

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional



**ACEITE DE OLIVA COMO ALIMENTO FUNCIONAL:
NUEVAS PERSPECTIVAS ANALÍTICAS Y TECNOLÓGICAS**

presentada por:

Jesús Lozano Sánchez

para optar al grado de:

Doctor Internacional por la Universidad de Granada

Tesis doctoral dirigida por:

D. Alberto Fernández Gutiérrez

D. Antonio Segura Carretero

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jesús Lozano Sánchez
D.L.: GR 80-2013
ISBN: 978-84-9028-274-8

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral de formación de profesorado universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia y a la financiación con cargo a fondos del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) procedentes de diferentes proyectos, contratos y subvenciones de las Administraciones central y autonómica, plan propio de investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de la investigación (Aceites Maeva S.L.).

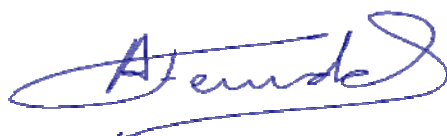


**ACEITE DE OLIVA COMO ALIMENTO FUNCIONAL:
NUEVAS PERSPECTIVAS ANALÍTICAS Y TECNOLÓGICAS**

por

Jesús Lozano Sánchez

Visado en Granada a 16 de Mayo de 2012



Fdo: Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada



Fdo: Prof. Dr. D. Antonio Segura Carretero
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Memoria para optar al grado de Doctor Internacional por la UGR:



Fdo: Jesús Lozano Sánchez

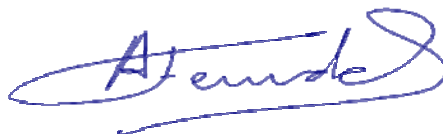


El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático de Universidad en el Departamento de Química Analítica “Profesor Fermín Capitán” y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” y Director del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) de la Universidad de Granada,

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral con el título: **“ACEITE DE OLIVA COMO ALIMENTO FUNCIONAL: NUEVAS PERSPECTIVAS ANALÍTICAS Y TECNOLÓGICAS”**, que ha sido realizado bajo mi dirección y la del Prof. Dr. D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud) y también parcialmente, en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid y en el Campus di Scienze degli Alimenti, Dipartimento di Scienze degli Alimenti de la Universidad de Bolonia, reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que el doctorando D. Jesús Lozano Sánchez pueda optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 16 de Mayo de 2012:



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Hace cuatro años que empecé esta aventura....un largo camino que ya está viendo su final, lo que no sería posible gracias a todos aquellos que me han acompañado durante todo este tiempo. Por eso quiero dedicar unas líneas a todas esas personas maravillosas que han aportado algo a esta etapa de mi vida.

Quiero empezar mostrando mi gratitud a las personas que me permitieron iniciar este largo viaje, mis directores, D. Alberto Fernández Gutiérrez y D. Antonio Segura Carretero.

Alberto, muchas gracias por la confianza que depositaste en mí y permitirme realizar la tesis en el grupo de investigación que diriges. Gracias por demostrarme esa calidad humana y ayudarme en momentos difíciles tanto profesionales como personales, con tu ayuda he podido llegar al final de esta etapa. Antonio....la verdad....me lo has puesto muy difícil, pues nunca imaginé hace cuatro años que llegado este momento tendría tantas cosas que agradecerte. A pesar de las largas conversaciones que hemos mantenido y que tantas cosas me han hecho aprender, expresar mi gratitud en el día a día no forma parte de mi personalidad, por eso, aprovecho esta oportunidad para resumir lo que para mí ha significado tenerte cerca estos cuatro años. Nunca olvidaré tu visión de este largo camino, con sus momentos de desilusión, pero nada que no pueda borrar la satisfacción de un buen resultado. Después de tanto tiempo, aún no deja de sorprenderme la pasión con la entras cada día en el CIDAF y tu gran capacidad para compaginar las clases con la investigación, con todos nosotros y con una familia maravillosa con la que he tenido el placer de compartir buenos momentos. Para mí, es difícil pensar que alguien pudiese apostar tanto por los demás como tú lo haces por nosotros, ayudando a formar un grupo multidisciplinar como el que a



AGRADECIMIENTOS

día de hoy compone el CIDAF. Estás pendiente de las necesidades y demandas de cada uno, aceptas opiniones, orientas, compartes y consultas decisiones y nos haces sentir a cada uno de nosotros un poco más participes de todo esto....en definitiva nos haces sentir como parte de una segunda familia. Por todo ello, muchas gracias Antonio.

Me gustaría tomarme la libertad de continuar agradeciendo a mi familia porque todo esto ha sido posible gracias a ella. A mis padres, Mamá y Papá, porque sin vuestro amor incondicional, vuestra educación y forma de ver la vida, ni yo ni mis hermanas seríamos lo que somos hoy. Me habéis enseñado a luchar por lo que uno quiere y a defender en lo que uno cree, a no tirar nunca la toalla por muchos días grises que vengan. Gracias por todo eso y....mucho más, que ha permitido que hoy me encuentre donde estoy. A mis hermanas, Carmen y Jessi, por mostrarme siempre su apoyo incondicional, por enseñarme que por muy difícil que sea la vida siempre hay que poner la mejor de las sonrisas y por hacerme sentir querido en todos los momentos que lo he necesitado. A Norberto, por su saber estar y por ayudar siempre que le ha sido posible. A mis niñas, Cristina y Andrea....las peques de la casa, mi Cris y mi Andre, porque si alguien se merece lo mejor esas sin duda sois vosotras. Siendo las más pequeñas nos habéis enseñado a todos la lección más grande que se puede aprender, con esfuerzo y afán de superación todo es posible. Nunca olvidaré empezar el día en vuestra compañía, tantas y tantas mañanas de camino al trabajo pasando por el colegio para dejar a mis dos tesoros, repasar cono, mates, inglés....volver a mi infancia con vosotras es lo mejor que me ha podido pasar. Salir del laboratorio sabiendo que me estabais esperando en la guardería y llegar a casa de vuestra mano y en vuestra compañía, sin duda es uno de los mejores regalos que he podido tener estos cuatro años. A todos vosotros Mamá, Papá, Carmen, Jessi,



AGRADECIMIENTOS

Norberto, Cris y Andre, sólo me queda disculparme por mi ausencia y falta de disponibilidad en tantos momentos en los que por el trabajo no me ha sido posible dedicaros ese tiempo tan merecido.

A mis amigos Vanessa, Juanma, Oscar, Mari, Encarni.... por saber estar cerca tanto en los mejores como en los peores momentos, por tan largas conversaciones, en las que a pesar de que la investigación no es vuestro mundo, me habéis escuchado. Por apoyarme en aquellos momentos en los que he tenido que salir de casa para las tan necesarias estancias y he estado lejos de mi familia y de vosotros (Encarni...que decirte, Venecia sin ti...no habría sido lo mismo). Muchas gracias.

A todos aquellos que he tenido la oportunidad de conocer en mis dos estancias predoctorales, todos ellos con una elevada calidad científica y humana, que me han aportado momentos inolvidables.

Il mio primo soggiorno di ricerca in un'altra struttura è stato svolto a Cesena presso il Campus di Scienze degli Alimenti (Facoltà di Agraria) dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna. Mi sento fortunato per aver potuto realizzare un'esperienza di ricerca in un gruppo che vanta un'ampia esperienza sull'olio, diretto dal professor Giovanni Lercker il quale voglio ringraziare per avermi accolto nel suo gruppo di ricerca. Voglio anche ringraziare in special modo Lorenzo, Alessandra e Tullia perché senza il loro aiuto non avrei potuto realizzare il mio lavoro di ricerca.

Lollo, è stato per me un piacere aver potuto lavorare con una persona con tante conoscenze e con un'ampia esperienza sulla tecnologia dell'olio. Sei stato un buon collega e un amico. Ale, sempre disposta ad aiutarmi nel



AGRADECIMIENTOS

mio lavoro quotidiano, ad ascoltare tutte le proposte, ad offrire il tuo appoggio...una delle migliori tutor su cui si può contare. Tullia, ti ringrazio tanto per aver collaborato attivamente nell'organizzazione del lavoro realizzato durante il mio soggiorno presso la vostra struttura e per esserti preoccupata perché lo svolgimento della mia attività procedesse sempre correttamente.

Voglio ringraziare anche i colleghi del laboratorio Chicco, Sara, Lucian, Federica, Ilenia..., e specialmente la nostra comunità "hispanohablantes", che in numero era quasi superiore a quella italiana: i miei argentini Ruben e Laura, che tutti i giorni mi hanno rallegrato con le loro barzellette; i miei italiani che parlano quasi meglio di me lo spagnolo, Gori, grazie per avermi accolto in casa tua (grazie a tua madre ed a tua nonna per avermi accolto come uno di famiglia), Vito, per avermi fatto sentire come a casa, Elisa, la mia Elisa, che dirti che non sai, sempre disponibile per tutto...; i miei spagnoli Ana, Cristina e Sandra, grazie a tutte e tre per tutti i momenti passati insieme. Non potevo immaginare che nel mio soggiorno di ricerca all'estero mi sarei unito a tre spagnole nello stesso laboratorio. Attenemmo che gli italiani adottassero il "momento del café" molto importante dopo pranzo per gli spagnoli, in cui poter parlare e condividere momenti di allegria che rende più leggera la distanza da casa. Aver avuto la possibilità di incontrarsi dopo il lavoro per prendere aperitivi, gelati o andare al bar di "Luilli" con tutti gli "hispanohablantes" è stata una fortuna. Grazie a tutti.

Mi segunda estancia fue realizada en el CIAL (CSIC de Madrid). Quiero agradecerles especialmente a Elena y Alejandro por darme la posibilidad de poder realizar una estancia en el CIAL haciéndome sentir como un miembro más del equipo desde el primer día en el que llegué al



AGRADECIMIENTOS

laboratorio. A los que fueron mis compañeros durante esta etapa en Madrid: Carolina, Virginia, Clara, Alberto, María.... y especialmente a José, Miguel y Lucian, gracias a los tres por estar siempre dispuestos a echarme una mano en el trabajo del día a día.

He tenido la suerte de realizar una tercera estancia, a pesar de no haber salido de mi Graná para ello, y es que parte del trabajo de esta tesis no se podría haber llevado a cabo sin la disponibilidad de la empresa Aceites Maeva S.L.. Quiero empezar agradeciendo en primer lugar a Luis Torres por permitirme entrar en sus instalaciones como si fuese de la casa, siempre dispuesto a poner todo a mi alcance, a escuchar propuestas y a innovar en este campo, me has tratado como uno más de tu gente. Por ello, siempre te estaré muy agradecido. No quiero olvidarme de todos los que me han acompañado en el día a día en mi paso por la fábrica: Eduardo, Maribel....y en especial Juande y Sandra. Juande, a pesar de interrumpir tu trabajo con mis pruebas nunca has puesto inconvenientes y hemos podido organizarnos de la mejor manera. Sandra, la verdad...tengo muchas cosas que agradecerte, la alegría con la que te diriges hacia mí, el cariño y confianza que me transmites y tu apoyo incondicional ha sido muy importante para mí en esta última etapa. Te has convertido en una buena amiga. Gracias a todos vosotros.

Tampoco quiero olvidarme de Custodio y Jesús, que me han transmitido su pasión por el aceite y la investigación, y no han dudado un momento en utilizar sus instalaciones y lo que estaba a su alcance para ayudarme en mi investigación. Muchas gracias a los dos de corazón.

Sin duda, estos agradecimientos no estarían completos sin incluir a todos los compañeros que me han acompañado desde el inicio de esta aventura.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer los momentos vividos con todos mis compañeros de la Facultad: Paulina, María, Paco, Marta, Santi, Pachi.... y en especial a Estefanía, mi Estefi, muchas gracias por todos esos desayunos y fiestecillas. Te tengo un cariño especial y por eso sinceramente, espero que pronto seas tú la que esté escribiendo los agradecimiento, pues si alguien se merece llegar al final de esta aventura con los mejores resultados no me cabe duda de que eres tú, por todo el esfuerzo y dedicación que le has puesto. Te deseo lo mejor y espero estar cerca para verlo.

A mis numerosos compañeros del CIDAF: Patri, Cristina, Celia y Ceci (ya era hora de que contásemos con más tecnólogos en el equipo) María del Mar (gracias por tus palabras de ánimo y apoyo tan necesarias en esta última etapa), Nassima (con más arte andalú que todos nosotros juntos haces que las risas siempre estén presentes en las comidas), Ishan (las reuniones de grupo no serían lo mismo sin tus intervenciones), Ibrahim (un poco reservado, por eso te agradezco esas conversaciones que me han permitido conocerte algo mejor), Ana Cobo (no he tenido oportunidad de compartir mucho tiempo contigo, pero espero poder tener la posibilidad de conocerte mejor), Javier (gracias por tu visión de marketing y tu orientación y consejos en las relaciones con empresas), Panocha, nuestra murciana, siempre le imprimes un carácter personal a las cosas que haces, con tus dotes de intérprete eres capaz de versionar cualquier voz y a cualquier personaje, haciendo pasar ratos divertidos e inolvidables. Hemos compartido muchos momentos y te has ganado a la Andre, pese a que eso no es nada fácil. Gracias por todo Panochica.

Hakim..... y “nuestros aceites”, y otras tantas cosas compartidas: horas delante de los equipos, del ordenador y de la “silenciosa” campana con las



extracciones.... a pesar de estar lejos de casa y de los tuyos siempre mantienes el buen humor. Te has integrado bien y te has hecho rápidamente uno más de nosotros. Espero poder seguir compartiendo cosas contigo tanto en el trabajo como fuera de él. Ya sabes donde tienes un amigo.

Ameni, rebautizada por todos como Emani, Imani, Imeni....y otros tantos nombre más. Para mí, Ameni Tamali-Tamali Ameni, que decirte que no sepas, pocas personas se caracterizan por su constancia en el trabajo y por su voluntad a ayudar a los demás como tú. A pesar de venir de otro país, eso no te ha impedido llegar a ser una de las personas más querida por todos nosotros. El final de la tesis ha llegado para ambos, pero espero poder seguir contando con tu presencia por mucho tiempo. Aunque ya sabes que esto lo digo sólo por conseguir esos dos camellos.

Luzia, nuestra bióloga de reciente incorporación, congeniamos desde el primer momento en que llegaste al grupo. Le has dado a nuestras conversaciones un toque cuanto menos divertido. Has hecho que me guste ir a trabajar en verano a pesar de lo que supone, haciéndome reír en momentos en los que más lo he necesitado. Eres una de las pocas personas que, en tan poco tiempo, se ha ganado mi confianza, cariño, afecto y un trocito de mi corazón, y estoy seguro de que esto no ha hecho más que empezar. Vales profesional y personalmente y es un placer para mí poder contar contigo.

David, cuanto me alegra haberte tenido cerca estos cuatro años. Siempre dándole un toque de humor a todo lo que te rodea, haces más llevaderos los madrugones con tu frase “que.....agobiadillo no?”, seguida de unas risas. Preocupado por la investigación y la docencia nos has transmitido



AGRADECIMIENTOS

siempre tus experiencias y nos has hecho partícipes de ellas. Pero lo mejor de ti es que, aún siendo el más veterano de todos, siempre tratas a todo el mundo por igual y haces sentirse cómodo a todos los que trabajan contigo o cerca de ti. Gracias por todos esos momentos que has compartido conmigo.

Mi trío, Salva, Rosa e Isa, tanto que agradecerle a aquellos que, después de pasar tantas horas juntos en el lab aún se necesita quedar con ellos para disfrutar del poco tiempo libre que nos queda. No sé si se trata de algún efecto secundario derivado del constante esfuerzo mental al que estamos sometidos el día a día, pero lo cierto es que, me siento orgulloso de tener esa necesidad y ello hace que os sienta como mi segunda familia. Rosa, contigo empecé esta aventura, a la que poco después se incorporaron Salva e Isa, y a pesar de que mi ceja se dio la vuelta entera y fue a parar a la nuca reconozco que cada día que pasa me alegro más del momento en el que os conocí. Juntos hemos compartido tantos momentos que no sabría ni por dónde empezar. Nos hemos ayudado personal y profesionalmente, hemos compartido nuestras primeras alegrías y pesares como principiantes en la investigación, nuestros miedos a las tan necesarias estancias en las que no nos ha hecho falta tiempo para pensar en coger un avión para visitarnos y como no podría ser de otra manera el estrés final de las tesis. Salva empezamos con la tuya (¡que campeón!) ahora la mía y, en breve.....nuestra Rosa, *¡esto sí es vivir la tesis tres veces!*. Y es que como dice el refrán....bueno de momento lo dejo..... ¿pensabais que iba a citar algunos refranes?. Sería demasiado obvio lo que pasaría, ya sabéis que se me da estupendamente bien versionarlos. Lo que tengo claro es que después de estos últimos meses, si las circunstancias nos lo permiten y seguimos por aquí, estaremos entrenados para vivir por cuarta vez la tesis con Isa que, aunque le quede un poco más, ha tenido



AGRADECIMIENTOS

que soportarnos todo este tiempo. Los tres sabéis que sin vosotros esto no habría sido posible porque cuando uno de nosotros cae los demás lo levantamos (.....y no es frase de azucarillo!!!!!! ☺).....porque cuando hay alguna situación de estrés para cualquiera de nosotros los demás ya están pensando en cómo solucionarlo.....porque.....podría seguir recogiendo motivos del por qué sin vosotros todo habría sido diferente, incluso podría dedicar unas líneas a cada uno de vosotros con lo mucho que me habéis aportado estos cuatro años pero.....y conociéndome (seguro ya lo estáis pensando), creo que para ello necesitaría imprimir la tesis en varios tomos y transportarla en carretilla. Por eso....no puedo más que volver a decir una vez más gracias por estar ahí, siempre a mi lado. Espero poder seguir estando cerca de vosotros.

¡GRACIAS A TODOS!!!!

¡GRAZIE A TUTTI!





Índice

RESUMEN	37
SUMMARY.....	43
OBJETO DE LA MEMORIA	49
INTRODUCCIÓN	
1. ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA: ALIMENTO FUNCIONAL	55
1.1. Dimensión antropológica y sociocultural del aceite de oliva en la cultura mediterránea	55
1.2. Efectos saludables del aceite de oliva virgen extra (EVOO): del mito a la evidencia científica.....	59
1.3 Compuestos bioactivos del EVOO	63
1.4 Polifenoles y bioactividad.....	68
1.4.1 Biosíntesis de polifenoles en el olivo	69
1.4.2 Familias de compuestos fenólicos.....	72
1.4.3 Propiedades funcionales de los polifenoles de EVOO	80
2. TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE EVOO	86
2.1 Operaciones preliminares: recolección, transporte, almacenamiento, limpieza y lavado del fruto.....	86
2.2 Preparación de la pasta	90
2.2.1 Molturación.....	90
2.2.2 Batido.....	95
2.3 Extracción de EVOO.....	98
2.4 Almacenamiento de EVOO.....	102
2.4.1 Operaciones previas al almacenamiento: decantación.....	102
2.4.2 Almacenamiento final en depósitos	103



2.4.3 Técnicas para conservar la calidad del aceite durante el almacenamiento.....	104
2.5 Filtración.....	106
2.5.1 Sistemas de filtración convencionales	107
2.5.2 Mejoras en los sistemas de filtración convencional.....	112
2.5.3 Nuevos sistemas de filtración	115
2.6 Envasado.....	117
2.7 Impacto del proceso de elaboración en los polifenoles del EVOO	118
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES.....	124
3.1 Extracción de los polifenoles de EVOO.....	124
3.2 Determinación del contenido en polifenoles del EVOO	127
3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	131
3.2.1 Caracterización de polifenoles del EVOO mediante HPLC acoplada a diferentes sistemas de detección	131
3.2.2 Instrumentación novedosa de HPLC.....	133
3.3 Espectroscopía de absorción molecular UV-Vis.....	137
3.4 Espectrometría de masas.....	139
3.4.1 Acoplamiento HPLC-MS.....	140
3.4.1 Analizadores de masas de trampa de iones.....	144
3.4.2 Analizadores de masas de tiempo de vuelo.....	147
BIBLIOGRAFÍA.....	153



PARTE EXPERIMENTAL

SECCIÓN I. NUEVAS PERSPECTIVAS ANALÍTICAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES DEL EVOO: CLASIFICACIÓN VARIETAL, BIOACTIVIDAD Y FUENTES ALTERNATIVAS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....183

Capítulo 1. Caracterización mediante HPLC-ESI-TOF-MS de polifenoles del aceite de oliva y su potencial como predictores de la variedad. Evaluación de su actividad citotóxica *in vitro* frente a células de cáncer de mama.....187

Capítulo 2. Potencial de los subproductos generados durante el almacenamiento del EVOO como fuente alternativa de polifenoles.....205

Capítulo 3. Monitorización de los compuestos bioactivos del EVOO y de los subproductos generados durante el almacenamiento.....219

SECCIÓN II. NUEVAS PERSPECTIVAS EN TECNOLOGÍA DE FILTRACIÓN DEL EVOO.....261

Capítulo 4. Filtración del EVOO: efecto en los componentes minoritarios, estabilidad oxidativa, y características físico-químicas y sensoriales.....265

Capítulo 5. Efecto de los nuevos sistemas de filtración en los compuestos antioxidantes, estabilidad oxidativa y características físico-químicas y sensoriales.....279

Capítulo 6. Caracterización de los compuestos fenólicos retenidos en diferentes coadyuvantes de naturaleza orgánica e inorgánica, utilizados en el proceso de filtración del EVOO.....291

Capítulo 7. Nuevas tendencias en filtración: desarrollo y formulación de tortas filtrantes a base de almidón.....299



CONCLUSIONES.....315

FINAL CONCLUSIONS.....327



Índice de Tablas

Tabla 1. Principales ácidos fenólicos presentes en el EVOO.73

Tabla 2. Principales lignanos presentes en el EVOO.....75

Tabla 3. Flavonoides del EVOO.....76

Tabla 4. Principales alcoholes fenólicos identificados en el EVOO.....77

Tabla 5. Principales secoiridoides identificados en el EVOO.79

Tabla 6. Algunos parámetros de las diferentes técnicas de cromatografía líquida en columna..... 136

Tabla 7. Longitud de onda máxima de absorción de los principales compuestos fenólicos..... 139



Índice de Figuras

Figura 1. Campo de olivos. Vincent Willem van Gogh. 1889.	56
Figura 2. Principales funciones del EVOO.....	62
Figura 3. Composición química del aceite de oliva.....	63
Figura 4. Ruta del ácido siquímico, del acetato y metabolismo fenilpropanoide.. ..	70
Figura 5. Ruta del ácido mevalónico y metabolismo de la oleuropeína..	71
Figura 6. Principales actividades biológicas atribuidas a los polifenoles del aceite de oliva virgen extra.	82
Figura 7. Frutos en diferentes estados de maduración.	86
Figura 8. Envase empleado en el transporte de la aceituna.	88
Figura 9. Lavadora de aceitunas.	89
Figura 10. Molino empiedro de tres muelas.....	92
Figura 11. Detalle interior de un molino de martillo.....	94
Figura 12. Detalle interior de una batidora horizontal.. ..	96
Figura 13. Método tradicional de prensado mediante capachos.	99
Figura 14. Detalle interior del sistema de extracción de tres fases.	101
Figura 15. Bodega de almacenamiento de aceite.....	104
Figura 16. Turbios generados durante el almacenamiento del aceite..	106
Figura 17. Tanque de desbastado.	109
Figura 18. Sala de filtración (Aceites Maeva S.L.).	111
Figura 19. Filtro prensa.	112
Figura 20. Procedimientos de extracción de celulosa	114
Figura 21. Sistema de filtración en saco.....	116
Figura 22. Envasadora de aceite de oliva.	118
Figura 23. Etapas de la extracción en fase sólida.....	126
Figura 24. Esquema de un equipo de HPLC.....	134



Figura 25. Plataforma analítica utilizada en el desarrollo de la parte experimental de la presente tesis doctoral. 140

Figura 26. Rango de aplicación de las principales interfases empleadas en el acoplamiento HPLC-MS para la determinación de polifenoles del EVOO..... 142

Figura 27. Detalle del acoplamiento HPLC-ESI-MS. 143

Figura 28. Proceso de formación de electrospray. 144

Figura 29. Componentes de un analizador de masas IT..... 145

Figura 30. Obtención de espectros de masas con analizador IT..... 147

Figura 31. Componentes de un analizador de masas TOF. 148



Índice de Abreviaturas

APCI: ionización química a presión atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization)

DAD: detector de batería de diodos (diodo array detection)

DNA: ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

3,4-DHPEA: hidroxitirosol (hydroxytyrosol)

3,4-DHPEA-EDA: decarboximetil oleuropeina aglicona (decarboxymethyl oleuropein aglycone)

3,4-DHPEA-EA: oleuropeina aglicona (oleuropein aglycone)

EVOO: aceite de oliva virgen extra (extra-virgin olive oil)

ESI: ionización por electrospray (electrospray ionization)

HDL: lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoproteins)

p-HPEA: tirosol (tyrosol)

p-HPEA-EDA: decarboximetil ligustrósido aglicona (decarboxymethyl ligstroside aglycone)

p-HPEA-EA: ligustrósido aglicona (ligstroside aglycone)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography)

IT: analizador de masas de trampa de iones (ion trap mass spectrometer)

LDL: lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoproteins)



LLE: extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction)

MS: espectrometría de masas (mass spectrometry)

NP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase normal (normal-phase high performance liquid chromatography)

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (reverse-phase high performance liquid chromatography)

RRLC: cromatografía líquida de resolución rápida (rapid resolution liquid chromatography)

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

SLE: extracción sólido-líquido (solid-liquid extraction)

SPE: extracción en fase sólida (solid-phase extraction)

TOF: analizador de masas de tiempo de vuelo (time-of-flight mass spectrometer)

UPLC: cromatografía líquida de ultra alta presión (ultrahigh pressure liquid chromatography)

UV-Vis: detector ultravioleta-visible (ultraviolet visible detector)





Resumen

El aceite de oliva virgen extra (extra-virgin olive oil, EVOO) se puede considerar como un alimento funcional ya que además de proporcionar nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos del individuo, contiene otros componentes que ejercen una serie de efectos beneficiosos sobre el organismo, más allá de los beneficios nutricionales aceptados. Entre estos componentes, los polifenoles del EVOO son los compuestos bioactivos que han despertado un mayor interés debido al creciente número de publicaciones científicas que ponen de manifiesto sus efectos saludables en los diferentes ámbitos de la medicina.

Esta memoria recoge los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada “**Aceite de oliva como alimento funcional: nuevas perspectivas analíticas y tecnológicas**”. Se ha dividido en dos bloques: introducción y parte experimental. La **INTRODUCCIÓN** incluye una revisión bibliográfica acerca de la composición fenólica del aceite de oliva, así como de sus propiedades bioactivas, del efecto del proceso de elaboración y de las diferentes metodologías analíticas para llevar a cabo el estudio de la composición de esta fracción. Finalmente se describen las técnicas analíticas utilizada en el trabajo experimental.

La **PARTE EXPERIMENTAL: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**, dividida en dos secciones, expone los resultados obtenidos en el análisis de la composición fenólica del EVOO, en sus propiedades bioactivas y en el impacto que las nuevas tecnologías, incorporadas en las etapas finales del proceso tecnológico, tienen sobre estos compuestos.

La **SECCIÓN I** se ha dedicado a profundizar en el conocimiento de la composición fenólica del aceite y su potencial bioactivo frente al cáncer



de mama, así como la búsqueda de fuentes alternativas de estos compuestos. El aceite de oliva es rico en polifenoles, sin embargo es una fracción compleja, y dada su demostrada bioactividad el desarrollo de metodologías analíticas que permitan un mayor conocimiento de la misma son prioritarias. Así, en el **capítulo 1** se describe la optimización de un método analítico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectroscopía UV-Vis con detector de batería de diodos (DAD) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) que se ha utilizado para la caracterización del extracto polifenólico de 14 aceites pertenecientes a las principales variedades de olivas españolas (Picual, Hojiblanca, Arbequina, Cornezuelo y Manzanilla). El método ha sido validado calculando para ello los parámetros correspondientes a la linealidad, sensibilidad y precisión. El perfil fenólico ha sido utilizado en la construcción de un modelo de clasificación varietal. A continuación se ha evaluado el potencial citotóxico *in vitro* de estos extractos frente a una línea celular de cáncer de mama sensible al tratamiento con anticuerpos anti-HER2, en colaboración con el Instituto Catalán de Oncología (ICO) de Girona. En el **capítulo 2** se demuestra el potencial de los subproductos generados durante el almacenamiento como fuente alternativa de compuestos bioactivos mediante extracción líquido-líquido y sólido-líquido seguido de HPLC-DAD acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) y trampa de iones (IT-MS). Para finalizar este bloque, en el **capítulo 3** se ha monitorizado el comportamiento de estos compuestos bioactivos tanto en el aceite como en los subproductos derivados de su almacenamiento mediante HPLC-ESI-TOF-MS.

La **SECCIÓN II** se ha centrado en el estudio de la etapa de filtración del aceite de oliva, sus diferentes tipos, el impacto en el contenido en polifenoles así como el desarrollo de nuevas alternativas en la tecnología



del proceso. En el **capítulo 4** se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el estado de la tecnología de filtración y su efecto en los componentes minoritarios del EVOO, con especial énfasis en la fracción fenólica. En el **capítulo 5** se ha establecido el efecto de los nuevos sistemas de filtración, en saco y con gases, sobre la calidad del aceite de oliva, así como las variaciones cualitativas y cuantitativas en el perfil fenólico producidas por los diferentes sistemas de filtración sometidos a evaluación. Además se ha establecido la relación existente entre el efecto de la filtración sobre los polifenoles y la estabilidad oxidativa del aceite. El trabajo experimental incluido en este capítulo se desarrolló en el Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Campus di Scienze degli Alimenti de la Universidad de Bolonia. En el **capítulo 6** se ha caracterizado el perfil fenólico de los compuestos retenidos por diferentes agentes filtrantes de naturaleza tanto orgánica como inorgánica empleados como coadyuvantes del proceso. En el **capítulo 7** se describe un nuevo procedimiento de filtración de aceite de oliva mediante la utilización de un agente filtrante constituido a base de almidón en las etapas de desbastado y/o abrillantado del aceite, así como la evaluación de su enriquecimiento en polifenoles del aceite de oliva. Este trabajo de investigación se ha realizado en colaboración con la empresa Aceites Maeva S.L. como consecuencia de una Orden de Incentivos de la Junta de Andalucía (440406).





Summary

Extra-virgin olive oil (EVOO) could be considered as functional food due to affecting beneficially one or more target functions in the body, beyond adequate nutrition, in a way that it improves health and well-being or reduces the risk of disease. Indeed, EVOO has compounds that provide health benefits, including the prevention and treatment of diseases. Among olive oil components, polyphenols have received considerable attention in recent years. Evidence from several studies has revealed that the protective effects of EVOO against chronic diseases such as atherosclerosis, cancer, obesity, diabetes, and coronary diseases are related to the phenolic compounds.

This work is a summary of all the results obtained for the PhD thesis: *“Aceite de oliva como alimento funcional: nuevas perspectivas analíticas y tecnológicas (Extra-virgin olive oil as functional food: new analytical and technological trend)”*. The current work can be divided in two sections: introduction and the experimental ones. The **INTRODUCTION** includes outstanding information about the health properties of the EVOO, its elaboration process and analytical approach to the qualitative and quantitative characterization of the EVOO polyphenols.

The **EXPERIMENTAL SECTION, RESULTS AND DISCUSSION**, divided in two sections, summarizes the results obtained in the experimental work.

SECTION I is focused on the study of the EVOO phenolic composition, its potential bioactivity against human breast cancer cells, and searching for an alternative source of these compounds. Polyphenols are a heterogenic and complex group of diverse nature, and their reported health



properties have promoted active research on analytical methods to qualitative and quantitative characterization of these compounds. **Chapter 1** describes the development of a high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (DAD) coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) method to characterize the phenolic extracts in 14 EVOOs belonging to the main Spanish olive varieties (Picual, Hojiblanca, Arbequina, Cornezuelo y Manzanilla). The linearity, sensitivity, and precision parameters have been evaluated by the analytical method validation. The phenolic profile has been used to classify five different varieties of EVOO under study. Crude phenolic extracts directly obtained from these 14 EVOOs have been employed to delineate the biological actions (in terms of cytotoxicity) of complex multicomponent phenolic extract against human breast cancer cells. This work has been carried out in collaboration with the Instituto Catalán de Oncología (ICO) of Girona (Spain).

In **Chapter 2**, the potential of byproducts generated during storage of EVOO as a natural source of bioactive compounds has been evaluated using solid-liquid and liquid-liquid extraction processes followed by HPLC-DAD coupled to electrospray time-of-flight and ion trap mass spectrometry (ESI-TOF/IT-MS). **Chapter 3** includes monitoring the bioactive compounds status of EVOO and storage by-products over the shelf life by HPLC-ESI-TOF-MS in order to achieve a better understanding of the behavior of these bioactive compounds during storage.

SECTION II, divided in 4 chapters, examines the EVOO filtration processes. **Chapter 4** provides an overview about different filtration systems and their effect on the minor fraction of EVOO with particular emphasis on polyphenols. **Chapter 5** discusses the effect of the new



filtration systems using polypropylene filter bag and inert gas flows (argon and nitrogen) as filter aids on the EVOO quality, and establishes the qualitative and quantitative variations of the polyphenols and the relationship between these compounds and their oxidative stability. This work has been carried out in the Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Campus di Scienze degli Alimenti, of the University of Bologna. **Chapter 6** includes the analytical characterization of the phenolic compounds retained in different inorganic and organic filter aids used for filtration of EVOO on a laboratory scale. **Chapter 7** describes a new filtration process to remove suspended solids or moisture and make the olive oil more brilliant using native starch as main filter aids and the evaluation of the filter cake enrichment in polyphenols coming from olive oil. This work was carried out in collaboration with the company Aceites Maeva S.L..





Objeto de la memoria

El creciente interés por el aceite de oliva se debe, entre otras muchas razones, a las referencias a sus efectos saludables. Tradicionalmente se ha atribuido la mayor parte de la bioactividad de este alimento al ácido oleico. Sin embargo, en los últimos años, las investigaciones sobre aceite de oliva y salud han ido perfilando rutas y mecanismos de acción frente a diferentes patologías en los que cada vez han tomado más protagonismo otros compuestos presentes en la fracción minoritaria del aceite. De todos ellos, son los polifenoles los compuestos que se han relacionado con la mayoría de esos efectos beneficiosos por lo que el objetivo general de esta tesis es **profundizar en el conocimiento analítico de este grupo de compuestos, en la evaluación de su bioactividad frente a patologías como el cáncer de mama, en la búsqueda de fuentes alternativas de polifenoles del aceite de oliva y en el efecto del proceso de producción sobre esta familia de compuestos.**

Este ambicioso objetivo se puede subdividir en dos grados objetivos correspondientes a las dos secciones en los que se ha dividido la parte experimental de la tesis:

- En el **primer bloque** de la tesis se pretende profundizar en el conocimiento de la fracción fenólica de aceites obtenidos a partir de las principales variedades de oliva españolas con una mayor extensión de área cultivada en el territorio español. Para ello el trabajo experimental a llevar a cabo estará basado en el potencial analítico que ofrece el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con espectroscopía UV-Vis con detector de batería de diodos (DAD) y espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS). De los resultados de caracterización se comprobará si el perfil fenólico de las diferentes variedades permite una diferenciación clara entre ellas. Se evaluará además la



bioactividad *in vitro* que presentan los extractos fenólicos de los aceites pertenecientes a las diferentes variedades de oliva en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3. Por último, y dada la importancia de estos compuestos, se procederá a evaluar el potencial de los subproductos generados durante el almacenamiento del aceite como una fuente alternativa de compuestos bioactivos, utilizando para ello extracción líquido-líquido y sólido-líquido seguido del análisis de los extractos fenólicos mediante HPLC-DAD acoplada a espectrometría de masas con analizadores TOF y de trampa de iones (IT).

- En el **segundo bloque** se trata de evaluar el efecto de los diferentes sistemas de filtración dada la importancia que esta etapa final del proceso presenta en la calidad y aceptación por el consumidor del aceite de oliva. Para ello se llevará a cabo una investigación del estado de la técnica y el conocimiento científico sobre el efecto de esta etapa en la fracción fenólica. Se aplicarán los nuevos sistemas de filtración en saco y con gases para poder establecer una comparación entre ellos y determinar la relación existente entre el efecto de estas nuevas tecnologías en la fracción fenólica del aceite y la repercusión final en la estabilidad oxidativa del mismo. Por otro lado, se evaluará la interacción con los polifenoles de los agentes filtrantes convencionales, tanto de naturaleza inorgánica como orgánica, utilizados en los procesos de desbaste y abrillantado del aceite de oliva y por último, se investigarán posibles alternativas al proceso de filtración para obtener tortas filtrantes enriquecidas en compuestos bioactivos de interés.



INTRODUCCIÓN



1. ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA: ALIMENTO FUNCIONAL

1.1. Dimensión antropológica y sociocultural del aceite de oliva en la cultura mediterránea

La alimentación y la historia de las civilizaciones están íntimamente relacionadas. El hombre se alimenta, no sólo porque ha de mantener su soporte biológico, sino que ligado a su función nutricional, el alimento presenta una dimensión psicológica y sociocultural. Los alimentos poseen carácter simbólico, ya que están revestidos de significado intelectual, moral o religioso. El hombre, realiza el aporte de nutrientes a su organismo y colma sus necesidades bioquímicas, sólo a través de las sensaciones que el alimento despierta mediante sus propiedades organolépticas y el valor simbólico con que se manifiesta. Por eso, su potencia de evocación trasciende más allá de su simple cualidad de vehículo de nutrientes. Estos diferentes planos del alimento se proyectan en una sola pantalla donde confluyen todos estos factores y determinan su inclusión en la dieta.

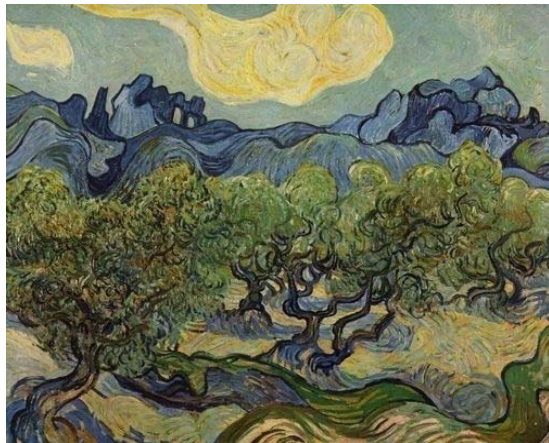
Entre todos los alimentos de una población, se encuentran los que formaron parte de la alimentación de sus antepasados en el contexto histórico-social en el que vivieron. Así, cada país ha tenido sus propios avatares históricos y en base a ello, cada uno tiene una pirámide de alimentación con peculiaridades propias. Dado a un pasado común, todos los pueblos mediterráneos comparten los alimentos tradicionales y representativos de la pirámide mediterránea: el aceite de oliva, el pan y el vino.



INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es el alimento de la triada cultural de la alimentación mediterránea con una mayor dimensión tanto cultural, como antropológica, económica y social. Su consumo comenzó en tiempos remotos y el mundo clásico siempre abanderó su difusión. La teoría más aceptada sitúa sus orígenes en Asia Menor, seis milenios antes que nuestra era, donde se han encontrado referencias históricas y vestigios arqueológicos del olivo y zumo obtenido de sus frutos en Mesopotamia y Persia. El pasado del aceite de oliva está ligado al cultivo del olivo y con él al de las distintas poblaciones que han ido pasando por el territorio de la cuenca mediterránea. Por ello, se puede considerar que el aceite de oliva es una expresión real de la rica huella cultural que las distintas civilizaciones han dejado en nuestras costumbres.

El olivar, su fruto y el zumo obtenido a partir de él han constituido el



símbolo del Mediterráneo y han marcado, en gran medida, los límites del ecosistema. Georges Duhamel refleja este hecho en su frase *“el mediterráneo acaba donde el olivo deja de crecer, la idea de cocina mediterránea evoca de forma natural el olor del aceite de oliva”*(1).

Figura 1. Campo de olivos. Vincent Willem van Gogh. 1889.

Este alimento ha impreso el carácter simbólico y funcional de muchos de los ritos y aplicaciones terapéuticas desarrolladas por las distintas civilizaciones, acompañando el florecer de las culturas que se han ido instalando en la cuenca mediterránea. Con aceite se ha consagrado durante milenios las personas, los altares, los objetos litúrgicos, los



edificios sagrados y los profanos. Con aceite celebraba la Iglesia Católica sus ceremonias, y con el nombre de Santo Óleo, acompañaba al ser humano desde el nacimiento, con el rito del bautismo, hasta la muerte, con el de la extremaunción.

En la antigua Grecia fue donde el olivo alcanzó su consideración más elevada. Con aceitunas alimentaban los griegos a sus soldados⁽²⁾, siendo un alimento tan especial que no podía ser ajeno a la voluntad divina. Cuenta la mitología griega que, Aristeos el “menor”, hijo de Apolo y de la ninfa Cirene, fue el inventor del cultivo del olivo. Gracias a la diosa Minerva, conocida como Palas Atenea, por primera vez se atribuyeron propiedades beneficiosas al zumo obtenido de su fruto. En el conflicto entre Palas Atenea y Poseidón, ambos tenían que ofrecer a la Acrópolis un presente, y a partir de entonces ésta llevaría el nombre del dios ganador. Poseidón proporcionó uno de los elementos fundamentales de la tierra, agua, haciendo aparecer un gran lago. Minerva, por el contrario, hizo aparecer un olivo. En su veredicto, el consejo de los dioses tuvo en cuenta que el regalo de Atenea era capaz de *“ser luz en la noche, bálsamo para las heridas y alimento que da salud y energía”*⁽³⁾. Pero fue con Hipócrates, considerado por muchos como el “Padre de la Medicina”, cuando el uso del aceite utilizado en el tratamiento de sus pacientes lo elevó a la categoría de medicamento. En la antigua Roma, el aceite de oliva se utilizaba tanto para alimentación como ungüento para masajes aromatizado con hierbas silvestres. Columela, entre otros gastrónomos de su época como Catón o Plinio, detalla el uso del aceite en la dieta romana en el año 54 d. C⁽⁴⁾.

El consumo del aceite de oliva en la antigua Hispania llegó de la mano de los fenicios, tomando su auge durante el Impero Romano. Sin embargo,



INTRODUCCIÓN

estuvo marcado por los vaivenes históricos, en especial durante la Edad Media, por la decadencia de este Imperio y la llegada de los invasores bárbaros. Esto dio lugar a que coexistieran dos tipos de dietas, una “bárbara-del norte” y una “romano-mediterránea”. En la primera de ellas, no estaba presente el aceite de oliva, en parte porque los bárbaros estaban acostumbrados a otro tipo de grasas en la dieta.

Afortunadamente, la dominación árabe de la península originó la recuperación del olivo. Este hecho tomó especial relevancia en la recuperación del concepto que, históricamente ha estado presente a lo largo de los siglos, la virtud del aceite de oliva. Sobre él se pronunciaron los ilustres sabios del califato cordobés, sabedores de la importancia que tenía la adecuada alimentación para tener una vida sana. Maimónides, considerado uno de los médicos más célebres de la Edad Media, recoge en su obra Mishné Torá “...todas las enfermedades que sufre el hombre, o al menos la gran mayoría, son consecuencia de una alimentación deficiente o desmesurada”. Para Abulcasis, médico y científico andalusí, el aceite de oliva era un medicamento de origen vegetal lleno de virtudes curativas. Todo esto dio lugar a que durante el siglo XII Al-Andalus se convirtiera en la región olivarera mayor productora de aceite de oliva de la Península⁽⁴⁾.

Tras la invasión árabe, el cristianismo trajo nuevamente la pérdida progresiva del aceite como alimento, tanto por consideraciones geográficas como culturales. Los cristianos autóctonos y los descendientes de los godos utilizaban la grasa animal como principal fuente de grasa dietética, excepto en los tiempos de cuaresma y de ayuno. Bajo el mandato del Papa Pío IV se aprobó el concilio de Trento. En este concilio ecuménico se establecieron los 180 días de abstinencia en los que se prohibía el consumo de grasas animales, siendo sustituidas por grasas



de origen vegetal, principalmente aceite de oliva. Esta diferencia en el consumo de aceite, que originariamente surgió por motivos religiosos, marco el patrón dietético de las sucesivas civilizaciones y duró hasta bien entrado el siglo XX.

1.2. Efectos saludables del aceite de oliva virgen extra (EVOO): del mito a la evidencia científica

El creciente interés por el aceite de oliva virgen extra (extra-virgin olive oil, EVOO)¹ se debe a las referencias a sus efectos saludables, atribuciones que, como se ha comentado anteriormente, le han acompañado a lo largo de los siglos. Sin embargo no ha sido hasta la época contemporánea cuando, de la mano de la epidemiología nutricional, se han aportado las primeras evidencias científicas de su beneficio para la salud.

En las últimas décadas esta rama de la epidemiología se ha encargado de establecer la relación de los diversos nutrientes presentes en los alimentos de la dieta con el riesgo de padecer enfermedades crónicas y degenerativas, especialmente en los países occidentales. Fue el estudio observacional de cohorte de los Siete Países, el primero que puso de manifiesto el efecto cardioprotector del aceite de oliva. En este estudio epidemiológico, Ancel Keys, conocido como el gran impulsor de la dieta mediterránea, observó una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares en los países mediterráneos frente al resto de Europa y Estados Unidos. Esta menor prevalencia estaba asociada a un mayor consumo de grasa monoinsaturada, siendo su principal fuente dietética el

¹ A lo largo de la presente memoria se ha utilizado indistintamente aceite de oliva y EVOO para hacer referencia al aceite de oliva virgen extra.



INTRODUCCIÓN

aceite de oliva. Debido a ello, a este aceite de oliva se le atribuyó el principal protagonismo en la protección del riesgo cardiovascular.

En los años siguientes, la evidencia científica de la relación entre una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados y enfermedades cardiovasculares se hizo cada vez más latente. Así, diferentes estudios clínicos de casos y controles demostraron que la ingesta de aceite de oliva mejora el perfil lipídico en plasma, reduciendo el riesgo de padecer infarto de miocardio⁽⁵⁻⁷⁾.

La relación del aceite de oliva con otro tipo de patologías características de las sociedades occidentales, tales como diabetes, obesidad y síndrome metabólico no ha pasado desapercibida en el área de la epidemiología. Diferentes estudios llevados a cabo con pacientes diabéticos establecieron que, una dieta rica en aceite de oliva tiene un mejor efecto sobre la glucemia y la insulinemia, reduciendo la resistencia a la insulina, que una dieta rica en otro tipo de grasas⁽⁸⁾. También se ha relacionado el consumo de aceite de oliva con una menor incidencia de obesidad. Aunque el mecanismo molecular es desconocido, algunos autores apuntan a la relación existente entre el ácido oleico y algunos mensajeros implicados en la sensación de saciedad⁽⁹⁾.

Los nexos de unión entre los factores nutricionales y el cáncer también se han puesto de manifiesto, especialmente en relación con el aporte dietético de grasa⁽¹⁰⁾. Las primeras evidencias científicas pusieron de relieve una relación positiva entre una dieta hipercalórica, con una mayor ingesta de grasas y con ello de energía total y el cáncer. Sin embargo, esta asociación positiva no fue unánime, en el sentido en que dependía de la calidad de la grasa de la dieta. Así, son numerosos los estudios de cohorte



que recogen que los datos de morbilidad y mortalidad por cáncer en los países del Mediterráneo, donde el aceite de oliva representa la principal grasa de la dieta, son menores^(11,12). Tal es el caso del cáncer de colon en el que, basándose en la evidencia científica de la relación existente entre un mayor consumo del aceite de oliva y una menor incidencia de esta patología, diferentes autores han llegado a afirmar que compuestos presentes en esta grasa podrían prevenir la aparición de la enfermedad reduciendo la progresión de una mucosa normal a adenocarcinoma. Su mecanismo de acción, todavía desconocido, estaría relacionado con efecto de estos compuestos en el metabolismo del colonocito⁽¹³⁾. Por otro lado, son varios los estudios de casos y controles que, incluso de un modo más consistente que para el cáncer de colon, han encontrado que el aceite de oliva resulta protector frente al cáncer de mama⁽¹¹⁾.

Todos estos estudios epidemiológicos ponen de relieve la importancia del aceite de oliva en relación con la salud de los consumidores. Se ha establecido la importancia del efecto fisiológico y funcional del aceite de oliva sobre el sistema nervioso, digestivo, cardiovascular, inmune y en la propia longevidad⁽¹⁴⁾. La **Figura 2** muestra, de forma esquemática los principales tejidos, órganos y sistemas para los que se han descrito funciones fisiológicas del aceite de oliva.

Las evidencias científicas de la significativa correlación entre aceite de oliva y salud han dejado patente la importancia del consumo de aceite de oliva para conseguir una adecuada alimentación, no sólo para el normal funcionamiento y desarrollo del organismo, sino también como medio para mejorar el estado de salud, prevenir algunas enfermedades, e incluso como apoyo terapéutico en algunas patologías. Por todo ello, se



INTRODUCCIÓN

puede afirmar que el **aceite de oliva** puede ser considerado un **alimento funcional**.

