacio de cabeza, con el fin de exponer las muestras por igual al oxígeno del aire. Una vez preparadas se dejaron almacenadas en una estantería expuestas a temperatura ambiente y a periodos de luz/oscuridad desde enero hasta agosto (figura 6), retirándose mensualmente una muestra de cada grupo para proceder al análisis de los compuestos fenólicos.

Las muestras se codificaron mediante los códigos ACE para el aceite, ALB para el aceite con la albahaca y ROM para el aceite con romero. El tiempo de almacenamiento se indicó añadiendo a los códigos anteriores un número del 0 al 8, siendo el 0 la muestra inicial y el 8 la correspondiente a 8 meses de almacenamiento.

3.2. Reactivos y materiales

Reactivos

- Metanol (Panreac).
- Hexano (Panreac).
- Ácido p-hidroxifenilacético (Sigma-Aldrich).

- Ácido o-cumárico (Sigma-Aldrich).
- Acetato de etilo (Panreac).
- Agua Milli-Q.
- Ácido orto-fosfórico (Merck).
- Metanol para cromatografía líquida (Merck).
- Acetonitrilo para HPLC (Merck).

Materiales

- Papel de filtro plegado 1320 (Filtros Anovia, S.A. Barcelona, España).
- Matraces en forma de pera de 25 y 50 ml con boca esmerilada y tapón.
- Vasos de precipitado de 25 y 50 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipeta de 100-1000 μ l de Nichiryo.
- Columnas de SPE con fase diol 500mg (Supelclean).
- Jeringas de 1 ml de TERUMO®.
- Agujas 20G de NIPRO.
- Filtros de paso de luz RephiQuik Phobic PTFE de 0.45 μ m.
- Viales color ámbar con tapón para HPLC de 2 ml de Agilent Technologies.
- Insertos para viales de HPLC de 0.2 ml.
- Columna Lichrospher 100 Rp- 18 (250 mm x 4.0 mm d.i.) de fase reversa tipo C18-RP de 5 μ m de tamaño.

3.3. Aparatos e instrumentos

Aparatos

- Rotavapor Heidolph con baño calefactor P Selecta.
- Estación de vacío equipada para la utilización de columnas de SPE (Supelco) (figura 7).



Figura 7. Estación de vacío con columnas de SPE conectada a bomba de vacío.

Instrumentos

- Balanza analítica Mettler AT 200.
- Cromatógrafo HPLC LaChrom Elite de Hitachi equipado con 5 módulos: organizador, detector de matriz de diodos (L-2455), horno (L-2300), inyector automático (L-2200) y bomba (L-2130). El detector de matriz de diodos (DAD) está formado por dos lámparas, una de deuterio y otra de wolframio. La bomba está equipada con accesorios para gradientes de baja presión y un degasificador en línea. El sistema completo se muestra en la figura 8.



Figura 8. Cromatógrafo HPLC equipado con 5 módulos.

3.4. Procedimiento analítico

3.4.1. Preparación del patrón interno

Como patrón interno se usó una disolución de ácido p-hidroxifenilacético (0.12 mg/ml) y de ácido o-cumárico (0.010 mg/ml) en metanol, que es un buen conservante.

3.4.2. Extracción en fase sólida

En un matraz con forma de pera de 50 ml se pesan 2.5 g de muestra a los que se les adicionan 0.5 ml de patrón interno usando micropipeta. Seguidamente, el disolvente del patrón se evapora en rotavapor usando una temperatura de agua aproximada de 30 °C y una velocidad de giro de 200-250 rpm, durante aproximadamente 7-8 minutos. Tras la evaporación completa del disolvente se añaden al matraz 6 ml de hexano y se agita.

Previo al aislamiento de la fracción fenólica mediante SPE, es necesaria la activación de la columna de SPE con fase diol. Para ello, se hacen pasar por la columna 6 ml de metanol seguidos de 6 ml de hexano, evitando la entrada de aire entre los disolventes.

Tras acondicionar la columna de SPE se le adiciona la disolución oleosa aplicando un flujo de vacío de 1 ml/min, pasando el disolvente y quedando retenidos en la fase sólida el aceite y los patrones. Es importante evitar la sequedad de la columna para impedir que se oxiden los compuestos fenólicos.

Se lava el matraz con 3 ml de hexano que se vierten a la columna, y se repite una segunda vez. El hexano permite eliminar los compuestos menos polares que puedan haber quedado retenidos en la fase sólida, como triglicéridos, ceras, tocoferoles e hidrocarburos. La fase de lavado continúa con 3 ml de hexano: acetato de etilo (9:1, v/v). El acetato de etilo eluye los compuestos polares que no interesan, como los triglicéridos oxidados, esteroides y diglicéridos. Todos los disolventes eluidos hasta este punto son desechados.

Finalmente, se recoge en un matraz de 25 ml la parte de la muestra que ha quedado retenida en la fase sólida con 10 ml de metanol, y se lleva a evaporar hasta sequedad en rotavapor en las mismas condiciones que antes y durante aproximadamente 30 minutos.

El residuo que queda en el matraz se reconstituye con 500 µl de metanol: agua (1:1, v/v). Con ayuda de jeringa y aguja se recoge el extracto para filtrarlo con un filtro de paso de luz de 0.45 µm sobre un inserto introducido en un vial para HPLC.

3.4.3. Separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Tras el encendido del cromatógrafo se inicia la fase de purga de las cuatro líneas de los disolventes utilizados en la separación de los compuestos fenólicos: disolvente A compuesto por agua: ácido orto-fosfórico (99.5: 0.5, v/v), disolvente B compuesto por metanol para HPLC, disolvente C compuesto por acetonitrilo para HPLC y disolvente D constituido por agua Milli-Q. La purga de cada línea se mantiene durante 2-3 minutos. Además, también se debe purgar y limpiar el sistema de muestreo.

Tabla 3. Gradiente de elución de la fase móvil.

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0.0	95.0	2.5	2.5
25.0	70.0	15.0	15.0
35.0	62.0	19.0	19.0
40.0	62.0	19.0	19.0
45.0	55.0	22.5	22.5

Finalizada la purga, se ponen las condiciones iniciales del gradiente de elución de la fase móvil: 95 % disolvente A, 2.5 % disolvente B y 2.5 % disolvente C. El gradiente de elución es variable, por lo que va cambiando conforme avanza el análisis (tabla 3). De forma gradual se

va aumentando el flujo hasta establecer un flujo fijo de 1.35 ml/min, que tendrá una presión final comprendida entre 170-250 bar.

Antes de inyectar cualquier muestra se dejan al menos 10-15 min para estabilizar la línea base. Una vez estabilizada, mediante el inyector automático, se inyecta en el cromatógrafo una alícuota de 20 μ l de muestra.

Antes de apagar el HPLC, se mantiene la columna en metanol: acetonitrilo 1:1, v/v (50 % disolvente B y 50 % disolvente C) a un flujo de 1 ml/min durante aproximadamente 20 minutos. Tras éstos, se limpia la columna con agua Milli-Q para eliminar la acidez.

La temperatura de la columna se fijó en 30 °C. Las longitudes de ondas utilizadas para la identificación de compuestos fenólicos fueron 235 nm, 280 nm y 335 nm.

Este procedimiento analítico al completo se repitió en cada muestra y por duplicado.

3.5. Tratamiento de datos

Para el tratamiento de datos se ha utilizado el programa Excel como interfaz entre la información proporcionada por el software de los instrumentos analíticos y el programa estadístico Statistica versión 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK). En el trabajo se han usado procedimientos estadísticos univariantes y multivariantes.

El pretratamiento de datos permite facilitar su interpretación y extraer la máxima información posible. Esta etapa utiliza algoritmos estadísticos univariantes y el cálculo de diferentes parámetros para evaluar las características de las poblaciones de datos obtenidos (media, varianza, coeficiente de variación, desviación estándar, etc.), la detección de datos anormales (“outliers”), la evaluación de los parámetros relacionados con la calidad de los procedimientos analíticos, etc.

El objetivo de la estadística multivariante consiste en analizar simultáneamente numerosas variables. Los procesos multivariantes se dividen en dos grandes grupos, descriptivos (no supervisado) y explicativos (supervisado). En el primer caso, no existe ninguna hipótesis previa que clasifique o defina las muestras. En el caso de los procedimientos supervisados, existe una hipótesis apriorística o son simplemente modelos de dependencia que pueden englobarse dentro de la teoría general de la regresión. En el trabajo se ha utilizado el análisis de la varianza y el análisis de agrupamiento o análisis de “clusters”.

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que al menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental

en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés.

El análisis de agrupamiento, también llamado “cluster”, es un término genérico para los métodos diseñados para la compresión de la información contenida en una matriz de datos, con la finalidad de describir las similitudes y diferencias entre objetos, y agrupar los objetos similares dentro de categorías. La distancia de unión utilizada en la construcción de los “cluster” fue la distancia “Manhattan”, que corresponde a la diferencia media entre las dimensiones y amortigua el efecto de los datos aberrantes (“outliers”). Como regla de amalgamiento se eligió el algoritmo de Ward, que usa el análisis de la varianza para evaluar las distancias entre los grupos.

Una información similar se obtiene mediante la utilización de un análisis de escalas multidimensionales, que se ha utilizado para comparar las muestras de los aceites aderezados y no aderezados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

El análisis de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante una metodología analítica previamente desarrollada (Mateos y cols., 2001), modificada y validada (Aparicio-Ruiz y cols., 2016) y dio lugar a la obtención de 3 cromatogramas por cada muestra, obtenidos a 280, 235 y 335 nm mediante análisis por HPLC con detector de matriz de diodos. La figura 9 muestra los cromatogramas obtenidos, a esas 3 longitudes de onda, para una muestra de AOV de la variedad Manzanilla sometida a un mes de almacenamiento.