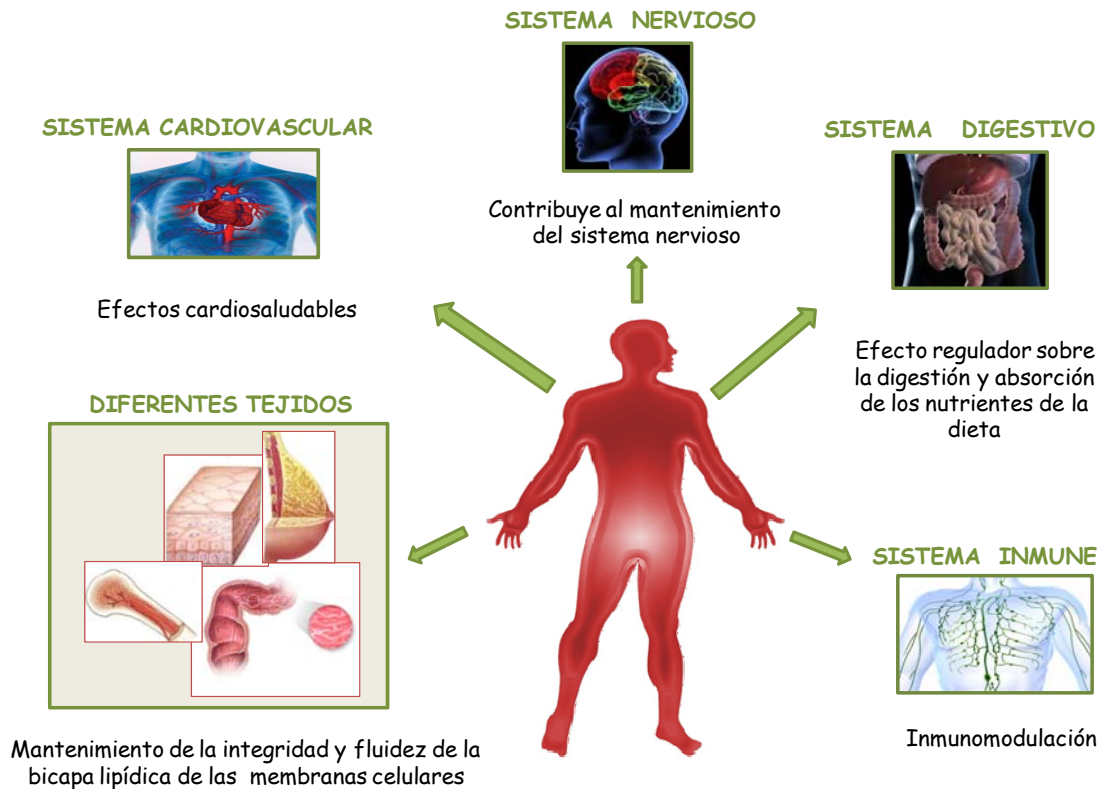


Figura 2. Principales funciones de EVOO.

Aunque la definición de alimento funcional aún no está muy clara, una aproximación que engloba todo lo anterior podría ser la siguiente: alimentos que logran demostrar satisfactoriamente que poseen un **efecto beneficioso** sobre una o varias funciones específicas del organismo, que **mejoran el estado de salud y de bienestar**, o bien que **reducen el riesgo de padecer una enfermedad**. Cuando se habla de alimentos funcionales, por tanto, se hace referencia a aquellos alimentos que, además de proporcionar los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos del individuo, contienen otros componentes que, estando presentes en el mismo de forma natural o procesada, pueden ejercer una serie de efectos fisiológicos beneficiosos sobre el



organismo, más allá de los beneficios nutricionales aceptados. A estos componentes del alimento responsables de ese efecto beneficioso se les denomina **compuestos bioactivos**. En el aceite de oliva se han incluido en esta categoría tanto componentes mayoritarios como otros que se encuentran en pequeñas concentraciones.

1.3 Compuestos bioactivos del EVOO

Desde el punto de vista químico el aceite de oliva se divide en dos fracciones, una fracción mayoritaria o saponificable, que representa el 98- 99% del peso total del aceite, y una fracción minoritaria, que alcanza sobre el 2% del peso del aceite de oliva (**Figura 3**).

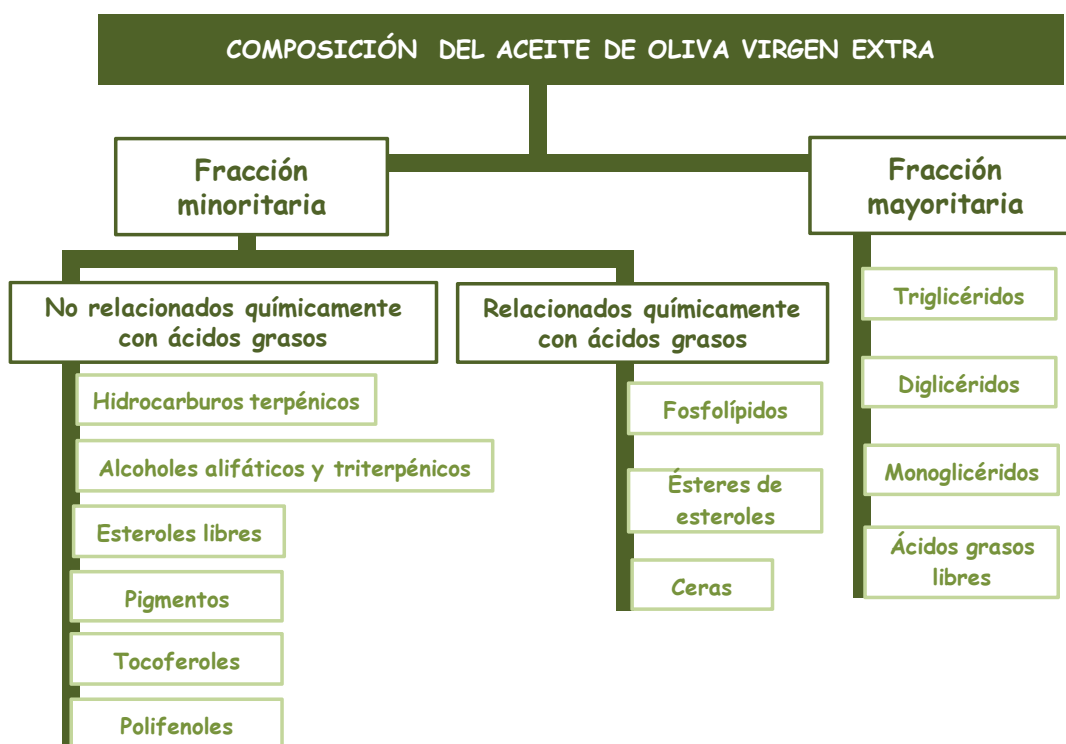


Figura 3. Composición química del aceite de oliva.

En ambas fracciones se encuentran componentes a los que en los últimos años se les ha atribuido propiedades bioactivas confirmadas. Entre los constituyentes de la fracción mayoritaria, el principal nutriente al que,



INTRODUCCIÓN

además de su función energética, tradicionalmente se le atribuye la mayor parte de la bioactividad de este alimento es el **ácido oleico** (18:1, n-9). Representa del 68-82% del total de ácidos grasos presentes en el aceite. Se puede encontrar en su forma libre, aunque principalmente está formando parte de los triglicéridos. Estos últimos compuestos suponen el componente principal del aceite de oliva, ya que los olivos al igual que la mayoría de los cultivos oleaginosos, acumulan en sus frutos lípidos en forma de triglicéridos.

Se ha demostrado que el ácido oleico contribuye al mantenimiento del endotelio vascular, la regulación de la hemostasia, e interviene en la agregación plaquetaria⁽¹⁵⁾. Este compuesto bioactivo reduce la concentración plasmática de colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol), y es capaz de aumentar los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol). Además del efecto sobre el sistema cardiovascular, diferentes autores han puesto de manifiesto las propiedades beneficiosas del ácido oleico sobre otros sistemas del organismo.

El demostrado efecto supresor sobre el sistema inmune que conlleva el consumo de aceite de oliva se ha atribuido, en parte, a su composición en ácido oleico. Tradicionalmente, en los estudios en los que se ha evaluado el efecto inmunosupresor de la grasa de la dieta, principalmente ácidos grasos poliinsaturados, el consumo de aceite de oliva se había utilizado como placebo al considerar que los ácidos grasos monoinsaturados presentaban una actividad neutra frente a los diferentes desórdenes del sistema inmune. Sin embargo, en estudios realizados con animales se ha visto que la administración oral de una dieta con aceite de oliva modula la síntesis de citoquinas implicadas en los procesos inflamatorios. De igual



forma su administración ha producido una menor actividad de las células “*Natural Killer*”(16). Aunque en algunos casos los estudios en humanos han dado lugar a resultados contradictorios, la mayoría de investigadores coinciden en que el aceite de oliva ejerce un efecto inmunomodulador, aunque en menor grado que otras grasas con elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

Sin embargo, los mecanismos de acción no están del todo definidos, y cada vez son más los autores que han establecido que este efecto podría no estar sólo relacionado con el ácido oleico. Así, aceite de oliva y sistema inmune es un campo de batalla en el que aún falta mucho por explorar debido en parte a los diferentes mecanismos de acción propuestos para los ácidos grasos de la dieta, así como la posible participación de otros compuestos presentes en el aceite(17).

En los últimos años, las investigaciones sobre aceite de oliva y salud han ido perfilando rutas y mecanismos de acción en los que cada vez más han tomado protagonismo otros compuestos presentes en la fracción minoritaria del aceite. En efecto, es un hecho ampliamente aceptado por la comunidad científica que, el efecto protector o beneficioso de este alimento funcional frente a diferentes patologías no sería debido sólo a su elevado contenido en ácido oleico, sino también a la participación de otros compuestos presentes de forma natural en la fracción minoritaria. Esto ha despertado un creciente interés en el conocimiento esta fracción insaponificable. Sin embargo, es extremadamente difícil determinar de forma precisa la totalidad de los constituyentes menores debido a su complejidad estructural y a su baja concentración. En base a la naturaleza química de los mismos pueden dividirse en dos grupos, el primero consta de derivados de ácidos grasos, tales como fosfolípidos, ceras y ésteres de



INTRODUCCIÓN

esteroles. El segundo grupo incluye clases de compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos al que pertenecen la mayoría de compuestos que se han relacionado con las propiedades bioactivas, como son hidrocarburos terpénicos, alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroles libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos.

El principal componente de esta materia insaponificable es el **escualeno**, un triterpeno lineal polímero del isopreno que puede llegar a suponer hasta un 40% del peso total de esta fracción. A este hidrocarburo triterpénico se le ha relacionado con propiedades inmunomoduladoras y anticancerígenas frente a diferentes tipos de tumores, tales como cáncer de mama, de colon y de próstata^(18, 19). En recientes estudios *in vitro* se ha demostrado que, a pesar de poseer una baja capacidad antioxidante, este compuesto es capaz de evitar el daño oxidativo del ADN producido por especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) en células epiteliales mamarias⁽²⁰⁾. Sin embargo, este efecto no fue observado en líneas celulares tumorales de cáncer de mama. Esto puso de manifiesto que este compuesto podría contribuir al efecto preventivo del aceite de oliva sobre esta patología, pero no paliativo. Este hecho podría ser una de las causas de la menor incidencia de cáncer de mama en la población de los países del Mediterráneo.

Otros compuestos minoritarios que han despertado el interés por la comunidad científica son el **eritrodiol** y **uvaol**. Se trata de alcoholes triterpénicos pentacíclicos que parecen estar relacionados con efectos cardiosaludables. Yosra y colaboradores evaluaron la actividad antiaterogénica de estos compuestos en estudios *in vitro* sobre las LDL junto con otros ácidos relacionados con ellos, el ácido maslínico y



oleanólico, los cuales están presentes en la piel de la drupa de oliva y en subproductos del proceso de elaboración del aceite de oliva⁽²¹⁾. Los resultados obtenidos pusieron de relieve las propiedades antioxidantes y antitrombóticas del eritrodiol y uvaol, propiedades que justificarían la actividad antiaterogénica previamente reportada en la literatura científica.

Sin embargo, otros compuestos de la fracción minoritaria se han relacionado con los efectos cardiosaludables del aceite de oliva, no tanto por sus propiedades antioxidantes o antitrombóticas, sino por reducir los niveles del LDL-colesterol plasmático. Se trata de los esteroides del aceite, de los que el componente mayoritario es el **β -sitosterol**. Estos compuestos presentan una estructura molecular análoga que deriva del ciclohexanoperhidrofenantreno. Su naturaleza química es responsable de su actividad. Debido a su similitud estructural con el colesterol les permite establecer una competencia con las moléculas de colesterol dietético limitando o reduciendo su absorción a través de la barrera intestinal⁽¹⁹⁾.

La complejidad de esta fracción minoritaria es mucho mayor si cabe que las propiedades beneficiosas del aceite de oliva y, ante la evidente bioactividad de este alimento, la evaluación de las propiedades de otras clases de compuestos presentes en esta fracción insaponificable no ha pasado desapercibida. Tal es el caso de los **tocóferoles**. Se han descrito cuatro tipos en el aceite de oliva: α -, β -, γ -, y δ -tocoferol, siendo el mayoritario el α -tocoferol, conocido como vitamina E. Debido a su carácter antioxidante, estos compuestos evitan la oxidación de los lípidos de las membranas celulares en los sistemas biológicos, previenen los desórdenes de la piel así como la aterosclerosis y actúan frente a



INTRODUCCIÓN

diferentes tipos de cáncer⁽¹⁴⁾. La naturaleza de esta contribución a la bioactividad del aceite no es conocida en profundidad. Diferentes autores han establecido una posible actividad sinérgica de estos compuestos con los polifenoles, otros componentes minoritarios presentes en el aceite de oliva⁽¹⁹⁾.

Los **polifenoles** del aceite de oliva son los compuestos bioactivos que, en el momento actual han alcanzado una mayor popularidad debido al creciente número de publicaciones científicas que ponen de manifiesto sus efectos saludables en los diferentes ámbitos de la medicina^(19, 22-24). El potencial antioxidante de estos compuestos les permite actuar como mecanismo de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO generadas como consecuencia del estrés oxidativo al que está sometido el organismo provocan daños en los lípidos, proteínas y ADN, desencadenando el envejecimiento celular, aterosclerosis, cáncer, así como diferentes enfermedades neurodegenerativas⁽¹⁹⁾. No obstante, no se puede olvidar que aunque en la mayoría de los casos su actividad biológica se ha asociado con su capacidad antioxidante, el mecanismo molecular por el cual estos compuestos producen efectos beneficiosos sobre la salud sigue siendo, a día de hoy y en la mayoría de los casos, desconocido. Dada la importancia de estos compuestos, y por ser objeto de estudio en la presente tesis doctoral, se van a desarrollar con mayor detalle en los próximos apartados.

1.4 Polifenoles y bioactividad

La fracción fenólica del aceite de oliva presenta una gran complejidad estructural, mucho mayor si cabe que los efectos beneficiosos con los que se han relacionado a estos compuestos. Así, en los últimos años han aumentado el número de investigaciones destinadas a establecer un



mayor conocimiento de la composición de esta fracción para facilitar la comprensión de sus propiedades bioactivas. En este apartado se va a proceder en esa misma dirección, llevando a cabo una descripción de las diferentes familias de polifenoles identificados en el aceite de oliva, para posteriormente recoger las evidencias científicas de sus efectos beneficiosos.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios caracterizados químicamente por la presencia de uno o más sustituyentes -OH unidos a un anillo aromático. En el aceite de oliva, la fracción fenólica está formada por los componentes extraídos del mesocarpio de la aceituna y sus derivados obtenidos en reacciones tanto enzimáticas como químicas que tienen lugar durante la maduración del fruto y proceso de elaboración del aceite.

1.4.1 Biosíntesis de polifenoles en el olivo

La síntesis de estos compuestos bioactivos tiene lugar a través de las rutas del ácido siquímico, del acetato, metabolismo fenilpropanoide y la ruta del ácido mevalónico. La **Figura 4** representa un esquema simplificado de las tres primeras en base a las principales reacciones anabólicas descritas en la literatura científica^(25, 26).

En la **ruta del ácido siquímico** los carbohidratos son la fuente fundamental de átomos de carbono. A partir de la glucólisis no oxidativa se obtienen el fosfoenol piruvato y eritrosa-4-fosfato, que actúan como precursores para la síntesis de ácido siquímico. Este compuesto actúa como sustrato utilizado por la planta para la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. El principal destino metabólico de los aminoácidos es la síntesis de proteínas. Sin embargo, ambos compuestos,



INTRODUCCIÓN

y principalmente la fenilalanina, son precursores comunes en la síntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos a través de una serie de reacciones conocidas como **metabolismo fenilpropanoide**.

Este metabolismo implica la participación de compuestos que poseen un anillo fenol con una cadena lateral de 3 átomos de carbono (C6-C3). Estas reacciones tienen como resultado final la síntesis de ácidos cinámicos, benzóicos y fenoles simples, que pueden actuar como precursores para la síntesis de otros compuestos fenólicos tales como lignanos y flavonoides. Los primeros son, por definición, dímeros de fenilpropanoides unidos por un átomo de carbono central de sus cadenas laterales. Los segundos son obtenidos a partir de la condensación de fenilpropanoides con tres moléculas de malonil coenzima A (malonil-CoA) y sucesivas reacciones.

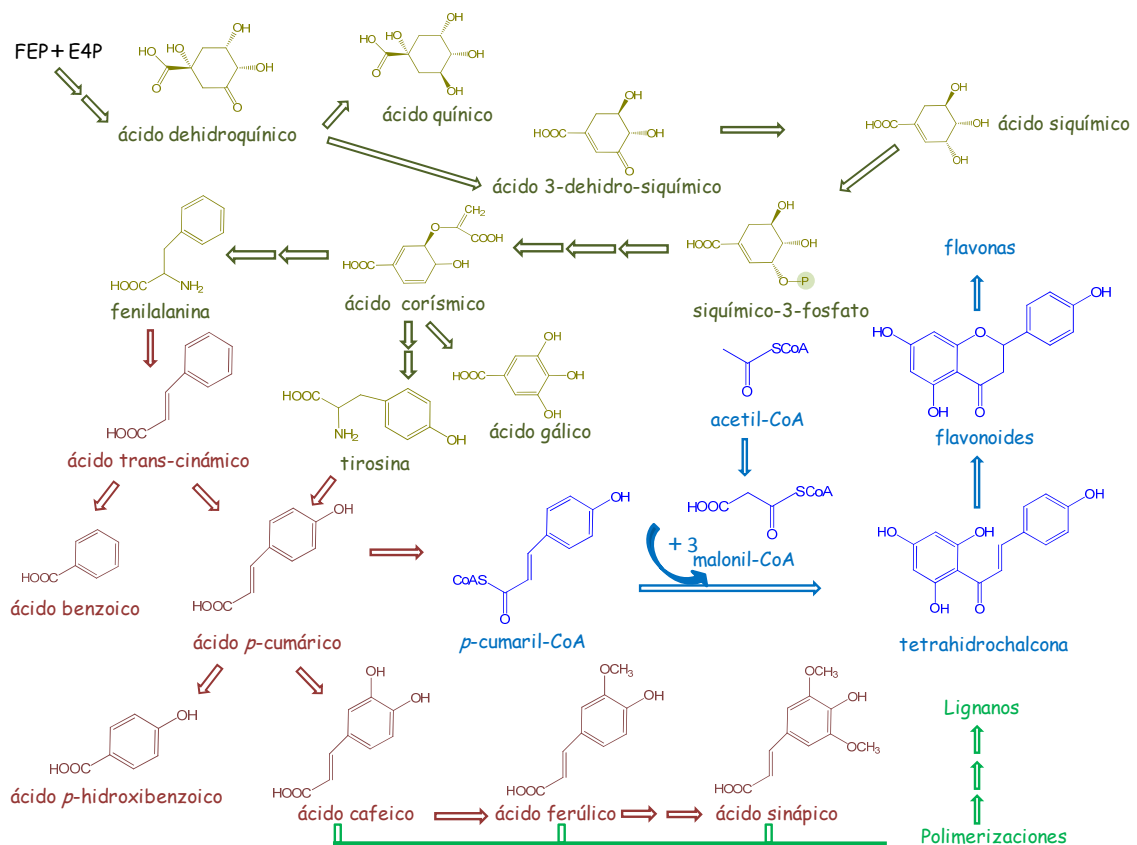


Figura 4. Ruta del ácido siquímico, del acetato y metabolismo fenilpropanoide. FEP y E4P: fosfoenolpirúvico y eritrosa-4-fosfato respectivamente.



La **ruta del ácido mevalónico** es la responsable de la síntesis de los secoiridoides pertenecientes al grupo oleósido. Este grupo está caracterizado químicamente por la combinación de un alcohol, ácido elenólico y un residuo glucosídico. El principal precursor es el ácido mevalónico que es el sustrato para la síntesis del oleósido 11-metil-éster (ácido elenólico glucosado). Este intermediario metabólico da lugar a los secoiridoides oleósidos por combinación con alcoholes mediante posteriores reacciones de esterificación e hidroxilación. La **Figura 5** muestra un esquema simplificado de la síntesis de secoiridoides en el fruto en base a la literatura científica^(25, 27, 28).

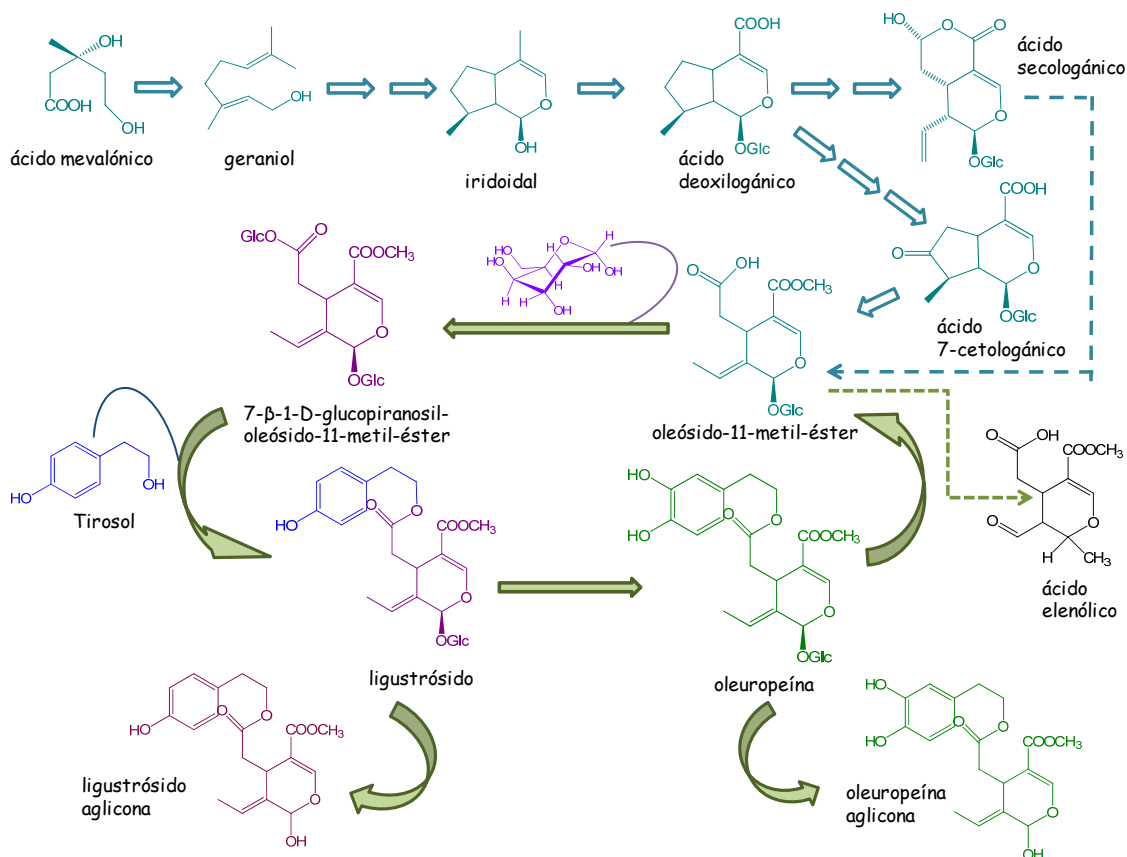


Figura 5. Ruta del ácido mevalónico y metabolismo de la oleuropeína.

Es importante resaltar que estas rutas metabólicas son complejas y la mayoría de los estudios se han centrado en un solo tejido, tales como la



INTRODUCCIÓN

hoja o el fruto, y a día de hoy las relaciones metabólicas entre las distintos tejidos vegetales del olivo no es bien conocida. Por otro lado, estas rutas metabólicas se pueden ver afectadas por numerosas variables tales como la variedad de fruto, las condiciones de crecimiento y el estrés ambiental, entre otros⁽²⁵⁾. Además, existe una relación entre estos compuestos con los mecanismos de defensa de la planta. Así estas rutas metabólicas se ven afectadas por infecciones microbianas que hacen que diferentes metabolitos secundarios pueden ser producidos de una forma preferente en respuesta a ellas. Otros factores que afectan a la composición final en polifenoles en el aceite de oliva son las condiciones agronómicas y climatológicas, área geográfica, proceso de extracción y elaboración del aceite⁽²⁹⁻³¹⁾.

Resultado de todo ello, hace que los polifenoles presentes en el aceite de oliva sean en parte diferentes a los del fruto. Los primeros investigadores que pusieron de manifiesto la presencia de estos compuestos en el aceite de oliva fueron Cantareli y Montedoro. Estos autores establecieron una serie de objetivos que conducían a profundizar en el conocimiento de la composición fenólica del aceite, así como del impacto que tenían algunos de los factores anteriormente indicados.

Dada la complejidad de esta fracción, a día de hoy su conocimiento sigue siendo el campo de batalla para muchos grupos de investigación. Los principales compuestos identificados pertenecen a las siguientes familias: ácidos fenólicos, lignanos, flavonoides, alcoholes fenólicos, secoiridoides e hidroxycumarinas.

1.4.2 Familias de compuestos fenólicos

Los **ácidos fenólicos** fueron los primeros descritos en el aceite de oliva.



Se subdividen en dos grandes grupos: ácidos benzoicos, con una estructura química básica de C6-C1, y ácidos cinámicos, con una estructura básica de C6-C3. En la **Tabla 1** se incluyen los principales compuestos identificados en muestra del zumo de la oliva. Los principales ácidos benzoicos descritos son el ***p*-hidroxibenzoico**, **protocatecuico**, **vanílico**, **siríngico** y **gálico**. Dentro del grupo de los ácidos cinámicos se han caracterizado en aceites de diferentes variedades el ácido ***p*-cumárico**, **cafeico**, **sinápico** y **ferúlico**^(32, 33). Estos compuestos están presentes en pequeñas cantidades, inferiores a 1 mg de analito/kg de aceite de oliva^(34, 35). Sin embargo, en algunas muestras de EVOO se han detectado algunos ácidos fenólicos, tales como ácido vanílico, siríngico, *p*-cumárico y ferúlico en cantidades superiores a estos valores⁽³⁶⁾.

Tabla 1. Principales ácidos fenólicos presentes en el EVOO.

Ácidos benzoicos		R ₁	R ₂	Estructura
<i>p</i>-Hidroxibenzoico	(4-hidroxibenzoico)	H	H	
Protocatecuico	(3,4-dihidroxibenzoico)	OH	H	
Vanílico	(4-hidroxi-3-metoxibenzoico)	OCH ₃	H	
Siríngico	(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico)	OCH ₃	OCH ₃	
Gálico	(3,4,5-trihidroxibenzoico)	OH	OH	
Ácidos cinámicos		R ₁	R ₂	Estructura
<i>p</i>-Cumárico	(4-hidroxicinámico)	H	H	
Cafeico	(3,4-dihidroxicinámico)	OH	H	
Ferúlico	(4-hidroxi-3-metoxicinámico)	OCH ₃	H	
Sinápico	(4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico)	OCH ₃	OCH ₃	

Los ácidos fenólicos se han asociado con las cualidades sensoriales y organolépticas (sabor y astringencia) del aceite de oliva, así como con las propiedades antioxidantes⁽²³⁾.

INTRODUCCIÓN

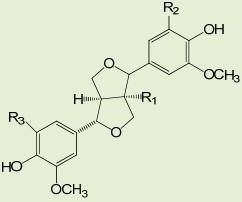
Los **lignan**os son dímeros de fenilpropanoides (C6-C3) unidos por un átomo de carbono central de las cadenas laterales. Junto con los secoiridoides, son los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva. Según Owen y colaboradores el EVOO puede contener hasta 100 mg/kg de este grupo de compuestos, pero hay variaciones considerables entre los distintos aceites⁽³⁷⁾.

Los primeros lignanos detectados en el aceite de oliva fueron el **(+)-1-pinoresinol** y **(+)-1-acetoxipinoresinol**. Brenes y colaboradores establecieron que estos compuestos están presentes dentro del rango de 20 a 25 mg/kg para el (+)-1-acetoxipinoresinol y de 2 a 95 mg/kg para el (+)-1-pinoresinol. Además evaluaron el contenido en aceites provenientes de diferentes variedades tanto españolas como italianas, llegando a establecer que la concentración de (+)-1-acetoxipinoresinol en aquellos que provenían de la variedad Picual era prácticamente insignificante o nula en comparación con los demás aceites⁽³⁸⁾. En las conclusiones derivadas de su estudio recogen que su ausencia podría ser considerada como un marcador varietal. Otros autores han descrito cantidades de (+)-1-acetoxipinoresinol de hasta 160 mg de analito/kg en aceites de oliva italianos⁽³⁹⁾.

En los últimos años el análisis de diferentes EVOOs ha puesto de manifiesto la presencia de otros compuestos pertenecientes a este grupo tales como hidroxipinoresinol y siringaresinol⁽⁴⁰⁾. La **Tabla 2** incluye los principales lignanos descritos en el aceite de oliva.



Tabla 2. Principales lignanos presentes en el EVOO.

Lignanos	R ₁	R ₂	R ₃	Estructura
(+)-1-Pinoresinol	H	H	H	
(+)-1-Acetoxipinoresinol	COOCH ₃	H	H	
Hidroxi-pinoresinol	OH	H	H	
Siringaresinol	H	OCH ₃	OCH ₃	

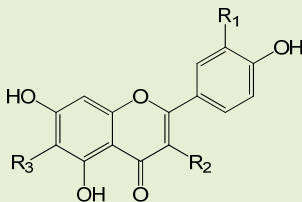
Los **flavonoides** son sintetizados por condensación de un fenilpropanoide con tres moléculas de malonil-CoA. Presentan anillos aromáticos en su estructura, uno de ellos y la cadena lateral de tres átomos de carbono provienen de la L-fenilalanina, mientras que el resto proviene del acetyl-CoA, por la ruta del acetato. Presentan una variación estructural debida a reacciones de hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación. Se subdividen en flavonas, flavonoles, flavanones y flavanonoles.

En el EVOO se han descrito tanto flavonas como flavonones. Sin embargo, son los compuestos pertenecientes al primer grupo los que han sido caracterizados por un mayor número de autores en el aceite de oliva. Así, las flavonas **apigenina** y **luteolina** y sus derivados, como la metoxiluteolina, son las que han sido ampliamente identificadas en muestras de aceite de oliva^(33, 40, 41). Su origen podría estar en las formas glucosadas que aparecen en el fruto. La concentración en la que se encuentran presentes va desde 0.5 hasta 10 mg de compuesto por kg de aceite⁽³³⁾.

INTRODUCCIÓN

Con respecto a otros grupos de compuestos fenólicos pertenecientes a los flavonoides, Fernández-Gutiérrez y colaboradores identificaron en el aceite de oliva un flavanonol, (+)-taxifolin⁽⁴²⁾. La **Tabla 3** incluye los principales flavonoides descritos en el aceite de oliva virgen extra.

Tabla 3. Flavonoides del EVOO.

Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃	Estructura
Luteolina	OH	H	H	
Apigenina	H	H	H	
Metoxiluteolina	OH	H	OCH ₃	
(+)-Taxifolin	OH	OH	H	

Los principales **alcoholes fenólicos** descritos en el aceite de oliva son: **hidroxitirosol** (3,4-dihidroxifeniletanol ó 3,4-DHPEA) y **tirosol** (*p*-hidroxifeniletanol, *p*-HPEA). Diferentes autores han determinado el contenido en estos compuestos. Owen y colaboradores analizaron 18 muestras de aceites pertenecientes a diferentes variedades y obtuvieron unos valores medios en torno a 14 mg/kg para el hidroxitirosol y 28 mg/kg para el tirosol⁽⁴³⁾. De la Torre-Carbot y colaboradores determinaron el contenido en polifenoles presentes en aceites obtenidos de olivas de las variedades españolas Arbequina y Picual. Estos autores observaron un amplio rango para ambos compuestos: de 7 a 64 y de 3 a 24 mg de analito/kg aceite de oliva para el hidroxitirosol y el tirosol respectivamente⁽³³⁾.

También se han identificado derivados de alcoholes fenólicos tales como el hidroxitirosol acetato, tirosol acetato y una forma glucosilada del hidroxitirosol^(44,45). La **Tabla 4** incluye los principales alcoholes fenólicos



así como sus derivados encontrados en el aceite de oliva. Este grupo de compuestos se ha relacionado con atributos positivos del aceite de oliva como son el amargor y el picante⁽³¹⁾.

Tabla 4. Principales alcoholes fenólicos identificados en el EVOO.

Alcoholes fenólicos		R ₁	R ₂	Estructura
Hidroxitirosol	(3,4-dihidroxifenil etanol)	OH	H	
Tirosol	(<i>p</i> -hidroxifenil etanol)	H	H	
Hidroxitirosol acetato	(2-(3,4-dihidroxifenil)etil acetato)	OH	COCH ₃	
Tirosol acetato	(2-(4-hidroxifenil)etil acetato)	H	COCH ₃	

Los polifenoles pertenecientes al grupo de los **secoiridoides** se encuentran sólo en las plantas que pertenecen a la familia Olearaceae, que incluye *Olea europaea L.* Proceden del metabolismo secundario de los terpenos siendo sintetizados a partir de la ruta del ácido mevalónico. Se caracterizan por la presencia en su estructura de un fenil etil alcohol (3,4-DHPEA o *p*-HPEA) unido al ácido elenólico o sus derivados, y en la mayoría de las ocasiones se encuentran glucosilados. El ácido elenólico y sus derivados pueden presentar diferentes formas en base al anillo cerrado o abierto y a sus formas aldehídicas o no, y todas ellas se pueden unir a la parte alcohólica generando compuestos pertenecientes a este grupo⁽³³⁾.

El principal glicósido presente en el fruto del olivo es la **oleuropeína** ^(28, 46). Químicamente es un éster del oleósido-11-metil-éster (ácido elenólico glucosado) con el 3,4-DHPEA. En el proceso de maduración del fruto y extracción del zumo de la oliva se produce la aglicona correspondiente por la actividad del enzima β-glucosidasa⁽²⁸⁾. Esto justifica que en el aceite de oliva se encuentren únicamente las agliconas de este grupo de



INTRODUCCIÓN

compuestos. Otro secoiridoide de interés presente en el aceite de oliva es el **ligustrósido aglicona**, que tiene una estructura similar a la de la oleuropeína, pero en este caso el alcohol que forma parte de la molécula es el *p*-HPEA.

En los últimos años se han identificado derivados tanto de la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) como del ligustrósido aglicona (*p*-HPEA-EA) debido a diversas reacciones, tales como metilación, decarboximetilación, hidroxilación e hidrólisis^(47,48). Además, se han descrito diferentes isómeros de estos compuestos, principalmente de la oleuropeína aglicona, compuesto para el que se han detectado hasta un total de 11 isómeros⁽⁴⁹⁾, aumentando aún más la complejidad de esta fracción. Todo ello hace que el número de compuestos derivados o isómeros aumente de forma considerable, llegando a ser los componentes más abundantes en el aceite de oliva virgen extra.

Las cantidades de estos compuestos son diferentes en función de la variedad, pero en su totalidad este grupo supera los 100 mg/kg de aceite en la mayoría de las muestras analizadas por diferentes investigadores^(35, 48, 50, 51). La **Tabla 5** incluye los principales secoiridoideos y sus derivados identificados en muestras de aceite. El almacenamiento durante la vida útil del zumo de la oliva produce la hidrólisis de estos compuestos dando lugar a un incremento de los fenoles simples (3,4-DHPEA y *p*-HPEA) y de la parte acídica de la molécula.

Estos compuestos se han relacionado con los atributos positivos del aceite de oliva. Gutiérrez-Rosales y colaboradores analizaron el contenido en polifenoles de 20 EVOOs y establecieron la relación existente con las características sensoriales reportadas para esas muestras por un panel de



cata⁽⁵²⁾. Estos autores concluyeron que las formas aldehídicas y dialdehídicas de los derivados decarboximetilados de la oleuropeína y ligustrósido agliconas eran los principales compuestos responsables del amargor del aceite. Un año más tarde, Mateos y colaboradores establecieron que la mejor correlación entre este atributo y los polifenoles del aceite fue con la forma aldehídica del 3,4-DHPEA-EA⁽⁵³⁾.

Tabla 5. Principales secoiridoides identificados en el EVOO.

Secoiridoides agliconas	R ₁	R ₂	R ₃	Estructura
Oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA)	OH	COOCH ₃	H	
Ligustrósido aglicona (<i>p</i> -HPEA-EA)	H	COOCH ₃	H	
Hidroxi-oleuropeína aglicona	OH	COOCH ₃	OH	
Metil-oleuropeína aglicona	OH	COOCH ₃	CH ₃	
Decarboximetil-oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EDA)	OH	H	H	
Hidroxi-decarboximetil-oleuropeína aglicona	OH	H	OH	
Decarboximetil-ligustrósido aglicona u oleocantal (<i>p</i> -HPEA-EDA)	H	H	H	

Otros atributos positivos del aceite también se han relacionado con el contenido en polifenoles. Así, la astringencia es producida por la interacción de los polifenoles con las proteínas presentes en la saliva. Su percepción va a depender del número de radicales hidroxilo unidos a la mitad aromática de la molécula⁽⁵⁴⁾. Por otro lado, el compuesto principalmente responsable del picante de los aceites es la forma decarboximetilada del ligustrósido aglicona, recientemente denominado oleocantal⁽⁵⁵⁾.

INTRODUCCIÓN

A parte de las principales familias de compuestos fenólicos identificados en el aceite, se ha descrito la presencia de otros compuestos fenólicos derivados como los **hidroxi-cromans**. Estos compuestos son formados durante la extracción por reacción del 3,4-DHPEA con diferentes ácidos fenólicos⁽⁵⁶⁾. Bianco y colaboradores detectaron la presencia de dos de estos compuestos, 1-fenil-6,7-dihidroxi-isocroman y su derivado 1-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-6,7-dihidroxi-isocroman⁽⁵⁷⁾.

1.4.3 Propiedades funcionales de los polifenoles de EVOO

Esta compleja fracción del aceite de oliva se ha relacionado con un efecto preventivo y paliativo frente a diferentes enfermedades crónicas y degenerativas cada vez más extendidas en las sociedades occidentales, tales como enfermedades del endotelio vascular, neurodegenerativas, síndrome metabólico y tumores de diferentes localizaciones corporales.

Esta actividad se debe, en parte, a sus **propiedades antioxidantes** lo que los hacen especialmente activos en la protección frente a ROS. Diferentes investigadores han evaluado la capacidad antioxidante de estos compuestos. Baldioli y colaboradores determinaron la estabilidad oxidativa de fenoles simples y secoiridoides aislados del aceite de oliva empleando para ello el test Rancimat⁽⁵⁸⁾. Cuando estos autores compararon los resultados de cada uno de los compuestos con los obtenidos para el *p*-HPEA y α -tocoferol pudieron comprobar como aquellos compuestos caracterizados por ser *o*-difenoles poseían una mayor capacidad antioxidante. Estos resultados fueron concordantes con los posteriormente obtenidos por Mateos y colaboradores⁽⁵⁹⁾. Estos investigadores evaluaron la capacidad antioxidante de fenoles simples, secoiridoides, flavonas y α -tocoferol dopando para ello muestras de aceite y sometiéndolas al test Rancimat. En sus resultados concluyeron



que los compuestos 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EA y luteolina presentaron una mayor capacidad antioxidante que el compuesto α -tocoferol. Artajo y colaboradores obtuvieron resultados similares cuando evaluaron la capacidad antioxidante de estos compuestos adicionados a aceites de oliva refinados⁽⁶⁰⁾. Fernández-Gutiérrez y colaboradores aislaron polifenoles de diferentes muestras de aceite y determinaron su potencial antioxidante⁽⁶¹⁾. En los ensayos llevados a cabo, y de igual forma que en estudios anteriores, fueron los compuestos caracterizados estructuralmente por ser *o*-difenoles los de mayor capacidad antioxidante.

Esta capacidad de bloquear radicales libres les permite proteger frente al daño celular. Intervienen en el desbalance corporal de producción/eliminación de ROS que da lugar al estrés oxidativo involucrado en la patogénesis de enfermedades degenerativas, crónicas y el envejecimiento, así como diferentes enfermedades que tienen una base patológica de inflamación. Tal es el caso de los procesos inflamatorios como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Chron, patologías en las que se puede dar una sobreproducción de ROS por los linfocitos de la mucosa intestinal⁽³¹⁾. Sin embargo el mecanismo molecular por el que estos compuestos bioactivos presentan propiedades beneficiosas no es bien conocido, y aunque tradicionalmente su bioactividad se atribuye a su potencial antioxidante, otros mecanismos que van más allá de su capacidad como secuestrantes de ROS están involucrados en el desarrollo de su actividad funcional. La **Figura 6** incluye las principales actividades biológicas atribuidas a los compuestos fenólicos.

Los estudios llevados a cabo para evaluar el efecto de los polifenoles sobre la **salud cardiovascular** han puesto de manifiesto una actividad



INTRODUCCIÓN

biológica importante que incluye, además de evitar la oxidación de las LDL-colesterol tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* deteniendo el desarrollo del proceso aterogénico^(62,63), otras funciones tales como **antiagregantes plaquetarios, antihiperlipémicos y antiinflamatorios** ^(64,65).

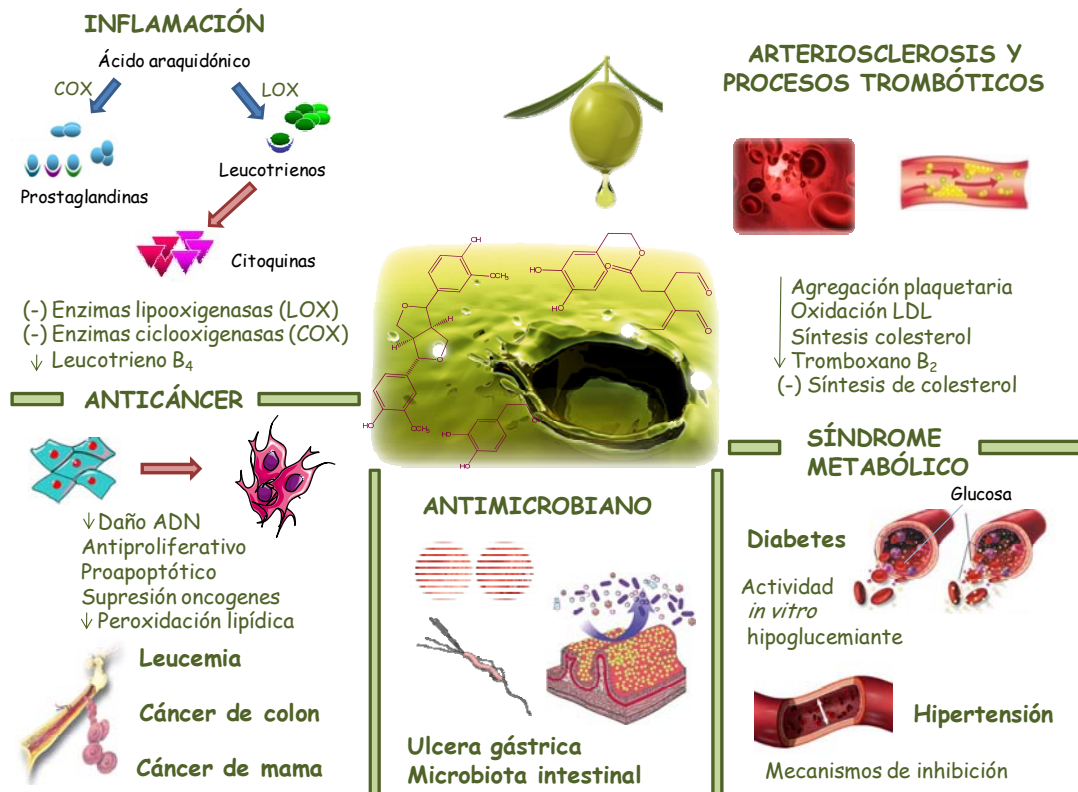


Figura 6. Principales actividades biológicas atribuidas a los polifenoles del aceite de oliva virgen extra.

En la actualidad se conoce que estos compuestos intervienen en la prevención de esta patología a través de diferentes mecanismos moleculares. Estudios llevados a cabo con ratas han demostrado que estos compuestos son capaces de reducir la actividad de la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A ((HMG)-CoA)⁽⁶⁶⁾. Este enzima está implicado en la síntesis del colesterol, principal compuesto responsable



de la formación de placas de ateroma. Además, se ha demostrado que el 3,4-DHPEA es capaz de inhibir la agregación plaquetaria y reducir la formación de tromboxano B₂ incluso con una capacidad similar a la aspirina. El tromboxano B₂ es una molécula proinflamatoria implicada en procesos trombóticos del endotelio vascular⁽⁶⁷⁾. Por otro lado, los polifenoles del aceite son capaces de incrementar la producción de NO por los macrófagos lo que limita el daño vascular y con ello las señalizaciones que dan lugar al reclutamiento de monocitos, la agregación plaquetaria y la trombosis⁽⁶⁶⁾.

Diferentes autores han establecido la relación existente entre estos compuestos y otros **procesos inflamatorios**. El 3,4-DHPEA es capaz de intervenir en el metabolismo de los eicosanoides inhibiendo la formación de moléculas proinflamatorias como el leucotrieno B₄ por inhibición del enzima lipooxigenasa⁽⁵¹⁾. Otro compuesto, el *p*-HPEA-EDA (oleocantal), presenta un efecto similar al producido por el ibuprofeno. Ambos, polifenol y principio activo del fármaco, son capaces de inhibir las mismas enzimas ciclooxigenasas en la ruta biosintética de las prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico⁽⁶⁸⁾.

También se ha investigado la relación de los polifenoles del aceite con enfermedades del **síndrome metabólico**. Loizzo y colaboradores evaluaron la actividad de extractos fenólicos de diferentes variedades en ensayos *in vitro* con enzimas implicada en la diabetes (α -amilasa y α -glucosidasa) e hipertensión (enzima convertidora de angiotensina)⁽⁶⁹⁾. Estos autores concluyeron que todos los extractos demostraron una actividad *in vitro* hipoglucemiante e inhibidora de la principal enzima asociada con la hipertensión.



INTRODUCCIÓN

Otras propiedades bioactivas de los polifenoles del aceite están relacionadas con su **actividad antimicrobiana**. Medina y colaboradores demostraron la actividad bactericida de estos compuestos frente a un amplio espectro de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas⁽⁷⁰⁾. Los compuestos responsables de esta actividad fueron 3,4-DHPEA, *p*-HPEA, 3,4-DHPEA-EDA, y *p*-HPEA-DEA. De todos ellos el polifenol que mostró una mayor correlación con la actividad bactericida fue *p*-HPEA-DEA. Este compuesto también fue el principal responsable de la actividad bactericida demostrada frente a *Helicobacter pylori* que encontraron Romero y colaboradores, lo que podría relacionarlos con la prevención de úlcera gástrica ⁽⁷¹⁾.

Sin embargo la mayor popularidad de estos compuestos bioactivos se debe fundamentalmente a sus efectos beneficiosos sobre la función celular y en gran medida a la acción preventiva en el desarrollo de tumores malignos al evitar el daño oxidativo del ADN⁽²²⁾. En los últimos años numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la **actividad anticancerígena** de los polifenoles del aceite de oliva. Fabiani y colaboradores evaluaron el efecto antiproliferativo y proapoptótico de los polifenoles en líneas celulares de leucemia mediante la acumulación de H₂O₂^(72,73). En sus resultados pusieron de manifiesto una relación positiva entre el contenido en secoiridoides y alcoholes fenólicos con una mayor actividad. Además comprobaron que el extracto fenólico completo presentó una mayor actividad que los compuestos aislados, lo que podría indicar efectos sinérgicos entre estos compuestos. Corona y colaboradores demostraron que el compuesto 3,4-DHPEA presentó una fuerte capacidad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de colon⁽⁷⁴⁾. Otros investigadores del mismo campo han demostrado que los polifenoles del aceite evitan la peroxidación lipídica en líneas celulares



intestinales Caco2⁽⁷⁵⁾.

En estudios en los que se evaluó la actividad anticancerígena de los polifenoles frente al cáncer de mama, Menéndez y colaboradores concluyeron que los polifenoles del aceite son capaces de inhibir el crecimiento de las células cancerígenas y reducir la expresión del oncogen Erb2, el cual interviene en los procesos de transformación maligna, tumorogénesis y metástasis⁽⁷⁶⁾. En relación a este tipo de cáncer, Warleta y colaboradores demostraron que el compuesto 3,4-DHPEA protegía a las células no cancerígenas del epitelio mamario frente al daño oxidativo del ADN, aunque su mecanismo de acción no ha sido dilucidado⁽⁷⁷⁾.

Muchas de las actividades biológicas atribuidas a los polifenoles del aceite de oliva se han demostrado en estudios clínicos con humanos y otras han sido respaldadas por los estudios epidemiológicos⁽²⁴⁾. Sin embargo, no se puede olvidar que, algunas propiedades bioactivas y mecanismos de acción citados en la bibliografía científica se han puesto de manifiesto en ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación. Futuras investigaciones llevadas a cabo en estudios clínicos en humanos se hacen necesarias para poder confirmar los resultados obtenidos.



2. TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE EVOO

El término “*tecnología de producción de aceite*” engloba el conjunto de procesos físicos y mecánicos aplicados para separar la fracción oleosa del resto de componentes de la aceituna. Pueden agruparse en los siguientes: operaciones preliminares, preparación de la pasta, extracción y centrifugación del aceite, almacenamiento, filtración y envasado.

2.1 Operaciones preliminares: recolección, transporte, almacenamiento, limpieza y lavado del fruto

Las operaciones tecnológicas asociadas a la extracción del aceite llevan consigo la realización de algunas etapas preliminares que van desde la recolección de la drupa hasta su molturación. La **recolección** es una de las principales etapas de control de la calidad del aceite obtenido. Para obtener un aceite de calidad se debe de partir de unas aceitunas enteras, sanas y con un estado de maduración adecuado. Este estado está relacionado con el color del fruto y una máxima acumulación de aceite en



Figura 7. Frutos en diferentes estados de maduración.

el mismo para obtener un mayor rendimiento en la extracción. Aunque ambos parámetros coinciden en el tiempo pero que no están relacionados entre sí, por lo que tanto color como contenido graso deberían ser tenidos en cuenta a la hora de

estimar el mejor momento de la recolección. Aún así, en la mayoría de las ocasiones la recolección se establece en base al índice de madurez calculado únicamente con el color del fruto. Se han establecido diferentes fórmulas matemáticas para determinarlo⁽⁷⁸⁾. En líneas generales se puede afirmar que este momento llega en el “**envero**”, entendiéndose como tal

cuando se produce el cambio de color verde-amarillento a morado de la mitad de la pulpa en la mayoría de los frutos del árbol. Una vez estimado el momento adecuado se procede a la recolección del fruto. El método tradicional es a mano mediante el ordeño, vareo o con rasquetas. Puesto que la recogida manual es muy cara, a veces es necesario automatizar el proceso para obtener beneficios. Existen distintos tipos de máquinas para ello, desde aquellas de pequeña potencia que simulan el ordeño o el vibrado de pequeñas ramas, hasta los vibradores de tronco, que situados sobre 20-30 cm del suelo someten al árbol a una potente vibración que hacen caer las aceitunas al interior de un paraguas. Las últimas máquinas desarrolladas incorporan unos rodillos capaces de adaptarse a la forma y el tamaño de la copa del olivo^(79, 80). La aceituna recolectada de esta manera recibe el nombre de aceituna de vuelo. Sea cual sea el sistema de recolección empleado, siempre se debe tener en cuenta no dañar ni al fruto ni al olivo, causando el menor daño posible a sus hojas y tallos. Se debe tener en cuenta que la producción del año siguiente dependerá de los tallos producidos el año anterior. Una vez recolectadas, y previo a su traslado a la almazara, la mayoría de los agricultores proceden a separar las aceitunas de tallos y hojas. Se puede realizar de forma manual, o mediante el empleo de cribas. Esta última, supone un mayor maltrato de la aceituna.