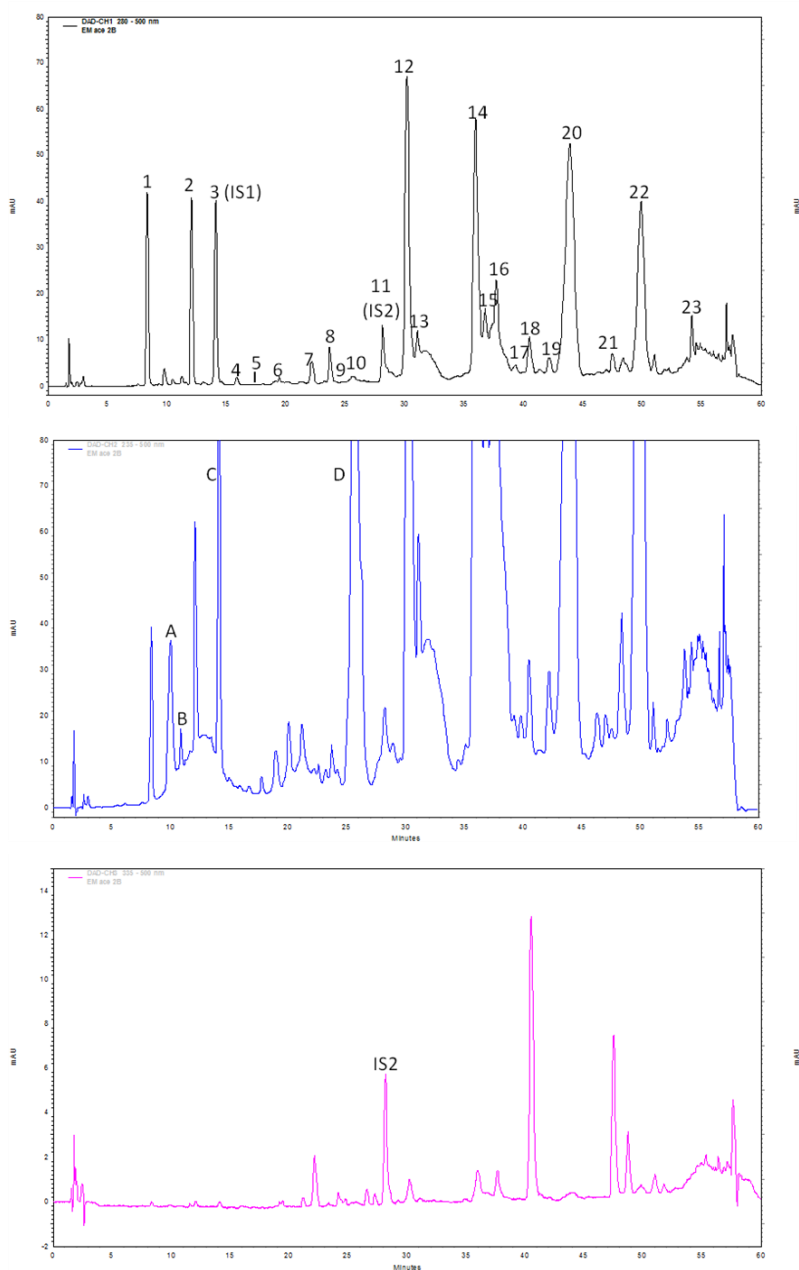


Figura 9. Cromatogramas de compuestos fenólicos (280, 235 y 335 nm) de la muestra de AOV sin aderezo y con un mes de almacenamiento. Los códigos se muestran en la tabla 4.

Son 27 los compuestos fenólicos que pueden cuantificarse utilizando esta metodología, estos compuestos se encuentran recogidos en la tabla 4 que muestra los códigos asignados a los picos del cromatograma, sus tiempos de retención bajo las condiciones de la metodología analítica empleada y su estructura química, excepto en el caso de 8 de los compuestos que no han sido aún identificados. A pesar de que todavía no se conoce su estructura química, han sido objeto de estudio con el fin de evaluar si se ven afectados por el almacenamiento de las muestras.

Tabla 4. Códigos, tiempos de retención e identificación de los compuestos fenólicos cuantificados en las muestras.

Código (280 nm)	t_R (min)	Compuestos fenólicos
1	8.353	Hidroxitirosol
2	12.087	Tirosol
3	14.100	Ácido p-hidroxifenilacético (IS1)
4	15.893	Ácido vainílico
5	17.660	Vainillina
6	19.180	Ácido p-cumárico
7	22.213	Acetato de hidroxitirosol
8	23.713	Ácido ferúlico
9	24.793	-
10	25.660	-
11	28.167	Ácido o-cumárico (IS2)
12	30.213	Forma dialdehídica de la aglicona de la decarboximetiloleuropeína (3,4-DHPEA-EDA)
13	31.100	Acetato de tirosol
14	35.980	Forma dialdehídica de la aglicona del decarboximetiligustrósido (p-HPEA-EDA)
15	36.787	(+)-pinorresinol
16	37.733	(+)-1-acetoxipinorresinol
17	39.333	-
18	40.520	-
19	42.187	Luteolina
20	43.920	Forma aldehídica de la aglicona de la oleuropeína (3,4-DHPEA-EA)
21	47.507	Apigenina
22	49.927	Forma aldehídica de la aglicona del ligustrósido (p-HPEA-EA)
23	54.207	-
Código (235 nm)	t_R (min)	Compuesto fenólicos
A	9.980	-
B	10.867	-
C	14.973	-
D	25.673	Ácido elenólico

Como se muestra en la tabla 4, en el trabajo se han determinado compuestos fenólicos que pertenecen a las distintas clases de fenoles que se pueden encontrar en los aceites de oliva vírgenes: ácidos fenólicos simples como el vainílico y *p*-cumárico; flavonoides como la apigenina y luteolina; fenoles simples tales como hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol, tirosol y vainillina; lignanos como el (+)-1-acetoxipinorresinol y (+)-pinorresinol y derivados de la oleuropeína como son las formas dialdehídicas y aldehídicas de las agliconas de la oleuropeína y del ligustrósido o el ácido elenólico.

4.2. Precisión de los patrones internos

Aunque el método había sido previamente validado desde un punto de vista analítico (Romero, 2015), se llevó a cabo un estudio de precisión de los patrones internos utilizados para comprobar la reproducibilidad y precisión intermedia de su respuesta, fundamental para poder llevar a cabo una cuantificación fiable de los compuestos fenólicos presentes en las muestras de aceite. Con el fin de estudiar la precisión en la propia matriz de la muestra, se preparó la muestra control de la forma anteriormente descrita y se repitió el análisis de la muestra en 5 ocasiones dentro de una única sesión de trabajo, la precisión intermedia se evaluó mediante análisis en 9 días no consecutivos.

Los resultados obtenidos mostraron unos valores de coeficiente de variación (desviación estándar relativa, %) que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Repetibilidad y precisión intermedia de los patrones internos utilizados en la cuantificación.

	Repetibilidad (CV%)	Precisión intermedia (CV%)
Ácido <i>p</i>-hidroxifenilacético (IS1)	1.95	3.38
Ácido <i>o</i>-cumárico (IS2)	2.15	5.93

En ambos estudios la respuesta de los patrones obtuvo valores de CV% inferiores al 10%, tanto en repetibilidad como en precisión intermedia, para la determinación de los compuestos fenólicos, lo que está de acuerdo con los valores encontrados por otros autores (Mateos y cols., 2001; Romero, 2015). Este hecho permitió establecer que se obtenía una adecuada precisión de los patrones internos usados en la cuantificación de las muestras.

4.3. Evolución de compuestos fenólicos durante el almacenamiento

La muestra de aceite de oliva inicial presentó una concentración de compuestos fenólicos propia de un aceite de oliva virgen extra, los resultados obtenidos (tabla 6) están de acuerdo con los encontrados por otros autores para aceites vírgenes de esa categoría (Aparicio-Ruiz y cols., 2016). Las concentraciones de fenoles oscilaron dependiendo del tipo de compuesto fenólico, la vainillina (5) y el ácido p-cumárico (6) fueron los fenoles con menor concentración en la muestra inicial y la forma aldehídica de la aglicona de la oleuropeína (20) el de mayor concentración.

Tabla 6. Concentración (mg/Kg) de compuestos fenólicos en la muestras de AOV (replicado 1) sometida a almacenamiento durante 8 meses. Los códigos se muestran en la tabla 4.

Código fenoles	Ace0	Ace1	Ace2	Ace3	Ace4	Ace5	Ace6	Ace7	Ace8
1	10,79	12,99	12,27	17,49	17,18	20,26	21,18	23,79	16,14
2	13,68	12,92	14,20	14,51	14,89	16,97	18,25	19,05	22,37
4	0,29	0,17	0,19	0,14	0,14	0,21	0,24	0,15	0,25
5	0,01	0,01	0,03	0,01	0,002	0,01	0,01	0,001	0,01
6	0,10	0,04	0,12	0,02	0,00	0,08	0,12	0,11	0,15
7	3,49	3,33	3,21	3,11	2,92	3,39	3,29	3,39	2,88
8	2,94	2,57	3,06	3,30	3,38	3,60	3,69	3,53	2,14
12	118,18	115,93	77,32	74,95	94,44	93,47	84,42	113,70	77,39
13	4,68	2,64	2,31	5,66	6,77	8,07	6,81	4,40	11,25
14	145,02	133,08	97,00	112,83	103,96	103,63	96,15	129,87	114,75
15	0,93	0,61	0,69	0,77	0,84	0,92	0,99	0,95	2,26
16	16,88	14,78	11,66	11,84	9,71	10,25	9,14	9,50	5,07
19	2,99	1,35	1,68	3,80	4,42	5,90	5,95	5,46	10,21
20	256,18	238,19	219,90	289,16	261,22	240,45	241,90	304,91	207,69
21	3,54	2,93	3,22	2,86	2,61	2,63	3,01	3,00	2,36
22	135,01	112,79	130,49	152,90	161,53	146,12	172,26	229,73	207,05
SUMA TOTAL FENOLES	716,38	655,80	578,50	694,51	684,96	656,96	668,31	752,48	682,48
SUMA ORTODIFENOLES	391,63	371,79	314,38	388,51	380,17	363,48	356,74	351,26	314,32
SUMA DERIVADOS SECOIRIDOIDES	654,38	599,99	524,71	629,85	621,15	583,67	594,72	678,22	606,88

La figura 10 muestra los resultados encontrados en las concentraciones de algunos de los compuestos representativos de cada uno de los tipos de fenoles presentes en los aceites, en general se observa una reducción gradual de la concentración de los compuestos fenólicos

a lo largo del almacenamiento, aunque en el caso de algunos fenoles simples como el tirosol e hidroxitirosol se produce un aumento de su concentración como consecuencia de la degradación de otros fenoles complejos que contienen moléculas de los fenoles simples. Este hecho ya ha sido descrito por otros autores al estudiar la vida útil del AOV (Tsimidou, 2013). Se ha descrito que la disminución de los derivados secoiridoides da origen a fenoles simples (hidroxitirosol y tirosol) y a la formación de productos oxidados, lo que se atribuye a efectos hidrolíticos y oxidativos, respectivamente (Kotsiou y Tasioula-Margari, 2016).