El **transporte** de las aceitunas hasta la almazara es una etapa fundamental. En él se tiene que prestar especial atención a dos parámetros: presión ejercida por el propio peso del fruto y temperatura alcanzada. El empleo de cajas con orificios de material plástico, resistentes y lavables son las más adecuadas (**Figura 8**). Los orificios permiten disipar el calor generado por la propia actividad catabólica del fruto, lo que es muy importante para evitar que aumente la temperatura y



INTRODUCCIÓN

se produzcan fermentaciones y a su vez se evita que se ejerza una presión elevada sobre los frutos depositados en la parte inferior de las cajas⁽⁸¹⁾.



Figura 8. Envase empleado en el transporte de la aceituna desde el campo hasta la almazara.

La **limpieza** y el **lavado** del fruto se llevan a cabo en la zona de la almazara habilitada para la recepción de la materia prima, comúnmente conocida como “**patio**”. Las instalaciones para llevar a cabo las operaciones de limpieza y lavado cuentan con cintas limpiadoras, despalladoras y lavadoras de aceitunas. Las **limpiadoras** se basan en un sistema de aspiración de aire colocado encima de una cinta transportadora con bandejas vibradoras y cribas. El sistema de aspiración absorbe todas las impurezas que acompañan a la aceituna, principalmente hojas y ramas, pero también piedras, terrones pequeños, aceitunas defectuosas de escaso tamaño, huesos, etc. Para caudales superiores a 5t/h se emplean turbinas que proyectan una corriente de aire a través de la criba. Cuando las impurezas son de gran tamaño se utilizan las **despalladoras** constituidas por ejes helicoidales giratorios que sólo permiten el paso de aceitunas y material de similar tamaño. Actualmente, otros sistemas de limpieza incluyen cilindros rotatorios inclinados cuya superficie está perforada con orificios de un diámetro que



sólo permite la salida de las aceitunas⁽⁸²⁾.

El lavado de la aceituna se realiza únicamente con las aceitunas de suelo para eliminar aquel material que no han eliminado las limpiadoras. Todas las **lavadoras**, aunque responden a muy diversas concepciones, tienen en común que las aceitunas se ponen en contacto con un caudal de agua en el que flotan gracias a sal disuelta, aire insuflado, etc.⁽⁸¹⁾ (**Figura 9**).



Figura 9. Lavadora de aceitunas.

Siempre se debe realizar con agua fría, debido a que el empleo de agua caliente puede dar lugar al desarrollo de mohos. Las lavadoras trabajan en circuito cerrado, y disponen de un depósito de agua, bombas de recirculación y cribas o cilindros para la separación del fruto del agua de lavado. Algunos sistemas actualmente disponibles en el mercado integran en un mismo equipo las funciones de limpieza y lavado.

Las aceitunas sin impurezas se clasifican según su estado sanitario, variedad y estado de maduración, pasando a ser molturados de forma

INTRODUCCIÓN

casi inmediata, evitando con ello el **almacenamiento del fruto**. Es importante que transcurra poco tiempo entre la recolección y la molturación debido a que una vez separados del árbol comienza una descomposición de la materia orgánica, con desintegración de las paredes celulares y el epicarpio pierde la cualidad de barrera antimicrobiana.

El almacenamiento de la aceituna sólo se debe llevar a cabo cuando no hay tantas líneas de molturación como frutos llegan a la almazara. Siempre habrá que remover los montones con cuidado de no romper el fruto. El principal objetivo será evitar la aparición del defecto de **atrojado**.

2.2 Preparación de la pasta

La preparación de la pasta consiste en romper íntegramente la estructura vegetal de las aceitunas con el fin de liberar las gotículas de aceite que se encuentran en el interior de las células que constituyen el parénquima oleoso del mesocarpio para a continuación llevar a cabo la coalescencia de las fases líquidas por medio del batido.

2.2.1 Molturación

La molturación del fruto tiene por objeto la rotura de los tejidos de la aceituna donde se aloja la materia oleosa. Probablemente sea esta etapa del proceso de elaboración la que más ha evolucionado a lo largo de los años⁽⁸³⁾. Para conseguir la rotura de las estructuras vegetales del fruto los primeros sistemas estaban basados en la torsión de bolsas de diferentes tejidos llenos de aceitunas, denominados “*de saco o costal*”. Estos sistemas evolucionaron con la aparición de los sistemas a presión. A lo largo del siglo XIX, fueron pasando por diferentes estadios tecnológicos en base a una mejora en el rendimiento del proceso. Así evolucionaron



desde las típicas **prensas** de cuñas hasta las **prensas de husillo y palanca**. Estas últimas incorporaron rápidamente mejoras que simplificaron el esfuerzo humano como fueron las prensas de doble husillo o de doble volante. Muchas de ellas han estado funcionando hasta principios del siglo XX. Pero sin embargo la gran revolución tecnológica llegó de la mano de las prensas hidráulicas. La posibilidad de aplicar mayor presión y obtener un mayor rendimiento y calidad del aceite en menor tiempo facilitó su expansión en el sector. Esta transformación propició además la incorporación a esta etapa del proceso de los **molinos empiedros**, conocido en la actualidad como sistema tradicional de molturación.

El **procedimiento tradicional** realiza la molturación con piedras. El equipamiento está formado por una base circular de granito sobre la que se disponen unas ruedas de piedra conocidas como “*muelas*” que giran alrededor del eje central de la base. Se distinguen dos tipos de molinos empiedros: molinos italianos, si en su interior se encuentran unas ruedas de piedra cilíndricas (modalidad más difundida en Italia) o molinos españoles, si las piedras son troncocónicas (más difundida en España)⁽⁸²⁾. El número de piedras varía entre 2-4 y su peso está comprendido entre las 2 y las 4 toneladas. Por normal general, los molinos italianos cuentan con 2-3 piedras, mientras que la mayoría de los molinos españoles cuentan con 4. Estos molinos realizan la trituración por compresión debido a la diferencia existente entre las superficies de las piedras y la de la base, favoreciendo a su vez la coalescencia de las gotas de aceite e imposibilita la formación de emulsiones (velocidad de 12-14 rpm) (**Figura 10**). Además facilita la separación del aceite del resto de la pasta en etapas posteriores.



INTRODUCCIÓN

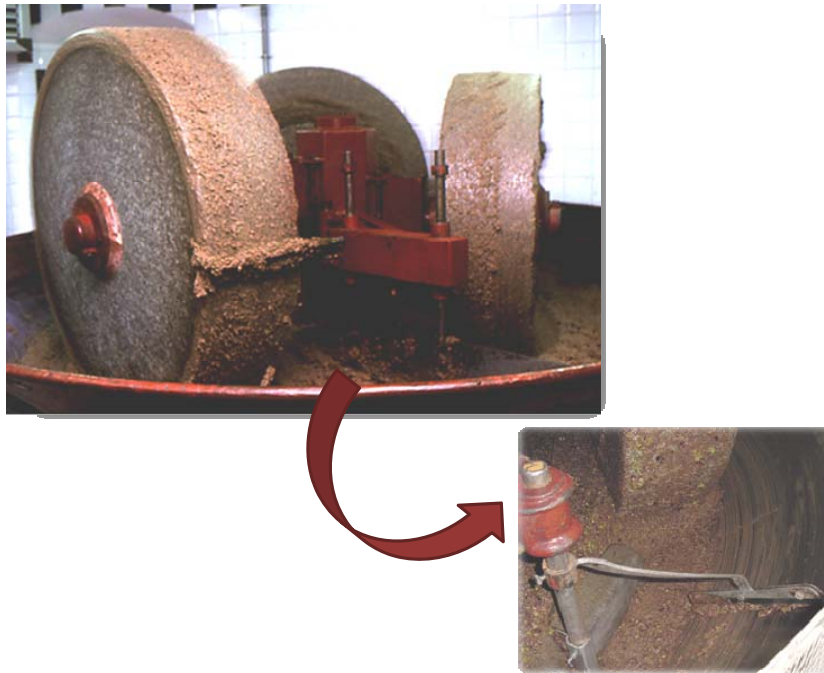


Figura 10. Molturación de la drupa del olivo mediante el uso de un molino empiedro de tres muelas.

Siempre que la molturación se lleve a cabo en las condiciones adecuadas se obtienen aceites de mayor calidad, más equilibrados y con características organolépticas armónicas⁽⁸⁴⁾. Las piedras trabajan en el exterior con mayor aireación y como consecuencia se produce un menor atrojado. Como inconvenientes presentan una mayor mano de obra, mayor limpieza, mayor espacio necesario, con mayor superficie de molienda, que facilita la evaporación de componentes volátiles, mayor tiempo de permanencia de la pasta en el molino, etc.⁽⁸¹⁾. Además el proceso es discontinuo. Cuando el molino en piedra se usa en almazaras localizadas en zonas muy productoras es indispensable utilizarlo junto a otros sistemas de molturación más modernos ya que el máximo de su capacidad está en torno a 2000 kg/h.

Existe una modalidad de molinos de empiedro formados por dos rodillos

de piedra que rotan en sentido inverso. La rotura del fruto se produce por las fuerzas de fricción ejercidas sobre el mismo entre ambos rodillos. Estos sistemas presentan una mayor capacidad de trabajo ya que permite trabajar en continuo y además evita las emulsiones producidas por los sistemas más modernos. Además, los aceites obtenidos son armoniosos debido a que se extrae una menor cantidad de sustancias amargas. La gran limitación que presenta es debida a que la fricción de los rodillos provoca un mayor desgaste de los mismos, reduciendo la vida útil de la instalación.

El **procedimiento moderno** realiza la molturación con **molinos metálicos** que pueden ser de martillos, de discos dentados, o de cilindros estriados. El material interior del que están hechos los molinos debe ser de acero inoxidable, tanto sus paredes, como el fondo y las uniones, ya que de no ser así, se produce la incorporación de trazas metálicas en la pasta, que actuarán como catalizadores del proceso de oxidación.

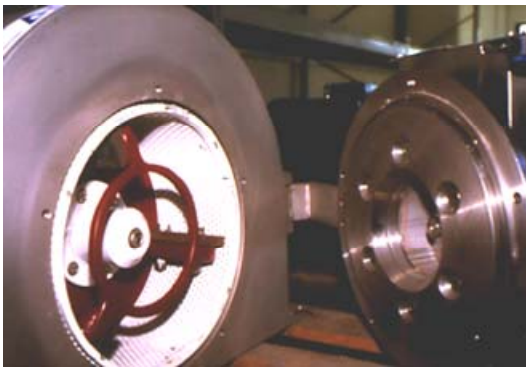
Los **molinos de martillos** contienen en su interior martillos y cribas de regulación del grado de molienda. Se alimentan por la parte central y la rotura del fruto se lleva a cabo por impacto del fruto contra la criba. Esta última es intercambiable para poder conseguir diferentes grados de molienda, además en la mayor parte de los molinos es móvil y gira en sentido contrario a la de los martillos, con objeto de disminuir la zona de impacto, el desgaste y dotándolo de un ligero efecto de cizalla. La velocidad de giro habitual es de 3.000 rpm y existen modelos con capacidades de trabajo comprendidas aproximadamente entre los 2.500-7.000 kg/h⁽⁸²⁾. Los aceites que se obtienen van a poseer características organolépticas muy marcadas con gran influencia de la sensación del amargor. Debido a que se crean emulsiones, en los últimos años han



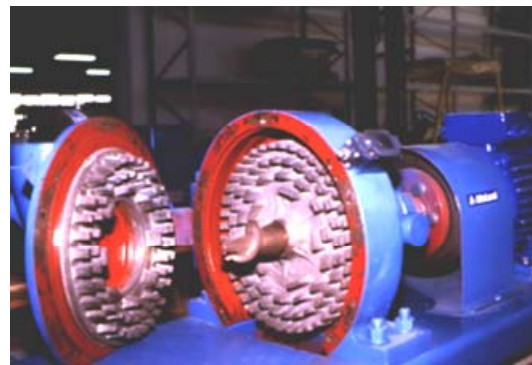
INTRODUCCIÓN

aparecido en el mercado molinos de martillo de doble criba y una velocidad de giro inferior (1500 rpm). Estos nuevos equipos de molturación palian el incremento de temperatura provocado por los molinos de martillo existentes (entre 3-5°C), evitan la emulsión y el aumento del amargor.

Los **molinos de discos dentados** realizan la trituración por cizallas. En su interior presentan dos discos verticales, en cuyas superficies enfrentadas se encuentran distribuidos en forma circular una serie de varillas. Mientras que uno de los discos es fijo, el otro es móvil, pudiendo desplazarse uno con respecto al otro con objeto de poder modificar el grado de molienda. La velocidad de giro es inferior a 1400 rpm por lo que se limita la emulsión. La **Figura 11** muestra imágenes del interior de los molinos metálicos.



(a)



(b)

Figura 11. Detalle interior de un molino de martillo (a) y de discos (b).

Sea cual sea el tipo de molino utilizado en el proceso de molturación siempre es necesario tener en cuenta una serie de parámetros técnicos: velocidad, aireación, adición de agua, emulsión y grado de molienda. Este último viene dado por el diámetro de perforación de la criba y se refiere al tamaño medio mayoritario que se quiere conseguir en los huesos de las



aceitunas por ser la materia más resistente. De una forma generalista se establece un tamaño de criba de 5 mm al principio de campaña y terminando con uno de 6-7 mm, en función de la textura y la humedad de las aceitunas.

2.2.2 Batido

Tradicionalmente las aceitunas trituradas en los molinos se almacenaban junto con los huesos en los mismos sacos o recipientes. Para la obtención de la fase líquida se empleaban las prensas, y esta fase conteniendo tanto el aceite como otros productos de poco valor (agua de vegetación, fibras, partículas de fruto, etc.) era almacenada. Tras un lento proceso de sedimentación era posible separar aceite, eliminando las partículas no disueltas todavía presentes en el aceite. Esta separación por sedimentación era lenta y presentaba el inconveniente de una capacidad de producción baja, grandes espacio para el almacenamiento y la baja calidad del aceite debido a que al estar en contacto con el resto de material se producía la oxidación del mismo⁽⁸³⁾. Estos problemas fueron solventados con la introducción de batidoras y centrifugadoras en el diagrama de flujo del proceso de elaboración.

Las **batidoras** son equipos constituidos por un recipiente dotado de una camisa externa por la que se hace circular agua caliente para modificar la temperatura del proceso de batido según las necesidades. En el interior presenta uno o varios ejes con paletas, con una velocidad fija comprendida entre 20-30 rpm. Cuando las paletas se disponen en el eje vertical se habla de **batidora vertical**, y de forma análoga cuando se dispone en el eje horizontal se denominan **batidoras horizontales** (**Figura 12**).



INTRODUCCIÓN



Figura 12. Detalle interior de una batidora horizontal. Hélice con las paletas para llevar a cabo el batido (izquierda) y pasta sometida a esta operación donde se pueden apreciar las islas de aceite (derecha).

Su función es conseguir una separación inicial de las diferentes fases que constituyen la pasta. Para ello este proceso permite unificar las pequeñas gotas de aceite que van saliendo de las vacuolas del fruto en gotas de mayor tamaño, denominadas islas de aceite. Este proceso es vital en la elaboración del aceite debido a que la pasta molida obtenida en la etapa anterior presenta una complejidad constitucional que posibilita interacciones físicas y biológicas que pueden modificar la textura y reología de la pasta debido a la formación de membranas lipoproteicas que facilitan la formación de emulsiones. Esto dificultaría la posterior separación de fases sólido-líquido y líquido-líquido.

El efecto deseado del batido se consigue teniendo en cuenta la **velocidad** de las paletas, el **tiempo** de batido y la **temperatura** a la que se lleva a cabo el proceso. Un movimiento lento de la pasta promueve la coalescencia al aumentar la probabilidad de encuentro de las gotas de aceite y la formación de las mencionadas islas de aceite. A mayor tiempo de batido se consigue una mayor extracción final del aceite, con una



menor presencia del mismo en los subproductos finales. Llegado un momento determinado se alcanza una meseta en el que por más que se prolongue el tiempo de batido no aumenta la cantidad de aceite extraído⁽⁸²⁾. Además, el tiempo necesario va a estar influenciado por el sistema de molturación empleado. Como se ha comentado anteriormente, cuando se utiliza un molino empiedro el movimiento de mezcla continuo favorece la unión de las gotas de aceite, facilitando así la separación en las siguientes etapas de la elaboración del aceite. Debido a esto, en cadenas de producción que integran molinos empiedros el batido no tiene una larga duración por lo que representa una operación secundaria.

Por su lado la temperatura influye en la viscosidad de la pasta. En base a este parámetro se establecen dos sistemas de batido: **en frío**, donde el rendimiento en aceite que conseguimos es menor, y **mixtos**, primero un batido en frío y a continuación, con el fin de facilitar la posterior separación de los aceites, se dota a las batidoras de un sistema de calefacción consistente en un fluido calefactor que circula por la camisa externa del cuerpo de la batidora y que generalmente es agua. La mayoría de las batidoras presentes en el sector oleícola traen de fábrica fijado el tipo y velocidad de las paletas en base a la capacidad del cuerpo de la batidora, dejando la decisión de la temperatura al responsable de fábrica. Para la elección del valor de este parámetro se debe de tener en cuenta que bajas temperaturas (18-20°C) no permiten obtener rendimientos de extracción satisfactorios, y temperaturas superiores a 30-35°C provocan alteraciones en la calidad de los aceites.

La capacidad de los cuerpos de batidoras industriales va desde 150 hasta 3500 kg/cuerpo. Cuerpos de mayor capacidad imposibilitan llevar a cabo un batido en las condiciones recomendadas teniendo en cuenta todo lo



INTRODUCCIÓN

citado anteriormente. Así, para líneas de producción con una elevada capacidad se diseñan batidoras de varios cuerpos, haciendo pasar la pasta en serie por todos ellos.

Para determinar si el proceso se ha llevado a cabo de forma correcta es posible orientarse partiendo del aspecto de la pasta. Así, es indicativo de que el proceso se ha llevado a cabo de forma correcta cuando la pasta presenta un aspecto granuloso, las paletas no tienen masa adherida y se observa una determinada cantidad de aceite en el sobrenadante. Cuando el fruto está recién recolectado, en la mayoría de las ocasiones su contenido en agua es elevado (mayor del 40-45%). En estos casos se produce una mayor emulsión durante la molturación y se forman membranas lipoproteicas que envuelven las gotas de grasa e impiden la coalescencia. Para facilitar el proceso en pastas emulsionadas se pueden utilizar coadyuvantes del batido, como es el talco.

2.3 Extracción de EVOO

La extracción del aceite de oliva se lleva a cabo en el cuerpo de fábrica de la almazara. Esta etapa se puede hacer por dos procedimientos diferentes: tradicional y continuo.

En España, el **método tradicional** está prácticamente en desuso. Sin embargo, a nivel mundial el 52% de las almazaras aún poseen este sistema de elaboración⁽⁸²⁾. Se lleva a cabo en dos etapas: prensado de la pasta batida para la separación sólido-líquido y centrifugación para la separación líquido-líquido.

La etapa de prensado mecánico se realiza mediante capachos que son discos planos de diferentes materiales con un diámetro variable que



cuentan con un orificio central. Los más extendidos son los de polipropileno. Los capachos se disponen unos encima de otros en una vagoneta y van guiados por una aguja central. Entre ellos se coloca la pasta batida y se someten entonces a la presión necesaria. Se trata, por tanto, de un sistema discontinuo de carga de capachos, prensado y descapachado. La **Figura 13** muestra un esquema del proceso. Al prensar la pasta, se obtiene por un lado un líquido denominado mosto oleoso que contiene aceite de oliva (30%), agua de vegetación (65%) y una pequeña cantidad de sólidos que se escapan en la prensa (5%), y por otro lado el residuo sólido denominado orujo.

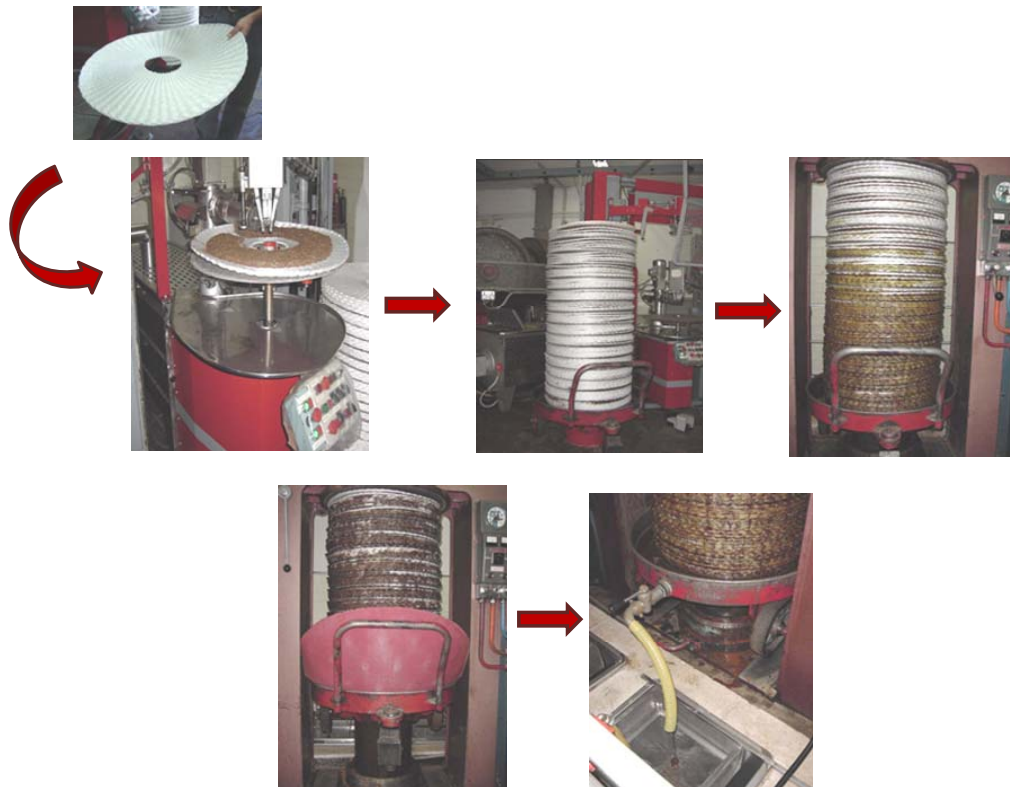


Figura 13. Método tradicional de prensado mediante capachos.

El mosto oleoso se introduce en centrífugas verticales y aprovechando la fuerza centrífuga se separa y obtiene finalmente el aceite de oliva. Los inconvenientes con los que cuenta este sistema son la discontinuidad del

INTRODUCCIÓN

proceso y la imposibilidad de una limpieza completa de los conductos de drenaje que podría dar lugar a fermentaciones, disminuyendo la calidad del aceite obtenido.

Bajo la denominación de **sistema continuo** de extracción del aceite de oliva se agrupan las instalaciones que realizan este proceso con una doble característica: utilizan la fuerza centrífuga como elemento fundamental para la separación de las diferentes fases y el proceso de extracción se lleva a cabo de forma continua. Dentro de éste, se pueden diferenciar a su vez dos subtipos: tres fases y dos fases.

El **sistema continuo de tres fases** fue el primer sistema centrífugo en introducirse en la producción de aceite de oliva para separar las diferentes fases presentes en la pasta batida. En estas plantas el equipo diferenciador es el decantador centrífugo horizontal, comúnmente conocido como decanter. Está constituido por una fuente de alimentación de la pasta batida, un rotor de forma cilíndrico-cónica, un tornillo helicoidal y tres salidas diferentes. El proceso se inicia mezclando la pasta batida con una cantidad de agua a 30-35°C comprendida entre un 40-50% con objeto de establecer una mayor separación entre las fracciones sólida y oleosa en el interior del decanter. Se introduce en el sistema y se separan de forma continua tres fracciones: la parte sólida u orujo de tres fases, las aguas de vegetación y el aceite.

El orujo de tres fases es transportado hasta la zona de descarga por el tornillo helicoidal que, dispuesto de forma coaxial con el rotor, consigue este efecto girando a distinta velocidad (10-20 rpm). Los conductos de salida disponen de unos rascadores para evitar apelmazamientos. El agua de vegetación y el aceite son separados por efecto de la fuerza centrífuga.



Estas fracciones líquidas forman en el interior del rotor cilindros concéntricos en función de la densidad, y salen al exterior separadas por unos orificios regulados por medio de diafragmas. Por una lado sale el aceite y por otro el efluente líquido formado por unión del agua de vegetación de las aceitunas y del agua de adición al decanter, conocido como alpechín. La **Figura 14** muestra un esquema del sistema de extracción de tres fases.

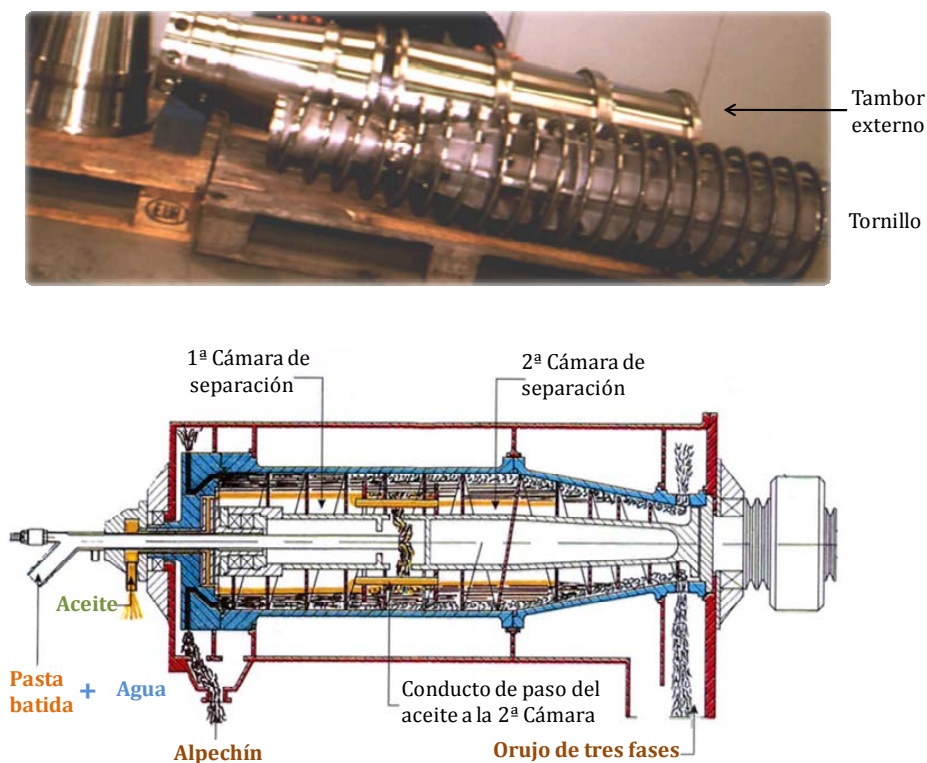


Figura 14. Detalle interior del sistema de extracción de tres fases.

Este último subproducto supone un gran problema medioambiental. Debido a ello, a principios de 1990 comenzaron a desarrollarse nuevos sistemas de extracción del aceite en los que no era necesaria la adición de agua al decanter. Este nuevo sistema se denominó **sistema continuo de dos fases**. La pasta batida entra en el decanter tal y como sale de la batidora. El único requisito para poder extraer el aceite con un sistema de

INTRODUCCIÓN

dos fases es que la pasta de aceituna, y por extensión las aceitunas, deben de contener un mínimo de humedad (50-53%) para permitir una mínima separación de agua entre las fases aceite y sólidos en el interior del decanter⁽⁸²⁾. Si por condiciones climatológicas, estado de maduración etc., esto no es posible, es necesario incorporar la cantidad de agua hasta llegar a ese nivel a la entrada del decanter. Después de someter la pasta a la acción de la centrifugación, por una salida salen los sólidos y el agua de vegetación y por la otra, fluye el aceite. En el interior del decanter de dos salidas están separadas las tres fases de la pasta, pero constructivamente sólo posee dos salidas una para la fracción de aceite y otra para el conjunto de agua de vegetación y sólidos. A este conjunto se le denomina orujo de dos fases o alperujo.

Actualmente en España el sistema de extracción de dos fases representa el 96%, el de tres fases aproximadamente el 3%, y el sistema de prensas está prácticamente en desuso⁽⁸²⁾. En numerosas ocasiones el aceite se pasa por centrífugas verticales para conseguir una mayor pureza del mismo.

2.4 Almacenamiento de EVOO

El aceite de oliva, como todos los productos cuya elaboración se concentra en unas fechas determinadas y el consumo se efectúa durante todo el año, necesita ser almacenado. Para una conservación adecuada del mismo la empresa oleícola realiza una serie de operaciones previas y durante el almacenamiento.

2.4.1 Operaciones previas al almacenamiento: decantación.

Se debe tener en cuenta que para que el aceite conserve sus propiedades originales el almacenamiento del mismo debe hacerse en las mejores



condiciones. Por ello, en la mayoría de las ocasiones el aceite que proviene de la centrífuga vertical es sometido a una decantación. Su objetivo es eliminar la mayor cantidad de sólidos que hayan podido quedar en suspensión antes del almacenamiento final en la bodega. Existen dos tipos de decantación, estática y dinámica.

La **decantación estática** se lleva a cabo por precipitación de los sólidos suspendidos mediante el almacenamiento del aceite durante aproximadamente 48 horas en depósitos de acero inoxidable de menor capacidad que los de la bodega donde serán posteriormente almacenados de forma definitiva. La **decantación dinámica** se lleva a cabo mediante el paso sucesivo del aceite por distintos depósitos, entrando por la parte inferior al depósito y saliendo por la parte superior hacia el siguiente depósito. Esta decantación continua permite una separación de sólidos muy efectiva. Ambos tipos de decantación pueden ser favorecidos mediante sistemas de purgado automático.

2.4.2 Almacenamiento final en depósitos

Los tanques para tal fin deben construirse con materiales totalmente impermeables e inatacables y proteger al aceite de la luz y el aire para evitar la oxidación. Es aconsejable que el almacén esté separado de cualquier foco capaz de transmitir al aceite olores extraños. Deberá estar dotado de un sistema de calefacción que mantenga la temperatura entre 15-18°C. Temperaturas bajas pueden provocar la congelación del aceite y altas contribuir a su oxidación. Hasta hace unos años los tanques que mejor cumplían estas condiciones eran los depósitos enterrados con un adecuado recubrimiento (generalmente azulejos refractarios). Hoy en día se emplean depósitos de acero inoxidable. El acero inoxidable es un material inerte que evita reacciones que pueden disminuir la calidad del



INTRODUCCIÓN

aceite mismo tiempo que lo aísla de la luz. La **Figura 15** muestra tanques de almacenamiento del aceite de oliva.



Figura 15. Bodega de almacenamiento de aceite con tanques de capacidad para 100.000 kg de aceite.

Se considera que la capacidad idónea de los depósitos es de 50.000 kg, porque facilita el control de calidad y la trazabilidad, ya que esta capacidad es múltiplo de las cisternas (25.000 kg). El acabado interior recomendado es pulido y lo más liso posible para facilitar la limpieza. El fondo de los depósitos debe ser cónico o plano inclinado (5%) para facilitar la acumulación y extracción de los turbios y agua.

2.4.3 Técnicas para conservar la calidad del aceite durante el almacenamiento

Existen diferentes procedimientos para preservar la calidad del aceite durante el almacenamiento. Entre ellos se encuentra el **inertizado**, también conocido como "*blanketing*", que consiste en eliminar el oxígeno presente en la atmósfera que está en contacto con el aceite durante su



almacenamiento mediante el empleo de nitrógeno⁽⁸⁵⁾. Este gas debido a sus propiedades (inerte, seco, inodoro, incoloro, exento de aroma e inmisible con el aceite) es la mejor opción para contribuir a la conservación del aceite. El depósito es conectado por la parte superior a un flujo de nitrógeno a baja presión, que actúa a demanda y que puede introducirse o liberarse del tanque cada vez que se produzcan depresiones o sobrepresiones en el interior.

Otro procedimiento que también utiliza nitrógeno es el **sparging**, conocido también como “bazuqueo”⁽⁸⁵⁾. Este procedimiento consiste en insuflar en el interior de la masa de aceite almacenado una corriente de nitrógeno capaz de desplazar al oxígeno que hay disuelto en la masa. Para aplicar esta técnica se equipa al depósito con un aro de acero inoxidable perforado en todo su perímetro, colocado en la parte inferior y conectado con una toma de suministro de nitrógeno. Para que esta técnica sea más precisa y se eviten flujos preferenciales de nitrógeno se aconseja realizar inyecciones intermitentes (más de una inyección por sección y espaciadas en el tiempo) y de forma periódica durante el tiempo que dure el almacenamiento. Esta técnica también se utiliza para la homogeneización de las partidas o lotes.

La última tendencia en ambos procesos, tanto de inertizado como de bazuqueo, es utilizar argón en lugar de nitrógeno. Aunque es más caro que el nitrógeno, dada su mayor densidad frente al oxígeno, al contrario que ocurre con el nitrógeno, la capacidad de inertización es más elevada siendo necesario menos tiempos de tratamiento para conseguir los mismos efectos.

Otra práctica extendida en el sector y orientada a preservar la calidad del



INTRODUCCIÓN

aceite es el **sangrado**. A pesar de la decantación previa de los aceites antes de su almacenamiento, durante el mismo aparecen sedimentos en el fondo del tanque conocidos como turbios que pueden dar lugar a fermentaciones y aparición de defectos (borras y moho). Para eliminar estos sedimentos los depósitos cuentan con una válvula de purga a una altura determinada. La **Figura 16** muestra una fotografía de estos subproductos generados durante el almacenamiento.

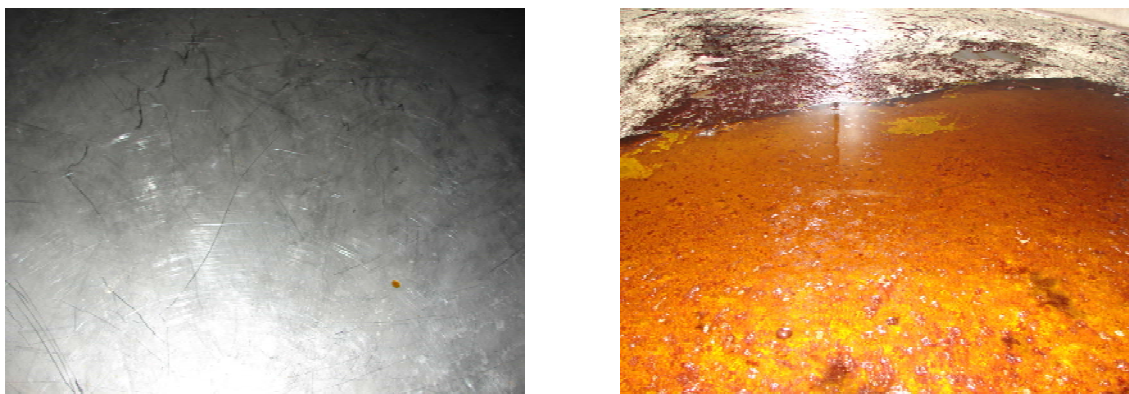


Figura 16. Turbios generados durante el almacenamiento del aceite de oliva. Izquierda, fondo de un tanque de almacenamiento limpio. Derecha, sedimento formado durante esta etapa.

2.5 Filtración

A pesar de todas las operaciones llevadas a cabo para preservar la calidad del aceite, previo al envasado final para su comercialización se lleva a cabo otra operación tecnológica que tiene un fuerte impacto en la calidad final de EVOO. En la mayoría de las almazaras, el aceite es filtrado para eliminar cualquier material que aún pueda quedar en suspensión y reducir la humedad a un valor aceptable por los clientes de forma que no comprometa el aspecto impecable durante su vida comercial ($\leq 0.07\%$). Como toda operación de filtración, el procedimiento consiste en hacer pasar el aceite a través de materiales porosos (tierras filtrantes, perlitas,



diatomeas) que han sido depositados en un soporte físico o tejidos (lonas de material textil, fibras, papel, bujías) donde queden retenidas las impurezas que se desean eliminar⁽⁸¹⁾.

Las empresas del sector oleícola cuentan con diferentes sistemas tradicionales que en la actualidad están siendo mejorados en algunos casos y sustituidos por nuevos sistemas en otros. Así, la filtración del aceite de oliva se puede dividir en sistemas de filtración convencionales y nuevos sistemas de filtración.

2.5.1 Sistemas de filtración convencionales

Los sistemas de filtración convencionales están integrados por las operaciones de desbastado y abrillantado. Ambas operaciones se llevan a cabo de forma independiente, y en ocasiones el desbastado va seguido de un abrillantado. Estos sistemas de filtración son los predominantes y ampliamente extendidos en España.

El **desbastado** es un tipo de filtración indicado en aceites con un elevado contenido en sólidos. Se trata de una separación grosera, debida en la mayoría de los casos a que el aceite no ha tenido tiempo para una correcta decantación, que se lleva a cabo mediante el empleo de filtros de material filtrante pulverulento.

Esta etapa se lleva a cabo en tanques de filtración en cuyo interior pueden presentar diferentes elementos físicos sobre un soporte donde se deposita el agente filtrante tales como placas o bujías. De este modo es posible elaborar un material filtrante más poroso para que el proceso de filtración se lleve a cabo con mayor facilidad y eficacia. El número de placas o de bujías va a estar en función de la capacidad del filtro. Estos



INTRODUCCIÓN

tanques son capaces de filtrar entre 5.000 y 10.000 litros/h.

El proceso de desbastado requiere de la formación de una pre-capa. Para tal fin los tanques de filtración llevan asociado un pequeño cuerpo de una batidora donde se procede al batido del aceite con el agente filtrante a utilizar. En este tanque adicional se homogeniza una cantidad de agente filtrante con aceite y se hace pasar a través del tanque de filtración manteniendo dicha mezcla en recirculación hasta que el aceite mezclado que atraviesa el filtro recupere su limpidez original. Esto indica que el agente filtrante ha sido retenido sobre las placas o bujías que hay en el interior del tanque, formándose una capa de pocos milímetros denominada torta filtrante que es la responsable de la filtración. Conseguido esto, se da entrada al aceite a filtrar. La **Figura 17** muestra un ejemplo de un tanque de desbaste constituido por bujías.

En ocasiones cuando el aceite filtrado comienza a salir turbio o no pasa la prueba del velado, se interrumpe el proceso de filtración y se realizan adiciones periódicas del agente filtrante con un tamaño de poro mayor al empleado en la formación de la torta para conseguir alargar la vida útil de la misma. Se trata de un proceso discontinuo de carga y descarga de la torta filtrante una vez que se ha saturado y no es capaz de eliminar más humedad del aceite. Las partículas de polvo del agente filtrante, los sólidos en suspensión y el agua retenidos son eliminados juntos como una mezcla de la torta formada.



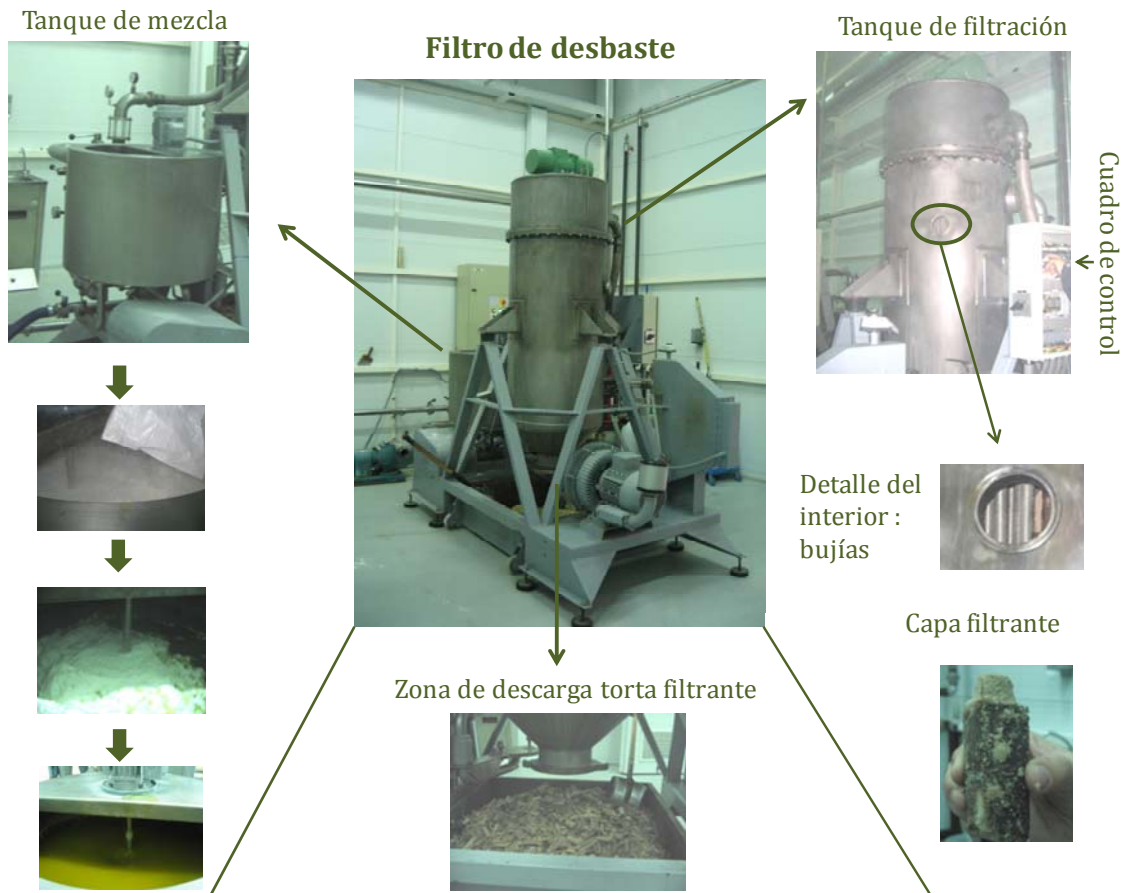


Figura 17 .Tanque de desbastado.

En la mayoría de las almazaras españolas el material filtrante pulverulento empleado son las tierras de diatomeas, restos fosilizados de algas microscópicas de las que han sido descritas hasta 10.000 variedades diferentes. Las cáscaras de estas algas son prácticamente puro sílice. Tras la muerte del alga, la cáscara de sílice permanece debido a la estabilidad química del elemento que la constituye, y se generan una gran multitud de diminutos esqueletos que dan lugar a importantes depósitos. El valor comercial de estos depósitos varía en gran medida, debido tanto a las impurezas solubles, insolubles y contaminantes, como a la arcilla. Son importantes los que se localizan en Argelia, Francia, Islandia, Japón, España y California. Los depósitos se extraen del agua en que viven las algas y se someten a una secuencia de trituración, molienda, cribado,

INTRODUCCIÓN

lavado, secado y calcinación. Inevitablemente existe alguna variación en la composición química de los diversos tipos de tierras de diatomeas comerciales, pero las diferencias son en general, relativamente pequeñas. Mucha más variación se presenta cuando se realiza un análisis del tamaño de partícula de las tierras, debido a las diferencias tanto en la roca fósil de partida como en el equipo y las técnicas utilizadas para procesarla.

En la práctica industrial las distintas almazaras deciden realizar mezclas entre las fracciones de polvo filtrante de distinto tamaño de partícula, que van desde alrededor de 1 a 100 μm . Debido a su porosidad y elevado poder hidrófilo, estas tierras constituyen el material clásico para la formación de la pre-capa. La duración de la vida útil de la torta viene determinada tanto por su capacidad de retener sólidos suspendidos y agua, como por su resistencia a la rotura por la presión ejercida sobre las mismas. Esta presión será mayor cuanto mayor sea la cantidad de impurezas acumuladas. Para ello se dispone de un barómetro, que cuando marca una presión equivalente a 4-5 bares, determina la necesidad de cambiar el material filtrante. Una forma de aumentar la rentabilidad del proceso es la posibilidad de conectar entre sí diferentes tanques de filtración de forma que puedan trabajar en serie y en continuo. En estos casos las tortas tardan más tiempo en saturarse. Para ello, las almazaras cuentan con salas dedicadas exclusivamente a la filtración del aceite (**Figura 18**), que suelen estar directamente conectadas con la bodega.

Las tierras saturadas de impurezas son retiradas y almacenadas en petras que serán enviadas a la extractora para retirarles el aceite que puedan contener y controlar la cantidad de residuo generado. Este tipo de agentes filtrantes también puede ser empleado en el proceso de abrillantado.





Figura 18. Sala de filtración (Aceites Maeva S.L.).

El **abrillantado** es el otro sistema de filtración convencional aplicado en la industria oleícola. Para esta operación de filtración se emplean los filtros prensa y en este caso el material filtrante no es pulverulento, sino que está constituido por una tela compacta de algodón o de papel de celulosa. Éste se coloca entre las placas filtrantes, que variarán en número en función de la capacidad de filtrado. En ocasiones pueden contar con un cuerpo de batidora adicional en el que, igual que para el caso anterior, se pueden mezclar con material filtrante pulverulento de diferente naturaleza para aumentar la eficacia del proceso. Igual que en el desbastado, el depósito de este material sobre las placas de algodón o de papel de celulosa se realiza mediante recirculación. En la **Figura 19** queda recogido un equipo de filtro prensa.

INTRODUCCIÓN

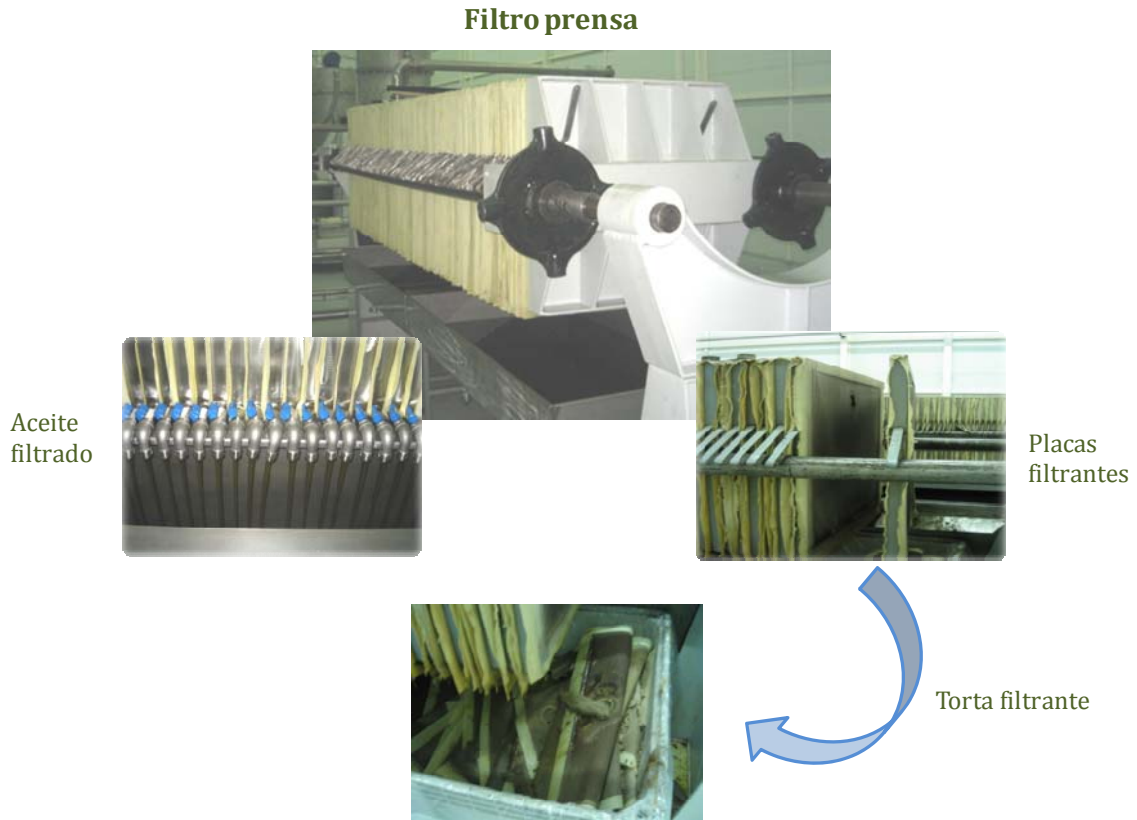


Figura 19. Filtro prensa.

2.5.2 Mejoras en los sistemas de filtración convencional

Las mejoras llevadas a cabo en los sistemas de filtración convencional se han focalizado principalmente en el diseño de nuevas tortas filtrantes por sustitución de los agentes filtrantes ya existentes. Estos materiales deben cumplir una serie de requisitos, como son:

1. Calidad.
2. Alta capacidad de retención.
3. Soportar un alto flujo de aceite a filtrar.
4. Libre de problemas de manipulación.
5. No ser contaminante el medio ambiente.
6. No ser tóxicos.

En la actualidad, en los procesos industriales de filtración los agentes filtrantes de naturaleza inorgánica empleados tradicionalmente, tierras

de diatomeas y perlitas, están siendo desplazados por coadyuvantes de la filtración de naturaleza orgánica, que cada vez están tomando más popularidad en el sector industrial. El uso de estos *filtros orgánicos* ofrece una serie de ventajas frente a los tradicionales⁽⁸⁶⁾:

1. Menor densidad de la torta formada.
2. Largos ciclos de vida útil y aumento de los flujos de trabajo debido a la estructura fibrosa, superficie rugosa y elevada porosidad.
3. No atacan al material; no son abrasivos frente a material, bombas, etc.
4. Son seguros.
5. Debido a su estructura, actúan elásticamente frente a las caídas de presión, de forma que la torta no se rompe.
6. En caso de ser empleados para el abrillantado, en los filtros de tela, la limpieza posterior es facilitada por la adhesión interna de las fibras.
7. El alto valor calorífico y el bajo contenido en cenizas de los coadyuvantes orgánicos facilita que no queden residuos.
8. Ausencia de componentes nocivos.
9. Los residuos no son contaminantes. Se descomponen de forma natural.
10. Pueden ser usados como compost: fertilizante natural.
11. Mayor efectividad. Si se compara la efectividad de filtros orgánicos (celulosa) frente a las tierras de diatomeas, se necesita un 70 % menos para llevar a cabo la filtración.

Estos coadyuvantes son, en su mayoría, polímeros de origen vegetal procedentes de madera o de fibras vegetales. Desde el punto de vista químico, están compuestos por una mezcla de celulosa, hemicelulosa y lignina en función del procedimiento de extracción aplicado (**Figura 20**).



INTRODUCCIÓN

El componente mayoritario es la celulosa, el principal polisacárido de las plantas leñosas y fibrosas y el polímero más abundante de la biosfera.

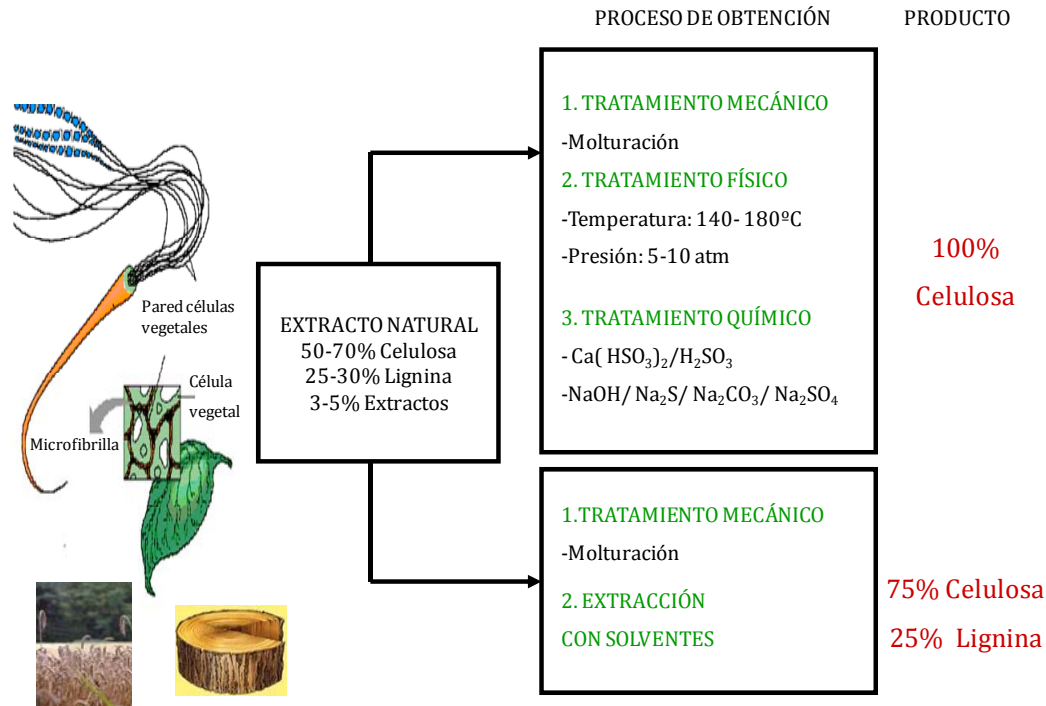


Figura 20. Procedimientos de extracción de celulosa para su utilización como coadyuvante en procesos de filtración.

La pared de una planta es una estructura compleja, formada por varias capas en la que se encuentran empaquetadas las microfibrillas de celulosa. Estas microfibrillas están colocadas con un patrón entrecruzado e impregnado con una matriz del resto de polisacáridos y algunas proteínas. Está formado por moléculas de D-glucosa, en la que los residuos de azúcar se unen mediante enlaces β (1 \rightarrow 4). Puede encontrarse en forma de cadenas totalmente extendidas, de tal manera que cada residuo de glucosa presenta un giro de 180° respecto al residuo de al lado en la cadena. En esta forma extendida, las cadenas pueden formar cintas que se empaquetan lado a lado con una red de enlaces de hidrógeno dentro de ellas y fuera.



2.5.3 Nuevos sistemas de filtración

Recientemente investigadores italianos han desarrollado e implantado dos nuevos sistemas de filtración en el sector oleícola. El primero de ellos ha sido desarrollado por FilterFlo, Binasco (Milan, Italia). Este consiste en la adaptación y utilización de un sistema de **filtración en saco** previamente utilizado en la industria del sector vinícola⁽⁸⁷⁾.

Estos equipos están constituidos por dos compartimentos consistentes en un tubo cilíndrico y un filtro. Este último está constituido por el agente filtrante que no es más que un saco de polipropileno y su soporte. El filtro es introducido en el interior del tubo cilíndrico, y el sistema es presurizado mediante un cierre hidráulico. Entonces el aceite es conducido directamente desde los tanques de almacenamiento al interior de la luz del filtro en saco del equipo de filtración. El aceite pasa a través del filtro de forma que los sólidos suspendidos son eliminados y la humedad reducida. En ocasiones, y de forma similar a los sistemas de filtración convencionales, diferentes materiales seleccionados por el operario pueden ser utilizados como coadyuvantes tecnológicos del proceso. La principal ventaja de este sistema es su amplia versatilidad y fácil mantenimiento. Aunque la capacidad de filtración va a depender del momento en que se sature el filtro y por extensión del contenido en impurezas y humedad del aceite, normalmente con este sistema es posible filtrar entre unos 2.000-4.000 litros. Debido a su baja capacidad su utilización está menos extendida, sobre todo en almazaras con una elevada capacidad de trabajo. La **Figura 21** muestra un equipo de filtración en saco.



INTRODUCCIÓN



Figura 21. Sistema de filtración en saco.

El segundo sistema de filtración, patentado por la Universidad de Bolonia y Sapiro⁽⁸⁸⁾, es un nuevo sistema de **filtración con gases**, basado en la utilización de un flujo de gas inerte. El equipo de filtración está constituido por dos módulos, el primero de ellos consiste en un tanque donde el aceite de oliva es introducido para llevar a cabo el proceso de filtración. El segundo módulo está formado por un tanque de almacenamiento de gas inerte. Este módulo cuenta con un dispositivo de inserción conectado por el fondo del tanque de aceite, que introduce en el centro de la masa de aceite un flujo de gas inerte constante. La inserción del gas provoca un movimiento circular de la masa que facilita la separación de los sólidos suspendidos y agua del aceite.

Como agentes filtrantes se pueden utilizar tanto nitrógeno como argón. El caudal es de aproximadamente unos 15 litros/min. El gas puede ser recirculado nuevamente al tanque de almacenamiento del mismo,



permitiendo su reutilización. Es importante resaltar que este sistema de filtración elimina el uso de materiales inorgánicos y/o orgánicos que entran en contacto con el aceite. Además el gas puede ser utilizado igualmente en el envasado en botellas, permitiendo una mejor conservación del aceite. Existen equipos disponibles comercialmente con capacidades desde 50 hasta 300 litros/h.

Otro sistema de filtración descrito para el aceite de oliva es la filtración tangencial. La funcionalidad de este sistema se ha evaluado a escala de laboratorio, pero hasta la actualidad no ha sido implantado en el sector oleícola a escala industrial^(89, 90).

2.6 Envasado

Después de ser filtrado, el aceite ya está listo para ser envasado y comercializado. El envase del aceite de oliva debe de cumplir los siguientes requisitos:

1. Material inerte que no reaccione con el aceite ni le comunique olores o sabores extraños.
2. Debe de ser lo más impermeable posible a la humedad y al oxígeno atmosférico.
3. Proteger al aceite de la luz y de los cambios de temperatura.
4. No ser poroso.

Los envases más empleados son los de plástico. La **Figura 22** muestra unas fotografías del proceso de envasado del aceite de oliva.



INTRODUCCIÓN



Figura 22. Envasadora de aceite de oliva.

2.7 Impacto del proceso de elaboración en los polifenoles del EVOO

Como se ha indicado anteriormente la composición tanto cualitativa como cuantitativa de polifenoles en el aceite de oliva va a ser resultado de la interacción de multitud de factores tales como la variedad, condiciones pedoclimáticas y proceso de elaboración del aceite, entendido desde la recolección del fruto hasta su envasado.

El estado, tanto sanitario como de maduración del fruto, en el momento de la **recolección** afecta a la composición fenólica de EVOO obtenido a partir del mismo. Tamendjari y colaboradores evaluaron el efecto del ataque de la mosca *Bactrocera oleae*, uno de los principales insectos que afecta al fruto del olivo, sobre la composición fenólica⁽⁹¹⁾. Estos autores observaron que el contenido en polifenoles de aceites obtenidos a partir de frutos afectados se veía disminuido, sobre todo a expensas de los *o*-difenoles. Con respecto al estado de maduración del fruto, la presencia de

compuestos fenólicos en el aceite de oliva está estrictamente relacionada con la actividad de varias enzimas endógenas de la aceituna, actividad que es diferente a lo largo del proceso de maduración. Gutiérrez-Rosales y colaboradores evaluaron diferentes rutas anabólicas y catabólicas de la oleuropeína y sus derivados basadas en la actividad del enzima β -glucosidasa⁽²⁸⁾. De la investigación llevada a cabo concluyeron que en estadios inmaduros la actividad del enzima β -glucosidasa era elevada, siendo la ruta catabólica más activa que la anabólica, predominando en el fruto las formas agliconas de la oleuropeína así como su forma demetilada. La mayoría de los autores coincide en que el momento en el que se alcanzan los niveles máximos de polifenoles complejos se corresponde con el envero. A partir de este estado de maduración su contenido disminuye, aumentando la cantidad de fenoles simples tales como los alcoholes fenólicos 3,4-DHPEA, *p*-HPEA y los derivados hidroxicinámicos⁽⁹²⁻⁹⁴⁾.

Durante todo el proceso tecnológico posterior a la recolección y transporte a la almazara se siguen produciendo cambios en la fracción fenólica. Servili y colaboradores evaluaron el impacto de la **molturación** utilizando un molino de martillo⁽⁹⁵⁾. En sus resultados concluyeron que durante esta etapa se produce una pérdida de polifenoles debido a la actividad del enzima peroxidasa que procede mayoritariamente del hueso de la aceituna. Los principales compuestos afectados fueron los secoiridoides y sus derivados, mientras que el efecto sobre los lignanos fue menos notable. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos por Artajo y colaboradores. Estos investigadores determinaron el efecto de la molturación y el tiempo de batido empleando para ello un molino metálico y una batidora horizontal⁽⁹⁶⁾. Estos autores pusieron de manifiesto una pérdida considerable de los polifenoles más polares, a la



INTRODUCCIÓN

vez que verificaron que en estas etapas es donde se generan derivados decarboximetilados y formas aldehídicas y dialdehídicas de los secoiridoides agliconas. Principalmente detectaron la aparición del compuesto 3,4-DHPEA-EDA como consecuencia del tratamiento tecnológico al que es sometido el fruto en estas etapas.

Estos cambios despertaron el interés de otros investigadores por estas etapas de preparación de la pasta y su impacto en los polifenoles. Inarejos-García y colaboradores evaluaron el efecto del tiempo y la temperatura de batido⁽⁹⁷⁾. Evidenciaron que un incremento en la temperatura iba acompañado de un incremento en el contenido en polifenoles y *o*-difenoles. Temperaturas altas favorecían por tanto la disolución de los polifenoles de la pasta en el aceite. Sin embargo, no ocurría lo mismo con el tiempo de batido, donde la relación fue inversa, debido probablemente a la intervención de enzimas fenoloxidasas que cataliza la oxidación de los fenoles a quinonas. Posteriormente estudiaron el efecto de diferentes condiciones de molturación empleando para ello un molino de martillo⁽⁹⁸⁾. Estos autores concluyeron que las condiciones de molturación más severas, empleando cribas con diámetros pequeños y alta velocidad, fueron las que dieron lugar a una pasta con un mayor contenido en polifenoles.

El efecto de las etapas de **separación sólido-líquido** sobre la fracción fenólica también ha sido evaluado debido a que la necesidad de adición de agua a la pasta batida en algunos sistemas de centrifugación podría tener efecto sobre estos compuestos. Salvador y colaboradores investigaron las diferencias existentes en aceites obtenidos por los diferentes sistemas de extracción tanto por el método tradicional como por ambos sistemas continuos (de tres y dos fases)⁽⁹⁹⁾. En sus resultados



observaron un mayor contenido en polifenoles en aceites obtenidos por el sistema de dos fases, seguido por el de tres fases, siendo el aceite con la menor concentración el obtenido por prensado. Esto evidencia que el volumen de agua utilizada para diluir la pasta en el decantar tipo tres fases disminuye la concentración de los compuestos fenólicos de la fase acuosa por dilución y provoca asimismo la disminución de la concentración de dichos componentes en la fase oleosa.

El **almacenamiento** del aceite de oliva también produce efectos importantes en la composición de la fracción fenólica. El efecto más detectado en estos compuestos ha sido la hidrólisis de los secoiridoides complejos dando lugar a un incremento de alcoholes simples (3,4-DHPEA y *p*-HPEA) y del ácido elenólico y sus derivados⁽¹⁰⁰⁾. Con el objetivo de poder establecer rutas de degradación y acelerar el proceso que tiene lugar durante el almacenamiento diferentes investigaciones se han llevado a cabo bajo condiciones de estrés, tales como exposición a la luz y calentamiento a elevadas temperaturas⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾.

Sin embargo, estas condiciones aplicadas en la mayoría de los casos no reproducen aquellas que tienen lugar en el almacenamiento del aceite tanto en los tanques industriales como en los envases comerciales. Mancebo-Campos y colaboradores evaluaron la degradación de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento de aceites en envases comerciales tanto a temperatura ambiente como en condiciones de estrés⁽¹⁰⁴⁾. Los resultados derivados de su estudio manifestaron que, las reacciones de hidrólisis y oxidación que sufren los compuestos fenólicos bajo condiciones que simulan la evolución de los mismos durante la vida comercial, no se correspondían con las que tenían lugar bajo condiciones de estrés. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos en



INTRODUCCIÓN

otros trabajos de investigación que simulaban las condiciones normales de almacenamiento^(105, 106).

Por tanto, cuando se pretende comprender el efecto de esta etapa en la fracción fenólica las condiciones de almacenamiento, tales como temperatura y exposición a la luz, deberían ser tenidas en cuenta para no desvirtuar los resultados que se obtendrían al evaluar el impacto de esta etapa durante la vida comercial del aceite. También es importante tener en cuenta que la mayor parte de los estudios se han focalizado en evaluar el almacenamiento en envases comerciales y sus diferentes tipos⁽¹⁰⁷⁾, existiendo menos información disponible sobre el efecto del almacenamiento en tanques industriales.

El impacto de la etapa de **filtración** sobre los polifenoles del aceite de oliva ha sido estudiado en menor profundidad que otras etapas del proceso de elaboración, y la mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo a escala de laboratorio. Además, existe una controversia acerca de su efecto. Mientras que unos autores no observaron variación significativa en el contenido en polifenoles⁽¹⁰⁸⁾, otros han descrito desde un descenso de los mismos tras la filtración^(109, 110) hasta un incremento aparente del contenido en polifenoles pertenecientes a algunas de las principales familias^(100, 111).

Los diferentes resultados obtenidos por estos autores pueden ser debidas tanto a la extracción como a la técnica analítica utilizada. Mientras que aquellos autores que observaron un descenso en el contenido en polifenoles, evaluaron el efecto mediante la técnica espectrofotométrica con el reactivo de Folin Ciocalteu, los autores que no observaron ningún efecto, o un incremento aparente de la concentración, llevaron a cabo la



determinación mediante técnicas cromatográficas empleando como detectores ultravioleta-visible, diodo array o diferentes espectrómetros de masas.

Por otro lado, las pérdidas de polifenoles que se producen a lo largo del tratamiento tecnológico conlleva el enriquecimiento en compuestos fenólicos de los diferentes efluentes generados como **subproductos**. En los últimos años ha crecido el número de publicaciones científicas en las que se ha investigado la presencia de estos compuestos bioactivos en subproductos tales como el orujo, alpechín, alperujo y aguas de vegetación⁽¹¹²⁻¹¹⁸⁾. Esto ha hecho que se desarrollen diferentes metodologías para la recuperación de los polifenoles presentes en estos efluentes⁽¹¹⁹⁻¹²²⁾. Muchas de estas tecnologías incluyen procesos que van desde la recuperación de estos analitos hasta su reincorporación en el EVOO para el desarrollo de alimentos con mejores propiedades bioactivas^(123, 124).

Sin embargo, los subproductos generados durante las etapas finales de almacenamiento y filtración del proceso de elaboración del zumo de la oliva han tenido un papel menos protagonista en el desarrollo y búsqueda de fuentes alternativas de polifenoles del aceite. La caracterización de estos subproductos, turbios y tortas filtrantes, podría permitir evaluar su potencial como nuevas fuentes de estos compuestos. Es en este punto donde la convergencia de la **Química Analítica** con la **Tecnología de los Alimentos** puede actuar para establecer nuevas líneas de investigación en el campo de los alimentos funcionales.



3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

La necesidad, por parte de los diferentes ámbitos de la comunidad científica, de un conocimiento más profundo acerca de los compuestos que forman la fracción fenólica del aceite de oliva ha hecho que se desarrollen diferentes metodologías analíticas encaminadas a dar respuesta a esta demanda, abarcando desde la extracción de estos compuestos hasta su determinación.

3.1 Extracción de los polifenoles de EVOO

En toda metodología analítica se necesita de un paso previo de aislamiento de los analitos de interés de la matriz en la que se encuentran, obteniendo un extracto enriquecido en esos compuestos y libre de cualquier otro componente que pueda interferir en la determinación analítica posterior.

La extracción de los compuestos fenólicos en muestras de aceite se ha llevado a cabo mediante extracción líquido-líquido^(111,125) y extracción en fase sólida^(126,127). La **extracción líquido-líquido** (liquid-liquid extraction, LLE) fue el primer sistema de extracción utilizado para aislar la fracción fenólica del aceite de oliva. Como disolvente de extracción se han empleado principalmente metanol, agua y sus mezclas en diferentes proporciones, que van desde el 50 al 100%, en v/v de H₂O:MeOH ^(34,37,43). Para mejorar la eficiencia en la extracción en ocasiones se han adicionado diferentes compuestos orgánicos como la N,N-dimetilformamida (DFM), tensioactivos (Tween 20) para favorecer la liberación de los polifenoles o se han realizado mezclas THF:H₂O seguida de centrifugación⁽⁵⁶⁾. Este sistema de extracción presenta altos



porcentajes de recuperación. Sin embargo, necesita de un tratamiento posterior de limpieza o clean-up y concentración del extracto obtenido para conseguir una buena selectividad y sensibilidad.

Uno de los tratamientos posteriores más ampliamente utilizados consiste en un almacenamiento durante toda la noche posterior a la extracción seguida de filtración y centrifugación, permitiendo así eliminar interferentes⁽¹²⁸⁾. Esto conlleva mayores tiempos de extracción. La etapa de clean-up también se puede llevar a cabo con disolventes orgánicos como hexano, éter de petróleo, cloroformo o sus mezclas, o bien con el empleo de columnas rellenas con diferentes adsorbentes^(42,56). La concentración final del extracto se lleva a cabo mediante evaporación a vacío o con nitrógeno.

En los últimos años la LLE está siendo desplazada por la **extracción en fase sólida** (solid phase extraction, SPE). Estos sistemas de extracción presentan una serie de ventajas frente a la extracción convencional como son una reducción en la manipulación de la muestra y la posibilidad de llevar a cabo el clean-up y preconcentración del extracto obtenido durante el desarrollo de la extracción. Esto permite eliminar etapas posteriores, consiguiendo reducir considerablemente el tiempo de tratamiento de la muestra. La **Figura 23** muestra un esquema de las diferentes etapas de este sistema de extracción. Esta técnica presenta una gran versatilidad en cuanto a la gran cantidad de columnas que se pueden utilizar para retener los compuestos de interés, así como diferentes disolventes para eluir los analitos retenidos. Mannino y colaboradores fueron los primeros en utilizar la SPE para aislar los polifenoles del aceite de oliva, empleando un cartucho con una fase sólida de alquilsílica C8 y metanol como disolvente de elución⁽⁵⁶⁾. Posteriormente también se



INTRODUCCIÓN

evaluó la potencialidad de columnas de adsorbente de C18 para el aislamiento de estos compuestos. Sin embargo, se estableció que con estas fases sólidas no se conseguía una extracción completa de los compuestos fenólicos.

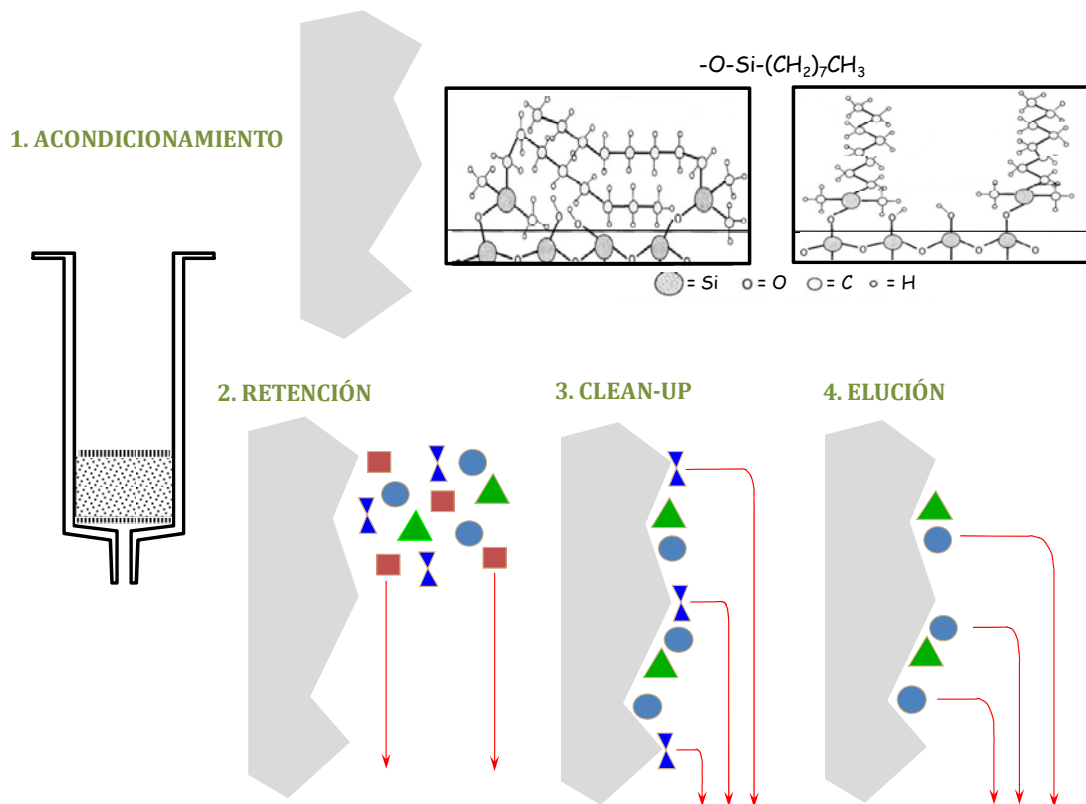


Figura 23. Etapas de la extracción en fase sólida.

Los resultados posteriores obtenidos con extracción en fase normal demostraron que era la más adecuada para aislar estos compuestos polares presentes en una matriz apolar. Para ello, se han utilizado cartuchos de sílice modificada con grupos amino o diol. Mateos y colaboradores emplearon ambos tipos de cartuchos y obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 90% para la mayoría de los polifenoles presentes en las muestras de aceite⁽¹²⁹⁾. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos posteriormente por otros investigadores que llevaron a cabo un estudio comparativo de la



eficiencia de la SPE utilizando cartuchos de extracción con diferentes adsorbentes. De las diferentes fases sólidas evaluadas, fue la extracción con cartuchos DIOL-SPE la que mostró una mayor eficiencia en el aislamiento de polifenoles del aceite de oliva⁽¹³⁰⁾.

Hrcirik y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo entre la LLE y SPE, obteniendo mejores resultados con la LLE⁽³⁵⁾, mientras que otros autores no han observado diferencias entre ambos sistemas⁽¹³¹⁾, o por el contrario una mejor eficacia en el aislamiento de la fracción fenólica mediante SPE. Esta controversia en los resultados entre diferentes autores puede ser debida en parte a que los procedimientos descritos difieren tanto en los disolventes utilizados, tipo de fase sólida, cantidades de muestra usadas en la extracción y sistema de detección empleado en el análisis del extracto obtenido.

3.2 Determinación del contenido en polifenoles del EVOO

Tradicionalmente el análisis de los polifenoles totales se ha llevado a cabo mediante métodos espectrofotométricos basados en la reacción de los grupos funcionales de los polifenoles con una serie de reactivos. Como resultado de la reacción se origina un cambio en la intensidad del color de la solución proporcional a la cantidad de polifenoles presentes en la muestra, cambio utilizado para determinar la concentración del contenido total de los analitos de interés.

El primer reactivo utilizado en la determinación espectrofotométrica fue el conocido como reactivo de **Folin-Denis**, constituido mayoritariamente por ácido fosfórico. Sin embargo, este reactivo presentaba una serie de inconvenientes, entre ellos es importante destacar que la intensidad de la coloración no era estable pasados 30 minutos del inicio de la reacción, así



INTRODUCCIÓN

como la posibilidad de formación de un precipitado que podía interferir en la determinación.

Por ello, se llevaron a cabo numerosas investigaciones dirigidas a solventar estos y otros problemas analíticos. Estos trabajos de investigación consistieron principalmente en modificaciones en la metodología analítica, y lo más importante, en la composición del reactivo original. Las mejoras culminaron con el desarrollo del reactivo de **Folin-Ciocalteu**. El cambio más importante fue la incorporación a este reactivo de ácidos fosfomolibdicos que aumentaron la sensibilidad del método. Este reactivo está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdicos y fosfowolfrámicos que son reducidos por los grupos funcionales hidroxilo de los polifenoles en medio básico generando una mezcla de óxidos azules de molibdeno y wolframio que presentan una absorbancia proporcional a la cantidad de polifenoles de la muestra^(132, 133). Debido a la coloración de los óxidos formados, se puede llevar a cabo la detección espectrofotométrica de los mismos a una longitud de onda comprendida entre 500 y 750 nm.

Se han descrito diferentes procedimientos utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Todos ellos consistentes en la preparación de una curva patrón (para relacionar la señal analítica de la muestra con la concentración de polifenoles) y medida de la absorbancia del compuesto coloreado formado. Los patrones más utilizados han sido los ácidos cafeico y gálico^(134, 135). Las ventajas de esta determinación son su rapidez y simplicidad. La determinación de **o-difenoles totales** se ha llevado a cabo también mediante espectrofotometría empleando como reactivo la sal dihidratada de molibdato sódico, midiendo la absorbancia a 370 nm. Este



procedimiento también se ha optimizado por diferentes autores que han propuesto algunas modificaciones sobre el original (136).

Sin embargo el empleo de estos métodos espectrofotométricos presenta una serie de limitaciones, entre ellas una baja selectividad, dependencia de la señal analítica utilizada para la medida con la temperatura y no permite una cuantificación individualizada de los componentes presentes en la muestra. La gran diversidad de compuestos fenólicos presentes en el aceite, la escasa selectividad de los métodos espectrofotométricos y el creciente interés que estos compuestos han despertado tanto en las áreas de la tecnología de alimentos como de salud pública hizo que los métodos espectrofotométricos fueran desplazados por otros que proporcionasen información cualitativa y cuantitativa individual de cada uno de los polifenoles presentes en el aceite de oliva.

En este sentido, la aplicación de técnicas analíticas separativas permitió un gran avance en este campo. La separación de mezclas complejas de polifenoles posibilitó conocer en mayor grado la fracción fenólica del aceite de oliva. Para ello, las primeras separaciones de estos compuestos se llevaron a cabo mediante cromatografía en papel y en capa fina(137). La evolución de las diferentes **técnicas separativas** tanto no cromatográficas (electroforesis capilar) como cromatográficas (cromatografía de gases y de líquidos) permitió el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, que a día de hoy aún se siguen desarrollando y que proporcionan una mejora en la identificación individual de los componentes presentes en esta fracción.

La **electroforesis capilar** (EC), presenta una serie de ventajas como son el requerimiento de pequeños volúmenes de muestra y una alta eficiencia



INTRODUCCIÓN

en la separación junto con tiempos cortos de análisis⁽⁴⁷⁾. Esto la convierte en una técnica adecuada para el análisis de muestras complejas. El detector más usado con esta técnica ha sido UV-Vis o detectores diodo array^(131,138,139). El posterior acoplamiento a analizadores de MS ha revalorizado el potencial de esta técnica⁽¹⁴⁰⁾, aunque este acoplamiento presenta mayores dificultades que con otras técnicas separativas. Este hecho unido a una serie de inconvenientes como son la dificultad para la automatización y una menor reproducibilidad en el análisis cuantitativo que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) han hecho que sea menos utilizada en el análisis de polifenoles.

La **cromatografía de gases** (GC) ha sido ampliamente utilizada en la caracterización analítica de estos compuestos. La fase estacionaria más comúnmente empleada para la separación de los analitos de interés han sido las columnas capilares de sílice fundida⁽¹⁴¹⁾. El primer detector utilizado fue el detector de ionización de llama (FID)⁽¹⁴²⁾, para en años posteriores dar paso a diferentes analizadores de espectrometría de masas (MS)^(42,143,144). Esta técnica separativa presenta la ventaja de tener una mejor resolución cromatográfica que HPLC, y su acoplamiento a diferentes espectrómetros de masas ha facilitado la identificación de polifenoles del aceite⁽¹⁴⁵⁾.

Sin embargo, dada la naturaleza de los compuestos fenólicos, presenta el inconveniente de necesitar un paso previo de derivatización. La mayoría de estas reacciones llevadas a cabo con polifenoles del aceite consisten en la formación de trimetilsilil derivados⁽⁴²⁾. Esto conlleva un incremento en la masa molecular de los analitos de interés (+73 unidades de masa por cada grupo funcional derivatizado). El principal problema de las reacciones de derivatización es que se pueden producir de forma



incompleta. Por tanto, a partir de un mismo compuesto pueden aparecer diferentes especies químicas en función de la cantidad de grupos funcionales que se derivaticen. Esto dificulta la identificación y cuantificación de los mismos. Por otro lado si el extracto fenólico no está puro, con presencia de ácidos grasos, estos pueden ser derivatizados constituyendo interferentes en la determinación⁽⁴²⁾.

A día de hoy la **cromatografía líquida** sigue siendo la técnica separativa más utilizada en la determinación de polifenoles del aceite de oliva debido a que combina de una buena resolución, eficiencia y versatilidad^(23, 31, 42, 56). Debido a que la cromatografía líquida ha sido la técnica separativa utilizada en la presente Tesis Doctoral será desarrollada con mayor profundidad en el siguiente apartado.

3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

3.2.1 Caracterización de polifenoles del EVOO mediante HPLC acoplada a diferentes sistemas de detección

Las primeras separaciones llevadas a cabo con cromatografía líquida se realizaron tanto en fase normal (NP-HPLC) como en **fase reversa** (RP-HPLC)⁽⁴²⁾, siendo ésta última la que mejores resultados ofrecía en términos de reproducibilidad y separación de los compuestos de interés. En este sentido la RP-HPLC fue utilizada en los estudios posteriores para tratar de separar los polifenoles en el aceite de oliva. Para llevar a cabo esta separación cromatográfica la **fase estacionaria** utilizada principalmente ha sido octadecilsilano C18 con longitudes de lecho cromatográfico comprendidas entre 10 y 30 cm y tamaño de partícula de relleno de 5 a 10 μm ⁽⁵⁶⁾.



INTRODUCCIÓN

Aunque algún método cromatográfico se ha desarrollado en **elución isocrática**⁽¹⁴⁶⁾, en la mayoría de los casos se ha llevado a cabo una elución en gradiente que, debido a la complejidad de la fracción fenólica del aceite, mejora la eficacia de la separación^(23, 42, 56). Como fase móvil se han utilizado principalmente dos eluentes: ácidos diluidos (ácido fórmico, acético y fosfórico) como eluente más polar y metanol, acetonitrilo o sus mezclas como eluente menos polar. No obstante se han desarrollado algunas separaciones cromatográficas basadas en gradientes cuaternarios (mezclas de agua, metanol, acetonitrilo e isopropanol)⁽¹⁴⁷⁾.

Con respecto a los **sistemas de detección** de los compuestos fenólicos eluidos, el más utilizado ha sido la espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). No obstante, aunque se ha descrito en la literatura científica el uso de otros detectores como electroquímicos⁽¹⁴⁸⁾ (tanto amperométricos como coulombimétricos) y de fluorescencia⁽³⁸⁾, sin duda ha sido el acoplamiento de HPLC con diferentes **espectrómetros de masas** una de las herramientas analíticas más potentes utilizadas en la caracterización de polifenoles del aceite de oliva. Prueba de ello ha sido el creciente número de publicaciones científicas que han aparecido en los últimos años empleando esta metodología analítica ^(23, 31, 56).

La espectrometría de masas proporciona información adicional que, junto con la generada por otros sistemas de detección tales como la espectroscopía UV-Vis y de **Resonancia Magnética Nuclear** (RMN) permite llevar a cabo una identificación casi inequívoca de los compuestos de interés⁽¹⁴⁹⁾. El potencial analítico de este acoplamiento se ha visto incrementado con los avances realizados en la instrumentación de los equipos de HPLC, lo que ha permitido mejoras en la resolución cromatográfica de mezclas complejas de compuestos de interés. La



instrumentación utilizada en la presente tesis doctoral incluye equipos de cromatografía líquida que incorporan estas mejoras, así como su acoplamiento a diferentes espectrómetros de masas. Por ello se van a exponer con mayor nivel de detalle en los apartados siguientes.

3.2.2 Instrumentación novedosa de HPLC

Los componentes de un cromatógrafo de líquidos son: sistema de bombeo, sistema de inyección, columna, horno termostaticado y sistema de detección (**Figura 24**). A continuación queda recogida una descripción de los principales avances incorporados a cada uno de ellos.

Los **sistemas de bombeo** son los dispositivos que suministran una presión adecuada para impulsar el/los disolventes al resto del sistema alcanzando el caudal suficiente. Las bombas actuales disponen de sistemas de filtrado de fase móvil. Para ello, los depósitos de fase móvil de capacidad variable (200-1.000 mL) se equipan con filtros para eliminar el paso de impurezas presentes en la fase móvil tales como partículas en suspensión. Estas partículas podrían dañar bombas, sistema de inyección o provocar la obturación de las columnas. Además, el sistema de bombeo cuenta con un desgasificador, cuya función es eliminar gases disueltos que interfieren formando burbujas en la columna y en el sistema de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento de bandas e interfieren en el sistema de detección. Pero los principales avances en los sistemas de bombeo han ido orientados a obtener una mayor reproducibilidad de flujo reduciendo o eliminando los pulsos y a una mayor capacidad para trabajar a elevadas presiones, lo que permite el acoplamiento de columnas más empaquetadas y con un menor tamaño de partícula.



INTRODUCCIÓN

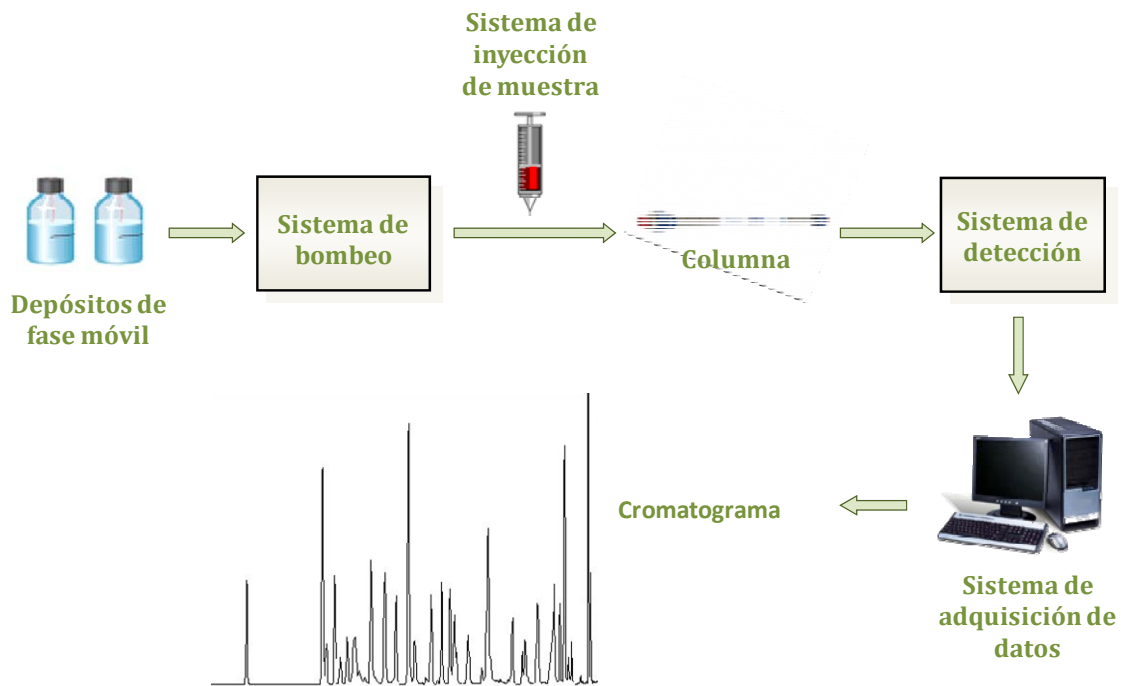


Figura 24. Esquema de un equipo de HPLC.

El **inyector** permite la introducción de una cantidad de muestra a analizar en el cromatógrafo. Uno de los factores limitantes en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna sin despresurizar el sistema. Para ello, los equipos actuales cuentan con sistemas de inyección basados en válvulas rotatorias con bucles de muestra. Estos bucles de muestra presentan diferente capacidad, algunos ejemplos son aquellos que permiten alojar cantidades de muestra entre 2 y 20 μL en unos casos o 0,5 a 5 μL en otros. Estos sistemas permiten inyectar volúmenes pequeños y exactos evitando el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Además la reproducibilidad entre pinchazos es elevada. Por otro lado, los sistemas actuales cuentan con la opción de poder realizar una limpieza del dispositivo inyector entre un



análisis y otro, lo que disminuye la posibilidad de contaminación o “*carry-over*”.

La **columna cromatográfica** contiene la fase estacionaria y en ella tiene lugar la separación de los analitos. El tamaño de partícula está directamente relacionado con la eficacia de la separación, siendo las columnas con partículas de 5 μm las más utilizadas en los equipos de HPLC convencionales. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie, aumentando el número de platos teóricos y con ello una mejor separación, consiguiendo mejor eficacia y resolución. Por otro lado, al trabajar con un tamaño de partícula más pequeño esto permite aumentar los flujos de trabajo y con ello reducir los tiempos de análisis sin una disminución en la eficiencia de la separación cromatográfica. Sin embargo, en los equipos convencionales de HPLC es prácticamente imposible trabajar con columnas cuyo tamaño de partícula es menor de 3 μm de diámetro de partícula, ya que la sobrepresión generada supera el valor máximo soportado por el sistema. Como se ha mencionado anteriormente, los equipos actuales de HPLC incorporan mejoras en la instrumentación del sistema de bombeo que han aumentado los límites máximos de presión de trabajo a valores de hasta 600 y 1.000 bares. Esto permite utilizar fases estacionarias con un tamaño de partícula muy pequeño ($< 2 \mu\text{m}$)⁽¹⁵⁰⁾.

Existen diferentes equipos comerciales en el mercado que cuentan con esta tecnología. Como ejemplos tenemos los denominados RRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography, marca registrada de Agilent Technologies), que permite trabajar a presiones de hasta 600 bares y UPLC (Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography, marca registrada de



INTRODUCCIÓN

Water Corporation) que pueden llegar a trabajar con presiones de hasta 1.000 bares. La **Tabla 6** recoge las principales características de las columnas utilizadas en los diferentes equipos de HPLC. Entre el sistema de inyección y la columna se suele colocar una precolumna cuya función es eliminar materia en suspensión o contaminantes de la fase móvil o de la muestra.

Tabla 6. Algunos parámetros de las diferentes técnicas de cromatografía líquida en columna.

Parámetro	HPLC convencional	HPLC alta eficacia	Micro LC	LC capilar	Nano LC
Diámetro interno de la columna (mm)	10-15	1.5-4.5	0.8	0.18-0.32	0.075-0.1
Longitud (cm)	50-200	3-30	5-25	5-25	5-15
Diámetro medio de partícula (μm)	> 150-200	3-40	3-5	3-5	3-5
Flujo de fase móvil	1-2 ml/min	0.2-2.5 ml/min	10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$	0.1-1 $\mu\text{l}/\text{min}$

Otro parámetro a tener en cuenta debido a que influyen en la separación cromatográfica es la temperatura. Para asegurar una mayor reproducibilidad en las separaciones los equipos actuales de HPLC cuentan con un compartimento termostático u horno para poder controlar este parámetro durante la separación cromatográfica.

El **detector** es el encargado de producir las señales analíticas ante la presencia de un determinado compuesto. Pueden utilizarse más de uno simultáneamente, colocándose en serie. Como se ha indicado anteriormente, los detectores más utilizados en el análisis de polifenoles



en el aceite de oliva han sido detectores de absorción UV-Vis y espectrómetros de masas.

3.3 Espectroscopía de absorción molecular UV-Vis

La espectroscopía de absorción molecular UV-Vis tiene una gran aplicación en la identificación y cuantificación de multitud de moléculas, entre ellas los polifenoles, debido a que estos compuestos son capaces de absorber radiación electromagnética por la presencia de grupos cromóforos en su estructura. Estos grupos absorben radiación UV-Vis dando lugar a bandas de absorción que pueden ser utilizadas para su caracterización. Debido a su posibilidad para determinar un gran número de compuestos y grupos funcionales y su facilidad de manejo, este modo de detección puede considerarse cercano al detector universal. Probablemente sea la técnica de análisis cuantitativo más utilizada en todo el mundo.

Este sistema de detección ha evolucionado con el tiempo. Así, se pueden diferenciar tres tipos de detectores: los de longitud de onda fija, los de longitud de onda variable y de batería de diodos. Los primeros están constituidos por una lámpara de mercurio a baja presión que emite una radiación monocromática a 254 nm. Otro tipo de detectores son los de **longitud de onda variable**, que trabajan en el rango del UV-Vis. En sus orígenes estaban dotados de dos lámparas, una de deuterio para trabajar de 190 a 360 nm y otra de tungsteno, para trabajar en el visible, con un monocromador para seleccionar la longitud de onda deseada. Hoy en día, con una sola lámpara de deuterio se abarca todo el espectro.

Pero sin duda el detector más versátil de los tres es el **detector de batería de diodos** (DAD), que permite la detección simultánea de un



INTRODUCCIÓN

rango de longitudes de onda en segundos con el fin de obtener espectros completos de absorción UV-Vis. Es su posibilidad de obtener información a numerosas longitudes de onda de forma instantánea lo que lo han convertido en el detector UV-Vis más utilizado.

La espectroscopía UV-Vis presenta la ventaja de ser sensible a un gran número de especies químicas, lo que puede utilizarse para resolver un gran número de problemas analíticos. Además cuenta con límites de detección bajos, aunque no es tan sensible como otros sistemas de detección. La información espectral que proporciona es útil en los procesos de identificación de compuestos. La detección de los polifenoles del aceite se lleva a cabo generalmente a las longitudes de onda 240 y 280 nm. En la **Tabla 7** se incluyen los máximos de absorción de algunos compuestos fenólicos y sus derivados presentes en el aceite de oliva.

Sin embargo este sistema de detección cuenta con una serie de limitaciones, sobre todo en la caracterización de mezclas complejas. Los compuestos absorben a diferentes longitudes de onda y dado que los espectros de absorción generados por moléculas son en forma de bandas anchas se pueden cometer errores en la determinación cuando el método cromatográfico no posee una buena resolución. Compuestos con tiempos de retención similares pueden contribuir a la intensidad de una misma banda de absorción. Además, en la mayoría de los casos es necesario disponer de patrones comerciales para llevar a cabo la identificación de los compuestos por comparación de los espectros de absorción y los tiempos de retención de los patrones con los de los analitos presentes en la muestra. Los polifenoles del aceite de oliva constituyen una mezcla compleja de compuestos de los que, en su mayoría, no disponen de patrones comerciales. Esto dificulta el proceso de identificación. Por todo



ello, en los últimos años se ha potenciado la utilización de espectrómetros de masas acoplados en serie con estos detectores.

Tabla 7. Longitud de onda máxima de absorción de los principales compuestos fenólicos

Compuesto fenólico	Longitud de onda (nm)
Ácido vanílico	228/265/295
Ácido <i>p</i> -cumárico	230/310
Ácido ferúlico	240/295/325
3,4-DHPEA	232/280
3,4-DHPEA acetato	232/285
<i>p</i> -HPEA	232/276
<i>p</i> -HPEA acetato	232/285
Ácido elenólico	240
3,4-DHPEA-EA	236/282
3,4-DHPEA-EDA	235/280
<i>p</i> -HPEA-EA	235/285
<i>p</i> -HPEA-EDA	235/285
(+)-1-Pinoresinol	232/280
(+)-1-Acetoxipinoresinol	232/280
Luteolina	255/350
Apigenina	230/270/340

3.4 Espectrometría de masas

En los últimos años la espectrometría de masas ha estado cada vez más presente en las investigaciones llevadas a cabo para la caracterización de los polifenoles presentes en el aceite de oliva. Entre los analizadores de masas más utilizados para tal fin se pueden destacar: triple cuadrupolo (QqQ)^(36, 57, 151, 152), trampa de iones (IT)⁽⁵⁶⁾ y tiempo de vuelo (TOF)⁽¹⁵³⁾. La elección del analizador va a estar en función de la disponibilidad así como de los objetivos perseguidos. Todos ellos se distinguen en la



INTRODUCCIÓN

velocidad de barrido, el rango de masas en el que pueden medir, la posibilidad de aislar iones precursores para su posterior fragmentación dando lugar a espectros de MS-MS o MS², el análisis de las distribuciones isotópicas (true isotopic pattern) así como la determinación de la masa exacta (proporcionando una mayor información de la composición elemental) y la resolución. De todos ellos, los analizadores de masas trampa de iones y tiempo de vuelo han sido utilizados en el desarrollo experimental de la presente tesis doctoral (**Figura 25**), por lo que serán desarrollados en mayor detalle en los próximos apartados.

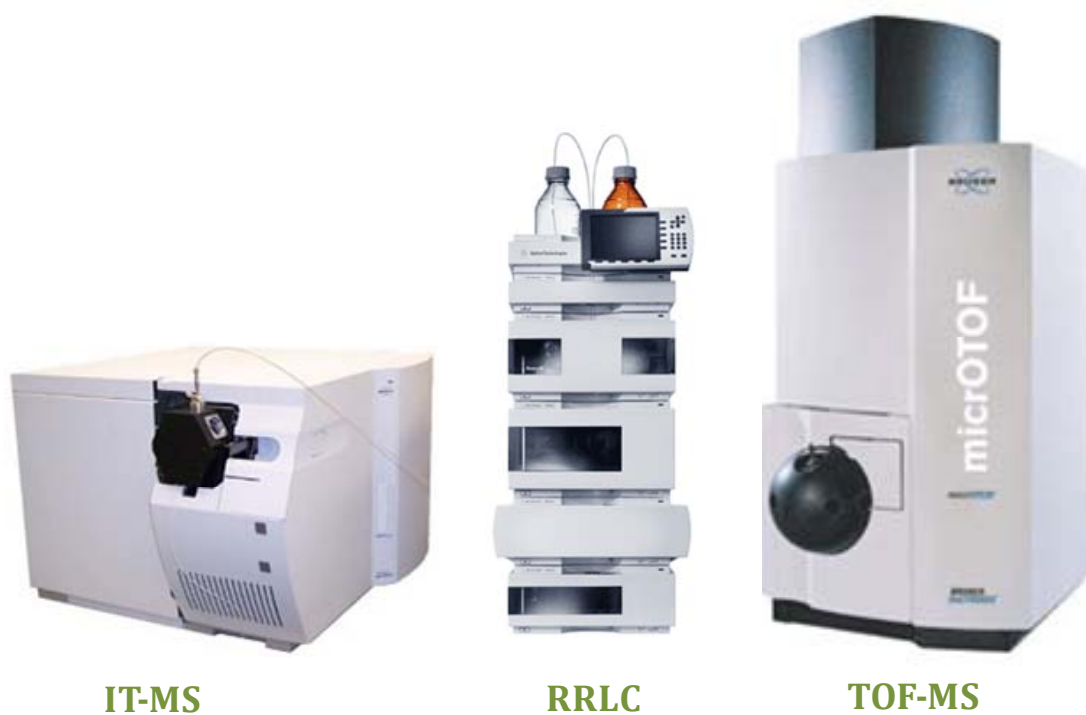


Figura 25. Plataforma analítica utilizada en el desarrollo de la parte experimental de la presente tesis doctoral.

3.4.1 Acoplamiento HPLC-MS

Los espectrómetros de masas son equipos que trabajan en fase gas a alto vacío permitiendo separar iones en función de su relación masa/carga



(m/z), lo que conduce a la obtención de los espectros de masas. Sin embargo, HPLC es una técnica separativa que trabaja en fase líquida. Por ello es necesario llevar a cabo un acoplamiento que permita la evaporación de la fase móvil y la ionización de las moléculas de analito. Este acoplamiento HPLC-MS se realiza mediante la utilización de diferentes interfases⁽¹⁵⁴⁾. Se han desarrollado un gran número de ellas que difieren en el principio por el que llevan a cabo la evaporación del disolvente y formación de las especies iónicas (impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización química a presión atmosférica (APCI), electrospray (ESI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), bombardeo atómico (FAB), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), etc).

La elección de la interfase depende del peso molecular y la polaridad de los analitos de interés. Para la determinación de polifenoles en el aceite de oliva las interfases más utilizadas en el acoplamiento HPLC-MS han sido APCI y ESI en modo de ionización negativo^(23,56). La **Figura 26** muestra el rango de aplicación de ambas interfases en función de las características de los analitos.

La interfase APCI es capaz de permitir el acoplamiento cuando se trabaja con analitos de interés en un rango de masas de hasta 2.000 Da y de baja a moderadamente alta polaridad. Presenta la ventaja frente a ESI de suprimir la formación de aductos con iones (sodio, potasio...) cuando se trabaja en positivo. Además permite trabajar a flujos más elevados (superiores a 1.5 mL/min) ya que soporta una mayor cantidad de disolvente proveniente del cromatógrafo.