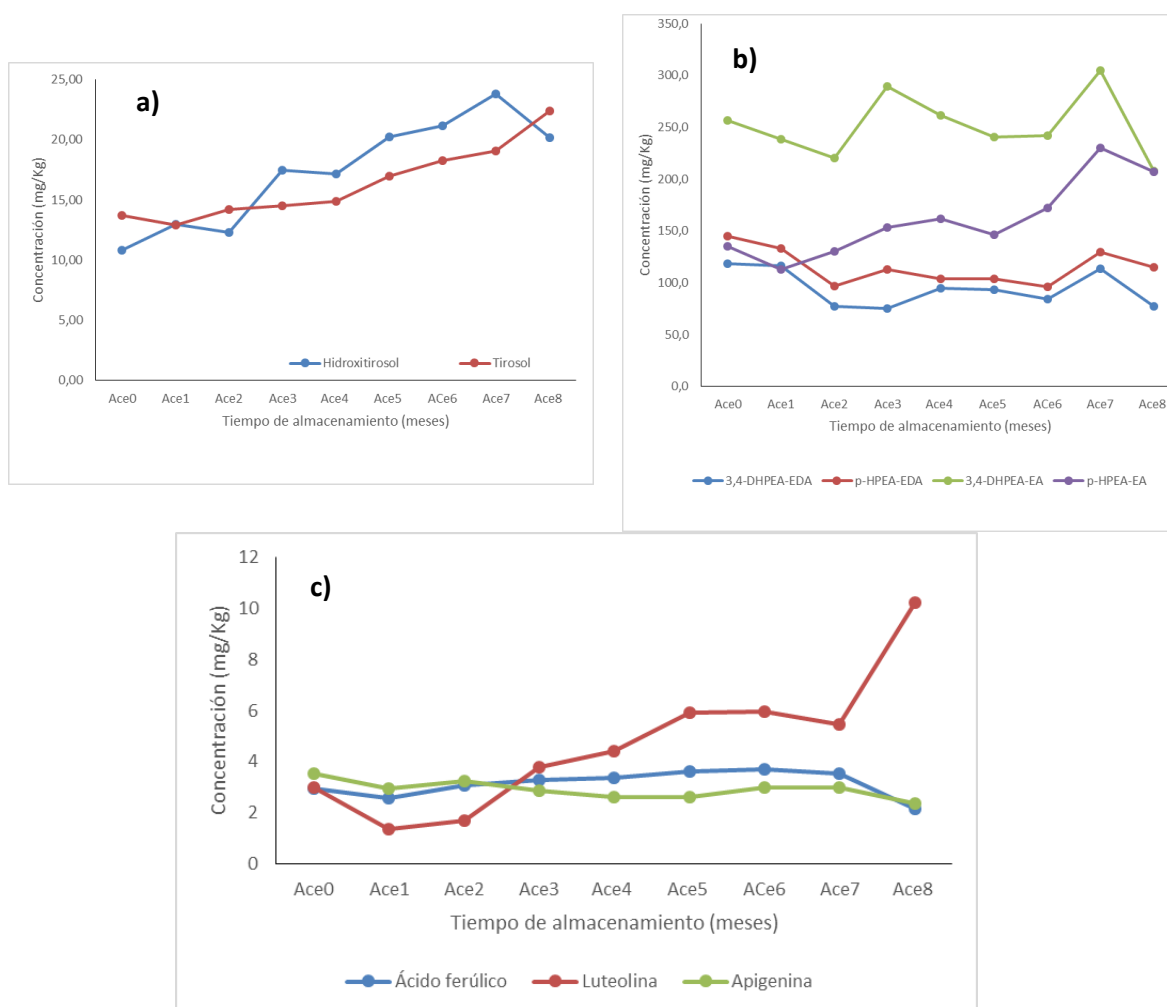


Figura 10. Evolución de compuestos fenólicos del AOV durante el periodo de almacenamiento estudiado. a) Fenoles simples; b) Derivados de la oleuropeína; c) Flavonoides.

Por otro lado, la figura 11 muestra los valores de fenoles totales, ortodifenoles y derivados secoroidoides, observándose que el contenido de fenoles totales varía a lo largo del estudio, produciéndose un descenso lento y gradual en su contenido a lo largo del periodo estudiado.

Puede observarse que el contenido de las sumas del total de fenoles, o-difenoles y derivados secoroidoides disminuye de forma progresiva y lenta durante el almacenamiento a temperatura ambiente, lo que ha sido descrito previamente por algunos autores (Esposto y cols., 2017). Cuando el estudio se hace en condiciones aceleradas, otros autores han descrito una degradación mucho más rápida debido a la aplicación de elevada temperatura y alto flujo de oxígeno (Tsimidou, 2013).

Aunque todos ellos disminuyen solo los o-difenoles muestran una disminución significativa ($p < 0.05$) entre la concentración de la muestra inicial (Ace0) y la de los 8 meses (Ace8) de almacenamiento.