INTRODUCCIÓN

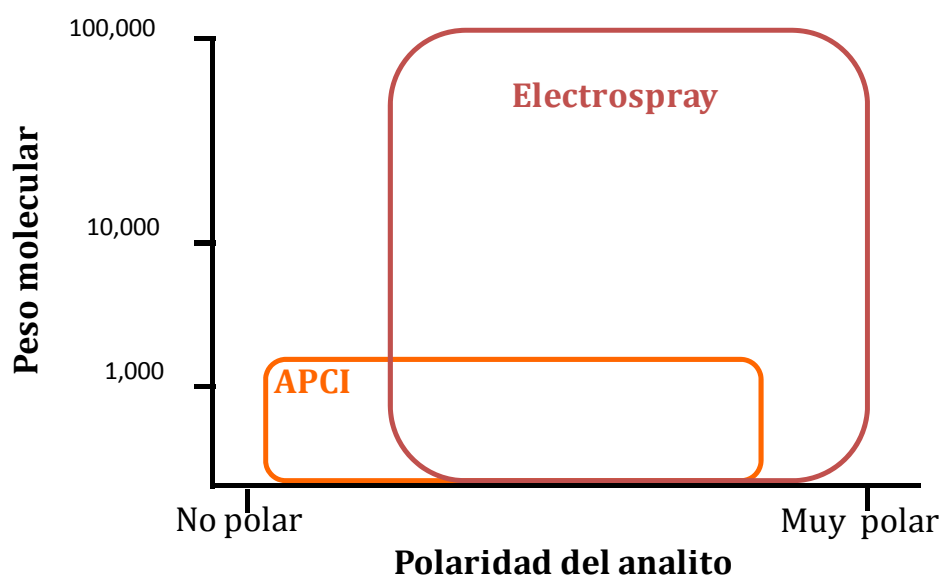


Figura 26. Rango de aplicación de las principales interfases empleadas en el acoplamiento HPLC-MS para la determinación de polifenoles del aceite de oliva virgen extra. Ionización química a presión atmosférica (APCI) y electrospray (ESI).

No obstante la **interfase ESI** es mucho más versátil, y ha sido la utilizada para el acoplamiento HPLC-MS en la presente tesis doctoral ya que cubre el rango de masas y polaridad de los analitos de interés. Aunque acepta flujos menores, entre 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ -1 ml/min , estos exceden el límite de lo recomendado a la entrada del espectrómetro de masas (entre 0.2-0.5 ml/min , dependiendo del analizador). Este flujo máximo permitido se debe tener en cuenta sobre todo en el desarrollo de nuevos métodos cromatográficos en los que se aumenta el flujo para reducir los tiempos de análisis. Para solucionar el problema se recurre a divisores de flujo entre la salida del cromatógrafo y la entrada de la interfase. La **Figura 27** muestra el acoplamiento HPLC-ESI-MS.



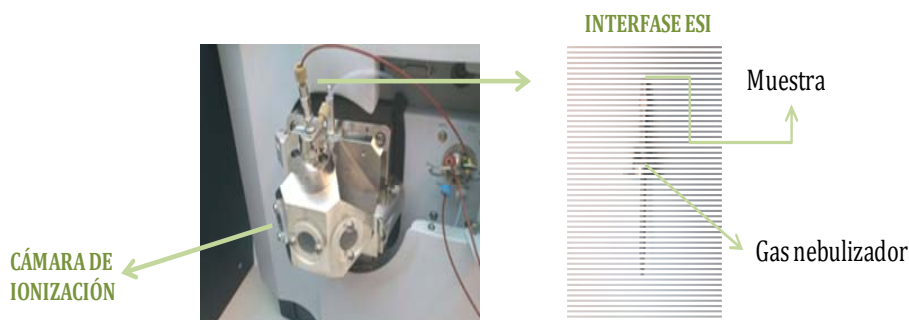


Figura 27. Detalle del acoplamiento HPLC-ESI-MS.

El **proceso de formación del electrospray** tiene lugar a presión atmosférica y en él intervienen diferentes mecanismos que conllevan la transferencia de los iones desde una fase líquida a una fase gaseosa. La **Figura 28** muestra un esquema de este proceso. La muestra que llega de la columna cromatográfica es cargada y dispersada en la cámara de nebulización de los espectrómetros de masas con la ayuda de un gas nebulizador. Se produce la desolvatación del disolvente en las microgotas formadas y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. En muchos analizadores de masas la desolvatación total se completa por el uso de un gas de secado aplicado en contracorriente a la trayectoria de los iones atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado.

Debido a la desolvatación, las gotas disminuyen de tamaño y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí. Cuando las fuerzas de repulsión coulombica exceden la tensión superficial de la gota (límite de Rayleigh), ésta se rompe produciendo pequeñas gotas cargadas que están sujetas a una rápida evaporación (explosión de Coulomb). Cuando se evapora el disolvente de las pequeñas gotas, la superficie está altamente cargada y una vez que el campo creado

INTRODUCCIÓN

por los iones excede la tensión superficial los iones pasan directamente a una fase gaseosa.

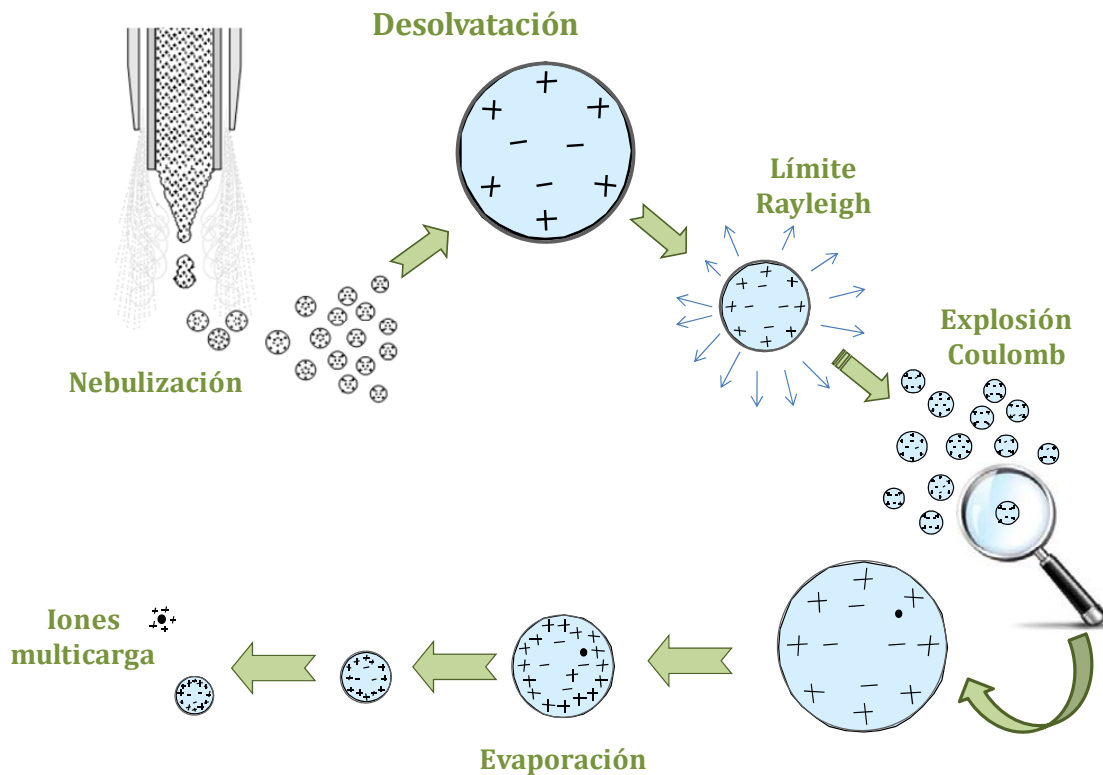


Figura 28. Proceso de formación de electro spray y generación de iones multicarga.

En el proceso de ionización se puedan formar iones multicargados. Estos iones van a reducir su relación masa/carga (m/z), que es el parámetro utilizado para el análisis por un espectrómetro de masas. Así, mediante la formación de iones multicargados, se va a poder detectar compuestos con pesos moleculares muy altos.

3.4.1 Analizadores de masas de trampa de iones

El analizador de trampa de iones consiste fundamentalmente en un electrodo anular y dos electrodos laterales de geometría hiperbólica, que



poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones. El rango de masas que puede analizar está comprendido entre 50-2.000 m/z. La **Figura 28** muestra las diferentes partes de este analizador. Se pueden distinguir cuatro zonas: cámara de ionización, zona de transferencia, trampa de iones y detector.

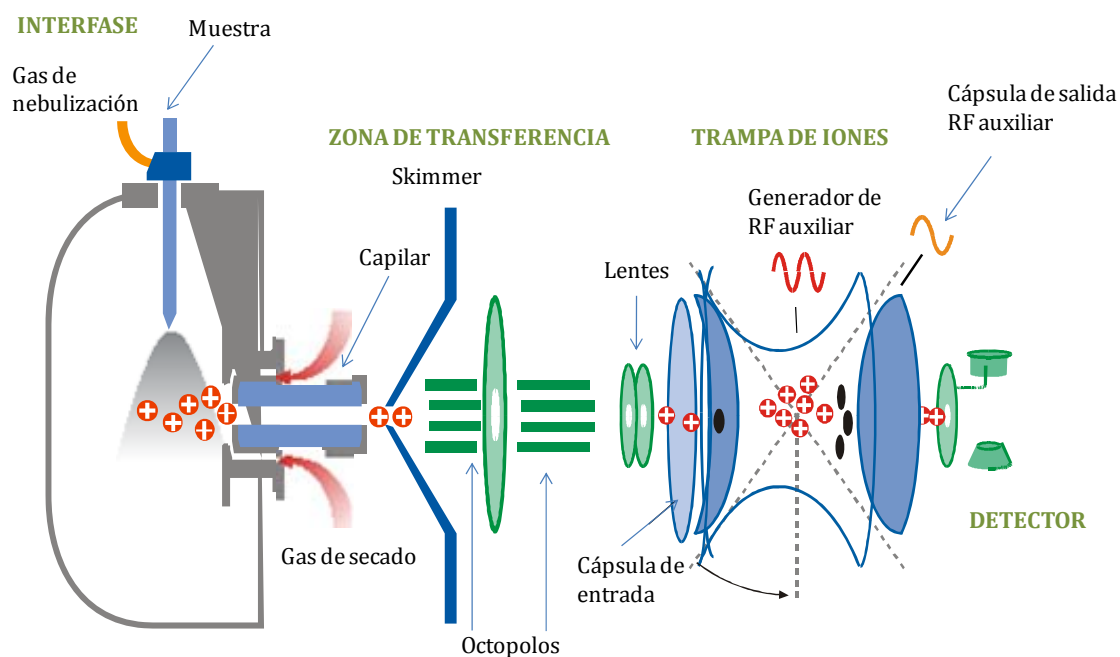


Figura 29. Componentes de un analizador de masas de trampa de iones.

En la **cámara de ionización** es donde se lleva a cabo la formación de especies iónicas y su transferencia de fase líquida a fase gas. El mecanismo de ionización dependerá de la interfase utilizada. En la presente tesis doctoral el acoplamiento HPLC-IT se ha llevado a cabo mediante una interfase ESI. Una vez que los iones se encuentran en fase gas pasan a la zona de **transferencia** o **focalización**. Esta zona se divide a su vez en otras cuatro que se encuentran a alto vacío. Los iones pasan primero a través de un capilar de vidrio hasta un skimmer que elimina el volumen del gas de secado. A continuación pasan por los octopolos que los transportan y guían desde el skimmer hasta el detector atravesando

INTRODUCCIÓN

una serie de lentes. Por último los iones entran en el **analizador de trampa de iones** donde se separan en función de su relación m/z . Una vez en la trampa de iones, éstos son sometidos a un campo eléctrico tridimensional que genera una trayectoria de oscilación estable que permite concentrar los iones. Para llevar a cabo la determinación de todas las especies químicas que entran o se forman en la trampa, los potenciales de los electrodos se alteran sometiendo a los iones confinados a una rampa lineal de radiofrecuencia (RF) de modo que son progresivamente expulsados como resultado de desestabilizaciones de la órbita que mantienen dentro de la trampa. Una vez que estos iones llegan al **detector** la señal se procesa y da lugar al espectro de masas. El detector utilizado es un fotomultiplicador.

Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro de este analizador se puede llevar a cabo tanto el análisis de sus masas (obteniéndose el espectro de MS) como el aislamiento de uno o varios iones precursores y su posterior fragmentación. Para llevar a cabo el análisis de MS/MS se utiliza helio como gas de colisión. La **Figura 29** muestra un esquema de ambos modos.



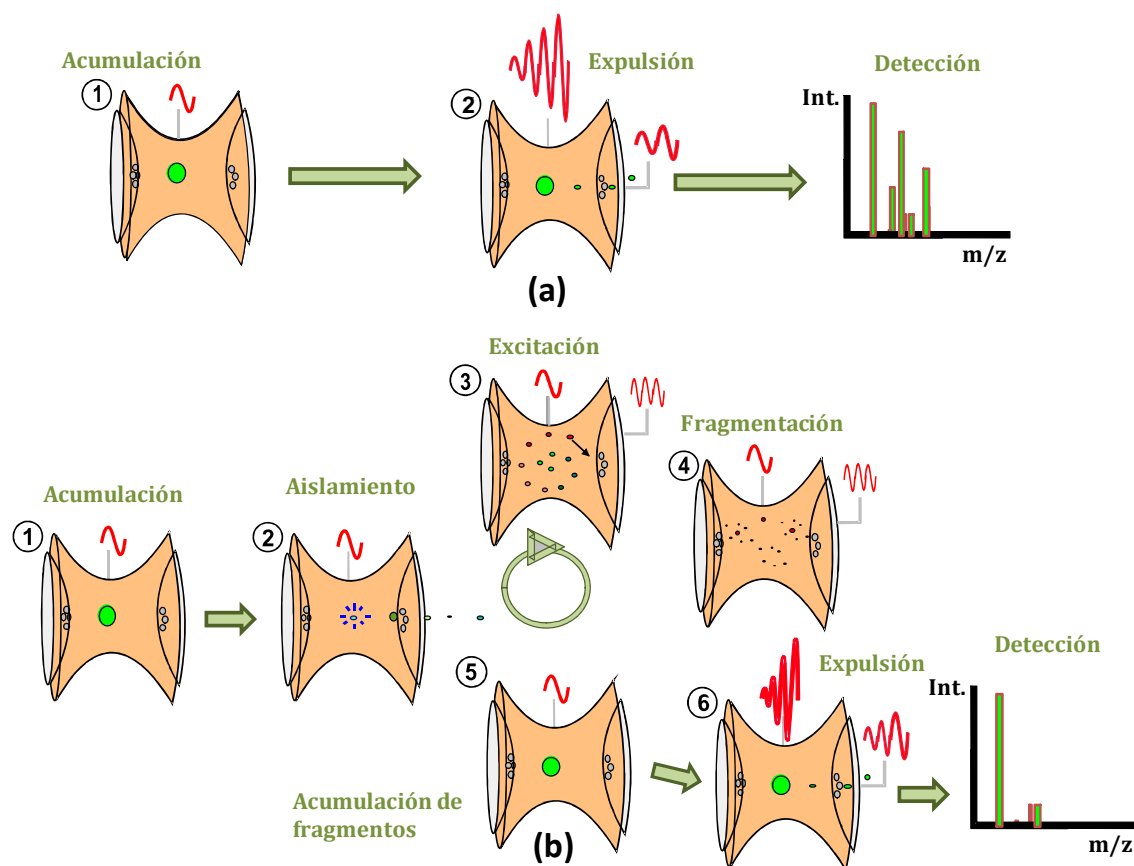


Figura 30. Obtención de espectros de masas con analizador IT:(a) MS;(b) MS/MS.

3.4.2 Analizadores de masas de tiempo de vuelo

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) discrimina según la distinta velocidad que adquieren los iones en el interior del analizador en función de su relación m/z . El rango de masas que puede analizar en modo estándar está comprendido entre 50-3.000 m/z . Las principales ventajas que presenta el analizador TOF frente a otros analizadores es que dada su elevada resolución permite obtener valores de masa molecular muy exactos. Combinando los datos de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica permite poder determinar la fórmula molecular del compuesto.

INTRODUCCIÓN

Un analizador TOF está integrado por los siguientes módulos: cámara de ionización, unidad de desolvatación, zona de transferencia, zona de aceleración ortogonal, detector de referencia, tubo de vuelo, reflector y detector (**Figura 30**).

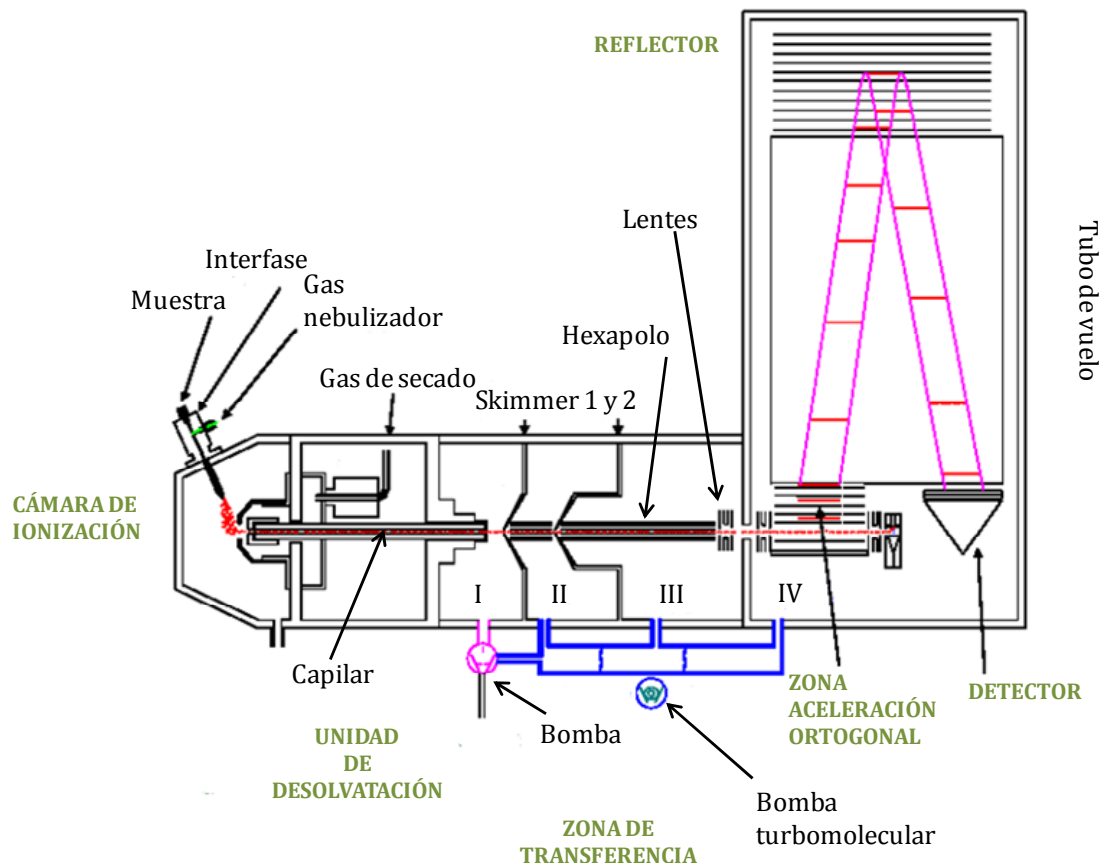


Figura 31. Componentes de un analizador de masas de tiempo de vuelo.

En la **cámara de ionización**, al igual que en el caso de la trampa de iones, es donde se lleva a cabo la formación de especies iónicas y su transferencia de fase líquida a fase gas. Como se ha indicado anteriormente, el mecanismo dependerá de la interfase utilizada (en este caso, ESI).

La **unidad de desolvatación** es el segundo módulo que conecta la cámara de ionización con la zona de transferencia. Cuenta con una



corriente de gas de secado (generalmente nitrógeno) que favorece la evaporación del disolvente. Esta zona es atravesada por un capilar de vidrio a través del cual los iones son transferidos hacia el interior del analizador. La diferencia de presión entre la entrada del capilar (cámara de ionización a presión atmosférica) y su salida (primera zona a vacío) combinada con la diferencia de potencial genera un flujo de iones de la cámara de ionización al primer módulo de la **zona de transferencia**.

En la zona de transferencia tiene lugar la separación de los iones del gas de secado y del disolvente, siendo transferidos hacia la zona de aceleración ortogonal. La zona de transferencia óptica está compuesta de tres módulos que están a alto vacío. El primero de ellos presenta una presión aproximada de 4 mbar y para ello está conectado a una bomba externa rotatoria. Los dos módulos siguientes están conectados a una bomba turbo molecular que permite que la presión de vacío alcance valores inferiores (de 5×10^{-1} mbar y 5×10^{-4} mbar en cada uno de ellos respectivamente). Estos módulos están separados entre sí por dos skimmers. Estos elementos están sometidos a un potencial elevado, y presentan unos orificios centrales lo suficientemente pequeños como para mantener la diferencia de vacío entre los módulos. Permiten focalizar y dirigir solo los iones, pero no las moléculas neutras. Otros elementos presentes en estos módulos son los hexapolos, que permiten la transferencia de los iones en función de su masa, que viene determinada por el valor de radiofrecuencia establecida. El hexapolo 2 se usa para el almacenamiento de iones, siendo su salida controlada por una lente a través de voltajes. El resto de lentes focalizan los iones en la trayectoria adecuada hacia la zona de aceleración ortogonal. Todo ello hace que la transferencia de iones se realice en función de un gradiente de presión y un gradiente de potencial.



INTRODUCCIÓN

La **zona de aceleración ortogonal** acelera los iones hacia el tubo de vuelo aplicando pulsos eléctricos intermitentes. Para ello se aplica un voltaje determinado que acelera los iones, lanzándolos a un tubo de vuelo de alto vacío con una energía cinética constante. Los iones que tienen la misma energía cinética pero diferentes valores de m/z adquieren distinta velocidad de forma que no todos llegarán al extremo contrario a la vez. Los iones de mayor m/z “volarán” a menor velocidad que los de menor m/z . La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea la trayectoria recorrida por los iones y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente.

Cuando los iones llegan al final del tubo de vuelo penetran en el **reflector** donde se ralentizan, se paran y se reflejan hacia el detector. Este dispositivo permite corregir la dispersión de energía de iones con el mismo valor de m/z y reenfoarlos sobre el detector, alargando sus trayectorias y mejorando la resolución. En función de su energía cinética (de su velocidad), los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector; los iones con mayor energía cinética penetrarán más en el reflector antes de ser repelidos.

El **detector** donde impactan los iones que preceden del reflector es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor; cada uno de ellos trabaja como un multiplicador de electrones independiente.





Bibliografía

1. Toussaint-Samat, M. A History of Food. *Wiley-Blackwell (1ª Edición)*. **1994**.
2. González -Turmo, I. Comida de rico, comida de pobre. Evolución de los hábitos alimenticios en el Occidente andaluz (Siglo XX). *Universidad de Sevilla*. **1997**.
3. March, L.; Rios, A. La milenaria cultura del olivo, el aceite de oliva, vida y cultura. *Patrimonio Comunal Olivarero*. **1998**.
4. Martínez-Alvarez, J.R.; Villarino-Martín, A.; Serrano-Morago, L.; Lezcano-Martín, C.; Urrialde de Andrés, R.; Sánchez-Muñiz, F.J.; Castro-Alija, M.J.; Cao-Torija, M.J. El aceite de oliva y la dieta mediterránea. *Nutrición y Salud*. Nueva Imprenta S.A.. **2005**.
5. Fernández-Jarne, E.; Martínez-Losa, E.; Prado-Santamaría, M.; Brugarolas-Brufau, C.; Serrano-Martínez, M.; Martínez-González, M.A. Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consumption: A case-control study in Spain. *International Journal of Epidemiology*. **2002**, 31, 474-480.
6. Martínez-González, M.A.; Fernández-Jarne, E.; Serrano-Martínez, M.; Martí, A.; Martínez, J.A.; Martín-Moreno, J.M. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: An operational healthy dietary score. *European Journal of Nutrition*. **2002**, 41, 153-160.
7. Bertuzzi, M.; Tavani, A.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Fernández Jarne, E.; Serrano-Martínez, M.; Martínez González, M.A. Olive oil consumption and risk of non-fatal myocardial infarction in Italy. *International Journal of Epidemiology*. **2002**, 31, 1274-1277.
8. Madigan, C.; Ryan, M.; Owens, D.; Collins, P.; Tomkin, G.H. Dietary



INTRODUCCIÓN

unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: Higher levels of postprandial lipoprotein on a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid-rich olive oil diet. *Diabetes Care*. **2000**, *23*, 1472-1477.

9. López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimón, L.; Covas, M.I.; Escrich, E.; Ordovás, J.M.; Soriguer, F.; Abiá, R.; Alarcón de la Lastra, C.; Battino, M.; Corella, D.; Chamorro-Quirós, J.; Delgado-Lista, J.; Giugliano, D.; Esposito, K.; Estruch, R.; Fernández-Real, J.M.; Gaforio, J.J.; La Vecchia, C.; Lairon, D.; López-Segura, F.; Mata, P.; Menéndez, J.A.; Muriana, F.J.; Osada, J.; Panagiotakos, D.B.; Paniagua, J.A.; Pérez-Martínez, P.; Perona, J.; Peinado, M.A.; Pineda-Priego, M.; Poulsen, H.E.; Quiles, J.L.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Ruano, J.; Serra-Majem, L.; Solá, R.; Solanas, M.; Solfrizzi, V.; de la Torre-Fornell, R.; Trichopoulou, A.; Uceda, M.; Villalba-Montoro, J.M.; Villar-Ortiz, J.R.; Visioli, F.; Yiannakouris, N. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. **2010**, *20*, 284-294.

10. Kontou, N.; Psaltopoulou, T.; Panagiotakos, D.; Dimopoulos, M.A.; Linos, A. The mediterranean diet in cancer prevention: A review. *Journal of Medicinal Food*. **2011**, *14*, 1065-1078.

11. Psaltopoulou, T.; Kosti, R.I.; Haidopoulos, D.; Dimopoulos, M.; Panagiotakos, D.B. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: A systematic review and a meta-analysis of 13800 patients and 23340 controls in 19 observational studies. *Lipids in Health and Disease*. **2011**, *10*.



- 12.** Sofi, F.; Cesari, F.; Abbate, R.; Gensini, G.F.; Casini, A. Adherence to Mediterranean diet and health status: Meta-analysis. *British Medical Journal*. **2008**, *337*, 673-675.
- 13.** Stoneham, M.; Goldacre, M.; Seagroatt, V.; Gill, L. Olive oil, diet and colorectal cancer: An ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiological Community Health*. **2000**, *54*, 756-760.
- 14.** Mataix Verdú, J.; Rodríguez Navarrete, G.; Barbancho Cisneros, F.J.; Martínez de Victoria Muñoz, E. Aceite de oliva salud. El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. *Fundación Unicaja*. **2009**, *1*, 327-357.
- 15.** López-Miranda, J.; Delgado-Lista, J.; Perez-Martínez, P.; Jiménez-Gómez, Y.; Fuentes, F.; Ruano, J.; Marín, C. Olive oil and the haemostatic system. *Molecular Nutrition and Food Research*. **2007**, *51*, 1249-1259.
- 16.** Puertollano, M.A.; Puertollano, E.; Álvarez de Cienfuegos, G.; de Pablo, M.A. Significance of olive oil in the host immune resistance to infection. *British Journal of Nutrition*. **2007**, *98*, S54-S58.
- 17.** Puertollano, M.A.; Puertollano, E.; Álvarez De Cienfuegos, G.; De Pablo, M.A. Olive oil, immune system and infection. *Nutricion Hospitalaria*. **2010**, *25*, 1-8.
- 18.** Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*. **2000**, *1*, 107-112.
- 19.** Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Gilani, A.; Saari, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-A review. *International Journal of Molecular Sciences*. **2012**,



INTRODUCCIÓN

13, 1291-1340.

20. Warleta, F.; Campos, M.; Allouche, Y.; Sánchez-Quesada, C.; Ruiz-Mora, J.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, *48*, 1092-1100.

21. Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J.; Uceda, M.; Mesa, M.D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, *48*, 2885-2890.

22. Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S.J. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. **2009**, *49*, 218-236.

23. 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.

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

25. Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*. **2002**, *92*, 147-176.



26. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Report*. **2009**, *26*, 1001-1043.
27. Damtoft, S.; Franzyk, H.; Jensen, S.R. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae. *Phytochemistry*. **1993**, *34*, 1291-1299.
28. Gutiérrez-Rosales, F.; Romero, M.P.; Casanovas, M.; Motilva, M.J.; Mínguez-Mosquera, M.I. Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, 12924-12933.
29. Chiacchierini, E.; Mele, G.; Restuccia, D.; Vinci, G. Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends in Food Science & Technology*. **2007**, *18*, 299-305.
30. Gallina-Toschi, T.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Bonoli-Carbognin, M.; Lercker, G. Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques. *Journal of Separation Science*. **2005**, *28*, 859-870.
31. Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*. **2004**, *1054*, 113-127.
32. Carrasco-Pancorbo, A.; Cruces-Blanco, C.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of*



INTRODUCCIÓN

Agricultural and Food Chemistry. **2004**, *52*, 6687-6693.

33. De La Torre-Carbot, K.; Jauregui, O.; Gimeno, E.; Castellote, A.I.; Lamuela-Raventos, R.M.; Lopez-Sabater, M.C. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 4331-4340.

34. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*. **1992**, *44*, 53-60.

35. Hrnčirik, K.; Fritsche, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2004**, *106*, 540-549.

36. Bianco, A.; Buiarelli, F.; Cartoni, G.P.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Margherita, P. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in virgin olive oil, Part II. *Journal of Separation Science*. **2003**, *26*, 417-424.

37. Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*. **2000**, *46*, 976-988.

38. Brenes, M.; García, A.; Ríos, J.J.; García, P.; Garrido, A. Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 615-625.

39. Oliveras-López, M.J.; Innocenti, M.; Giaccherini, C.; Ieri, F.; Romani, A.; Mulinacci, N. Study of the phenolic composition of Spanish and Italian



monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*. **2007**, *73*, 726-732.

40. Christophoridou, S.; Dais, P.; Tseng, L.I.-; Spraul, M. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 4667-4679.

41. Dais, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Hatzakis, E.; Fragaki, G.; Agiomyrgianaki, A.; Salivaras, E.; Siragakis, G.; Daskalaki, D.; Tasioula-Margari, M.; Brenes, M. Comparison of analytical methodologies based on H-1 and P-31 NMR spectroscopy with conventional methods of analysis for the determination of some olive oil constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, *55*, 577-584.

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

43. Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*. **2000**, *38*, 647-659.

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



INTRODUCCIÓN

858.

45. Tovar, M.J.; Motilva, M.J.; Luna, M.; Girona, J.; Romero, M.P. Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2001**, *78*, 843-849.

46. Savarese, M.; De Marco, E.; Sacchi, R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2007**, *105*, 761-770.

47. Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *Journal of Separation Science*. **2006**, *29*, 2221-2233.

48. Suarez, M.; Macía, A.; Romero, M.; Motilva, M. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*. **2008**, *1214*, 90-99.

49. Fu, S.; Arráez-Román, D.; Menéndez, J.A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2009**, *23*, 51-59.

50. García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Vazquez-Martín, A.; Menéndez, J.A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization and quantification of phenolic compounds



of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2010**, *51*, 416-429.

51. Servili, M.; Esposito, S.; Fabiani, R.; Urbani, S.; Taticchi, A.; Mariucci, F.; Selvaggini, R.; Montedoro, G.F. Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*. **2009**, *17*, 76-84.

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

53. Mateos, R.; Cert, A.; Pérez-Camino, M. C.; García, J.M. Evaluation of Virgin Olive Oil Bitterness by Quantification of Secoiridoid Derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2004**, *81*, 71-75.

54. Inarejos-García, A.M.; Androulaki, A.; Salvador, M.D.; Fregapane, G.; Tsimidou, M.Z. Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. *Food Research International*. **2009**, *42*, 279-284.

55. Andrewes, P.; Busch, J.L.H.C.; De Joode, T.; Groenewegen, A.; Alexandre, H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, *51*, 1415-1420.

56. El Riachy, M.; Priego-Capote, F.; León, L.; Rallo, L.; Luque de Castro, M.D. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic



INTRODUCCIÓN

phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2011**, *113*, 678-691.

57. Bianco, A.; Coccioli, F.; Guiso, M.; Marra, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*. **2002**, *77*, 405-411.

58. Baldioli, M.; Servili, M.; Perretti, G.; Montedoro, G.F. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1996**, *73*, 1589-1593.

59. Mateos, R.; Domínguez, M.; Espartero, J.; Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, *51*, 7170-7175.

60. Artajo, L.S.; Romero, M.P.; Morelló, J.R.; Motilva, M.J. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, 6079-6088.

61. Carrasco-Pancorbo, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Del Carlo, M.; Gallina-Toschi, T.; Lercker, G.; Compagnone, D.; Fernández-Gutiérrez, N.G. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 8918-8925.

62. Covas, M. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: Reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology*. **2008**, *16*, 216-218.



- 63.** De La Torre-Carbot, K.; Chávez-Servín, J.L.; Jaúregui, O.; Castellote, A.I.; Lamuela-Raventós, R.M.; Nurmi, T.; Poulsen, H.E.; Gaddi, A.V.; Kaikkonen, J.; Zunft, H.-.; Kiesewetter, H.; Fitó, M.; Covas, M.-.; López-Sabater, M.C. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *Journal of Nutrition*. **2010**, *140*, 501-508.
- 64.** Yang, D.-.; Kong, D.-.; Zhang, H.-. Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. **2007**, *104*, 1269-1271.
- 65.** Dell'Agli, M.; Maschi, O.; Galli, G.V.; Fagnani, R.; Dal Cero, E.; Caruso, D.; Bosisio, E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition*. **2008**, *99*, 945-951.
- 66.** 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. *Nutrition Research Reviews*. **2005**, *18*, 98-112.
- 67.** Huang, C.L.; Sumpio, B.E. Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*. **2008**, *207*, 407-416.
- 68.** Beauchamp, G.K.; Keast, R.S.J.; Morel, D.; Lin, J.; Pika, J.; Han, Q.; Lee, C.; Smith, A.B.; Breslin, P.A.S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **2005**, *437*, 45-46.
- 69.** Loizzo, M.R.; Lecce, G.D.; Boselli, E.; Menichini, F.; Frega, N.G. Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes involved in diabetes, obesity and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*. **2011**, *35*, 381-399.



INTRODUCCIÓN

70. Medina, E.; De Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, 4954-4961.

71. Romero, C.; Medina, E.; Vargas, J.; Brenes, M.; De Castro, A. In vitro activity of olive oil polyphenols against helicobacter pylori. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, *55*, 680-686.

72. Fabiani, R.; Sepporta, M.V.; Mazza, T.; Rosignoli, P.; Fuccelli, R.; De Bartolomeo, A.; Crescimanno, M.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Servili, M.; Morozzi, G. Influence of cultivar and concentration of selected phenolic constituents on the *in vitro* chemiopreventive potential of olive oil extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, 8167-8174.

73. Fabiani, R.; Sepporta, M.V.; Rosignoli, P.; De Bartolomeo, A.; Crescimanno, M.; Morozzi, G. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *European Journal of Nutrition*. **2011**, 1-10.

74. Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessi, M.A.; Spencer, J.P.E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2009**, *53*, 897-903.

75. Deiana, M.; Corona, G.; Incani, A.; Loru, D.; Rosa, A.; Atzeri, A.; Paola Melis, M.; Assunta Dessì, M. Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, *48*, 3008-3016.



76. Menéndez, J.A.; Vázquez-Martín, A.; Colomer, R.; Brunet, J.; Carrasco-Pancorbo, A.; García-Villalba, R.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin (TM)) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. **2007**, 7,1-19.
77. Warleta, F.; Quesada, C.S.; Campos, M.; Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*. **2011**, 3, 839-857.
78. Civantos López-Villalta, L. La maduración de las aceitunas. Algunas consideraciones sobre olivicultura y elaiotecnia desde la perspectiva de la experiencia. *GEA Westfalia Separator Andalucía S.L.* **2009**, 1, 121-135.
79. Humanes Guillén, J.; Humanes Martín, M.D. Técnicas de cultivo encaminadas a la mejora de la producción del olivar y desarrollo sostenible. Algunas contribuciones sobre olivicultura y elaiotecnia desde la perspectiva de la experiencia. *GEA Westfalia Separator Andalucía S.L.* **2009**, 1, 137-171.
80. Porrás Soriano, A.; Marcilla, I.; Gonzales, J.A.; Redonda, A.; Porrás Piedra, A. Recolección mecanizada de la aceituna. Ad oleum habendum. *GEA Westfalia Separator Ibérica, S.A.* **2011**, 1, 173-206.
81. Civantos López-Villalta, L. Obtención del aceite de oliva virgen. *Editorial Agrícola Española S.A.* **1999**, 2.
82. Mendoza Alba, J.; Martínez Román, F.; Moyano Pérez, M.J.; Hidalgo-Casado, F. Tecnología de elaboración del aceite de oliva. Algunas contribuciones sobre olivicultura y elaiotecnia desde la perspectiva de la experiencia. *GEA Westfalia Separator Andalucía, S.L.* **2009**, 1, 137-175.



INTRODUCCIÓN

- 83.** Fernando Martínez, J.A.; Moyano, M.J.; Hidalgo, F.; Cárdenas, R.; Hruschka, S. Elaboración del aceite de oliva virgen en España. El cambio tecnológico. Ad oleum habendum. *GEA Westfalia Separator Ibérica, S.A.* **2011**, *1*, 207-229.
- 84.** Cerretani, L.; Gómez-Caravaca, A.M.; Bendini, A. Aspectos tecnológicos de la producción del aceite de oliva. El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. *Fundación Unicaja*. **2009**, *1*, 171-192.
- 85.** Humanes, M.D.; Humanes, L. El almacenamiento del aceite de oliva: calidad, estabilidad, condiciones y tiempo de conservación. Ad oleum habendum. *GEA Westfalia Separator Iberia, S.A.* **2011**, *1*, 231-250.
- 86.** Gerdes, E. Precoat filtration with organic filter aids. *Filtration Separation*. **1997**, *34*, 1040-1043.
- 87.** Malugade, D.; Wessel, M.A. Filter bag system with multifilter adaptability. *World Patent Application no. WO9600605*. Kind Code:A1. **1996**.
- 88.** Cerretani, L., Rocculi, P., Bendini, A., Romani, S. Oil clarifying process and apparatus for implementing the process. *World Patent Application no. WO 2009/107096*. Kind Code: A2. **2009**.
- 89.** Bottino, A.; Capannelli, G.; Comite, A.; Ferrari, F.; Marotta, F.; Mattei, A.; Turchini, A. Application of membrane processes for the filtration of extra virgin olive oil. *Journal of Food Engineering*. **2004**, *65*, 303-309.
- 90.** Bottino, A.; Capannelli, G.; Mattei, A.; Rovellini, P.; Zunin, P. Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2008**, *110*, 1109-1115.



- 91.** Tamendjari, A.; Angerosa, F.; Mettouchi, S.; Bellal, M.M. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas y Aceites*. **2009**, *60*, 507-513.
- 92.** El Riachy, M.; Priego-Capote, F.; León, L.; Rallo, L.; Luque de Castro, M.D. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2011**, *113*, 692-707.
- 93.** Dag, A.; Kerem, Z.; Yogev, N.; Zipori, I.; Lavee, S.; Ben-David, E. Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*. **2011**, *127*, 358-366.
- 94.** Beltrán, G.; Aguilera, M.P.; Rio, C.D.; Sanchez, S.; Martinez, L. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*. **2005**, *89*, 207-215.
- 95.** Servili, M.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Urbani, S.; Selvaggini, R.; Montedoro, G.F. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, *55*, 7028-7035.
- 96.** Artajo, L.-.; Romero, M.-.; Suárez, M.; Motilva, M.-. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*. **2007**, *225*, 617-625.
- 97.** Inarejos-García, A.M.; Gómez-Rico, A.; Salvador, M.D.; Fregapane, G. Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *European Food Research and Technology*. **2009**, *228*, 671-677.



INTRODUCCIÓN

- 98.** Inarejos-García, A.M.; Fregapane, G.; Salvador, M.D. Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *European Food Research and Technology*. **2011**, *232*, 441-451.
- 99.** Salvador, M.D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chemistry*. **2003**, *80*, 359-366.
- 100.** Brenes, M.; García, A.; García, P.; Garrido, A. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, 5609-5614.
- 101.** Rovellini, P., Cortesi N. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. **2002**, *69*, 1-14.
- 102.** Ríos, J.J.; Gil, M.J.; Gutiérrez-Rosales, F. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*. **2005**, *1093*, 167-176.
- 103.** Lerma-García, M.J.; Simo-Alfonso, E.F.; Chiavaro, E.; Bendini, A.; Lercker, G.; Cerretani, L. Study of Chemical Changes Produced in Virgin Olive Oils with Different Phenolic Contents during an Accelerated Storage Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57*, 7834-7840.
- 104.** Mancebo-Campos, V.; Salvador, M.D.; Fregapane, G. Comparative study of virgin olive oil behavior under rancimat accelerated oxidation



conditions and long-term room temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, *55*, 8231-8236.

105. Lavelli, V.; Fregapane, G.; Salvador, M. D. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, 3002-3007.

106. Gómez-Alonso, S.; Mancebo-Campos, V.; Salvador, M.D.; Fregapane, G. Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*. **2007**, *100*, 36-42.

107. Samaniego-Sánchez, C.; Oliveras-López, M.J.; Quesada-Granados, J.J.; Villalón-Mir, M.; Serrana, H.L.-. Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2012**, *114*, 194-204.

108. Fregapane, G.; Lavelli, V.; Leon, S.; Kapuralin, J.; Salvador, M.D. Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2006**, *108*, 134-142.

109. Tsimidou, M.Z.; Georgiou, A.; Koidis, A.; Boskou, D. Loss of stability of "veiled" (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*. **2005**, *93*, 377-383.

110. Koidis, A.; Boskou, D. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2006**, *108*, 323-328.

111. Gómez-Caravaca, A. M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura- Carretero, A.; Fernández- Gutiérrez, A.; Lercker, G. Effect of Filtration Systems on the



INTRODUCCIÓN

Phenolic Content in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*. **2007**, *2*, 671-678.

112. Obied, H.K.; Allen, M.S.; Bedgood Jr., D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 9911-9920.

113. Obied, H.K.; Allen, M.S.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K.; Stockmann, R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 823-837.

114. Obied, H.K.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chemistry*. **2008**, *111*, 171-178.

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

116. Cermola, F.; DellaGreca, N.; Iesce, M.R.; Montella, S.; Pollio, A.; Temussi, F. A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewater. *Chemosphere*. **2004**, *55*, 1035-1041.

117. Zafra, A.; Juárez, M.J.B.; Blanc, R.; Navalón, A.; González, J.; Vílchez, J.L. Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. **2006**, *70*, 213-218.

118. Bazoti, F.N.; Gikas, E.; Skaltsounis, A.L.; Tsaibopoulos, A. Development of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the quantification of



bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta*. **2006**, 573-574, 258-266.

119. Paraskeva, P.; Diamadopoulos, E. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2006**, 81, 1475-1485.

120. Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.; Mikros, E.; Tsarbopoulos, A.; Gikas, E.; Spanos, I.; Manios, T. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 2671-2676.

121. Suárez, M.; Romero, M.; Ramo, T.; Macia, A.; Motilva, M. Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 1463-1472.

122. Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Rubio-Senent, F.; Gómez-Carretero, A.; Fernández-Bolaños, J. New hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59, 1115-1123.

123. Servili, M.; Esposto, S.; Veneziani, G.; Urbani, S.; Taticchi, A.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Sordini, B.; Montedoro, G. Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olive-vegetation water concentrate produced by membrane treatment. *Food Chemistry*. **2011**, 124, 1308-1315.

124. López-Más, J., A.; Streitenberg, S., A.; Peñalver Mellado, M.; Martínez Ortiz, P. Aceites enriquecidos con hidroxitirosol y sus usos. *European*



INTRODUCCIÓN

Patent Application no. 08788910. **2010**.

125. Gómez-Caravaca, A.M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Del Carlo, M.; Compagnone, D.; Cichelli, A. Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, 4577-4583.

126. Pirisi, F.M.; Cabras, P.; Cao, C.F.; Migliorini, M.; Muggelli, M. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, *48*, 1191-1196.

127. Gómez-Rico, A.; Fregapane, G.; Salvador, M.D. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*. **2008**, *41*, 433-440.

128. Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Konstantinou, P.; Di Giacinto, L. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**, *43*, 1802-1807.

129. Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Ríos, J.J.; León-Camacho, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, 2185-2192.

130. Bendini, A.; Bonoli, M.; Cerretani, L.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin



olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*. **2003**, *985*, 425-433.

131. Gómez-Caravaca, A.M.; Carrasco-Pancorbo, A.; Díaz, B.; Segura-Carretero, A.; Gutiérrez-Fernández, A. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. **2005**, *26*, 3538-3551.

132. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1981**, *58*, 966-968.

133. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1956**, *16*, 144-158.

134. Blekas, G.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Boskou, D. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2002**, *104*, 340-346.

135. Cerretani, L.; Bendini, A.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Toschi, T.G. Evaluation of the oxidative stability of extra-virgin olive oils, obtained by different technological plants, with respect to some qualitative parameters. *Industrie Alimentari*. **2003**, *42*, 706-711.

136. Rotondi, A.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Mari, M.; Lercker, G.; Toschi, T.G. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, 3649-3654.

137. Ragazzi, E.; Veronese, G. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. *Journal of*



INTRODUCCIÓN

Chromatography A. **1973**, 77, 369-375.

138. Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2006**, 54, 7984-7991.

139. Buiarelli, F.; Berardino, S.D.I.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Russo, M.V. Determination of phenolic acids in olive oil by capillary electrophoresis. *Annali di Chimica.* **2004**, 94, 699-705.

140. Nevado, J.J.B.; Peñalvo, G.C.; Robledo, V.R.; Martínez, G.V. New CE-ESI-MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin olive oil. *Talanta* **2009**, 79, 1238-1246.

141. Robbins, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2003**, 51, 2866-2887.

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

143. Saitta, M.; Curto, S.L.; Salvo, F.; Bella, G.D.; Dugo, G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta.* **2002**, 466, 335-344.



- 144.** García-Villalba, R.; Pacchiarotta, T.; Carrasco-Pancorbo, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Deelder, A.M.; Mayboroda, O.A. Gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*. **2011**, *1218*, 959-971.
- 145.** Saitta, M.; Salvo, F.; Di Bella, G.; Dugo, G.; La Torre, G.L. Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry*. **2009**, *112*, 525-532.
- 146.** Pirisi, F.M.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V.L.; Di Teulada, M.T.S.; Dos Santos, M.K.; Bandino, G. Phenolic compounds in virgin olive oils. I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *Journal of Chromatography A*. **1997**, *768*, 207-213.
- 147.** Tasioula-Margari, M.; Okogeri, O. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry* **2001**, *74*, 377-383.
- 148.** Brenes, M.; García, A.; García, P.; Garrido, A. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, *48*, 5178-5183.
- 149.** Pérez-Trujillo, M.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Parella, T. Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin Olive Oil from *Olea Europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone. *Journal of Agricultural and Food*



INTRODUCCIÓN

Chemistry. **2010**, *58*, 9129-9136.

150. Cunliffe, J.M.; Adams-Hall, S.B.; Maloney, T.D. Evaluation and comparison of very high pressure liquid chromatography systems for the separation and validation of pharmaceutical compounds. *Journal of Separation Science*. **2007**, *30*, 1214-1223.

151. Bianco, A.; Buiarelli, F.; Cartoni, G.P.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Margherita, P. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*. **2003**, *26*, 409-416.

152. Di Maio, I.; Esposito, S.; Taticchi, A.; Selvaggini, R.; Veneziani, G.; Urbani, S.; Servili, M. HPLC-ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil. *Food Chemistry*. **2011**, *125*, 21-28.

153. Carrasco-Pancorbo, A.; Neususs, C.; Pelzing, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*. **2007**, *28*, 806-821.

154. Gelpí, E. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *Journal of Mass Spectrometry*. **2002**, *37*, 241-253.



PARTE EXPERIMENTAL



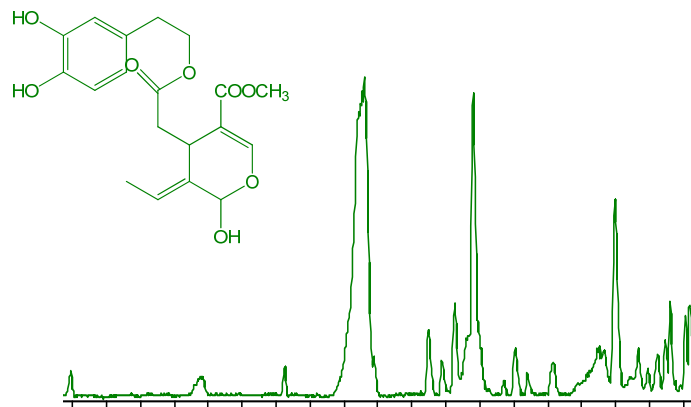
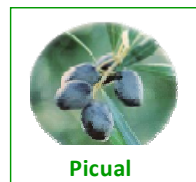
New analytical approach for the characterization of the
EVOO phenolic profile: varietal classification,
bioactivity and alternative source of phenolic
compounds



Nuevas perspectivas analíticas en la caracterización de
polifenoles del EVOO: clasificación varietal,
bioactividad y fuentes alternativas de polifenoles

Sección I

**Prediction of EVOO varieties
through their phenolic profile obtained by
HPLC-ESI-TOF-MS. Potential cytotoxic activity
against human breast cancer cells**



Caracterización mediante HPLC-ESI-TOF-MS de los polifenoles de EVOO y su potencial como predictores varietales. Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* frente a células de cáncer de mama

Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells

JESÚS LOZANO-SÁNCHEZ,^{†,‡} ANTONIO SEGURA-CARRETERO,^{*,†,‡}
JAVIER A. MENENDEZ,[§] CRISTINA OLIVERAS-FERRAROS,[§] LORENZO CERRETANI,^{||} AND
ALBERTO FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ^{†,‡}

[†]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, E 18071 Granada, Spain, [‡]Functional Food Research and Development Center, Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento s/n, E-18100 Granada, Spain, [§]Catalan Institute of Oncology, Girona Biomedical Research Institute (IdIBGi), Avenida de Francia s/n, E-17007 Girona, Spain, and ^{||}Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Piazza Goidanich 60, I-47521 Cesena (FC), Italy

The aim of this work was to develop a rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (RRLC-ESI-TOF-MS) method followed by tetrazolium salt (MTT)-based cell viability assays for qualitative and quantitative classification of extra virgin olive oil (EVOO) varieties by phenolic and other polar compound contents as well as for rapid characterization of putative cytotoxic activities against human cancer cells. Five different Spanish EVOO varieties were analyzed, and RRLC-ESI-TOF-MS method was applied for qualitative and quantitative identification of most important phenolic compounds. We finally employed MTT-based cell viability protocol to assess the effects of crude EVOO phenolic extracts (PEs) on the metabolic status of cultured SKBR3 human breast cancer cells. MTT-based cell viability assays revealed a wide range of breast cancer cytotoxic potencies among individual crude PE obtained from EVOO monovarietals. Remarkably, breast cancer cell sensitivity to crude EVOO-PEs was up to 12 times higher in secoiridoids enriched-PE than in secoiridoids-low/null EVOO-PE.