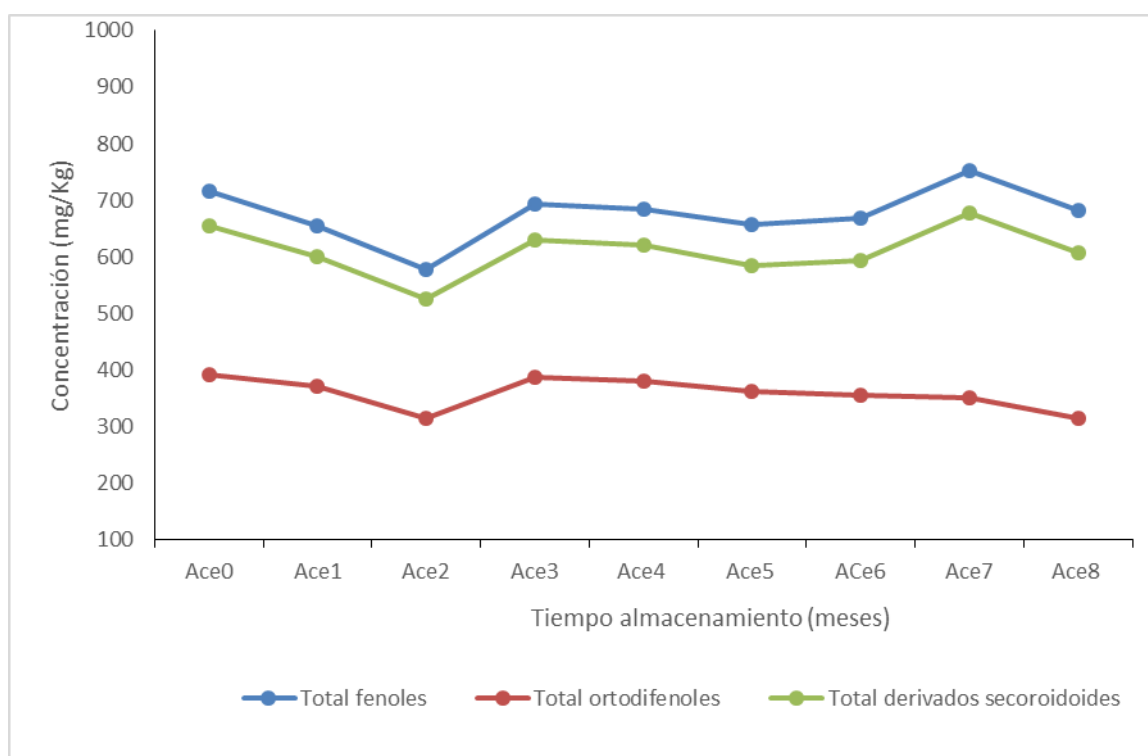


Figura 11. Concentración de fenoles, ortodifenoles y derivados secoroidoides durante el periodo de almacenamiento estudiado.

Con el fin de estudiar si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas se llevó a cabo un análisis de varianzas. Se utilizó el test de Brown-Forsythe para establecer cuáles eran las variables que presentaban esa diferencias ($p < 0.05$). El test mostró que los compuestos fenólicos individuales mostraban diferencias significativas con el tiempo de almacenamiento, por lo que se utilizaron todas las variables para llevar a cabo un análisis de “clusters” para evaluar el parecido que existía entre las muestras.

El resultado mostró (figura 12) que se formaban dos grupos iniciales en función del tiempo de almacenamiento del aceite, uno con la muestra inicial y la que había sufrido menor deterioro oxidativo y otro formado por las muestras almacenadas durante más tiempo.

El estudio detallado de los grupos mostró (figura 12) que el primero de ellos estaba formado por la muestra inicial y la almacenada durante un mes, observándose una pequeña diferencia entre ellas. En el segundo grupo se observó una división entre las muestras, y se formaron de nuevo dos grupos, uno constituido por las muestras entre 2 y 6 meses de almacenamiento y otro con las muestras con mayor tiempo de almacenamiento, 7 y 8 meses, y por tanto más alteradas.

El análisis de clusters mostró que los compuestos fenólicos contienen información directamente relacionada con el grado de alteración de las muestras, y que esta alteración se produce de forma gradual, originando unas similitudes entre las muestras que coinciden con el tiempo de almacenamiento. Todo ello indica que los compuestos fenólicos pueden ser marcadores adecuados de la estabilidad oxidativa del AOV.

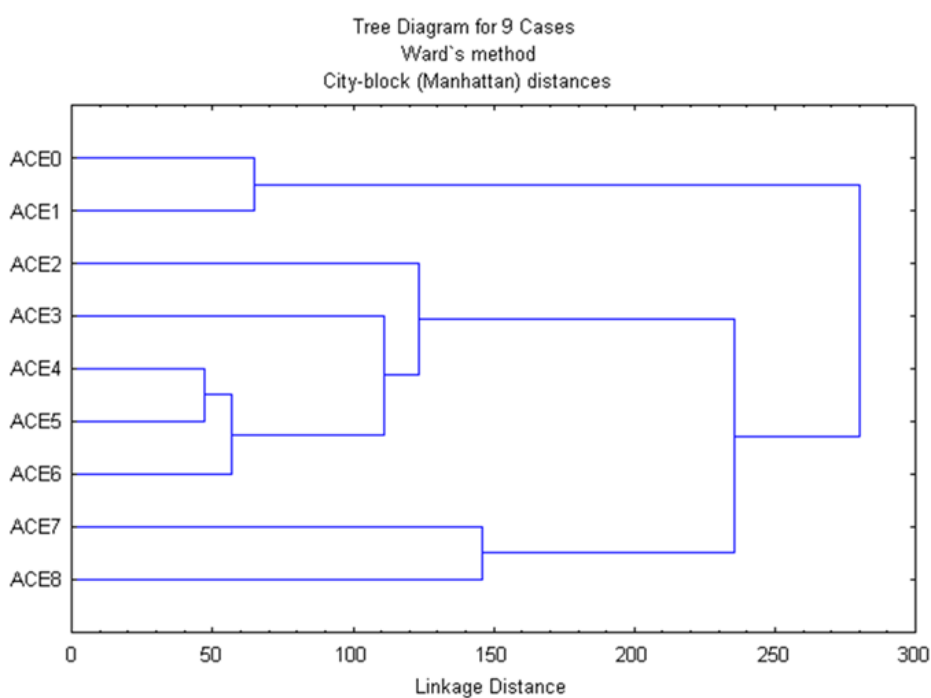


Figura 12. Análisis de clusters aplicado a las muestras de AOV.

4.4. Comparación con las muestras aderezadas

El estudio llevado a cabo con las muestras aderezadas ofreció resultados ligeramente diferentes de los encontrados en el AOV. Aunque se produce la oxidación de las muestras, éstas sufren un deterioro más lento, especialmente en los tres primeros meses del ensayo. A partir del cuarto mes, la concentración de algunos de los compuestos fenólicos es más alta que en el aceite sin aderezo, debido a la migración de antioxidantes del material vegetal hacia el aceite, tal como ha sido descrito en otros trabajos donde se ha puesto de manifiesto que las

muestra con aderezo de este tipo de plantas incrementan la cantidad de compuestos fenólicos con el tiempo (Esposto y cols., 2017).