KEYWORDS: Breast cancer; HER2; RRLC-MS; olive oil; phenolic compounds

INTRODUCTION

Food can be regarded as *functional* if it is satisfactorily demonstrated to affect beneficially one or more target functions in the body, beyond adequate nutrition, in a way that improves health and well-being or reduces the risk of disease. Extra virgin olive oil (EVOO) could be considered as functional food. Its health properties have been discussed extensively in literature. Olive oil has compounds that provide health benefits, including the prevention and treatment of diseases. Among olive oil compounds, the phenolic fraction has received considerable attention in recent years. Evidence from several studies have revealed that the protective effects of EVOO against chronic diseases such as atherosclerosis, cancer, obesity, diabetes, and coronary diseases are related to the phenolic compounds (1–4). The pharmaceutical interest in olive oil phenolic compounds due to their bioactivity on different cancer cells is also well-known (1, 5–7) and has stimulated multidisciplinary research on the composition of olive biophenols. The bioactivity of the phenolic compounds in these chronic diseases could be related to different properties such as antioxidant and anti-inflammatory,

although the molecular mechanism of these compounds in relation to many diseases could have different cellular targets.

The most important phenolic compounds that have been identified on EVOO may be divided into different groups such as phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones. Among these compounds, hydroxytyrosol and oleuropein aglycon have been related to different anticancer activities (7–9). In our hands, individual EVOO-derived complex phenolic compounds such as oleuropein aglycone efficiently inhibited proliferation and induced apoptotic cell death in human-derived breast cancer cell lines bearing high levels of the tyrosine kinase receptor HER2 (*erbB-2*), an oncoprotein which is found overexpressed in ~15–30% of human breast carcinomas (10, 11). Moreover, we established that isolated individual complex phenolic compounds and phenolic fractions mainly containing a sole phenolic component were not equivalent in their abilities to inhibit HER2-driven cell growth and to down-regulate the activity and expression of the HER2 protein itself. It is necessary to consider that because the biological effects of phenolic compounds, including breast cancer cytotoxic actions, are varied and compound specific, combinatorial effects (i.e., addition, antagonism or synergism) can occur in EVOO naturally exhibiting enriched or low levels of specific phenolic compounds.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +34 958 249510. Fax: +34958249510. E-mail: ansegura@ugr.es.



These reported health properties of virgin olive oil phenolic fraction have promoted active research on methods to identify and quantify these compounds. A large quantity of papers related to the evaluation of EVOO polyphenols, published before the 1990, reported colorimetric methods, such as UV spectroscopy, that generally use the Folin–Ciocalteu reagent (8, 12). The need to carry out an individual identification of each phenolic compound leads to the replacement of the conventional nonspecific methods by other more specific ones. Capillary electrophoresis (CE) and gas and liquid chromatography have been used (13, 14). Gas chromatography (GC) is less common because a derivatization step is necessary (15). The results obtained by CE are very useful, with short analysis times and high efficiency peak separation, but the downside of this technique is the low concentration sensitivity (16–18). The usual technique to analyze the phenolic fraction is high performance liquid chromatography (HPLC) (7, 13, 19–22). Recently, an improvement in chromatographic performance has been achieved by the introduction of rapid-resolution LC (RRLC) and ultraperformance LC (UPLC). These approaches use narrow-bore columns packed with very small particles (1.8 μm) and high flow rate with delivery systems operating at high backpressures. The major advantages of RRLC over conventional HPLC are improved resolution, shorter retention times, higher sensitivity, and better performance. Coupling RRLC with mass spectrometry (MS) further offers a potent analytical alternative, which has been applied in recent publications characterizing food products.

Because the anticancer activity as well as many other biological effects of EVOO-derived phenolics appears to have compound-specific properties, the aim of this study was to characterize and examine different EVOO to test the hypothesis that a naturally occurring family of phenolic compounds present in dietary EVOO might have synergistic properties to develop an efficient EVOO-based cancer preventive or intervention clinical strategy. First, we have developed a rapid and sensitive RRLC/MS method to identify and quantify the olive oil phenolic compounds with a high efficiency on the chromatographic separation together with the classification of extra virgin olive oil by phenolic profile. Moreover, the validation of the proposed method has been carried out with the sensitivity, linearity, and precision parameters. Second, we have employed whole crude phenolic extracts (PEs) directly obtained from 14 different monovarieties of EVOOs produced in Spain to preliminary delineate both the biological actions (in terms of cytotoxicity) and the clinical value (in terms of physiologically relevant concentration ranges) of complex multicomponent PEs against *HER2* gene-amplified SKBR3 breast cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Olive Oil. The olive oils used in this study were from five different monovarietal EVOOs obtained from different geographic zones in Spain: two Hojiblanca olive oils produced in Málaga (EVOO 1) and Sevilla (EVOO 9), seven Picual olive oils produced in Málaga (EVOO 2), Jaén (EVOOs 4, 10 and 11), Granada (EVOOs 5, and 6), and Córdoba (7), one Cornezuelo (EVOO 3), one Manzanilla (EVOO 8), and three Arbequina olive oils (EVOOs 12, 13, and 14). The EVOOs were produced in the same year (September 2008). Olives were processed by continuous industrial plants equipped with a hammer crusher, a horizontal malaxator, and a two-phase decanter. Samples were stored in bottles without headspace at room temperature and darkness before analysis. To isolate the phenolic fraction of olive oils from all varieties, solid phase extraction (SPE) with Diol-cartridges was used. EVOO (60 g) was dissolved and loaded onto the column. The cartridge was washed with 15 mL of hexane, which were then discarded in order to remove the nonpolar fraction of the oil. Finally, the sample was recovered by passing through 40 mL of methanol and the solvent was evaporated under vacuum. The residue was dissolved with 2 mL of methanol and filtered through a 0.25 μm filter before the

RRLC analysis. The extracts of olive oils were diluted (1:10, v/v) with methanol.

Breast Cancer Cell Lines and Culture Conditions. SKBR3 breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and were routinely grown in Improved MEM (IMEM, Biosource International, Invitrogen SA, Barcelona, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. SKBR3 cells were used between passages 12 and 18. The cultures were screened periodically to detect possible contamination of *Mycoplasma*.

Chemicals. All chemicals were of analytical reagent grade and used as received. Methanol and *n*-hexane, reagents used for the extraction of the phenolic compounds from the olive oil samples, were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile from Lab-Scan (Dublin, Ireland), acetic acid from Fluka and Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and methanol were used for preparing mobile phase. Solvents were filtered using a solvent filtration apparatus model 58061 (Supelco, Bellefonte, PA). Double-deionized water with conductivity lower than 18.2 M Ω was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Standards of hydroxytyrosol (HYTY), tyrosol (TY), vanillin, luteolin (Lut), apigenin (Apig), *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, and quinic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and (+)-pinoresinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland). Oleuropein (Ole) was purchased from Extrasynthèse (Lyon, France). Stock solutions at concentration of 1000 mg/L for each phenol were first prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol and then serially diluted to working concentrations. MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

RRLC-MS Analysis. The development of a rapid resolution liquid chromatography (RRLC) coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) method to characterize the phenolic profile in EVOOs was performed in an Agilent 1200-RRLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) of the Series Rapid Resolution equipped with a vacuum degasser, autosampler, a binary pump, and a UV–vis detector. The chromatographic separation was carried out on a Zorbax Eclipse Plus C₁₈ analytical column (4.6 mm \times 150 mm, 1.8 μm particle size). The flow rate was 0.80 mL/min, and the temperature of the column was maintained at 25 °C. The mobile phases used were water with 0.25% acetic acid as eluent A and methanol as eluent B. The optimal chromatographic method consisted in the following multistep linear gradient: 0 min, 5% B; 7 min, 35% B; 12 min, 45% B; 17 min, 50% B; 22 min, 60% B; 25 min, 95% B, 27 min, 5% B, and finally a conditioning cycle of 5 min with the same conditions for the next analysis. The injection volume in the RRLC was 10 μL . The compounds separated were monitored in sequence first with DAD (240 and 280 nm) and then with a mass spectrometry detector.

MS was performed using the microTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) which was coupled to the RRLC system. At this stage, the use of a splitter was required to the coupling with the MS detector as the flow which arrived to the TOF detector had to be 0.2 mL/min in order to obtain reproducible results and stable spray. The TOF mass spectrometer was equipped with an ESI interface (model G1607A from Agilent Technologies, Palo Alto, CA) operating in negative ion mode. External mass spectrometer calibration was performed with sodium formate clusters (5 mM sodium hydroxide in water/2-propanol 1/1 (v/v), with 0.2% of formic) in quadratic + high precision calibration (HPC) regression mode. The calibration solution was injected at the beginning of the run, and all the spectra were calibrated prior to polyphenol identification. The optimum values of source parameters were: capillary voltage of +4 kV; drying gas temperature, 190 °C; drying gas flow, 9 L/min; nebulizing gas pressure, 2 bar, and end plate offset, –0.5 kV. The values of transfer parameters were: capillary exit, –120 V; skimmer 1, –40 V; hexapole 1, –23 V, RF hexapole, 50 Vpp, and skimmer 2, –22.5 V. The source and transfer parameters were get for a good sensitivity and reasonable resolution of the mass range for compounds of interest (50–1000 *m/z*) in order to improve ionization performance.

The accurate mass data for the molecular ions were processed using the software Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonik), which provided with a list of possible elemental formulas by using the Generate Molecular Formula Editor. The latter uses a CHNO algorithm providing standard functionalities such as minimum/maximum elemental range, electron configuration, and ring-plus double bonds equivalent, as well as a



sophisticated comparison of the theoretical with the measured isotopic pattern (Sigma-Value) for increased confidence in the suggested molecular formula. The widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions has been established at 5 ppm for most of the compounds.

Metabolic Status Assessment (MTT-Based Cell Viability Assays). SKBR3 breast cancer cells were seeded at a density of ~3000 cells/200 μ L per well in a 96-well plate. The next day, cells were treated with concentrations ranging from 0% to 0.1% (v/v) (i.e., 0%, 0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.05%, and 0.1% v/v) of the whole crude EVOO-PE dissolved in 1 mL of ethanol (100% stock solution). Ethanol dilutions were prepared immediately before starting each experiment by diluting 100% full strength EVOO-PE (i.e., 1 mL of the methanol extract was evaporated under vacuum to give the dried methanol extract; after a complete solvent removal, dried methanol extract was dissolved in 1 mL of 95% ethanol) in fresh culture medium. An appropriate amount of ethanol (v/v) was added to control cells. After 5 days of treatment (EVOO-PEs were not renewed during the entire period of culture treatment), cells were incubated with a solution of MTT at a concentration of 5 mg/mL for 3 h at 37 °C. The supernatants were then carefully aspirated, 100 μ L of DMSO were added to each well, and the plates were agitated to dissolve the crystal product. Absorbances were read at 570 nm using a multiwell plate reader (model Anthos Labtec 2010 1.7 reader). Cell viability effects upon exposure to EVOO-PE were analyzed as percentages of the absorbance obtained in untreated control cells. For each treatment, cell viability was evaluated as a percentage using the following equation: (A_{570} of treated sample/ A_{570} of untreated sample) \times 100. Cell sensitivity to crude EVOO-PE was expressed in terms of the concentration of PE (v/v) needed to decrease by 50% cell viability (IC_{50} value). Because the percentage of control absorbance was considered to be the surviving fraction of cells, the IC_{50} values were defined as the concentration of EVOO-PE that produced 50% reduction in control absorbance.

Statistical Analysis. Statistical data treatment of the EVOO phenolic and other polar compounds profiles was performed using SPSS (v. 15.0, Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL). Linear discriminant analysis (LDA) of the phenolic profiles was used to classify five different varieties of EVOO under study. LDA, a supervised classificatory technique, is widely recognized as an excellent tool to obtain vectors showing the maximal resolution between a set of previously defined categories. In LDA, vectors minimizing the Wilks' lambda, λ_w , were obtained. This parameter is calculated as the sum of squares of the distances between points belonging to the same category divided by the total sum of squares. Using the normalized variables, an LDA model capable of classifying the EVOO samples according to their respective olive variety was constructed. From the samples (described above), a matrix containing 51 injections was constructed and used for evaluation purposes. To construct the LDA training matrix, only the means of the replicates of the samples were included (14 objects); in this way, the internal dispersion of the categories was reduced, which was important to reduce the number of variables selected by the SPSS stepwise algorithm during model construction. A response column, containing the five categories corresponding to the five varieties of the EVOO, was added to both matrices. According to the SPSS stepwise algorithm, a predictor is selected when the reduction of λ_w produced after its inclusion in the model exceeds F_{in} , the entrance threshold of a test of comparison of variances or F -test. However, the entrance of a new predictor modifies the significance of those predictors which are already present in the model (described above). For this reason, after the inclusion of a new predictor, a rejection threshold, F_{out} , was used to decide if one of the other predictors should be removed from the model. The process terminates when there are no predictors entering or being eliminated from the model. The probability values of F_{in} and F_{out} , 0.05 and 0.10, respectively, were adopted.

As far as the cell viability data are concerned, statistical data treatment of the Two-group comparisons were performed by the Student's t test for paired and unpaired values. Comparisons of means of ≥ 3 groups were performed by ANOVA and the existence of individual differences, in case of significant F values at ANOVA, tested by Scheffé's multiple contrasts.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of RRLC System and Quality Parameters. The mobile phases, gradient, injection volume, flow rate, and column

temperature were optimized. First, different mobile phases A and B were tested in order to estimate the best organic ones. Regular methods to analyze the olive oil phenolic fraction by HPLC used mainly gradient elution with acetonitrile–aqueous acetic acid (7). Elution with methanol–aqueous acetic acid has also been used (23). An initial gradient time of 50 min was used. The flow-rate was 0.5 mL/min. First, the optimum solvent to be used as eluent B was selected among acetonitrile, methanol, and different mixtures of acetonitrile–methanol (70:30, 50:50, and 30:70; v/v), maintaining the composition of the eluent A (water with 0.5% acetic acid) based on the chromatographic conditions reported in a previous study by HPLC (24). The change of eluents affects the retention times, but also the selectivity. The differences in the selectivity are based on the different properties of solvation of acetonitrile and methanol that are especially remarkable with the polar compounds. The results obtained are shown on the **Figure 1a**. RRLC analysis showed great differences on the separation of the studied compounds using different mobile phases B. The separation of individual phenols, mainly related with secoiridoid derivatives, was better when using methanol than acetonitrile or mixtures of acetonitrile/methanol as eluent B. Aglycones of oleuropein (Ol Agl), ligstroside (Lig Agl), and their decarboxymethyl forms (DOA and D-Lig Agl), the most important and abundant olive oil phenolic compounds, showed the best chromatographic resolution with methanol 100%. The importance of the separation of this fraction resides in their well-known pharmaceutical effects such as anticarcinogenic and antiatherogenic. Consequently, when using methanol as eluent B, these compounds were best separated, with a good resolution of the peaks for a better subsequent quantification. With the tested mobile phase B, the next step was to select the optimum solvent to be use as mobile phase A. Milli-Q water with different percentage of acetic acid was evaluated as mobile phase A. Their concentration was varied from 0.1 to 1%. Finally, the best separation, in terms of efficiency and resolution, was obtained with water with 0.25% acetic acid, and MeOH as mobile phases A and B, respectively.

Five different experimental gradients were tested, and among all of them, the best results were obtained with the multistep linear gradient detailed in the Materials and Methods. A good chromatographic resolution was obtained. To increase the resolution among the peaks, the injected volume was reduced from 20 to 10 μ L.

In the next step, the effects of flow rate and temperature on resolution were also evaluated. RRLC system offers a unique opportunity to reduce analysis time dramatically by increasing flow rate and temperature. When the flow rate increases, the back pressure of the system rises until reaching the maximum value (80–90% of the pressure accepted by the chromatograph). However, if the temperature of the column also increases the viscosity of the mobile phase decreases and the system back pressure is reduced. Choosing a suitable temperature, the flow could be increased up to the maximum value. The flow rate from 0.5 to 1.5 mL/min (0.5, 0.8, 1, and 1.5 mL/min) was evaluated, and the temperature of the column was varied between 25 and 40 °C in 5 °C intervals. With a flow rate higher than 1.5 mL/min, in some percentages of methanol in the mobile phase, the pressure was higher than 600 bar, maximum value of the pressure accepted by the chromatograph. Finally, the optimum conditions were a flow rate 0.80 mL/min and the temperature of the column was maintained at 25 °C. The maximum pressure reached during this analysis was approximately 500 bar. At this stage, the use of a splitter 1:4 was required for obtaining reproducible results and stable spray. The detection was carried out UV at two wavelengths characteristic of the phenolic compounds of interest (280 and 240 nm) and mass spectrometry (TOF). A good



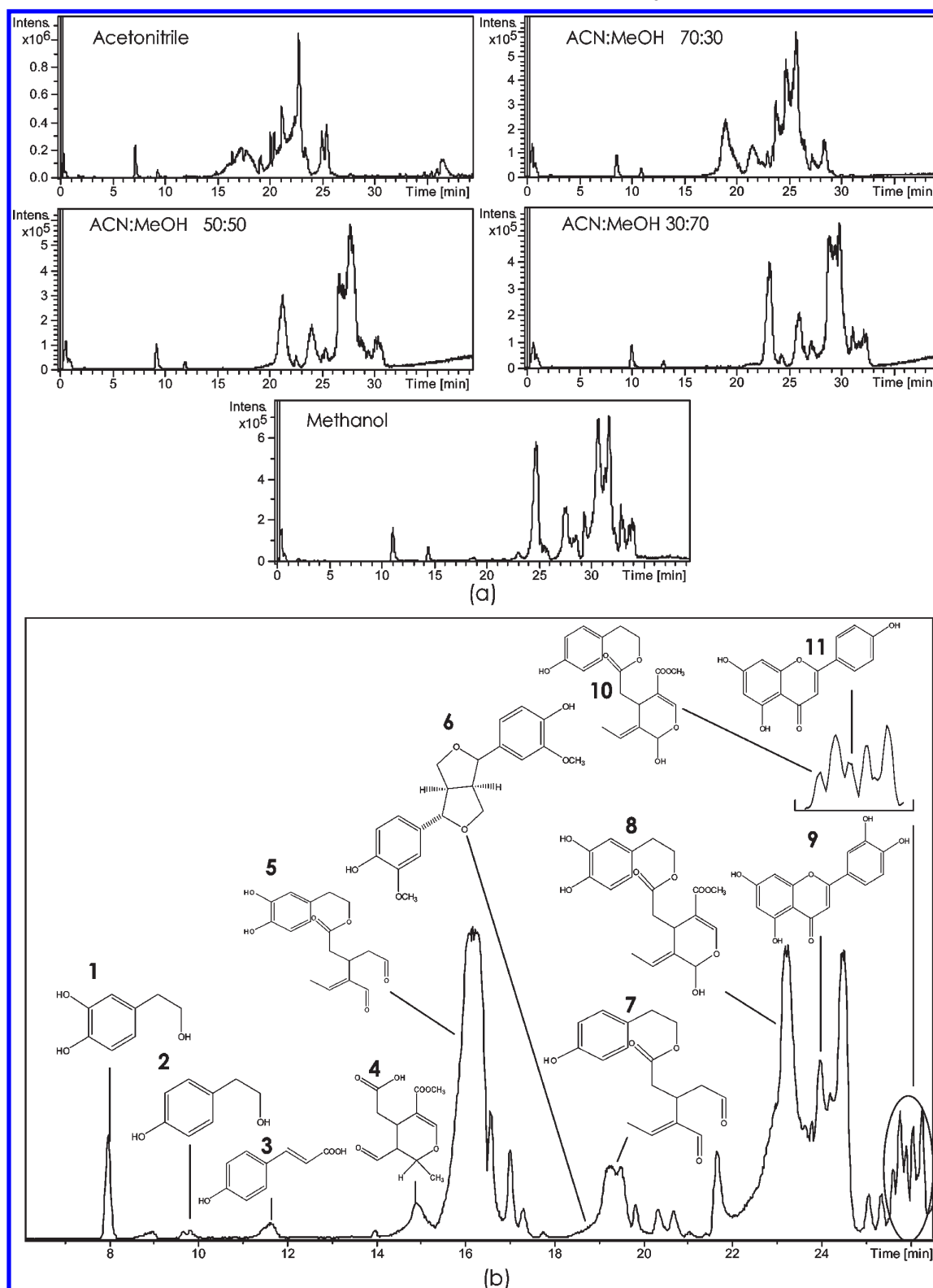


Figure 1. (a) Comparison of the base peak chromatograms (BPC) chromatograms obtained by RRLC-ESI-TOF using different mobile phase B. The mobile phase A was water with 0.5% acetic acid. (b) BPC base peak of the Picual EVOO-PE obtained by the proposed method. The main phenolic compounds are: 1, HYTY; 2, TY; 3, vanillin; 4, EA; 5, DOA; 6, Pin; 7, D-Lig Agl; 8, OI Agl; 9, Lut; 10, Lig Agl; 11, Apig.

resolution of phenolic compounds was achieved in less than 27 min. **Figure 1b** shows the chromatogram of the Picual EVOO-PE obtained by the proposed method.

The validation of the proposed method was carried out with the linearity, sensitivity, and precision parameters. **Table 1** shows the

following analytical parameters: relative standard deviation (RSD), limits of detection (LOD), and quantification (LOQ), calibration range, calibration curve equations, and regression coefficient (r^2).

The linearity range of the analytical method was established with standard solutions of phenolic and other polar compounds,

Table 1. Analytical Parameters of the Proposed Method

phenolic compds	RSD	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	calibration equations	r^2
HYTY	0.20	0.042	0.141	LOQ–50	$y = 10070155x - 156121.750$	0.9956
TY	3.64	0.278	0.928	LOQ–50	$y = 2120772.229x - 185414.271$	0.9924
Lut	0.55	0.012	0.041	LOQ–25	$y = 37539998.992x + 296205.770$	0.9963
Apig	1.82	0.005	0.019	LOQ–25	$y = 83626939.058x + 332983.761$	0.9959
Pin	0.70	0.087	0.353	LOQ–50	$y = 3812047.291x - 44338.807$	0.9987
Ole	1.89	0.099	0.174	LOQ–350	$y = 4169427.500x + 104290.881$	0.9921
vanillic acid	2.58	0.078	0.249	LOQ–25	$y = 2964238.718x + 289237.551$	0.9928
vanillin	2.16	0.338	1.084	LOQ–50	$y = 1236826.8571x + 20524.3905$	0.9912
<i>p</i> -coumaric acid	1.74	0.066	0.223	LOQ–25	$y = 9352746.464x + 133498.367$	0.9907
ferulic acid	0.65	0.064	0.213	LOQ–25	$y = 13563857.601x + 68785.193$	0.9962
Other Polar Compds						
quinic acid	1.16	0.055	0.179	LOQ–25	$y = 12771791.047x + 150060.98$	0.9918

Table 2. Main Phenolic Compounds Identified in a Representative Extract of Picual EVOO Variety by RRLC-ESI-TOF

compd	retention time (min)	<i>m/z</i> exptl	<i>m/z</i> calcd	molecular formula	error	σ
hydroxytyrosol	8	153.0556	153.0557	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$	1.0	0.0064
tyrosol	9.9	137.0617	137.0608	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$	1.4	0.0058
vanillin	11.7	151.0401	151.0401	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	0.3	0.0223
<i>p</i> -coumaric acid	13.5	163.0398	163.0401	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	1.8	0.0476
hydroxytyrosol acetate	14	195.0661	195.0663	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$	0.8	0.0120
elenolic acid	15	241.0714	241.0718	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_6$	1.7	0.0047
hydroxy elenolic acid	15.4	257.0667	257.0667	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_7$	-0.5	0.0165
decarboxymethyl oleuropein aglycon	16.3	319.1193	319.1187	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$	-1.0	0.0083
hydroxy D-oleuropein aglycon	16.6	335.1142	335.1136	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_7$	-1.8	0.0134
syringaresinol	18.2	417.1562	417.1555	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$	-1.7	0.0250
pinoresinol	18.8	357.1349	357.1344	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$	-1.4	0.0050
decarboxymethyl ligstroside aglycon	19.2	303.1236	303.1229	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5$	0.7	0.0120
hydroxy D-ligstroside aglycon	19.9	319.1190	319.1187	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$	-1.0	0.0151
10-hydroxy oleuropein aglycon	23	393.1200	393.1191	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_9$	-2.3	0.0050
oleuropein aglycon	23.2	377.1247	377.1242	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_8$	-1.2	0.0034
luteolin	23.7	285.0397	285.0405	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	2.5	0.0068
methyl D-oleuropein aglycon	25.4	333.1346	333.1344	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$	-3.6	0.0135
ligstroside aglycon	25.6	361.1310	361.1293	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_7$	3.1	0.0145
apigenin	25.8	269.0448	269.0451	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	2.9	0.0059
methyl oleuropein aglycon	26.2	391.1412	391.1398	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_8$	-3.4	0.0069

such as HYTY, TY, Lut, Apig, Ole, Pin, vanillic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, vanillin, and quinic acid. Calibration curves were prepared daily. All of them were obtained by plotting the standard concentration as a function of the peak area obtained from RRLC-ESI-TOF analyses. Calibration curves were calculated by using 10 points at different concentrations, estimated from the amounts of the analytes in samples, and were linear over the range of study (see **Table 1**). Furthermore, each different concentration was injected three times. The determination coefficients (r^2) were higher than 0.990 for all analytes.

The sensitivity of the method was studied by defining the LODs and LOQs for individual compounds in standard solutions. The LODs and LOQs were calculated using the signal-to noise ratio criterion of 3 and 10, respectively.

Repeatability of the method described was measured as relative standard deviation (RSD %) in terms of concentration. A methanolic extract was injected ($n = 6$) on the same day (intraday precision) and 3 times on the 2 consecutive days (interday precision, $n = 12$). Intraday repeatability of the developed method (for all the analytes) was from 0.07 to 3.92%, whereas the interday repeatability was from 0.10 to 3.23%, for MS detector.

Identification and Quantification of Phenolic and Other Polar Compounds in EVOOs. The identification of phenolic compounds was carried out by comparing both retention times and MS spectral data from olive oil samples and standards detailed in the

Materials and Methods. Remaining compounds, for which no commercial standards were available, were identified by the interpretation of their mass spectral provided by the TOF-MS and the information previously reported (most of these compounds have been previously described in the olive oil samples). The analysis of the true isotopic pattern by ESI-TOF-MS in combination with excellent mass resolution and mass accuracy is the perfect choice for molecular formula determination using the Generate Molecular Formula Editor. To identify the phenolic compounds, a low tolerance of 0.05 and a low error (≤ 5 ppm) were chosen. The position of the molecular formula in the table of possible compounds was also considered. Most of the identified compounds are in position number 1. **Table 2** summarizes the main compounds identified in the Picual variety, including the information generated by TOF analyzer: retention time, experimental and calculated *m/z*, molecular formula, and error and σ value. Finally, 20 compounds from different families (simple phenols, flavonoids, lignans, and secoiridoids) were identified. To identify and quantify the phenolic compounds in EVOOs and their PEs used for MTT-based cell viability assays, the analysis of five different EVOO varieties (Hojiblanca, Picual, Cornezuelo, Manzanilla, and Arbequina) was carried out. **Figure 2** shows the resulting chromatograms of representative samples from the five varieties. Additional phenolic compounds were found in other olive oil extracts from different varieties such as vanillic acid (Hojiblanca, Arbequina, and Manzanilla varieties), ferulic acid



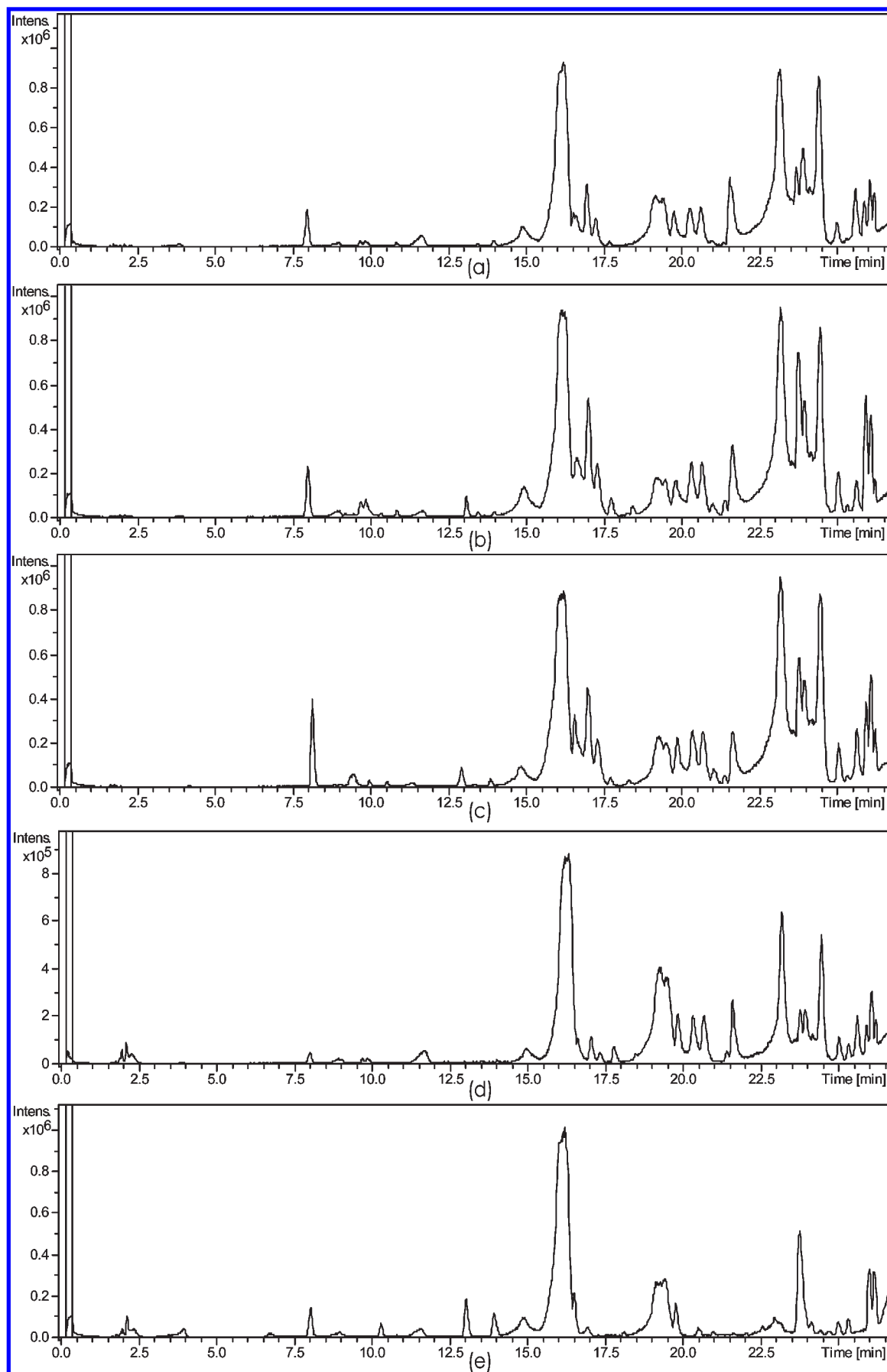


Figure 2. BPC of representative samples of the five EVOO varieties analyzed in this study by RRLC-ESI-TOF: (a) Picual; (b) EVOO Hojiblanca; (c) EVOO Manzanilla; (d) EVOO Cornezuelo; (e) EVOO Arbequina.

Table 3. Quantitative Results Expressed in mg Analyte/kg of EVOO; Value = $X \pm SD$

(a)							
Picual							
	EVOO 2 Málaga	EVOO 4 Jaén	EVOO 5 Granada	EVOO 6 Granada	EVOO 7 Córdoba	EVOO 10 Jaén	EVOO 11 Jaén
hydroxytyrosol	6.417 ± 0.073	11.314 ± 0.459	10.402 ± 0.039	10.122 ± 0.076	9.625 ± 0.208	4.903 ± 0.045	10.669 ± 0.083
tyrosol	4.712 ± 0.039	6.039 ± 0.059	4.991 ± 0.033	4.658 ± 0.011	4.162 ± 0.109	4.362 ± 0.075	4.487 ± 0.033
hydroxytyrosol acetate	0.699 ± 0.002	0.744 ± 0.008	0.683 ± 0.004	0.608 ± 0.004	0.680 ± 0.003	0.682 ± 0.001	0.692 ± 0.002
elenolic acid	7.157 ± 0.066	11.789 ± 0.084	11.940 ± 0.301	8.120 ± 0.039	13.123 ± 0.125	8.793 ± 0.353	9.086 ± 0.138
hydroxy elenolic acid	0.327 ± 0.004	0.233 ± 0.019	NQ ^b	1.181 ± 0.006	0.097 ± 0.002	NQ ^b	1.654 ± 0.037
oleuropein aglycon	146.005 ± 2.361	140.035 ± 1.254	143.330 ± 0.609	133.890 ± 0.124	157.917 ± 1.257	140.140 ± 4.141	125.778 ± 0.242
decarboxymethyl oleuropein aglycon	130.442 ± 1.987	133.794 ± 0.558	179.406 ± 2.328	185.778 ± 1.395	314.429 ± 2.189	212.442 ± 4.287	150.015 ± 0.188
hydroxy D-oleuropein aglycon	7.329 ± 0.133	10.156 ± 0.289	15.120 ± 0.140	30.795 ± 0.373	32.373 ± 1.584	11.225 ± 0.427	30.408 ± 0.315
10-hydroxy oleuropein aglycon	34.514 ± 0.228	61.794 ± 1.841	50.801 ± 0.477	59.782 ± 1.174	39.479 ± 0.806	16.731 ± 0.535	47.971 ± 1.669
methyl oleuropein aglycon	13.987 ± 0.381	27.316 ± 0.122	41.490 ± 0.404	10.417 ± 0.245	24.349 ± 0.516	3.022 ± 0.018	3.409 ± 0.110
methyl D-oleuropein aglycon	9.425 ± 0.304	11.929 ± 0.095	10.882 ± 0.107	14.147 ± 0.159	2.903 ± 0.079	2.523 ± 0.016	9.550 ± 0.184
ligstroside aglycon	30.603 ± 0.601	28.926 ± 0.461	25.646 ± 0.139	19.697 ± 0.301	16.261 ± 0.709	21.158 ± 0.156	20.931 ± 0.678
decarboxymethyl ligstroside aglycon	50.245 ± 0.051	51.788 ± 1.067	69.013 ± 0.184	49.606 ± 0.438	53.652 ± 0.354	55.432 ± 0.401	36.576 ± 0.280
hydroxy D-ligstroside aglycon	10.401 ± 0.107	16.172 ± 0.051	19.711 ± 0.055	19.936 ± 0.188	8.087 ± 0.353	6.306 ± 0.141	15.832 ± 0.557
pinoreosinol	1.485 ± 0.003	1.810 ± 0.005	1.643 ± 0.023	1.550 ± 0.005	0.815 ± 0.032	1.907 ± 0.014	1.737 ± 0.006
hydroxy pinoreosinol	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
acetoxypinoreosinol	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
syringaresinol	0.870 ± 0.021	0.814 ± 0.011	0.807 ± 0.012	0.724 ± 0.012	0.772 ± 0.029	0.738 ± 0.007	0.797 ± 0.009
luteolin	1.531 ± 0.004	2.011 ± 0.034	2.728 ± 0.067	3.165 ± 0.025	4.041 ± 0.065	4.005 ± 0.120	4.071 ± 0.094
apigenin	0.271 ± 0.004	0.313 ± 0.001	0.588 ± 0.011	0.431 ± 0.021	0.811 ± 0.040	0.562 ± 0.014	0.728 ± 0.006
total phenolic contents	456.412 ± 3.838	516.977 ± 4.484	589.189 ± 3.141	554.606 ± 1.389	683.579 ± 4.169	494.933 ± 6.115	474.392 ± 3.897
Other Polar Compounds							
quinic acid	ND ^a	1.238 ± 0.054	1.121 ± 0.004	0.872 ± 0.018	0.356 ± 0.012	ND ^a	ND ^a
(b)							
Hojiblanca							
Manzanilla							
Comezuelo							
Arbequina							
	EVOO 1 Málaga	EVOO 9 Sevilla	EVOO 8 Sevilla	EVOO 3 Granada	EVOO 12 Reus	EVOO 13 Sevilla	EVOO 14 Sevilla
hydroxytyrosol	5.921 ± 0.310	5.868 ± 0.053	9.818 ± 0.427	1.367 ± 0.029	1.747 ± 0.038	2.621 ± 0.096	4.056 ± 0.072
tyrosol	4.238 ± 0.002	4.687 ± 0.138	5.452 ± 0.075	4.049 ± 0.147	3.298 ± 0.009	3.542 ± 0.006	3.594 ± 0.029
hydroxytyrosol acetate	0.687 ± 0.002	0.678 ± 0.001	0.799 ± 0.003	0.585 ± 0.002	1.360 ± 0.076	2.282 ± 0.074	3.039 ± 0.098
elenolic acid	14.942 ± 0.093	18.632 ± 0.192	12.084 ± 0.179	4.932 ± 0.092	4.522 ± 0.154	6.492 ± 0.269	8.697 ± 0.074
hydroxy elenolic acid	0.161 ± 0.003	NQ ^b	1.149 ± 0.018	ND ^a	ND ^a	0.511 ± 0.012	ND ^a
oleuropein aglycon	99.959 ± 0.730	146.695 ± 0.519	143.006 ± 1.980	75.507 ± 1.727	2.347 ± 0.061	10.148 ± 0.234	17.807 ± 0.103
decarboxymethyl oleuropein aglycon	145.746 ± 1.711	217.683 ± 1.870	229.706 ± 7.558	199.324 ± 0.864	93.423 ± 1.203	183.907 ± 1.865	238.406 ± 3.321
hydroxy D-oleuropein aglycon	10.961 ± 0.140	7.850 ± 0.243	23.090 ± 0.309	6.316 ± 0.011	17.103 ± 1.053	22.085 ± 0.433	12.679 ± 0.226
10-hydroxy oleuropein aglycon	17.970 ± 0.264	5.450 ± 0.077	17.467 ± 0.336	2.093 ± 0.090	0.457 ± 0.016	0.197 ± 0.005	NQ ^b
methyl oleuropein aglycon	7.401 ± 0.018	0.474 ± 0.015	1.035 ± 0.028	1.835 ± 0.022	ND ^a	ND ^a	ND ^a
methyl D-oleuropein aglycon	3.488 ± 0.105	0.018 ± 0.0001	2.819 ± 0.002	0.559 ± 0.007	ND ^a	ND ^a	ND ^a
ligstroside aglycon	10.989 ± 0.393	12.780 ± 0.300	22.370 ± 0.135	13.695 ± 0.219	NQ ^b	1.146 ± 0.016	1.294 ± 0.032
decarboxymethyl ligstroside aglycon	29.489 ± 0.676	32.986 ± 0.658	51.999 ± 1.843	102.139 ± 3.780	14.381 ± 0.495	54.774 ± 2.570	62.271 ± 1.179
hydroxy D-ligstroside aglycon	6.582 ± 0.082	1.182 ± 0.015	7.534 ± 0.051	11.233 ± 0.562	10.338 ± 0.265	17.713 ± 0.691	10.939 ± 0.343
pinoreosinol	1.008 ± 0.002	0.867 ± 0.006	1.303 ± 0.019	0.869 ± 0.027	3.258 ± 0.023	2.634 ± 0.122	3.157 ± 0.019
hydroxy pinoreosinol	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1.160 ± 0.030	1.436 ± 0.015	1.551 ± 0.040
acetoxypinoreosinol	2.700 ± 0.036	3.039 ± 0.032	2.252 ± 0.009	ND ^a	17.227 ± 0.230	11.009 ± 0.741	12.050 ± 0.045
syringaresinol	0.796 ± 0.013	0.885 ± 0.004	1.173 ± 0.029	0.687 ± 0.002	1.650 ± 0.042	1.796 ± 0.013	2.259 ± 0.018
luteolin	2.746 ± 0.056	8.691 ± 0.048	6.664 ± 0.247	1.996 ± 0.007	4.852 ± 0.061	4.697 ± 0.065	5.907 ± 0.086
apigenin	0.955 ± 0.033	1.757 ± 0.015	1.079 ± 0.013	0.362 ± 0.002	0.909 ± 0.006	0.881 ± 0.010	1.064 ± 0.027
total phenolic contents	366.741 ± 1.654	473.242 ± 6.346	537.475 ± 6.027	427.549 ± 6.155	178.013 ± 1.411	327.269 ± 9.104	388.774 ± 4.584
Other Polar Compounds							
quinic acid	NQ ^b	ND ^a	NQ ^b	1.969 ± 0.032	NQ ^b	ND ^a	2.361 ± 0.044

^a Not detected. ^b Not quantified. Compound detected, but their concentration is between the detection and quantification limits.

(Manzanilla variety), acetoxypinoreosinol (Hojiblanca, Manzanilla, and Arbequina varieties), and hydroxypinoreosinol (Arbequina variety). Regarding the other polar compounds, quinic acid was also identified in the extracts deriving from all the analyzed varieties.

Eleven standard calibration graphs for the quantification of the principal compounds found in the samples were prepared using the 11 commercial standards detailed in Materials and Methods. All calibration curves showed good linearity between different



concentrations depending on the analytes studied (Table 1). The quantification was carried by RRLC-ESI-TOF.

The phenolic and other polar compound concentrations were determined using the area of each individual compound (three replicates) and by interpolation in the corresponding calibration curve. Phenolic compounds hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin, apigenin, and (+)-pinosresinol such as quinic acid (other polar compound) were quantified by the calibration curves obtained from their respective commercial standards. The other phenolic compounds, which had no commercial standards, were tentatively quantified on the basis of other compounds having similar structures. Hydroxytyrosol acetate was quantified using a HYTE calibration curve, hydroxypinosresinol, (+)-1-acetoxypinosresinol, and syringaresinol using a (+)-pinosresinol calibration curve. Regarding secoiridoid group, all these compounds were quantified with oleuropein standard. It has to be taken into account that the response of the standards can be different from the one of the analytes present in the oil samples, and consequently the quantification of these compounds is only an estimation of their actual concentrations. Table 3 summarizes the quantitative results obtained by RRLC-MS. Fourteen EVOOs from different varieties were quantified: two Hojiblanca varieties (EVOOs 1 and 9), seven Picual varieties (EVOOs 2, 4, 5, 6, 7, 10 and 11), one Cornezuelo (EVOO 3), one Manzanilla (EVOO 8), and three Arbequina (EVOOs 12, 13, and 14). The main components of the phenolic fraction were the derivatives of hydroxytyrosol (3, 4-DHEPA) and tyrosol (*p*-HPEA) linked to the aldehydic and dialdehydic forms of elenolic acid: oleuropein aglycon (3,4-DHEPA-EA), ligstroside aglycon (*p*-HPEA-EA) and their hydroxylated, decarboxymethylated and methylated forms. Among the phenolic compounds, two secoiridoids, i.e. oleuropein aglycon and its decarboxymethyl derivative, were the most abundant compounds. In all varieties, the range of concentrations was from 76 to 158 mg/kg and from 93 to 314 mg/kg for oleuropein aglycon and decarboxymethyl oleuropein aglycon, respectively. Concerning oleuropein aglycon, in the Arbequina variety, the amount was considerably less (from 2 to 18 mg/kg). Similarly, the quantity of ligstroside aglycon in EVOO 13 and 14 was 10 times lower than in Hojiblanca and Cornezuelo and 20 times lower than in Picual and Manzanilla varieties. Regarding EVOO 12, this compound was not quantified because their concentration was between the detection and quantification limits.

The content of the decarboxymethyl ligstroside aglycon in the Cornezuelo variety was significantly higher than in the other ones.

On the other hand, significant amounts of lignans (+)-pinosresinol, (+)-1-acetoxypinosresinol, and hydroxypinosresinol were detected. Except (+)-pinosresinol, which was found in all oils, hydroxypinosresinol was found only in the Arbequina variety and acetoxypinosresinol only in the three varieties: Arbequina, Hojiblanca, and Manzanilla. The concentrations of three compounds in Arbequina variety were higher than in the other four varieties. The olive oils from this variety had also the highest amounts of syringaresinol: twice than that found in Manzanilla and three times more than in Picual, Hojiblanca, and Cornezuelo.

As far as the amounts of flavones and phenyl alcohols are concerned, luteolin and apigenin were more abundant in Hojiblanca, Arbequina, and Manzanilla, while the content of phenyl alcohols such as hydroxytyrosol and tyrosol were the highest in Picual and Manzanilla olive oils. Regarding phenolic acids, all the EVOOs analyzed contained low quantity of phenyl acids. Furthermore, vanillin, ferulic acid, vanillic acid, and *p*-coumaric acid were not quantified because their concentrations in different olive oils were between their detection and quantification limits (detailed previously). Total phenolic content from

Table 4. Predictors Selected and Their Corresponding Standardized Coefficients of the LDA Model Constructed to Predict the Variety of the EVOO Samples

predictors	f1	f2	f3	f4
hydroxytyrosol	1.86	0.74	-0.92	-6.23
tyrosol	-1.75	3.65	1.20	-3.18
hydroxy elenolic acid	3.56	0.80	-3.01	2.46
decarboxymethyl ligstroside aglycon	2.30	1.22	-4.46	0.12
pinosresinol	3.07	3.05	2.45	0.76
10-hydroxy oleuropein aglycon	-1.34	0.01	-7.52	10.19
hydroxy D-ligstroside aglycon	-3.83	-0.70	5.41	1.26
elenolic acid	2.91	-8.03	4.86	1.81
luteolin	-4.49	-0.70	-5.62	0.79
hydroxy D-oleuropein aglycon	0.14	6.43	6.43	-4.30
methyl oleuropein aglycon	-0.21	3.93	-2.60	0.23
methyl D-oleuropein aglycon	2.56	-4.63	2.81	-4.68
syringaresinol	-3.62	1.79	2.38	0.48
oleuropein aglycon	4.12	2.94	3.83	0.77

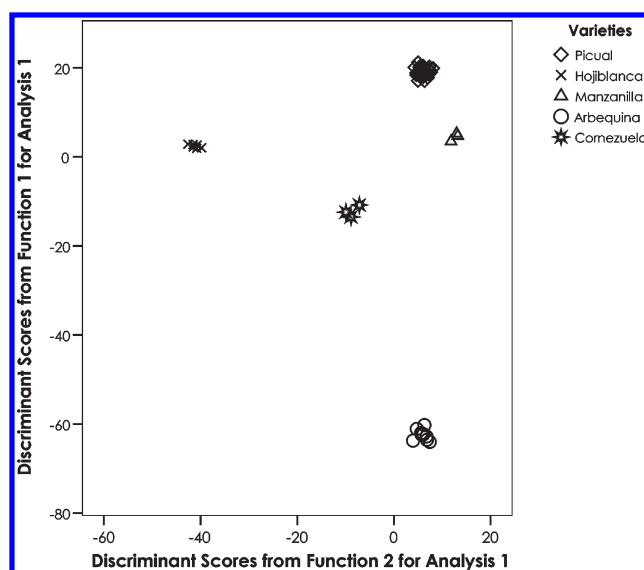


Figure 3. Score plot on the plane of the two LDA discriminant functions obtained to predict the olive varieties of EVOOs.

different EVOO varieties was tentatively calculated as sum of the individual phenolic compound concentrations.

Classification of EVOOs by Phenolic Profile and other Polar Compounds. Using the normalized variables, an LDA model capable of classifying the EVOO samples according to their olive variety was constructed. When the LDA model was carried out, an excellent resolution between all the category pairs was achieved ($\lambda_w < 0.002$). The variables selected by the SPSS stepwise algorithm, and the corresponding standardized coefficients of this model, showing the predictors with large discriminant capabilities, are given in Table 4. For this model, and using leave-one-out validation, all the points of the training set were correctly classified (100%). The corresponding evaluation set, containing the 51 original data points, was then used to check the prediction capability of the model. Using a 95% probability, all the objects were correctly assigned. Figure 3 shows the score plot on the plane of the two LDA discriminant functions obtained to predict the olive varieties of EVOOs.

Inhibitory Effects of Crude EVOO-PEs on Breast Cancer Cell Viability. To evaluate breast cancer cell sensitivity to crude EVOO-PE naturally bearing different amounts of complex polyphenols, SKBR3 cells were cultured in the absence or presence of a series of ethanolic dilutions in fresh culture medium detailed in

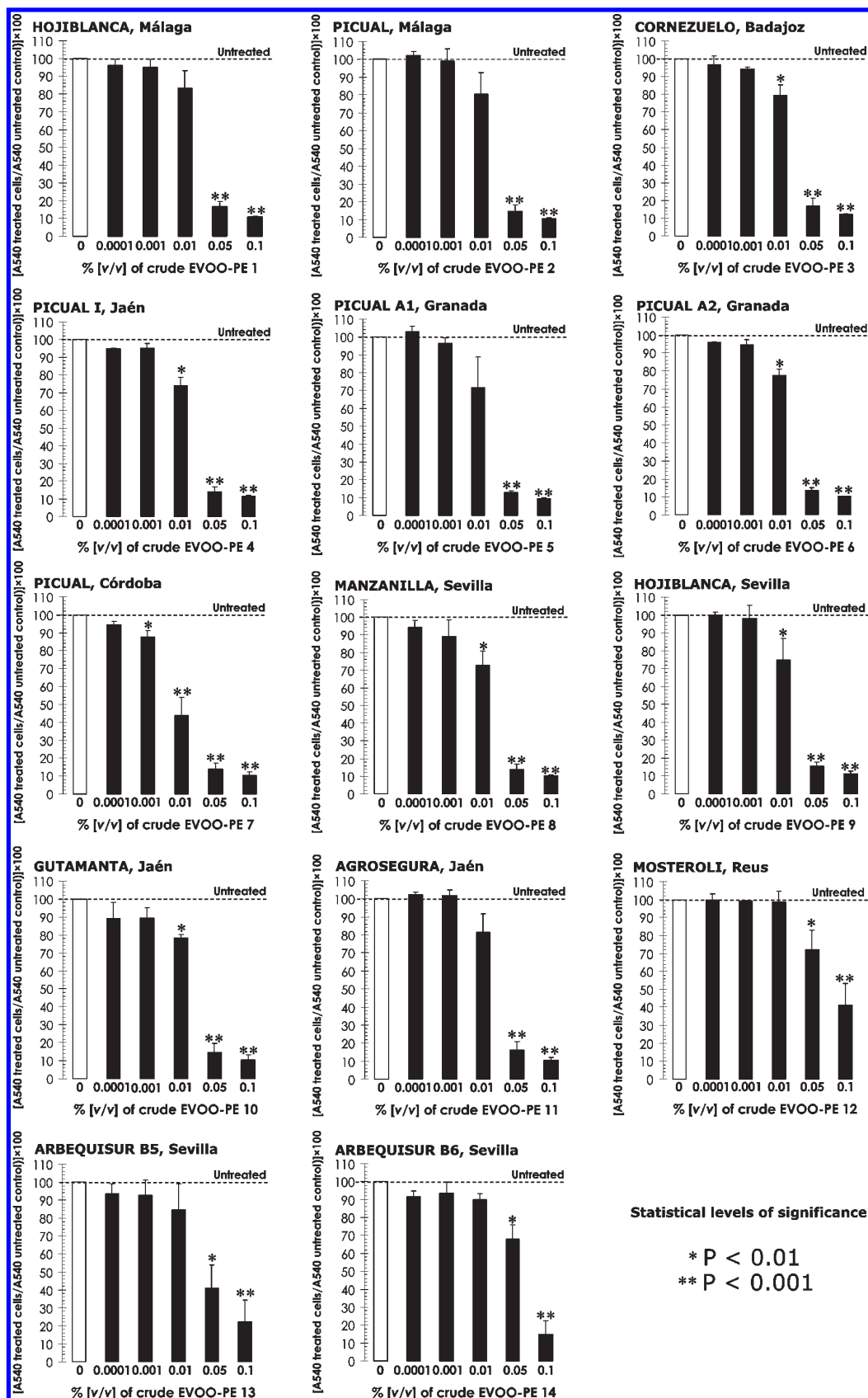


Figure 4. Effects of EVOO-PE on cell viability in HER2-overexpressing SKBR3 breast cancer cells. The metabolic status of SKBR3 cells treated with graded concentrations of individual EVOO-PE was evaluated using a MTT-based cell viability assays and constructing dose—response graphs as $[A_{540} \text{ treated cells}/A_{540} \text{ untreated control}] \times 100$. Results are means (columns) and 95% confidence intervals (bars) of three independent experiments made in triplicate.

Materials and Methods. The highest solvent concentration in culture media (0.1% v/v ethanol) had no significant effects on the

metabolic status of SKBR3 cells (data not shown). SKBR3 cells represent a widely used tumor cell in vitro model characterized by



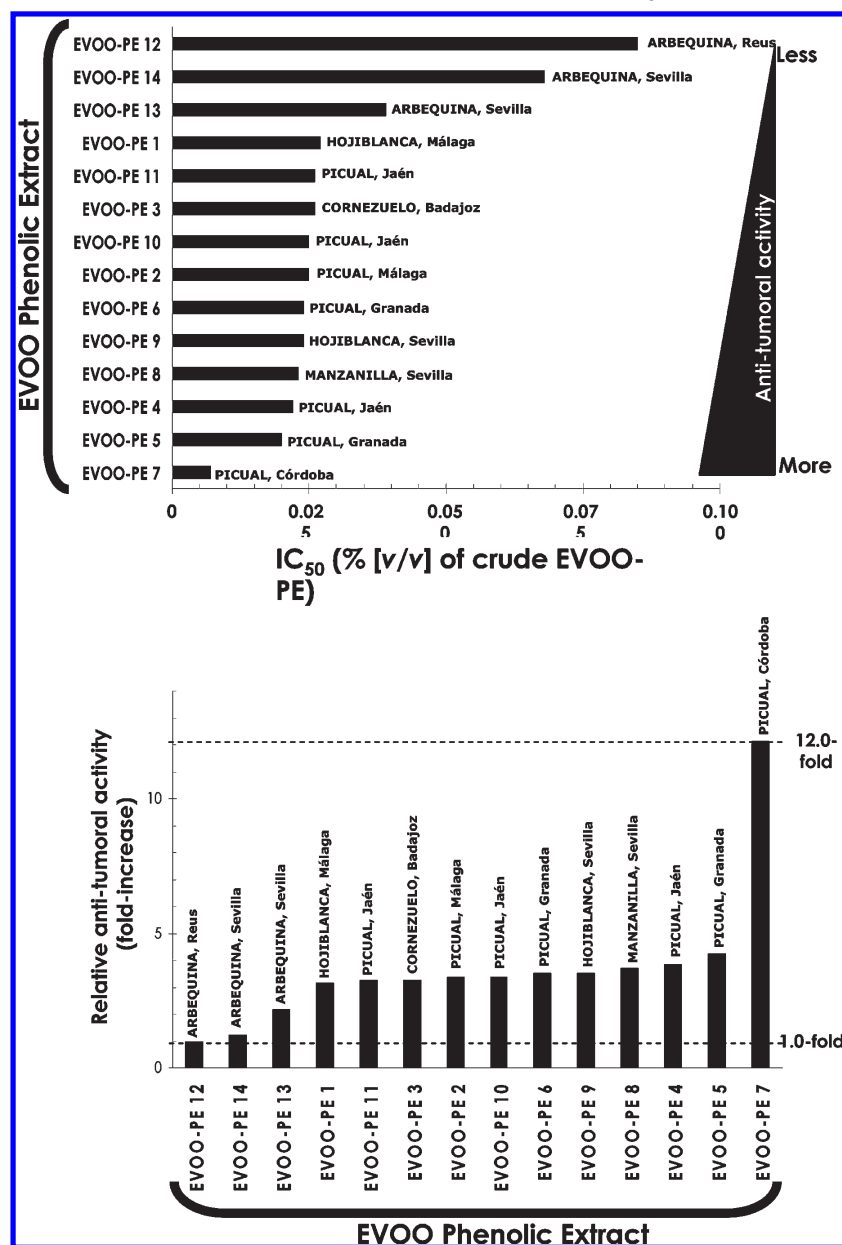


Figure 5. Differential antitumoral efficacy of EVOO-PE against SKBR3 cells. (top) Sensitivity of SKBR3 cells to individual EVOO-PE was expressed in terms of the concentration of PE (% [v/v]) required to decrease by 50% (IC_{50}) cell viability. Because the percentage of control absorbance in MTT-based cell viability assays (Figure 4) was considered to be the surviving fraction of cells, the EVOO-PE IC_{50} values were defined as the concentration of PE that produced 50% reduction in control absorbance (by interpolation upon construction of dose–response curves). (bottom) Comparative efficacy of EVOO-PE in SKBR3 cells was carried out by arbitrarily normalizing EVOO-PE IC_{50} values as fold-increases versus less-active EVOO-PE (= 1.0-fold).

exhibiting natural *HER2* oncogene amplification, *HER2* oncoprotein overexpression, and *HER2*-dependency for cell proliferation and survival. After 5 days of treatment, SKBR3 cell numbers were measured using a tetrazolium salt-based (MTT) protocol. MTT-based cell viability assays revealed that all the crude EVOO-PE negatively affected metabolic status of SKBR3 cells in a concentration-dependent manner (Figure 4). However, we noted remarkable differences in the ability of individual EVOO-PEs to elicit cytotoxic responses in SKBR3 cells. Thus, concentrations as high as ~0.1% v/v were needed to significantly decrease cell viability when SKBR3 cells were cultured in the presence of the PE obtained from the monovariety EVOO 12. Conversely, concentrations lower than 0.01% v/v significantly decreased cell viability when SKBR3 cells were exposed to graded volumes of the PE obtained from the monovariety EVOO 7.

To accurately evaluate quantitative differences in the SKBR3 breast cancer cytotoxic activities among EVOO-PE, IC_{50} values (i.e., the concentration of each EVOO-PE needed to decrease cell viability by 50% relative to untreated control cells) were calculated by interpolation upon construction of dose–response curves. We obtained a wide series of IC_{50} values ranging from 0.007% v/v (EVOO-PE 7) to 0.085% v/v (EVOO-PE 12) (Figure 5, top). Upon this approach, crude EVOO-PE exhibited the following cytotoxic potencies: EVOO-PE 7 > EVOO-PE 5 > EVOO-PE 4 > EVOO 8-PE > EVOO-PE 9 > EVOO-PE 6 > EVOO-PE 2 > EVOO-PE 10 > EVOO-PE 3 > EVOO-PE 11 > EVOO-PE 1 > EVOO-PE 13 > EVOO-PE 14 > EVOO-PE 12 (Figure 5, bottom). Importantly, anti-SKBR3 cytotoxic activity was found to be up to 12-times higher when using EVOO-PE 7 than in the presence of EVOO-PE 12.

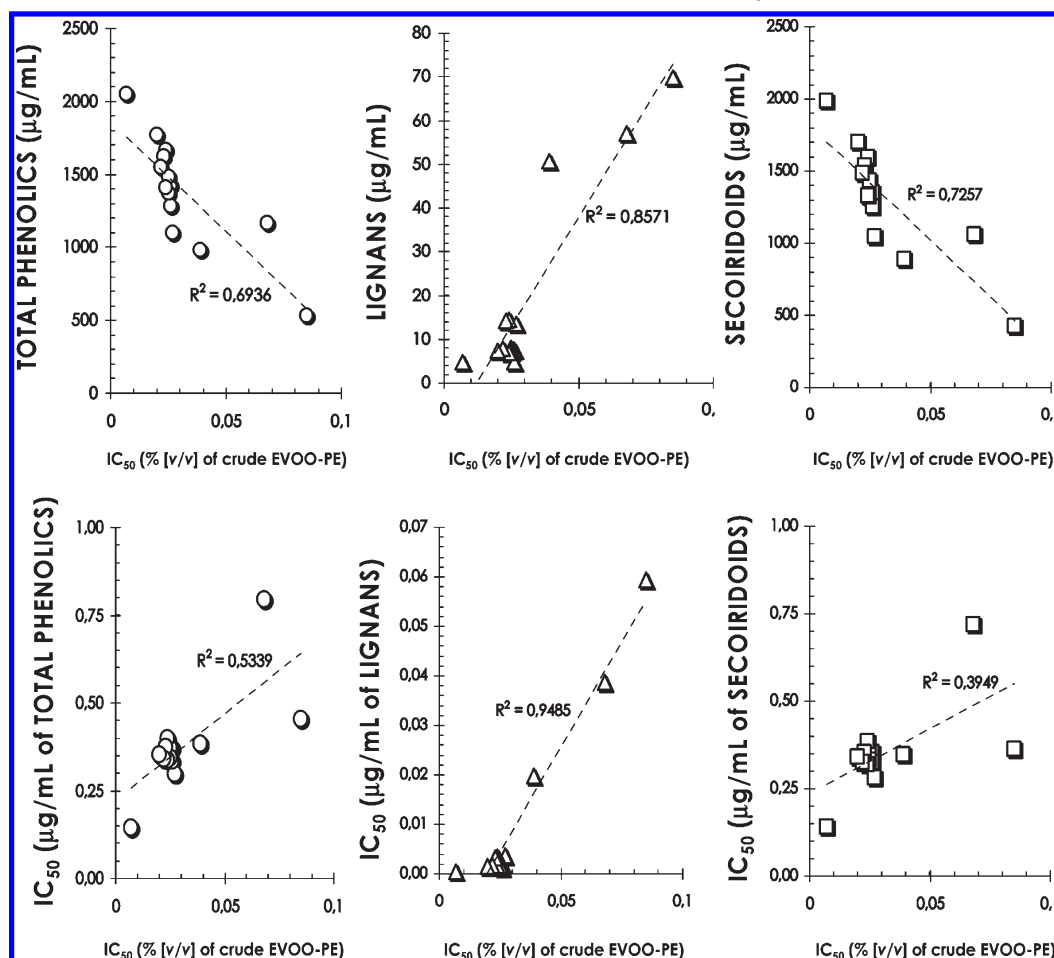


Figure 6. Correlations between phenolic composition and cytotoxic activity of crude EVOO-PE. Relationships between breast cancer cytotoxic activities (expressed as IC₅₀ values in % v/v) and either concentrations of total phenolics, lignans, and secoiridoids in 100% full strength EVOO-PEs (top panels) or actual content of total phenolics, lignans, and secoiridoids in corresponding IC₅₀ values in % v/v (bottom panels). Data are expressed on linear rather than log scales and adjusted linearly by plotting the regression line (R^2 values are shown).

grown in a hot environment (25). However, these oils are not appealing to most consumers due to their bitterness and pungency and they cannot be found on the market. In commercially available EVOOs, the concentration of phenolic compounds rather ranges between 100 mg/kg and 300 mg/kg (26). Because dietary EVOO intake has been reported to reach 50 g/day (27), an estimate of the daily intake of total phenols would range between 5 and 15 mg/day (up to 25 or 50 mg/day in EVOO-rich diets). Our stocks of crude phenolic extracts contained from ~500 to ~2000 µg/mL of total phenols. On the basis of these amounts, and because the IC₅₀ values (as surrogates of the antibreast cancer cytotoxic activities of individual EVOO-PE) ranged from 0.14 to 0.8 µg/mL of total phenolics, all the breast cancer cytotoxic concentrations of EVOO-PE used in our studies can be easily achievable with the actual daily intake of EVOO.

Although the total content of phenolics varied up to 4 times when comparing the less active (i.e., EVOO-PE12) with the most active one (i.e., EVOO-PE7), most of the EVOO-PE differed little both in the total content and in the relative abundance of the main EVOO phenolic families (i.e., phenolic alcohols, flavones, lignans, and secoiridoids), thus suggesting that small variations in these parameters significantly impact the cytotoxic potency of multicomponent EVOO-PE. To validate this notion, we initially plotted IC₅₀ values for each EVOO-PE as a function (on a linear–linear scale) of the total phenolic content (Figure 6, top

panels). Linear regression analyses suggested a positive correlation between the cytotoxic potencies of EVOO-PE and the total phenolic content in their stocks (i.e., the higher content in total phenolic the lower the amount of EVOO-PE to decrease breast cancer cell viability by 50%). Because secoiridoids did account for more than 90% of phenolics in all the EVOO-PE, an almost equivalent correlation was observed when linear regression analyses were performed to assess a correlation between the EVOO-PE IC₅₀ values and the concentration of secoiridoid in EVOO-PE stocks (i.e., lower IC₅₀ values [v/v] positively related to higher concentrations of secoiridoids). Of note, a strong negative correlation was found between the absolute concentration of lignans in EVOO-PE stocks and EVOO-PE IC₅₀ values. Indeed, the presence of lignans closely related with a loss of cytotoxic activity in EVOO-PE.

On the basis of the above-mentioned scenario, it could be reasonable to suggest that cytotoxic potencies of EVOO-PE, when calculated as % (v/v) of ethanolic EVOO-PE stocks, merely reflect a greater concentration of active polyphenols (i.e., secoiridoids) in any given % v/v experimental dilution rather than the occurrence of absence/presence of antagonistic/synergistic interactions between individual phenolic compounds in a given % v/v experimental dilution. To validate this notion, we converted IC₅₀ values (in % v/v) into actual amounts of phenolics (in µg/mL) to assess a linear relationship between the two variables (Figure 6, bottom panels). We found a very strong positive correlation between the IC₅₀ values in % v/v and their equivalents in µg/mL

of lignans. Thus, low IC₅₀ values, which did correspond to highly active EVOO-PE, contained low to null amounts of lignans, whereas high IC₅₀ values, which did correspond to poorly active EVOO-PE, were significantly enriched in their lignan contents. Remarkably, we failed to observe any significant correlation between IC₅₀ values and their equivalent $\mu\text{g/mL}$ contents in either total phenolics or secoiridoids (i.e., a lower IC₅₀ value, and therefore, a higher cytotoxic activity, did not correspond to higher concentrations of secoiridoids). Most of the IC₅₀ values, including those from poorly active EVOO-PE, contained $\sim 0.3 \mu\text{g/mL}$ secoiridoids and, remarkably, the IC₅₀ value from the most active PE (EVOO-PE) contained the lowest amount of total secoiridoids ($\sim 0.14 \mu\text{g/mL}$).

As expected, the 14 EVOO varieties had significantly different phenolic compositions, in which secoiridoids were the major phenolic fraction (>90% of total phenolics) in 11 EVOO monovarieties and lignans were significantly enriched (5–10% of total phenolics) in three EVOO monovarieties (Table 5). When compared with EVOO PE containing low to undetectable amounts of lignans, our data clearly demonstrated that lignans-enriched EVOO varieties had a relatively weak ability to alter cell viability in the SKBR3 breast cancer model. Thus, the cytotoxic potency of the lignans-negative EVOO-PE 7 (Picual variety from Córdoba) was found to be 12 times higher than that observed in lignans-enriched EVOO-PE 12 (Arbequina variety from Reus). It should be noted, however, that PE exhibiting small differences in their secoiridoid content notably differed in their abilities to significantly decrease breast cancer cell viability. These findings, altogether, strongly suggest that quality rather than quantity of the entire battery of complex phenols present in individual EVOO-PE ultimately dictate their antibreast cancer cytotoxic effects. In this regard, because the cytotoxic effects of complex PE mixtures were not the algebraic sum of their main phenolic fractions, which were earlier reported to induced significant cytotoxic effects on their own (10, 11), our current findings definitely support the notion that active phenolics may have not only additive but also synergic effects on physiological functions related to breast cancer cell survival. When considering that the presence of significant amounts of lignans directly related to a loss of breast cancer cytotoxic effects in EVOO-PE, we cannot exclude the possibility that antagonistic/protective cytotoxic interactions could take place also at the molecular level between EVOO complex phenols.

Although these experimental studies support the hypothesis of EVOO-derived complex phenols as breast cancer inhibiting compounds, forthcoming studies assessing the in vivo accessibility of EVOO phenolics to tumor tissues should be performed before suggesting that anticancer activity of EVOO-derived complex phenols should be expected from their direct local effects on the breast cancer tissues. In this regard, we should acknowledge that in vitro studies on biocompounds should always consider intestinal absorption and biotransformation. Unfortunately, the knowledge available on the metabolic fate of EVOO-derived complex phenols is still scarce. While absorption and bioavailability studies have revealed that tyrosol and hydroxyl-tyrosol can be retrieved in plasma and urine after olive oil consumption (28), there is an urgent need of data regarding the plasma/urine concentration of the free forms of various secoiridoid aglycones. Indeed, it is reasonable to suggest that limited bioavailability of EVOO-derived complex polyphenols and their conversion into less-active metabolites (e.g., glucuronidated or sulfated forms) could significantly affect their antibreast cancer potential in vivo. Conversely, it has been suggested that the unabsorbed fraction of EVOO-derived lignans such as pinoresinol can be used by intestinal flora to produce the mammalian

lignans enterodiol and enterolactone, which have been shown to reduce invasion in breast cancer cell lines (29). Although enrichment with the lignans fraction closely related to lower breast cancer cytotoxic activities as assessed by MTT-based cell viability assays in vitro, caution must be applied when trying to extrapolate in vitro results into clinical practice because dietary lignans have been repeatedly related with reduction of breast cancer risk (30). Moreover, methylation by catechol-*O*-methyltransferase (COMT), which has been described in vitro and in animal studies regarding the polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate [EGCG] (31), is a potential effect that could significantly alter the potent cytotoxic effects of secoiridoid aglycones in vitro against breast carcinomas in vivo. Experiments are currently underway in our laboratory to evaluate whether methylation of major EVOO-derived complex phenols may occur in breast cancer cells due to cytosolic COMT and whether cellular uptake and COMT-related metabolism may relate to the intrinsic responsiveness of breast cancer cells to EVOO phenolics. Because it has been recently established that methylation significantly decreases the anticarcinogenic activity of EGCG, thus providing a molecular explanation to epidemiological studies showing a significantly decrease in breast cancer risk only among those tea drinkers possessing at least one low-activity COMT allele (32), future EVOO-based intervention studies might benefit from the evaluation of interindividual variations in the methylation of EVOO-derived phenolics as well as from the notion that COMT inhibition may significantly increase the antibreast cancer properties of naturally occurring polyphenols (33).

In summary, the proposed RRLC-ESI-TOF-MS method, with the highest efficiency in the chromatographic separation of secoiridoids and their derivatives, lignans, and flavones, followed by MTT-based cell viability protocol, might offer for the first time an easy, rapid, and objective manner not only to classify EVOO based on their phenolic profile but to identify further naturally occurring biophenols with potential antibreast cancer value.

ABBREVIATIONS USED

Apig, apigenin; D-Lig Agl, decarboxymethyl ligstroside aglycon; DOA, decarboxymethyl oleuropein aglycon; EA, elenolic acid; EVOO, extra virgin olive oil; EVOO-PE, extra virgin olive oil phenolic extract; HYTY, hydroxytyrosol; hydroxy D-ligstroside aglycon, hydroxy decarboxymethyl ligstroside aglycon; hydroxy D-oleuropein aglycon, hydroxy decarboxymethyl oleuropein aglycon; LDA, linear discriminant analysis; Lig Agl, ligstroside aglycon; Lut, luteolin; methyl D-oleuropein aglycon, methyl decarboxy oleuropein aglycon; MTT, metabolic status assessment; Ole, oleuropein; Ol Agl, oleuropein aglycon; Pin, (+)-pinoresinol; Ty, tyrosol.

LITERATURE CITED

- (1) 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.
- (2) Huang, C. L.; Sumpio, B. E. Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surgeons* **2008**, *207*, 407–416.
- (3) Paiva-Martins, F.; Fernandes, J.; Rocha, S.; Nascimento, H.; Vitorino, R.; Amado, F.; Borges, F.; Belo, L.; Santos-Silva, A. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 609–616.
- (4) Larrosa, M.; Luceri, C.; Vivoli, E.; Pagliuca, C.; Lodovici, M.; Moneti, G.; Dolaro, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1044–1054.
- (5) Giovannini, C.; Scazzocchio, B.; Matarrese, P.; Vari, R.; D'Archivio, M.; Di Benedetto, R.; Casciani, S.; Dessi, M. R.; Straface, E.; Malorni, W.;

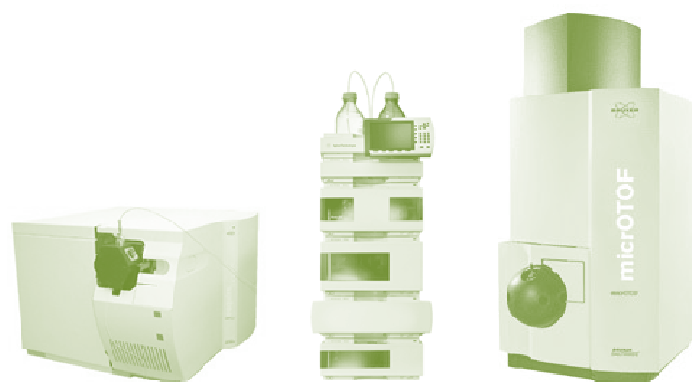


- Masella, R. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 118–128.
- (6) Hashim, Y.; Rowland, I. R.; McGlynn, H.; Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Montedoro, G.; Kaisalo, L.; Wahala, K.; Gill, C. I. R. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 495–500.
 - (7) Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, 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.
 - (8) Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposito, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 113–127.
 - (9) Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessi, M. A.; Spencer, J. P. E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 897–903.
 - (10) Menendez, J. A.; Vazquez-Martin, A.; Colomer, R.; Brunet, J.; Carrasco-Pancorbo, A.; Garcia-Villalba, R.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin (TM)) in HER2-over-expressing breast cancer cells. *BMC Cancer* **2007**, *7*.
 - (11) Menendez, J. A.; Vazquez-Martin, A.; Oliveras-Ferreros, C.; Garcia-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 43–51.
 - (12) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* **1956**, *16*, 144–158.
 - (13) Carrasco-Pancorbo, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Gallina-Toschi, T.; Fernandez-Gutierrez, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 837–858.
 - (14) Bonoli, M.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Lercker, G.; Toschi, T. G. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7026–7032.
 - (15) Saitta, M.; Salvo, F.; Di Bella, G.; Dugo, G.; La Torre, G. L. Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chem.* **2009**, *112*, 525–532.
 - (16) Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2221–2233.
 - (17) Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7984–7991.
 - (18) Bonoli, M.; Montanucci, M.; Toschi, T. G.; Lercker, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1011*, 163–172.
 - (19) Romero, C.; Brenes, M.; Garcia, P.; Garrido, A. Hydroxytyrosol 4-beta-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3835–3839.
 - (20) Oliveras-Lopez, M. J.; Innocenti, M.; Giaccherini, C.; Ieri, F.; Romani, A.; Mulinacci, N. Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta* **2007**, *73*, 726–732.
 - (21) Gomez-Alonso, S.; Salvador, M. D.; Fregapane, G. Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6812–6817.
 - (22) Gomez-Rico, A.; Salvador, M. D.; La Greca, M.; Fregapane, G. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7130–7136.
 - (23) Cert, A.; Moreda, W.; Perez-Camino, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 131–148.
 - (24) Carrasco-Pancorbo, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Del Carlo, M.; Gallina-Toschi, T.; Lercker, G.; Compagnone, D.; Fernandez-Gutierrez, N. G. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8918–8925.
 - (25) Monti, S. M.; Ritiene, A.; Sacchi, R.; Skog, K.; Borgen, E.; Fogliano, V. Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3969–3975.
 - (26) Fogliano, V.; Sacchi, R. Oleocanthal in olive oil: between myth and reality. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 5–6.
 - (27) De Lorenzo, A.; Alberti, A.; Andreoli, A.; Iacopino, L.; Serrano, P.; Perriello, G. Food habits in a southern Italian town (Nicotera) in 1960 and 1996: still a reference Italian Mediterranean diet? *Diabetes Nutr. Metab.* **2001**, *14*, 121–125.
 - (28) Vissers, M. N.; Zock, P. L.; Roodenburg, A. J. C.; Leenen, R.; Katan, M. B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 409–417.
 - (29) Magee, P. J.; McGlynn, H.; Rowland, I. R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* **2004**, *208*, 35–41.
 - (30) Saarinen, N. M.; Warri, A.; Airio, M.; Smeds, A.; Mäkelä, S. Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 857–866.
 - (31) Wang, P.; Aronson, W. J.; Huang, M.; Zhang, Y.; Lee, R. P.; Heber, D.; Henning, S. M. Green Tea Polyphenols and Metabolites in Prostatectomy Tissue: Implications for Cancer Prevention. *Cancer Prev. Res. (Philadelphia, PA)* **2010** Jul 13, doi: 10.1158/1940-6207.
 - (32) Wu, A. H.; Tseng, C. C.; Van Den Berg, D.; Yu, M. C. Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7526–7529.
 - (33) Landis-Piwovar, K.; Chen, D.; Chan, T. H.; Dou, Q. P. Inhibition of catechol-omicon-methyltransferase activity in human breast cancer cells enhances the biological effect of the green tea polyphenol (–)-EGCG. *Oncol. Rep.* **2010**, *24*, 563–569.

Received for review April 20, 2010. Revised manuscript received August 11, 2010. Accepted August 12, 2010. We are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for the project (AGL2008-05108-C03-03) and a grant (FPU, AP2007-03245) and to Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for the projects P07-AGR-02619 and P09-CTS-4564. This work was supported in part by Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spain, gGrants CP05-00090, PI06-0778, and RD06-0020-0028 to Javier A. Menendez). Javier A. Menendez was also supported by a grant from the Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC, Spain)) and by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-11579, Plan Nacional de I+D+I, MICINN, Spain).



Wastes generated during the storage of extra-virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds



Potencial de los subproductos generados durante el almacenamiento del EVOO como fuente alternativa de compuestos fenólicos

CAPÍTULO 2

Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds

Jesus Lozano-Sánchez,^{†,§} Elisa Giambanelli,[#] Rosa Quirantes-Piné,^{†,§} Lorenzo Cerretani,^{*,#} Alessandra Bendini,[#] Antonio Segura-Carretero,^{†,§} and Alberto Fernández-Gutiérrez^{†,§}

[†]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

[§]Functional Food Research and Development Center, Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento s/n, E-18100 Granada, Spain

[#]Department of Food Science, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Piazza Goidanich 60, I-47521 Cesena (FC), Italy

S Supporting Information

ABSTRACT: Phenolic compounds in extra virgin olive oil (EVOO) have been associated with beneficial effects for health. Indeed, these compounds exert strong antiproliferative effects on many pathological processes, which has stimulated chemical characterization of the large quantities of wastes generated during olive oil production. In this investigation, the potential of byproducts generated during storage of EVOO as a natural source of antioxidant compounds has been evaluated using solid–liquid and liquid–liquid extraction processes followed by rapid resolution liquid chromatography (RRLC) coupled to electrospray time-of-flight and ion trap mass spectrometry (TOF/IT-MS). These wastes contain polyphenols belonging to different classes such as phenolic acids and alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones. The relationship between phenolic and derived compounds has been tentatively established on the basis of proposed degradation pathways. Finally, qualitative and quantitative characterizations of solid and aqueous wastes suggest that these byproducts can be considered an important natural source of phenolic compounds, mainly hydroxytyrosol, tyrosol, decarboxymethyl oleuropein aglycone, and luteolin, which, after suitable purification, could be used as food antioxidants or as ingredients in nutraceutical products due to their interesting technological and pharmaceutical properties.

KEYWORDS: olive oil, storage, byproduct, polyphenols, degradation pathways, antioxidant natural source, RRLC, MS/MS fragmentation

INTRODUCTION

Phenolic compounds are an important class of natural antioxidants. The term “phenolic compound” includes a large number of secondary plant metabolites that differ in chemical structure and reactivity, ranging from simple compounds to highly polymerized molecules. When present in small amounts in food, phenolic compounds are capable of preventing or retarding the oxidation of oils and fats. The presence of these compounds in fats, oils, and lipid-based foods is very important to reduce oxidative reactions that can lead to a decrease in both the nutritional value and sensory quality.¹

Polyphenols belonging to many chemical classes have been described in extra virgin olive oil (EVOO), and in particular phenolic acids and alcohols, including *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, vanillin, 3,4-(dihydroxyphenyl)ethanol (hydroxytyrosol), and *p*-hydroxyphenylethanol (tyrosol), have been described. However, the main phenolic compounds are secoiridoid derivatives of oleuropein and ligstroside, such as the decarboxymethylated form of elenolic acid linked to either hydroxytyrosol or tyrosol (oleocanthal).^{2–4} The phenolic profile has been used to evaluate the quality of EVOO as well as the presence of these compounds as they differentiate olive oil from other edible vegetable oils as the most hydrophilic phenols in EVOO are not common to other oils or fats.⁵

There are many technological factors that can influence the content of phenolic compounds, and in this regard the effects of the extraction process as well as the changes in minor compounds of EVOO during storage have been evaluated.^{6–9}

Furthermore, olive oil production, an agroindustrial activity of vital economic significance for many Mediterranean countries, is associated with the generation of large quantities of wastes. Polyphenolic content has been assessed in these byproducts due to the biological and pharmaceutical interest in olive oil phenolic compounds.^{10,11} Indeed, the polyphenolic activity on different cancer cells is also well-known^{4,12} and has stimulated research on the profile of phenolic compounds in the different parts of the olive tree, and new methods have been developed to extract these compounds.¹³

Wastewater from olive oil mill wastes is characterized by a high content of phenolic alcohols (mainly hydroxytyrosol and tyrosol).¹⁴ Oleuropein has been described as a major compound in olive leaves and branches, which also contain high concentrations of glucosylated flavones such as luteolin-7-glucoside and apigenin-7-glucoside.¹⁵ Additionally, branches are characterized with an elevated amount of verbascoside, a precursor of hydroxytyrosol.^{16,17}

The byproducts generated during the filtration process of EVOO have been also evaluated, and different classes of hydrophilic phenolic compounds are retained in filter aids, including phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones.¹⁸

Received: June 29, 2011

Revised: September 21, 2011

Accepted: September 22, 2011

Published: September 22, 2011



In the Mediterranean area, olive oil is produced from September to February, and oil is generally stored in the mill until commercialization. During this storage time, both solid and aqueous wastes are generated. The aim of this investigation was to evaluate the wastes generated during the storage of EVOO as a potential source of phenolic compounds. In particular, phenolic compounds and other polar molecules present in both solid and aqueous wastes were identified and quantitated to establish if these byproducts might be a natural source of antioxidant compounds.

MATERIALS AND METHODS

Samples. EVOOs were produced in the San Placido production plant (Oleoestepa S.L., Sevilla, Spain) in September 2009. First, Hojiblanca variety olives (F1) were processed in a continuous industrial plant equipped with a hammer crusher, horizontal malaxator, and two-phase decanter. EVOO obtained with impurities (F8) was stored in a tank without headspace at room temperature in darkness for 9 months. After this time, suspended solids and others materials, which had been deposited by precipitation in the bottom of the tank, generated a mix of solid and aqueous wastes (F9). Afterward, EVOO (F10) was directly transferred from the storage tank to bottling equipment, and wastes were collected. The separation of the two wastes was carried out by decantation and subsequent centrifugation. To obtain representative results and eliminate confounding factors, which could affect the phenolic profile, isolation of this fraction from samples was performed without storage of wastes.

Chemicals and Apparatus. All chemicals were of analytical reagent grade. Methanol and *n*-hexane were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Sowinskiego, Poland). Acetic acid was purchased from Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and Lab-Scan, respectively. Solvents were filtered using a solvent filtration apparatus (Supelco, Bellefonte, PA). Double-deionized water with a conductivity of <18.2 M Ω was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Standards of hydroxytyrosol, tyrosol, vanillin, luteolin, and apigenin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and (+)-pinoselinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland). Oleuropein was purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Stock solutions of phenolic compounds at 1000 mg/L were first prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol and then serially diluted to working concentrations.

Extraction Procedure of Phenolic and Other Polar Compounds from Solid and Aqueous Wastes Generated during Storage of EVOO. Isolation of the phenolic fraction from solid waste (5 g) was performed using *n*-hexane, methanol, and water as solvents. The lipophilic fraction of samples was removed with 20 mL of *n*-hexane after shaking for 1 h. The mixture was centrifuged at 13000g for 10 min, and the supernatant was eliminated. After this, a comparative study using three different ratios of MeOH/H₂O (100:0, 75:25 and 50:50, v/v) was performed to determine the best solvent to extract the phenolic fraction. To assess this, the sample was soaked for 10 min in an ultrasonic bath with 20 mL of the different solvents indicated above and shaken for 30 min. Samples were centrifuged in the same conditions described above, and supernatants were collected. Each sample was analyzed in triplicate.

The extraction procedure of phenolic compounds from aqueous waste was as follows. To clean samples (10 mL), they were shaken for 1 h with 20 mL of *n*-hexane. In the next step, the samples were centrifuged at 13000g for 10 min to remove the nonpolar fraction, and water extracts were collected. This procedure was also carried out in triplicate.

All extracts were stored at -20 °C and filtered through a 0.25 μ m filter before chromatographic analysis.

RRLC-DAD-ESI-TOF Analysis. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry

(ESI-TOF-MS) was used to characterize the phenolic profile in solid and aqueous wastes using an Agilent 1200-RRLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a vacuum degasser, autosampler, binary pump, and diode array detector (DAD). A 150 mm \times 4.6 mm i.d., 1.8 μ m, Zorbax Eclipse Plus C18 column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) was used for analytical analyses. The flow rate was 0.80 mL/min, and the column temperature was maintained at 25 °C. The mobile phases were water with 0.25% acetic acid as eluent A and methanol as eluent B. The total run time was 27 min using a previously reported multistep linear gradient.⁴ The separated compounds were monitored first with a DAD (240 and 280 nm), and then MS was performed using a microTOF instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) coupled to a RRLC system (see the Supporting Information). At this stage, the use of a splitter was required for coupling with the MS detector as the flow at the TOF detector had to be 0.2 mL/min to obtain reproducible results and stable spray. The TOF mass spectrometer was equipped with a model G1607A ESI interface (Agilent Technologies) operating in negative ion mode. External mass spectrometer calibration was performed with sodium formate clusters (5 mM sodium hydroxide in water/2-propanol 1:1 (v/v), with 0.2% of formic acid) in quadratic high-precision calibration (HPC) regression mode.

The calibration solution was injected at the beginning of the run, and all spectra were calibrated prior to polyphenol identification. The optimum values of the source and transfer parameters were set for good sensitivity and reasonable resolution of the mass range for the compounds of interest (m/z 50–1000) to improve ionization performance.⁴ The accurate mass data for the molecular ions were processed using the software Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonics), which provided a list of possible elemental formulas using the Generate Molecular Formula Editor. The latter uses a CHNO algorithm providing standard functionalities such as minimum/maximum elemental range, electron configuration, and ring-plus double bonds equivalent, as well as a sophisticated comparison of the theoretical with the measured isotopic pattern (Sigma-Value) for increased confidence in the suggested molecular formula. The widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions was established at 5 ppm for most compounds.

Quantitation was carried out by RRLC-ESI-TOF-MS. Eight standard calibration curves of the principal compounds found in samples were prepared using eight commercial standards. All calibration curves showed good linearity.

ESI-IT-MS Analysis. The RRLC system was coupled to a Bruker Daltonics Esquire 2000 ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with the same ESI interface described above. The IT-MS spectrometer was run in the negative ion mode with the capillary voltage set at 3000 V. The IT instrument scanned at the m/z 50–1000 range. The maximum accumulation time and target count values were set at 100 and 10000 ms, respectively. The optimum parameters of the ESI-MS were as follows: dry temperature, 200 °C; drying gas flow, 9 L/min; nebulizing gas pressure, 29 psi. The instrument was controlled by a personal computer running Esquire NT software from Bruker Daltonics.

MS/MS fragmentation obtained by the IT-MS provided additional information, which when combined with UV chromatograms and MS data facilitated the structural identification of phenolic compounds.

Statistical Analysis. Data were analyzed using Origin (version Origin Pro 8 SR0, Northampton, MA) to perform one-way-analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$) to identify significant differences among individual concentrations in phenolic and other polar compounds in extracts using the three different MeOH/H₂O proportions described above to establish the optimum procedure to extract these compounds from solid waste. Individual concentrations of all compounds identified in aqueous waste were also analyzed statistically to evaluate significant differences between both types of wastes generated during storage of EVOO.



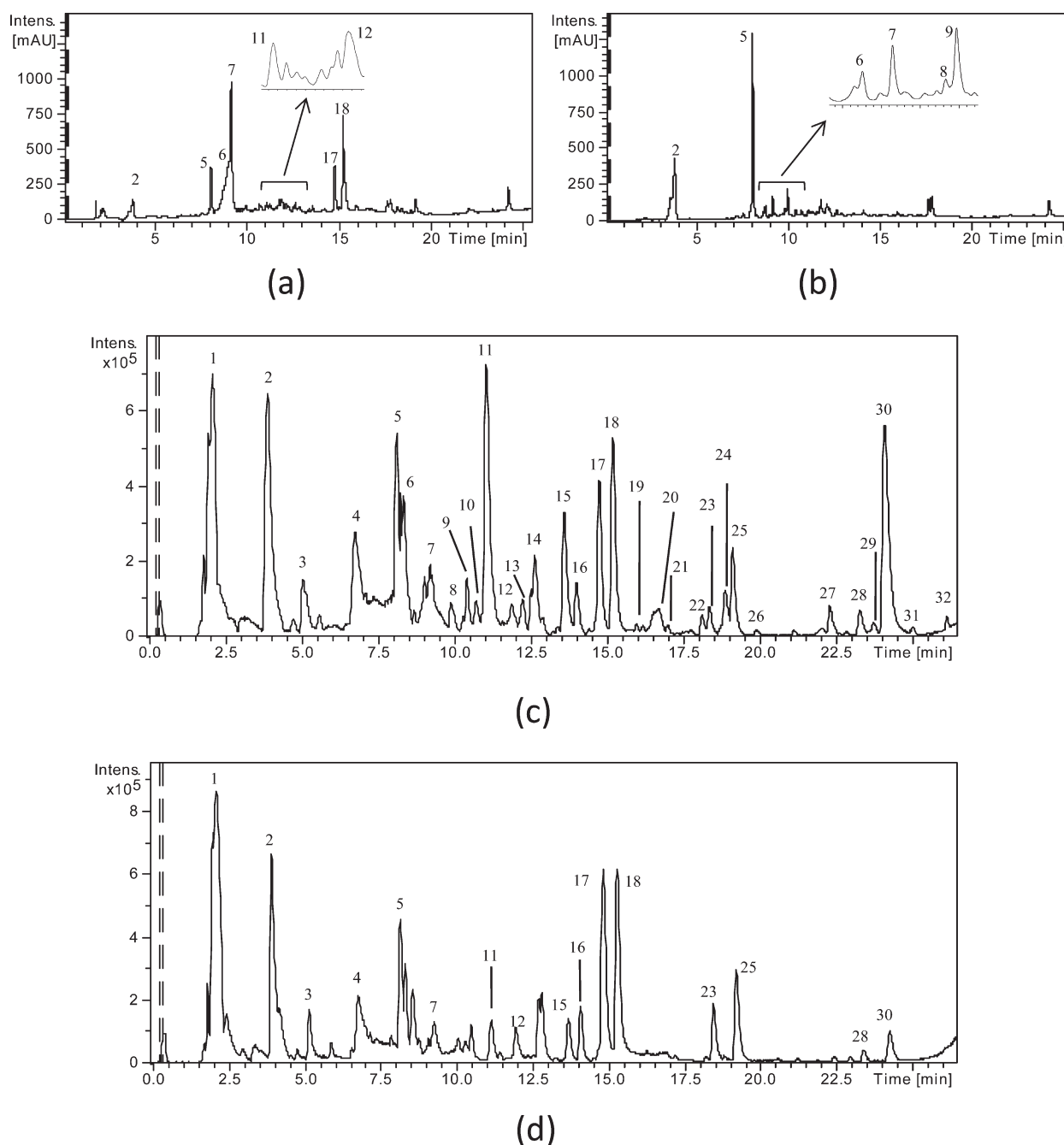


Figure 1. (a, b) HPLC-UV chromatograms detected at 240 and 280 nm of a representative solid waste extract using MeOH/H₂O 75:25, v/v. Base peak chromatograms (BPC) of the same representative solid waste extract (c) and aqueous wastes extract (d) generated during storage of EVOO.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and Quantitation of Phenolic and Other Polar Compounds in Solid and Aqueous Wastes. To our knowledge, this is the first time that these wastes have been characterized using RRLC-DAD-ESI-TOF/IT-MS. Identification of phenolic compounds was carried out by comparing retention times, UV absorbance maxima, MS data, and MS/MS fragmentation patterns from both samples and standards. The remaining compounds for which no commercial standards were available were identified by the interpretation of the information generated by the DAD, TOF analyzer, and IT-MS

and the information previously reported (most compounds have been previously described in olive oil).^{13,16,19,20}

Figure 1 shows the chromatograms of solid and aqueous waste extracts. The main phenolic compounds, which were identified in byproducts, are included in Table 1. The phenolic compounds vanillin, hydroxytyrosol, tyrosol, dialdehydic form of the decarboxymethyl elenolic acid (a secoiridoid derivative), decarboxymethyl oleuropein aglycone, luteolin, and apigenin as well as quinic acid were identified in both wastes. Additional secoiridoids, lignans, and their derivatives, such as oleuropein aglycone, hydroxylated forms of elenolic acid and decarboxymethyl oleuropein aglycone, and acetoxypinoresinol were found only in solid



Table 1. Phenolic and Other Polar Compounds Identified in Solid and Aqueous Wastes Generated during the Storage of EVOO by RRLC-DAD-ESI-TOF/IT-MS

peak	compound	molecular formula	T_r (min)	λ_{max}	phenolic compounds			solid waste			aqueous waste			major fragments ESI negative MS/MS ions	standard
					m/z calcd	m/z exptl	error	σ	m/z exptl	error	σ	m/z exptl	error		
5	hydroxytyrosol	$C_8H_{10}O_3$	8.1	232/280	153.0557	153.0562	2.3	0.0005	153.0572	4.2	0.0024	123	yes		
8	tyrosol	$C_8H_{10}O_2$	9.9	276	137.0608	137.0616	4.7	0.0174	137.0608	-0.1	0.0024	93	yes		
11	dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	$C_9H_{12}O_4$	11.0	230	183.0663	183.0668	-2.7	0.0054	183.0675	-4.5	0.0088	139	no		
12	vanillin	$C_8H_8O_3$	11.8	228, 230	151.0401	151.0417	4.3	0.0231	151.0418	3.9	0.0159	123	yes		
19	hydroxylated form of elenolic acid	$C_{11}H_{14}O_7$	15.9	280/320	257.0667	257.0654	4.9	0.0347	ND	ND	ND	213	no		
20	decarboxymethyl oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_6$	16.6	230, 280	319.1187	319.1199	-3.8	0.0136	319.1203	5.0	0.0274	195/183	no		
21	hydroxylated form of decarboxymethyl oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_7$	16.9	230, 280	335.1136	335.1154	-5.2	0.0431	ND	ND	ND	199	no		
26	acetoxypinoresinol	$C_{22}H_{24}O_8$	19.8	236, 280	415.1398	415.1399	0.1	0.0205	ND	ND	ND	151	no		
29	oleuropein aglycone or isomer	$C_{19}H_{22}O_8$	23.6	236, 282	377.1242	377.1249	-2.0	0.0320	ND	ND	ND	307, 275	no		
30	luteolin	$C_{15}H_{10}O_5$	23.9	254, 348	285.0405	285.0418	-3.7	0.0027	285.0399	2.1	0.0139	175, 151	yes		
31	oleuropein aglycone or isomer	$C_{19}H_{22}O_8$	23.6	236, 282	377.1242	377.1258	-4.6	0.0177	ND	ND	ND	307, 275	no		
32	apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	26.0	268, 338	269.0455	269.0448	2.2	0.0232	269.0460	-1.6	0.0192	225, 151	yes		
1	quinic acid	$C_7H_{12}O_6$	2.1		191.0561	191.0572	4.5	0.0073	191.0592	4.9	0.0287	103	yes		

waste. Figure 2 shows the structures of the phenolic compounds identified.

The concentrations of phenolic and other polar compounds were determined by RRLC-ESI-TOF-MS, using the area of each individual compound (three replicates) and by interpolation of the corresponding calibration curve. The phenolic compounds vanillin, hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin, and apigenin, as well as quinic acid, were quantitated by the calibration curves obtained from their respective commercial standards. The other phenolic compounds, which had no commercial standards, were tentatively quantitated using other compounds with similar structures. Secoiridoid and lignan groups were quantitated using oleuropein and (+)-pinoresinol standards, respectively. Elenolic acid derivatives, which cannot be considered phenolic compounds, were expressed as oleuropein. It should be taken into account that the response of standards may be different from the one of the analytes present in solid and aqueous wastes, and consequently the quantitation of these compounds is an estimation of their actual concentration.

Table 2 summarizes the quantitative results. The phenolic and other polar compound concentrations were determined in three extracts from solid waste obtained with MeOH/H₂O proportions of 100:0, 75:25, and 50:50 (v/v). Each individual concentration was used to carry out one-way analysis of variance at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$) to establish the best procedure to extract these compounds from solid waste.

The main components of the phenolic fraction and its derivatives in solid waste extracts were dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid and hydroxytyrosol. In all extracts, the range of concentrations was from 514 to 601 mg/kg and from 159 to 194 mg/kg for elenolic acid derivatives and phenolic alcohols, respectively. The amount of vanillin, another simple polyphenol, was 149 mg/kg.

Among the secoiridoids, oleuropein aglycone and its hydroxylated and decarboxymethyl derivatives were the most abundant compounds. With regard to MeOH/H₂O proportions, the amount of oleuropein aglycone in the solid waste extract obtained with proportions of 50:50 (v/v) was 2 times lower than in other proportions of MeOH/H₂O. The content of decarboxymethyl oleuropein aglycone in the 75:25 MeOH/H₂O (v/v) extract was significantly higher than in the others. Similarly, the highest quantity of its hydroxylated derivative was obtained using the same procedure.

With regard to lignans and flavones, significant amounts of (+)-acetoxypinoresinol, luteolin, and apigenin were detected. The concentrations of these three compounds in solid waste were higher than previously described in EVOO from Hojiblanca olives.⁴

The best results for all compounds were obtained using the following a MeOH/H₂O proportion of 75:25 (v/v). In reality, the use of aqueous methanol has already been described to provide good selectivity in extracting phenolic compounds from solid residues.²¹

Phenolic and other polar compounds present in aqueous waste extract obtained using the procedure detailed under Materials and Methods were also quantitated (three replicates). Among the polar compounds, quinic acid was the major compound, whereas in the phenolic fraction hydroxytyrosol and tyrosol were the most abundant. The content of hydroxytyrosol in aqueous waste was significantly higher than in the solid waste, and the amount of tyrosol was 6 times higher than in solid waste.

With regard to the amount of flavones, the contents of luteolin and apigenin in aqueous waste were significantly lower than in



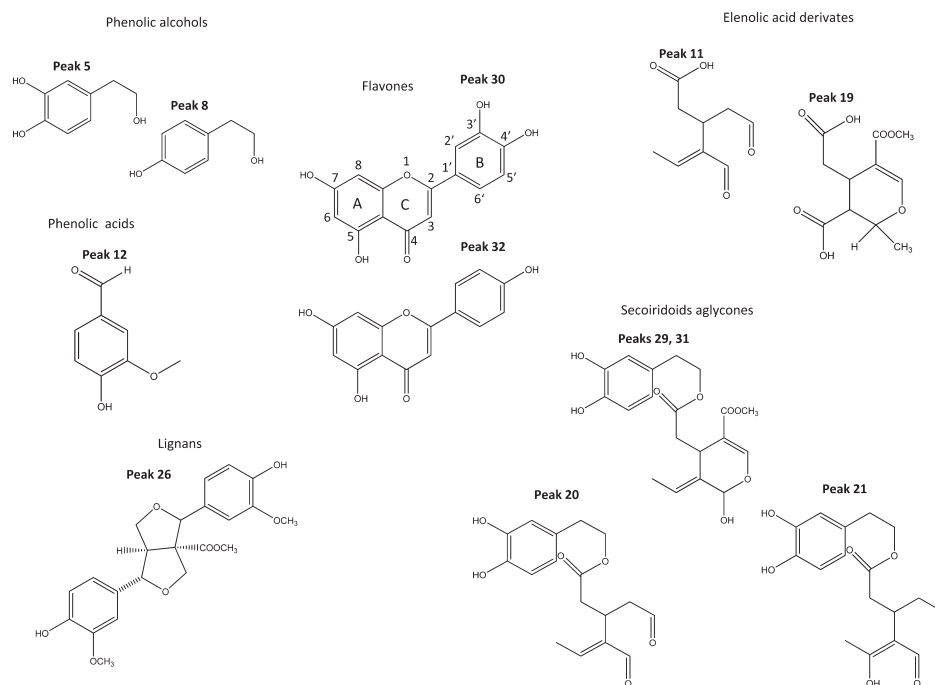


Figure 2. Main phenolic compounds and elenolic acid derivate structures identified in samples. Each compound has been numbered using the elution order obtained by RRLC-ESI-TOF-MS as indicated in Figure 1.