Al aplicar un análisis de escalas multidimensionales a todas las muestras para realizar una comparación y evaluar el grado de similitud que había entre ellas, utilizando todos los compuestos fenólicos como variables, se observó (figura 13) que había una gran similitud entre las muestras de los 3 tipos durante los 3 primeros meses, estando el cuarto mes de la albahaca situado muy próximo a las anteriores. Se observó que a partir del quinto mes la muestra de aceite se diferencia más de las aderezadas y que, según el tipo de aderezo, aparecen ordenadas según el tiempo en distintas zonas del gráfico, las muestras de aceite se sitúan en la parte inferior derecha, las de albahaca en una zona por encima de las anteriores, y las de romero en la zona superior derecha del gráfico. Estas últimas muestras presentaron un perfil de fenoles más deteriorado en los 3 últimos meses de almacenamiento.

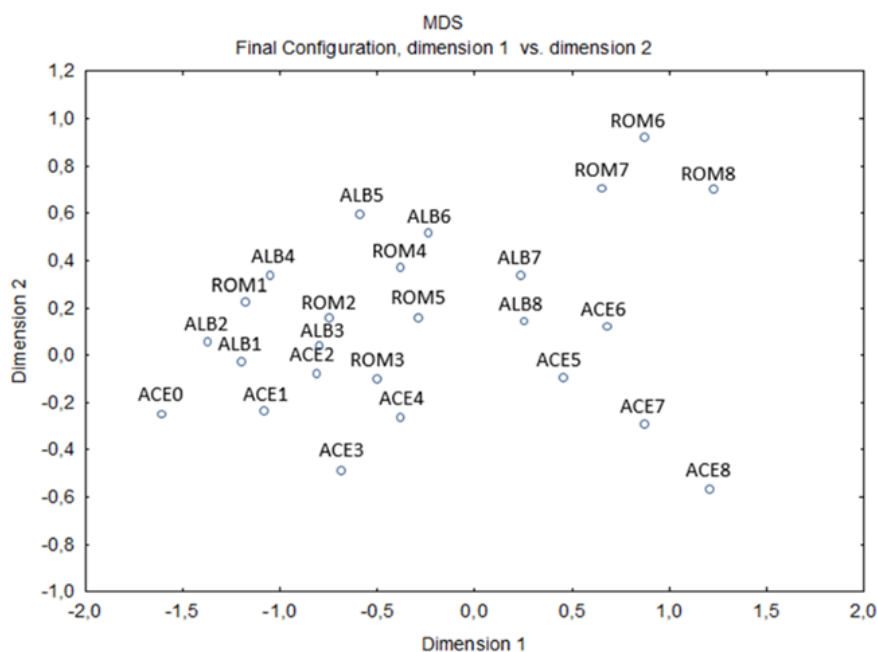


Figura 13. Análisis de escalas multidimensionales aplicado a las muestras de aceite aderezado y sin aderezo.

La situación de las muestras parece indicar que durante los primeros meses el contenido en fenoles de las muestras es similar pero que, a partir del cuarto mes, empiezan a darse diferencias entre ellas y que, conforme avanza el tiempo de almacenamiento, estas diferencias se hacen mayores, debido al diferente contenido en compuestos fenólicos y al diferente estado de oxidación de las muestras en los últimos meses de almacenamiento.

5. CONCLUSIONES

- 1) Se ha llevado a cabo un estudio de vida-útil del AOV, y aderezado con romero y albahaca, durante 8 meses de almacenamiento, estudiándose el contenido de compuestos fenólicos en las muestras a lo largo el tiempo mediante el análisis de una muestra mensual analizada por duplicado.
- 2) La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en la muestra de AOV a lo largo del almacenamiento aplicando la técnica HPLC, ha permitido determinar ácidos fenólicos simples como el vainílico y p-cumárico; flavonoides como la apigenina y luteolina; fenoles simples tales como hidroxitiroso, acetato de hidroxitiroso, tiroso y vainillina; lignanos como el (+)-1-acetoxipinoresinol y (+)-pinoresinol y derivados de la oleuropeína como son las formas dialdehídicas y aldehídicas de las agliconas de la oleuropeína y del ligustrósido o el ácido elenólico.
- 3) La variación producida en las concentraciones de compuestos fenólicos individuales se ha determinado a lo largo del tiempo, siendo de destacar el aumento que se produce en algunos fenoles simples, tales como tiroso e hidroxitiroso a expensas de la degradación de las agluconas, que contienen fenoles simples que son liberados durante este proceso.
- 4) Se ha estudiado la evolución sufrida por los compuestos fenólicos en las muestras de aceite aderezado con romero y albahaca, observándose una evolución distinta en los aceites aderezados a partir del cuarto mes de almacenamiento y una oxidación más lenta que la del AOV.
- 5) Una comparación realizada entre las muestras de aceite aderezado y no aderezado, mediante análisis multivariante de escalas multidimensionales, ha puesto de manifiesto diferencias entre las muestras de aceite aderezado y no aderezado, fundamentalmente a partir del cuarto mes de almacenamiento, demostrando el efecto protector frente a la oxidación de la presencia de las plantas aromáticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr A*. 2006; 1120: 221-229.
- Aparicio-Ruiz R, García-González DL, Oliver-Pozo C, Tena N, Morales MT, Aparicio R. Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2016; 118: 299–307.
- Ayadi MA, Grati-Kamoun N, Attia H. Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47: 2613-2619.
- Baiano A, Terracone C, Gambacorta G, La Notte E. Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage. *J Am Oil Chem Soc*. 2009; 86: 1083-1092.
- Baiano A, Terracone C, Viggiani I, Del Nobile MA. Changes Produced in Extra-Virgin Olive Oils from cv. Coratina during a Prolonged Storage Treatment. *J Food Sci*. 2014; 32(1): 1-9.
- Bajoub A, Carrasco-Pancorbo A, Ajal EA, Ouazzani N, Fernández-Gutiérrez A. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chem*. 2015; 166: 292-300.
- Bakhouch A, Lozano J, Fernández A, Segura A. Tendencias en la caracterización química del perfil fenólico del aceite de oliva virgen: situación actual y nuevos retos. *Olivae*. 2015; 122: 3-16.
- Barjol JL. Introduction. En: Aparicio R, Harwood J, editores. *Handbook of Olive Oil*. 2ª ed. New York: Springer; 2013. p.1-17.
- Bendini A, Bonoli M, Cerretani L, Biguzzi B, Lercker G, Gallina T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenol from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J Chromatogr A*. 2003; 985: 425-433.
- Boskou D. Cambios producidos en el aceite de oliva por las enzimas y la oxidación. En: Boskou D, editor. *Química y tecnología del aceite de oliva*. 1ª ed. Madrid: A. Madrid Vicente y Mundi Prensa; 1998. p.119-124.

- Boskou D. Olive oil: Properties and processing for use in food. En: Talbot G, editor. Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition. Properties, Processing and Applications. Londres: Elsevier; 2015. p.3-38.
- Carrasco A. Determinación de compuestos fenólicos en aceite de oliva mediante técnicas y metodologías separativas avanzadas. Tesis doctoral. Universidad de Granada; 2006.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, 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.
- Casanovas M. Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudios de aceite de oliva singulares de la provincia de Lleida. Tesis doctoral. Universitat de Lleida; 2012.
- COI. Trade Standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/NC No 3/Rev. 11. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2016.
- D'Evoli L, Huikko L, Lampi AM, Lucarini M, Lombardi-Boccia G, Nicoli S et al. Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. Mol Nutr Food Res. 2006; 50: 818-823.
- Douzane M, Tamendjari A, Abdi AK, Daas M-S, Mehdid F, Bellal MM. Phenolic compounds in mono-cultivar extra virgin olive oils from Algeria. Grasas aceites. 2013; 64(3): 285-294.
- EFSA. European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 9(4), 2033; 2011. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Esposito S, Taticchi A, Urbani S, Selvaggini R, Veneziani G, Di Maio I et al. Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition. Food Chem. 2017; 229: 726-733.
- Flanigan PM, Niemeyer ED. Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum Basilicum*, L.). Food Chem. 2014; 164: 518-526.
- Gilbert-López B, Valencia-Reyes ZL, Yufra-Picardo VM, García-Reyes JF, Ramos-Martos N, Molina-Díaz A. Determination of Polyphenols in Commercial Extra Virgin Olive Oils from Different Origins (Mediterranean and South American Countries) by Liquid Chromatography-Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. Food Anal Methods. 2014; 7: 1824-1833.

- Gonçalves S, Moreira E, Grosso C, Andrade PB, Valentão P, Romano A. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *J Food Sci Technol*. 2017; 54(1): 219-227.
- Gutiérrez-Rosales F, Ríos JJ, Gómez-Rey ML. Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electro spray Ionization Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem*. 2003; 51: 6021-6025.
- Kiritsakis AK. *El aceite de oliva*. Madrid: A. Madrid Vicente; 1992.
- Krichene D, Salvador MD, Fregapane G. Stability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds during Long-Term Storage (18 Months) at Temperatures of 5-50 °C. *J Agric Food Chem*. 2015; 63: 6779-6786.
- Kotsiou K, Tasioula-Margari M. 2016. Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage. *Food Chem*. 2016; 200: 255-262.
- Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F et al. 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.
- Montaño A, Hernández M, Garrido I, Llerena JL, Espinosa F. Fatty Acid and Phenolic Compound Concentrations in Eight Different Monovarietal Virgin Olive Oils from Extremadura and the Relationship with Oxidative Stability. *Int J Mol Sci*. 2016; 17: 1960.
- Morales MT, Przybylski R. Olive Oil Oxidation. En: Aparicio R, Harwood H, editores. *Handbook of Olive Oil*. 2ª ed. New York: Springer; 2013. p.479-522.
- Morales MT, Ríos JJ, Aparicio R. Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *J Agric Food Chem*. 1997; 45: 2666-2673.
- Moreno B, Lezcano A. Aceite de oliva: Piedra angular de la dieta Mediterránea. *Olivae*. 2015; 121: 19-27.
- Parkinson L, Cicerale S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules*. 2016; 21: 1734.
- Perestrelo R, Silva C, Silva P, Câmara JS. Global volatile profile of virgin olive oils flavoured by aromatic/medical plants. *Food Chem*. 2017; 227: 111-121.
- Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients*. 2017; 9: 306.

- Romero I. Evaluación de indicadores de la calidad del aceite de oliva virgen: fortalezas, debilidades y oportunidades. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla; 2015.
- Sousa A, Casal S, Malheiro R, Lamas H, Bento A, Pereira JA. Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants and antiradical potential. *LWT - Food Sci Technol.* 2015; 60: 22-28.
- Suárez M. Obtención de extractos fenólicos a partir de subproductos de la oliva y aplicación en el desarrollo de un aceite de oliva enriquecido. Tesis doctoral. Universitat de Lleida; 2010.
- Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. 3ª ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2002.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 2005; 18: 98-112.
- Tsimidou MZ. Analytical Methodologies: Phenolic Compounds Relates to Olive Oil Taste Issues. En: Aparicio R, Harwood H, editores. *Handbook of Olive Oil*. 2ª ed. New York: Springer; 2013. p.311-333.
- Vitaglione P, Savarese M, Paduano A, Scalfi L, Fogliano V, Sacchi R. Healthy Virgin Olive Oil: A Matter of Bitterness. *Crit Rev Food Sci.* 2013; 55: 1808-1818.