Table 2. Quantitative Results (Value = $X \pm SD$)^a

sample	solid waste (mg analyte/kg)			aqueous waste (mg analyte/L)
	100:0	75:25	50:50	
phenolic compounds/MeOH:H ₂ O				
hydroxytyrosol	180.916 c ± 11.698	194.673 b ± 3.584	159.312 d ± 14.580	303.069 a ± 4.041
tyrosol	95.942 d ± 4.987	123.940 b ± 3.072	119.226 c ± 2.418	687.841 a ± 9.751
vanillin	139.789 c ± 7.662	149.284 ± 4.703	149.472 b ± 5.258	181.142 a ± 0.535
dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	597.161 a ± 1.739	601.269 a ± 1.622	514.916 b ± 3.289	153.844 c ± 1.366
hydroxylated form of elenolic acid	32.387 b ± 1.303	37.590 a ± 2.647	29.690 c ± 1.137	ND
oleuropein aglycone	40.761 b ± 0.329	48.035 a ± 1.254	23.467 c ± 0.253	ND
decarboxymethyl oleuropein aglycone	128.667 b ± 5.403	152.761 a ± 0.456	120.927 c ± 2.239	45.682 d ± 0.711
hydroxylated form of decarboxymethyl oleuropein aglycone	29.272 ab ± 0.235	30.909 a ± 1.027	27.285 b ± 1.350	ND
acetoxypinoresinol	11.364 b ± 0.156	12.220 a ± 0.110	9.324 c ± 0.097	ND
luteolin	145.862 b ± 1.148	147.284 a ± 0.427	79.362 c ± 0.089	11.289 d ± 0.769
apigenin	0.468 a ± 0.002	0.501 a ± 0.001	0.219 b ± 0.007	0.195 b ± 0.004
other polar compounds/MeOH:H ₂ O				
quinic acid	591.271 b ± 13.303	589.416 b ± 10.418	529.362 c ± 11.671	1484.859 a ± 82.440

^a Values with the same letter in a row are not significantly different at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

solid waste. For oleuropein aglycone and its derived compounds, significant amounts of only its decarboxymethylated form were detected in aqueous waste, and its content was less abundant than in the solid extract.

Proposed Derivatives of Phenolic Compounds in Solid and Aqueous Wastes. Table 3 shows the unknown compounds determined by RRLC-ESI-TOF/IT-MS. Among these, several compounds were tentatively identified as products derived from phenolic compounds. Peak 2, with experimental m/z 151 and molecular formula ($C_8H_8O_3$) generated by TOF analyzer, was tentatively proposed as the oxidation product of hydroxytyrosol.

This oxidized form, being more polar than its nonoxidized derivative, elutes earlier (3.9 and 8.1 min, respectively). Parts a and b of Figure 1 report the UV chromatograms detected at 240 and 280 nm, respectively. These compounds showed absorbance maxima at 282 nm due to the presence of the *o*-hydroxyphenyl group in these molecules. MS/MS fragmentation carried out by the IT analyzer generated the same fragment at m/z 123 (Figure 3a). This corresponded to the loss of the CH_2OH and CHO groups for hydroxytyrosol and its oxidation product, respectively.

For elenolic acid, different structures have been previously described by basing their differences on the closed or open ring



Table 3. Unknown and Proposed Derivation Phenolic Compounds Determined by RRLC-ESI-TOF/IT-MS^a

peak	proposed compounds	compounds			solid waste			aqueous waste			major fragments ESI negative MS/MS ions
		molecular formula	T_r (min)	m/z calcd	m/z exptl	error	σ	m/z exptl	error	σ	
2	oxidation product of hydroxytyrosol	C ₈ H ₈ O ₃	3.9	151.0401	151.0408	3.3	0.0086	151.00410	3.8	0.0007	123
3	unknown	C ₉ H ₁₄ O ₆	5.0	217.0718	217.0716	0.9	0.0136	217.0725	-4.9	0.0083	173/199
4	unknown	C ₇ H ₁₀ O ₄	6.7	157.0506	151.0517	-4.7	0.0069	157.0522	-6.5	0.0095	69/139
6	hydrated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₉ H ₁₄ O ₅	8.3	201.0768	201.0773	-2.2	0.0025	ND			157
7	hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₉ H ₁₂ O ₅	9.2	199.0618	199.0612	-3.1	0.0390	199.0620	-4.0	0.0031	155
9	decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	10.4	213.0768	213.0758	4.8	0.0015	ND			169
10	unknown	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	10.7	407.1348	407.1337	2.7	0.0007	ND			273
13	unknown	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	12.2	317.1031	317.1017	4.3	0.0116	ND			287
14	unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	12.6	375.1085	375.1083	0.6	0.0136	375.1097	-3.2	0.0270	311/333
15	unknown	C ₉ H ₁₄ O ₂	13.5	153.0921	153.0936	-4.1	0.0019	153.0938	-4.7	0.0156	123/151
16	aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₁₀ H ₁₆ O ₅	14.0	215.0925	215.0927	-1.0	0.0024	215.0933	-3.6	0.0041	171/197
17	unknown	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	14.7	243.0874	243.0876	-0.9	0.0032	243.0884	-4.1	0.0016	123/211
18	unknown	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	15.2	243.0874	243.0884	-4.1	0.0041	243.0885	-4.9	0.0063	123/211
22	unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	18.0	375.1085	375.1086	-0.2	0.0006	ND			299/343
23	unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	18.3	257.1031	257.1029	0.7	0.0223	257.1030	0.1	0.0055	167/211
24	unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	18.8	375.1085	375.1094	-2.3	0.0017	ND			299/343
25	unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	19.0	257.1031	257.1027	0.7	0.0022	257.1034	-1.2	0.0053	167/211
27	unknown	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	22.2	185.1183	185.1177	3.2	0.0041	ND			95/111/139
28	unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	23.2	379.1398	379.1416	-4.5	0.0087	379.1379	5.2	0.0102	167/211/243

^a ND, compound not detected in sample.

and aldehydic or nonaldehydic forms:²² (1) closed ring carboxylated aldehydic form, (2) closed ring carboxylated hemiacetalic form, and (3) open ring carboxylated dialdehydic form (Figure 3b). Although elenolic acid was not found, other compounds, which were characterized by UV absorbance maxima near 240 nm, typical of elenolic acid and its derivatives, were proposed as hypothetical oxidized and hydrated compounds from different elenolic acid structures.

Figure 3c shows the major negative ESI MS/MS fragment ions. The spectra generated for peaks 6 and 7 yielded deprotonated molecules at m/z 201 and 199, respectively, which could be attributed to derivatives of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (peak 11). Peak 6 was proposed as its hydrated form. This compound has been reported previously in olive oil wastes.²³ It elutes before the nonhydrated and oxidized forms. Its major fragment ion was at m/z 157. Peak 7, which was proposed as hydroxylated form of peak 11, presented a fragment at m/z 155 corresponding to the same loss of 44 units, which is consistent with the fragmentation pattern of their nonderivative form (acid group decarboxylation).

Peak 9 yielded a deprotonated molecule at m/z 213 and 10.4 min, identified as a decarboxylated form of hydroxyelenolic acid. This compound presented a fragment at m/z 169, whereas the difference represented the loss of another carboxylic group.

Peak 16 had a deprotonated molecule at m/z 215. According literature reports, this compound was assigned to an elenolic acid derivative,²² which corresponds to an open ring decarboxylated aldehydic form of elenolic acid. The product ion at m/z 171 is

also justified by the loss of 44 units. For all of the compounds derived from EA, the loss of 44 units of molecular mass can be justified by the liberation of CO₂.

Relationship between Phenolic Compounds and Their Derivatives. Are These Wastes a Natural Source of the Antioxidant Compounds? Wastes generated during the storage of EVOO contain mainly polyphenols of different molecular masses, which are related to the phenolic composition of oil and its changes during storage. Phenolic acids and alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones may undergo modifications due to hydrolysis of complex phenolic compounds, increase in decarboxymethylated secoiridoids, and the appearance of oxidation products of phenolic and derived compounds during the storage of EVOO at an industrial site or after commercialization.²⁴ Such reactions have the consequence that lipophilic compounds (secoiridoid aglycones) are transformed into hydrophilic substances, which is important for their antioxidant action in micellar systems and absorption in the human body.²⁵ All of these compounds are found in wastes generated during the storage period.

Figure 4 shows the proposed degradation pathways including the main phenolic compounds identified in aqueous and solid wastes. Different reactions (oxidation, hydrolysis, hydration, and loss of carboxylic and carboxymethyl groups) must be taken into account.

Secoiridoids in their aglyconic forms, the main phenolic compounds in EVOO, are characterized by the presence of elenolic acid or its derivatives linked to phenolic alcohol structures (hydroxytyrosol and tyrosol). Hydrolysis of the ester bond between the phenolic portion and the rest of the molecule may



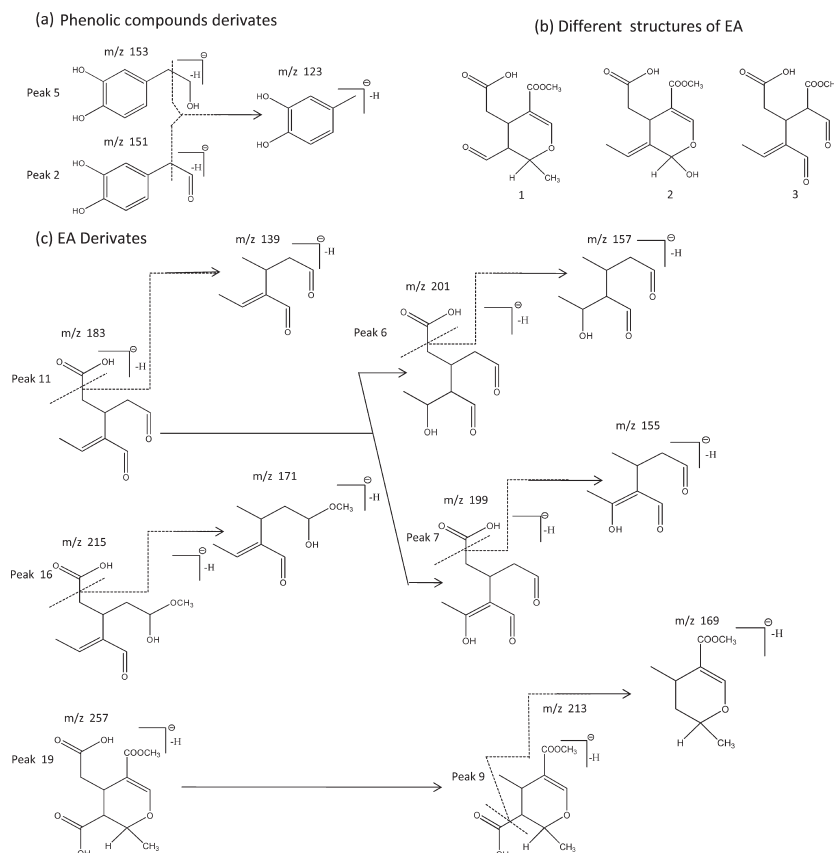


Figure 3. Fragmentation pathways for the proposed phenolic and elenolic acid derivatives illustrating the most representative product ions obtained by IT analyzer, which were used for identification purposes: (a) phenolic compounds derivatives; (b) different structures of elenolic acid previously described in the literature; (c) elenolic acid derivatives.

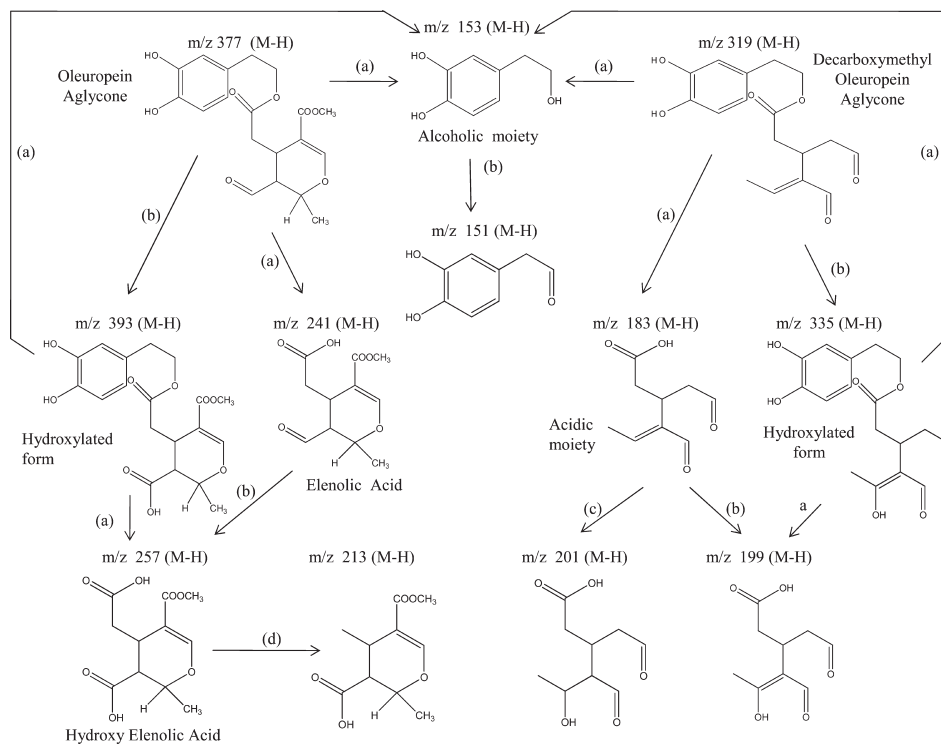


Figure 4. Degradation pathways for the main identified phenols in solid and aqueous wastes: (a) hydrolysis; (b) oxidation; (c) hydration; (d) loss of the carboxylic group.

increase the amount of free acidic and aromatic alcoholic moieties derived from these compounds.^{8,25,26} Indeed, solid and aqueous wastes were characterized by a high content of simple phenols, mainly hydroxytyrosol, tyrosol, and compounds derived from elenolic acid. The small amounts of these complex phenols detected and the high concentration of hydroxytyrosol can justify the proposed hydrolysis reaction. With regard to tyrosol, its amount could have a dual origin: free phenols present in olive oil plus tyrosol produced due to hydrolysis of ligstroside aglycone and its derivatives. Although these compounds have not been detected in these samples, it should be taken into account that they have been previously described in EVOO^{4,25,27} and could be completely hydrolyzed, increasing the amount of tyrosol and elenolic acid derivatives.

As far as elenolic acid is concerned, it was not detected in the present samples. However, several derivatives were identified. The combination of hydrolysis and oxidation could justify the presence of elenolic acid derivatives in olive oil wastes after storage. Oxidation in secoiridoid aglycones involves the acidic portion and not the aromatic alcoholic moiety, which is characterized by the conversion of the aldehydic group of elenolic acid to the carboxylic group. In fact, different oxidized forms according to this conversion have previously been described in EVOO as new compounds (i.e., the hydroxylated form of decarboxymethyl oleuropein aglycone).⁴

The origin of the oxidized free acidic moiety could be either the oxidation of these complex phenols and subsequent hydrolysis of the oxidized forms or hydrolysis previous to the oxidation process. The main complex phenolic compounds identified in the extracts were oleuropein aglycone, decarboxymethyl oleuropein aglycone, and its hydrated form. The hydroxylated form of elenolic acid could be generated by hydrolysis of oleuropein aglycone oxidized form or could arise from the oxidation of elenolic acid. The neoformation of the compound hypothetically proposed as the hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (at m/z 199) could be due to the same reactions described above: oxidation of the phenol complex and later hydrolysis of the oxidized form or hydrolysis of decarboxymethyl oleuropein aglycone and subsequent oxidation of the acidic moiety.

Other degradation pathways for elenolic acid derivatives are the loss of the carboxylic group (decarboxylated form of hydroxy elenolic acid) and hydration of the decarboxymethylated dialdehydic form of elenolic acid (compound at m/z 201).

With regard to other phenolic compounds, acetoxypinorexinol was the only lignan detected in these samples. The antioxidant activity of this phenolic molecule is controversial. Several authors have described a strict correlation between the antioxidant activity of EVOO phenols and the amount of lignans, whereas other investigators found no significant relationship between these values.^{28–30} Neither the oxidized nor the hydrolyzed forms of lignans were found in solid or aqueous wastes.

Apigenin and luteolin, characterized by the presence of three rings in their structure, were identified in extracts (Figure 2). From an antioxidant activity point of view, the B- and C- rings are the most important sites, whereas the A-ring seems to be less important. The predominant role of the B-ring could be to transfer hydrogen. The $\Delta^{2,3}$ double bond may also contribute to the antioxidant capacity, as it ensures π -electron delocalization between the B- and C-rings, which contributes to the stabilization of radicals formed during oxidation. Furthermore, the 3-OH group has been considered to be important because it contributes

to the antioxidant potential. However, Lut (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) and Apig (4',5,7-trihydroxyflavone) are characterized by the absence of this group, and both compounds have shown major stability to oxidation.³¹ Indeed, the oxidized forms of Lut and Apig were not found in extracts.

For benzoic and cinnamic acids, different authors have reported the presence of dimers (i.e., *p*-coumaric and ferulic acid dimers) identified as oxidation and degradation products in olive oil mill wastewater³² and in synthetic mixtures from several commercial standards exposed to different oxidation conditions.³³ Among the phenolic derivatives and unknown compounds, cleavages of cinnamic and benzoic acids have not been identified in the present extracts. This could be because the amounts of these compounds in Hojiblanca variety EVOO are lower than those of other polyphenols.

Finally, among the phenolic compounds identified and quantitated in wastes generated during the storage of EVOO, hydroxytyrosol and secoiridoids, which contain a phenolic alcohol in their structure, have higher antioxidant activity than other phenols including α -tocopherol. The major activity could be linked to their *o*-diphenolic structure. Although the amount of complex secoiridoids in samples is low, the final concentration of derived secoiridoids, mainly decarboxymethyl oleuropein aglycone, is similar to values described in olive oil.⁴ Moreover, the amount of hydroxytyrosol is from 30 (solid waste) to 100 (aqueous waste) times higher than the value described in EVOO^{4,34,35} due to hydrolysis reactions of secoiridoids containing this alcoholic phenol. Beneficial properties have been reported for hydroxytyrosol in inhibiting the proliferation of cells derived from human colon adenocarcinoma and other pathologies.^{36–38}

In this preliminary work, the potential of the wastes generated during storage of Hojiblanca variety EVOO as a source of phenolic compounds has been evaluated. It should be taken into account that the variety chosen could affect the phenolic content of byproduct as it is related to EVOO composition. Phenolic acids and alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones were identified and quantitated in both solid and aqueous wastes generated during the storage of EVOO. Different degradation pathways for the main phenols were proposed, and several derived compounds were tentatively identified. Among these, the amount of hydroxytyrosol was much higher than that described in EVOO due to the hydrolysis reactions of secoiridoids containing this alcoholic phenol. It is necessary to consider that wastes generated during storage could represent an interesting natural source of antioxidant phenols and have antiproliferative effects against many pathological processes. Future investigations are warranted to develop purified antioxidant extracts of hydroxytyrosol and other possible active compounds, with the application of more environmentally friendly and selective extraction techniques, such as supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction. The optimal extraction technique should be applied to obtain extracts with applications in food antioxidants as well as the development of nutraceutical products.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Figure S1. Flow diagram of the elaboration process of EVOO. Figure S2. MS spectra of the main phenolic compounds identified in samples. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. Table S1. Analytical parameters of the RRLC-ESI-TOF MS methods.



AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: lorenzo.cerretani@unibo.it or lcerreta@gmail.com.
Phone: +390547338121. Fax: +3905473382348.

Funding Sources

We are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for Projects AGL2008-05108-C03-03 and AGL2011-29857-C03-02 and a grant (FPU, AP2007-03245) and to the Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for Projects P09-CTS-4564 and P10-FQM-6563.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Custodio Borrego from the San Placido production plant (Sevilla, Spain) for their invaluable help.

REFERENCES

- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, 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.
- Impellizzeri, J.; Lin, J. M. A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleo-antithrombotic activity in extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3204–3208.
- Suarez, M.; Macia, A.; Romero, M.; Motilva, M. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1214*, 90–99.
- Lozano-Sanchez, J.; Segura-Carretero, A.; Menendez, J. A.; Oliveras-Ferraro, C.; Cerretani, L.; Fernandez-Gutierrez, A. Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9942–9955.
- Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 113–127.
- Angerosa, F.; Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Montedoro, G. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 17–31.
- Chiacchierini, E.; Mele, G.; Restuccia, D.; Vinci, G. Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 299–305.
- Di Lecce, G.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Bonoli-Carbognin, M.; Lercker, G. Shelf stability of extra virgin olive oil under domestic conditions. *Ind. Aliment. Italy* **2006**, *461*, 873–880.
- Lozano-Sanchez, J.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physico-chemical characteristics. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 201–211.
- Badimon, L.; Vilahur, G.; Padro, T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, 202–215.
- Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 946–953.
- Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessi, M. A.; Spencer, J. P. E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 897–903.
- Suarez, M.; Romero, M.; Ramo, T.; Macia, A.; Motilva, M. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1463–1472.
- Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.; Mikros, E.; Tzarbopoulos, A.; Gikas, E.; Spanos, I.; Manios, T. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2671–2676.
- Lujan, R. J.; Capote, F. P.; Marinas, A.; de Castro, M. D. L. Liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring for optimal selection of transitions to evaluate nutraceuticals from olive-tree materials. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 855–864.
- Fu, S.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Menendez, J. A.; Menendez-Gutierrez, M. P.; Micol, V.; Fernandez-Gutierrez, A. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 643–654.
- Paiva-Martins, F.; Pinto, M. Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (*Olea europaea*) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5582–5588.
- Lozano-Sanchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1146–1150.
- De Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chem.* **2007**, *104*, 858–867.
- Fu, S.; Arraez-Roman, D.; Menendez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 51–59.
- Obied, H. K.; Allen, M. S.; Bedgood, D. R., Jr.; Prenzler, P. D.; Robards, K. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9911–9920.
- De La Torre-Carbot, K.; Jauregui, O.; Gimeno, E.; Castellote, A. I.; Lamuela-Raventos, R. M.; Lopez-Sabater, M. C. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4331–4340.
- Bazoti, F. N.; Gikas, E.; Skaltsounis, A. L.; Tzarbopoulos, A. Development of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *573–574*, 258–266.
- Lerma-Garcia, M. J.; Simo-Alfonso, E. F.; Chiavaro, E.; Bendini, A.; Lercker, G.; Cerretani, L. Study of chemical changes produced in virgin olive oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7834–7840.
- Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Garrido, A. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5609–5614.
- Morello, J. R.; Motilva, M. J.; Tovar, M. J.; Romero, M. P. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem.* **2004**, *85*, 357–364.
- García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Vázquez-Martín, A.; Menéndez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 416–429.
- Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 647–659.
- Tovar, M. J.; Motilva, M. J.; Romero, M. P. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5502–5508.



(30) 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.

(31) Ghidouche, S.; Es-Safi, N.; Ducrot, P. Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 619–623.

(32) Cermola, F.; DellaGreca, N.; Iesce, M. R.; Montella, S.; Pollio, A.; Temussi, F. A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewater. *Chemosphere* **2004**, *55*, 1035–1041.

(33) Antolovich, M.; Bedgood, D. R.; Bishop, A. G.; Jardine, D.; Prenzler, P. D.; Robards, K. LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 962–971.

(34) Gómez-Alonso, S.; Mancebo-Campos, V.; Salvador, M. D.; Fregapane, G. Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chem.* **2007**, *100*, 36–42.

(35) Garcia-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferreros, C.; Vazquez-Martin, A.; Menendez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *51*, 416–429.

(36) Deiana, M.; Incani, A.; Rosa, A.; Corona, G.; Atzeri, A.; Loru, D.; Melis, M. P.; Dessì, M. A. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H₂O₂ induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2984–2990.

(37) Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessì, M. A.; Spencer, J. P. E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 897–903.

(38) Incani, A.; Deiana, M.; Corona, G.; Vafeiadou, K.; Vauzour, D.; Dessì, M. A.; Spencer, J. P. E. Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H₂O₂-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 788–796.



**Monitoring the bioactive compounds status of
extra-virgin olive oil and storage byproducts
over the shelf life**



**Monitorización de los compuestos bioactivos del
aceite de oliva virgen extra y del subproducto
generado durante su almacenamiento**

CAPÍTULO 3

Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life

Lozano-Sánchez Jesus^{a,b}, Bendini Alessandra^c, Quirantes-Piné Rosa^{a,b}, Cerretani Lorenzo^c, Segura-Carretero Antonio^{a,b}, Fernández- Gutiérrez Alberto^{a,b}

Under review in Food Control Journal

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, E- 18071 Granada, Spain.

^bFunctional Food Research and Development Center, Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento s/n, E-18100 Granada, Spain.

^cDepartment of Food Science, Alma Mater Studiorum - University of Bologna, P.zza Goidanich 60, I-47521 Cesena (FC), Italy.

* Corresponding author

E-mail address: ansegura@ugr.es

Phone: +34 958249510 Fax: +349582495



Abstract

The goal of this work was to monitor the phenolic profile of extra-virgin olive oil (EVOO) and of storage by-products in order to achieve a better understanding of the behaviour of these bioactive compounds during storage in the mill companies. Olive oil was stored in 1000-L tanks for 10 months. Qualitative and quantitative variations of the bioactive polyphenols over time were evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) method. Half-life, and elimination, and appearance rate constants (K_{el} and K_a , respectively) were established for the main phenolic compounds characterized in the samples. When the correlation for the pair oleuropein aglycone or decarboxymethyl oleuropein aglycon and their hydrolysed derivatives was evaluated, the determination coefficients (r^2) were higher than 0.950. On the other hand, at all stages of the storage, by-products exhibited a higher hydroxytyrosol content than did olive oil because its K_a was higher in the by-products than in the olive oil. The results could have a dual application: to determine the freshness:aging ratio of an extra-virgin olive oil, and to establish the optimal time for collecting the storage by-products as an alternative source of polyphenols with bioactive properties.

KEYWORD: olive oil; storage by-products; polyphenols; half-life; elimination and appearance rate constants; HPLC-ESI-TOF-MS.



1. Introduction

Extra-virgin olive oil (EVOO), the main Mediterranean dietary fat, is well-known for its health benefits (Kontou, Psaltopoulou, Panagiotakos, Dimopoulos & Linos,2011;Psaltopoulou, Kosti, Haidopoulos, Dimopoulos & Panagiotakos,2011). Early studies attributed these benefits to its monoinsaturated fatty acid content (Fernández-Jarne, Martínez-Losa, Prado-Santamaría, Brugarolas-Brufau, Serrano-Martínez & Martínez-González,2002;Martínez-González, Fernández-Jarne, Serrano-Martínez, Martí, Martínez & Martín-Moreno,2002). However, recent research indicates that minor constituents appear to prevent several diseases. Indeed, the juice derived from the first cold pressing of the olives without any further refining process, naturally contains high levels of phenolic compounds associated with the health benefits (Cicerale, Conlan, Sinclair & Keast,2009). These compounds exert strong antiproliferative effects on many pathological processes (Corona, Deiana, Incani, Vauzour, Dessi & Spencer,2009;Deiana et al.,2010;Incani et al.,2010), motivating the polyphenolic characterization of the different EVOO varieties (Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, Menendez, Oliveras-Ferraros, Cerretani & Fernandez-Gutierrez,2010).

Several high-performance analytical methods have been developed to characterize the complex phenolic pattern in EVOO. The main tool in characterization and quantitative analysis of phenolic compounds is liquid chromatography coupled with mass spectrometry using different kinds of mass spectrometers (De La Torre-Carbot, Jauregui, Gimeno, Castellote, Lamuela-Raventos & Lopez-Sabater,2005;Suarez, Macia, Romero & Motilva,2008;García-Villalba et al.,2010;Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, Menendez, Oliveras-Ferraros, Cerretani & Fernandez-Gutierrez,2010). Nevertheless, phenolic compounds present primarily in a fresh EVOO are characterized by a complex



mixture of compounds belonging to different classes (simple and alcoholic phenols, secoiridoids, lignans and flavones). Furthermore, these compounds may generate derivatives during EVOO storage which have not been completely characterized.

Given the importance of the phenolic fraction, regard to antioxidant activities (Bendini, Cerretani, Vecchi, Carrasco-Pancorbo & Lercker,2006), sensory properties (Esti, Contini, Moneta & Sinesio,2009) and health benefits (Bendini et al.,2007), the change in the phenolic compounds over time could be an important quality control parameter of EVOO. The main effects tested in the phenolic fraction during oil storage have been hydrolysis of secoiridoids and oxidation of some phenolic molecules (Brenes, Garcia, Garcia & Garrido,2001). The ratio between single phenols and specific derivatives formed by hydrolysis/oxidation could be useful to determine the freshness:aging ratio of a virgin olive oil (Bendini, Cerretani, Salvador, Fregapane & Lercker,2009).

Several studies have focused on possible hydrolytic and oxidative degradation forms of phenolic compounds present in EVOO during the storage. With the aim of understanding the possible pathways, different stress conditions have been applied. For example, Rovellini and Cortesi (2002) proposed several oxidized forms derived from phenolic compounds of EVOO exposed to light for 2 years. Rios, Gil and Gutierrez-Rosales (2005) collected individual oxidation products from an oxidized EVOO that had been heat stressed at 100°C for 8 h under an air flow. More recently, Lerma-Garcia, Simo-Alfonso, Chiavaro, Bendini, Lercker, and Cerretani (2009) accelerated the storage of an EVOO by a 60°C treatment for up to 7 weeks Also, Valli, Bendini, Cerretani, Fu, Segura-Carretero, and Cremonini (2010) submitted EVOO samples to heat treatments by microwave or conventional oven, while Samaniego-Sánchez, Oliveras-López, Quesada-Granados, Villalón-Mir and Serrana (2012) evaluated the effect of different container types on the EVOO quality over time.



The oxidation and storage conditions applied in these studies do not exactly reflect the real storage conditions of EVOO in the mill companies until the oil is sold and, as suggested by Frankel (1993), the phenolic patterns discerned could depend on storage conditions (i.e., temperature, oxygen availability, and industrial or commercial container). Laveli, Fregapane and Desamparados (2006) evaluated the degradation of compounds in EVOO during storage in commercial containers. The results obtained in this study showed that the autoxidation and hydrolytic processes of phenolic compounds under conditions that mimic its routine commercial storage differs from the observed under accelerated storage conditions.

In the Mediterranean region, olive oil is produced from September to February and stored by the mill companies in large tanks until the oil is sold. During this storage time, suspended solids are deposited at the bottom of the tanks, and may affect the EVOO polyphenolic content. Indeed, Lozano-Sanchez et al. (2011) characterized the phenol composition of the wastes generated for 9 months and evidenced high contents of simple phenols, mainly hydroxytyrosol, tyrosol, and compounds derived from elenolic acid in the industrial storage by-products.

The main aim of the present study concerns the changes in the phenolic patterns of an EVOO and in by-products during storage for 10 months in tanks without headspace at room temperature in darkness. Given that storage by-products become enriched in polyphenols over time, the relationship between the polyphenolic status in the EVOO and wastes could be useful for understanding the changes of these bioactive compounds over time. Monitoring was performed by a high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) method. A sample of phenolic fraction was extracted and analysed once a month. An in-depth



study of the mass spectral information was performed and the half-life, as well as the elimination and appearance constant rates of the main compounds were calculated.

2. Material and Methods

2.1. Samples

The EVOO used in this study was of the Hojiblanca olive variety of *Olea europaea* L. In November 2010, olives were collected in southern Spain (Seville, Andalucía) and processed by continuous industrial plants equipped with a hammer crusher, a horizontal malaxator, and a two-phase decanter (San Placido production plant, Oleoestepa S.L.). The EVOO obtained was homogenized and stored in 1000-L tanks without headspace at room temperature and in darkness for 10 months. Suspended solids and other materials were deposited by precipitation in the bottom tank over time. At this stage, samples of EVOO and solid wastes were collected every 30 days for 10 months. As a means of gaining representative results and eliminating factors which could affect the monitoring of the phenolic compounds, this fraction was isolated without storage of collected samples once a month.

2.2. Chemical and reagents

All chemicals were of analytical reagent grade. Methanol and *n*-hexane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid was purchased from Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Standards of hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin, apigenin, and quinic acid were purchased by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and (+)-pinoresinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland). Oleuropein was purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Double-deionized water with conductivity less than 18.2 M Ω was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The vacuum pump used for this work was a Millipore pump model WP6222050 (Millipore,



Billerica, MA, USA). Stock solutions at concentration of 1000 mg/L for each phenolic compound were first prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol and then serially diluted to working concentrations.

2.3. Extraction procedure of phenolic and other polar compounds from samples

Polar phenols, were isolated from the EVOO using solid-phase extraction (SPE) with Diol-cartridges (bed weight 1000 mg, 6 mL of tube size), following the method described by Lozano-Sanchez, Cerretani, Bendini, Segura-Carretero and Fernandez-Gutierrez (2010). EVOO (60 g) was dissolved in *n*-hexane and loaded into the column. The cartridge was washed with 15mL of *n*-hexane. Finally, the sample was recovered by passing through 40 mL of methanol and the solvent was evaporated under vacuum. The residue was dissolved with 2 mL of methanol and filtered through a 0.25 µm filter before the HPLC analysis. Three replicates were prepared and analysed per sample.

The phenolic fraction was isolated from storage by-products following Lozano-Sanchez et al. (2011). The samples (5 g) were dissolved with 20 mL of *n*-hexane, being shaken for 1 h to remove the lipophilic fraction. The mixture was centrifuged at 13000 g for 10 min and the supernatant was eliminated. After this, the sample was soaked for 10 min in an ultrasonic bath with 20 mL of the MeOH:H₂O (75:25, v/v) and shaken for 30 min. Finally, the samples were centrifuged under the same conditions as described above, and the supernatants were collected. Three replicates were prepared and analysed per sample.

2.4. HPLC-DAD-ESI-TOF-MS analysis

An analytical method to characterize the phenolic profile in EVOO and solid wastes was performed in an Agilent 1200-RRLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) of the Series Rapid Resolution equipped with a vacuum degasser,



autosampler, a binary pump, and a diode array detector (DAD). For the qualitative and quantitative characterization of phenolic extract, RRLC was coupled to a time-of-flight mass spectrometer detector microTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), which was equipped with a model G1607A ESI interface (Agilent Technologies) operating in negative ion mode. A 150 mm x 4.6 mm i.d., 1.8 μm , Zorbax Eclipse Plus RP-C18 column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for analysis. The mobile phases used were 0.25% acetic acid as eluent A and methanol as eluent B. The total run time was 27 min using a previously reported multistep linear gradient (Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, Menendez, Oliveras-Ferraros, Cerretani & Fernandez-Gutierrez,2010). The flow rate was 0.80 mL/min, and consequently the use of a splitter was required for the coupling with the MS detector, as the flow which arrived to the TOF detector had to be 0.2 mL/min in order to ensure reproducible results and stable spray.

External mass spectrometer calibration was performed with sodium acetate clusters (5 mM sodium hydroxide in water/2-propanol 1/1 (v/v), with 0.2% of acetic) in quadratic β high-precision calibration (HPC) regression mode. The optimum values of the source and transfer parameters were established according to Lozano-Sánchez et al. (Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, Menendez, Oliveras-Ferraros, Cerretani & Fernandez-Gutierrez,2010). The widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions was established at 10 ppm for most of the compounds.

The phenolic compounds were identified by comparing retention times, UV absorbance maxima, and MS data from both samples and standards. The remaining compounds for which no commercial standards were available were identified by the interpretation of the information generated by the DAD, TOF analyser, and the information reported (most compounds were previously described in olive oil and solid waste).



Quantification was made by HPLC-ESI-TOF-MS. Seven standard calibration curves of the main compounds found in the samples were prepared using seven commercial standards. All calibration curves showed good linearity over the study range ($r^2 = 0.997$). The individual concentrations were determined using the area of each individual compound (three replicates) and by interpolation of the corresponding calibration curve. Results are given in mg of analyte per kg of oil or mg of analyte per kg of solid waste.

3. Results and Discussion

3.1. Qualitative characterization of the phenolic and other polar compounds in EVOO and storage by-product

Fig. 1 shows the resulting chromatograms of olive-oil and by-product extracts. The main phenolic compounds, which were identified in samples, are included in Table 1. A total of 32 compounds were characterized in EVOO and solid-waste extracts, 10 were unknown (Uk 1-10). Among these, 4 were characterized as phenolic alcohols or derivatives, 15 were from secoiridoids, 7 from elenolic acid derivatives, 3 from lignans and 2 flavones, and one, the quinic acid, was not a phenolic molecule.

With regard to phenolic alcohols, oxidized hydroxytyrosol (peak 2), hydroxytyrosol (peak 5), and tyrosol (peak 8) were identified in both olive-oil and waste phenolic extracts, while hydroxytyrosol acetate (peak 17) was found only in olive-oil samples. Indeed, tyrosol, hydroxytyrosol, and its oxidized form have been previously described as the main phenols in EVOO storage by-products (Lozano-Sánchez et al., 2011).

The most representative complex phenols identified in olive oil were oleuropein aglycone, ligstroside aglycone, and their derivatives. These components, belonging to the secoiridoid group, are characteristic of olives and EVOO. Different isomers have



been previously reported in olive oil (Fu, Arraez-Roman, Menendez, Segura-Carretero & Fernandez-Gutierrez,2009). In fact, four ligstroside aglycone isomers (peaks 29, 30, 31 and 40) and three oleuropein aglycone ones (36, 38 and 39) were characterized in the olive-oil extracts. Additional secoiridoids, such as decarboxymethylated, hydroxylated and methylated forms of oleuropein aglycone (peaks 22, 35, and 42, respectively) as well as a decarboxymethylated form of ligstroside aglycone (peak 27) were found in olive-oil samples, which have been widely described in the literature (De La Torre-Carbot, Jauregui, Gimeno, Castellote, Lamuela-Raventos & Lopez-Sabater,2005;Suarez, Macia, Romero & Motilva,2008;Saitta, Salvo, Di Bella, Dugo & La Torre,2009;Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, Menendez, Oliveras-Ferraros, Cerretani & Fernandez-Gutierrez,2010). Among secoiridoids, dehydrated oleuropein aglycone (peaks 14), decarboxymethyl oleuropein aglycone (peak 22), and its hydroxylated isomers (peaks 12 and 23) and oleuropein aglycone or isomer (peak 36) were also identified in storage by-products.

Other polar compounds belonging to elenolic-acid derivatives were identified in samples. Among these, decarboxylated form of hydroxy-elenolic acid (peak 9), dialdehydic form of decarboxymethyl-elenolic acid (peak 11), elenolic acid (peak 20), and hydroxy-elenolic acid (peak 21) were identified in both olive-oil and storage by-product extracts. Additional derivatives, such as hydrated and hydroxylated products of dialdehydic form of decarboxymethyl-elenolic acid (peaks 6 and 7, respectively) and aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (peak 16) were found only in storage by-products. All elenolic-acid derivatives have been previously reported in olive-oil wastes (Obied, Allen, Bedgood, Prenzler & Robards,2005;Suarez, Romero, Ramo, Macia & Motilva,2009;Lozano-Sánchez et al.,2011).



With regard to lignans and flavones, while syringaresinol (peak 24), acetoxypinoresinol (peak 28), luteolin (peak 37) and apigenin (peak 41) were identified in both samples, pinoresinol (peak 26) was detected only in olive-oil samples. Fig. 2a shows the structures of the main polyphenols characterized in samples. As far as the presence of other polar compounds is concerned, quinic acid (peak 1) was found in all samples.

3.2. Behaviour of phenolic and other polar compounds in EVOO over time.

Individual concentrations of the all compounds were calculated by the calibration curves drawn from their respective commercial standards. The other polyphenols, which had no commercial standards, were tentatively quantitated using other compounds with similar structures. The secoiridoid and lignan groups were quantitated using oleuropein and (+)-pinoresinol standards, respectively. The elenolic acid and derivative concentrations were expressed as oleuropein. It should be taken into account that the response of standards may differ from that of the analytes with similar structure present in samples, and consequently the quantitation of these compounds is an estimation of their actual concentration.

Fig. 2b shows the time course of the total content for all polyphenol families in EVOO, tentatively calculated as the sum of the individual phenolic-compound concentrations. A variable trend was found in the total polyphenol content, with a gradual decrease at 300 days. Mainly phenolic compounds belonging to secoiridoid group were responsible for this behaviour. Indeed, this trend was the same as for the total secoiridoid amount, while the simple phenol and elenolic acid derivatives increased over the storage time. With respect to other phenolic-compound families, storage did not appear to have a great effect on lignans and flavones, which were present at similar concentrations at the end of the study.



The trends of the simple phenols, secoiridoids, lignans, and flavones during storage are related to the stability and nature of their molecular structure. Indeed, these compounds may undergo alterations due mainly to hydrolysis, oxidation, and increase of decarboxymethylated derivatives during the storage of EVOO in the industry or after sales (Brenes, Garcia, Garcia & Garrido,2001;Lerma-Garcia, Simo-Alfonso, Chiavaro, Bendini, Lercker & Cerretani,2009). Fig. 3 shows the monitoring of the individual phenolic compounds in EVOO over time.

The time course of phenolic alcohols and elenolic acid derivatives was linked to the changes in secoiridoid aglycones. These complex phenols are characterized by the presence of elenolic acid or its derivatives linked to phenolic alcohol structures (hydroxytyrosol and tyrosol). The decrease in these complex phenols and the increase in the amount of free acidic and aromatic alcoholic moieties may be explained in the hydrolysis of the ester bound between the phenolic portion and the rest of the molecule (Brenes, Garcia, Garcia & Garrido,2001). Indeed, the lysis of the complex phenols during the oil storage led to a higher content of low-molecular-weight phenols. In this way, the amount of hydroxytyrosol and elenolic acid derivatives increased in parallel with the decrease of secoiridoid derivatives. That reduction was more marked in oleuropein aglycone and its decarboxymethylated form, indicating a more active participation in the hydrolysis and oxidation processes.

Table 2 includes correlation data among the main complex secoiridoids and their oxidized and hydrolysed derivatives. Different models were analysed to establish the best mathematical function representative of the ratio between complex phenols and specific derivatives formed by hydrolysis over time. All the compounds showed a good correlation when an exponential model was applied. The decrease of the decarboxymethyl oleuropein aglycone was positively related to the increase in the



hydroxytyrosol and dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid in oil storage ($r^2=0.97$). A good correlation was also found between the amounts of the oleuropein aglycone and its free acidic and alcoholic moities over time ($r^2=0.95$).

However, different reactions were also taken into account to establish the change of the main secoiridoids over time. Consequently, further exponential models were computed, including oxidized derivatives of the main oleuropein aglycone derivative: 10-OH-oleuropein aglycone, and hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone isomer I and isomer II. Given that the amount of the hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone isomer I decreased over time, this compound was included as a source of simple phenols. When the ratio between the sum of oleuropein aglycone, decarboxymethyl oleuropein aglycone and hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone isomer I with their hydrolysed and oxidized derivatives form was established, a good correlation was also found ($r^2=0.95$).

The slope a of the exponential equation for the three different combinations included in Table 2 showed very similar values (decarboxymethyl oleuropein aglycone model, $a = 0.0059$; oleuropein aglycone model, $a=0.0053$; sum of the main oleuropein aglycone derivatives model, $a= 0.0054$). Thus, the increase in hydroxytyrosol, elenolic acid, as well as the two hydroxylated complex secoiridoids occurred mainly at the expense of the lysis and oxidation of the decarboxymethyl oleuropein aglycone and oleuropein aglycone. The half-life of these compounds was calculated as $\ln 2/ K_{el}$, where K_{el} (elimination rate constant) was established from the slope of the elimination phase in the concentration vs. time plot, according to the residual method (Funes et al.,2009). Half-life is expressed as the time (days) needed to decrease the initial concentration by 50%. The values found for both compounds were similar, 405 and 445 days for



oleuropein aglycone and its decarboxymethyl derivative, respectively, because both compounds showed similar K_{el} values.

With regard to tyrosol, the content only increased starting from five months of storage (150 days). The change of this compound over time may be related to the ligstroside aglycone and derivatives. These complex phenols are characterized by the presence of the tyrosol as an aromatic alcoholic moiety. Because the decarboxymethyl ligstroside aglycone showed a noticeable decline at the end of the storage, the lysis of this compound could be the main factor responsible for the increase in tyrosol. Furthermore, an increase in the amount of free acidic moiety (dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid) was detected only after seven months in parallel to tyrosol, and both compounds showed similar values of their appearance rate constants (K_a). The change of ligstroside aglycone over time differed from that of the other secoiridoids, which increased at the end of the storage. Similar trends have been previously reported for this compound by other authors (Morello, Motilva, Tovar & Romero,2004;Boselli, Di Lecce, Strabbioli, Pieralisi & Frega,2009;Suárez, Romero, Ramo & Motilva,2011).

Storage did not appear to have a great effect on flavone and lignan contents. Although several derivatives of flavones have previously been reported in storage oil (Boselli, Di Lecce, Strabbioli, Pieralisi & Frega,2009), degradation products of these compounds did not find in EVOO. These phenolic groups appear to be the most stable over time.

3.3. Behaviour of the phenolic and other polar compounds in storage by-product

Polyphenols present in storage by-products were related to the oil phenolic composition and its changes during storage. To establish the changes of these compounds in this by-product, the hydrolysis, oxidation, hydration, and the enrichment in polyphenols come from olive oil were taken into account. Indeed, the increase of these compounds in by-



products is related to the stability in this matrix, and the continuous contribution for the olive-oil polyphenolic composition.

Fig. 2c shows the time course of the total content for all polyphenol families, tentatively calculated as the sum of the individual phenolic-compound concentrations. Simple phenols increased with by-product generation time. However, total secoiridoids decreased during the first four months. After this time, this family showed a gradual increase, probably due to the contribution of the olive-oil polyphenolic composition. The opposite trend was followed by elenolic acid derivatives and lignans. Concerning flavones, luteolin was the only compound quantified, which augmented in the first period quickly until the second month of by-product generation time, then remained almost constant to the end of the study.

Fig. 4 shows the time course of the individual phenolic compounds and derivatives in storage by-products. Over the entire 10 months, the most representative components in storage by-products were phenolic alcohols and elenolic acid derivatives. K_{el} and K_a values for these compounds are included in Table 3. In general, the values for the both constants were higher in the by-products than in the olive oil. In terms of phenolic alcohols, the time course of tyrosol was different from those found in olive oil. The concentration of this simple phenol increased for the first four months in parallel to the data registered in olive oil. However, after this time, the amount of tyrosol showed a gradual decline over time.

Other phenolic alcohols, such as hydroxytyrosol and its oxidized derivative showed a behaviour similar to that in olive oil. These compounds increased their concentrations over time, and at all stages of storage, by-products exhibited higher contents in these compounds than did olive oil. In fact, the K_a values for both compounds were higher in



by-products than in olive oil. The increase of these two molecules could have a dual origin: free phenols provided by olive oil plus hydroxytyrosol produced due to hydrolysis of oleuropein aglycone and its derivatives present in by-products.

Concerning secoiridoids, decarboxymethyl oleuropein aglycone showed a strong trend to disappear for the first 120 days. The lysis of this molecule may explain the increase in hydroxytyrosol. Furthermore, its free acidic moiety, the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid, also increased its amount considerably during this time. Thus, the increase in the hydroxytyrosol and elenolic acid derivative amount tested for four months of by-products generation may have been mainly at the expense of decarboxymethyl oleuropein aglycone. However, after this time, both simple and complex phenols followed the same trends. The amount of decarboxymethyl oleuropein aglycone rose from a minimal value of 52 to 134 mg per kg of by-products at the end of storage. This enrichment could come from the olive-oil phenolic composition. With regard other secoiridoid aglycones characterized in by-products, the concentrations hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone isomers showed trends that were generally similar to those of olive oil. However, the time course of oleuropein aglycone, which showed an irregular trend, remained almost constant at the end of the study. Indeed, this compound registered similar K_e and K_a values.

The noticeable increment in elenolic acid derivatives for the first 4 months appears to be due to the lysis of the oleuropein aglycone, and its decarboxymethylated form. These compounds are precursors of elenolic acid and the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid, respectively. After four months, the content in these compounds diminished, with different irregular trends. Thus, the increase in the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid and its hydrated derivative paralleled the decrease of the elenolic acid. This could be because elenolic acid could



have undergone changes due to loss of carboxymethyl groups, and subsequent hydration, increasing the amount of derivatives. Thus, their origin and behaviour during storage could be either the hydrolysis of the secoiridoid aglycones containing these acidic moieties or the degradation of free elenolic acid.

As can be seen in Fig. 4, the amount of luteolin increased over time. The levels of the acetoxypinoresinol and syringaresinol rose until three months of the by-product generation. This trend reversed in the following three months, and remained almost constant at the end of the study.

4. Conclusion

The results show the trend of the phenolic compounds in EVOO as well as by-products during storage and by-product generation time, these findings being of great value in establishing of the EVOO quality and storage by-product. The quantitative results of phenols and derivatives in EVOO and storage by-product suggest degradation pathways which were confirmed taking into account the half-life, K_{el} , and K_a for the complex phenols and their oxidized and hydrolysed derivatives. In fact, when the correlation for the pair oleuropein aglycone or decarboxymethyl oleuropein aglycon and their hydrolysed derivatives was evaluated in EVOO, the determination coefficients (r^2) proved higher than 0.950. On the other hand, by-products at all stages of the storage exhibited higher contents in hydroxytyrosol than olive oil because its K_a was higher in the by-products than in the olive oil. Given that this waste is enriched in polyphenols, mainly hydroxytyrosol, this study could help olive-oil producers to establish the optimal time for collecting this by-product as an alternative source of polyphenols with bioactive properties.



Acknowledgements

We are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for Project AGL2011-29857-C03-02 and a grant (FPU, AP2007-03245) and to the Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for Projects P09-CTS-4564, P10-FQM-6563 and P11-CTS-7625 and to GREIB.PT.2011.18 projects.

We thank Custodio Borrego and Jesús Dominguez from San Placido production plant (Seville, Spain) for supplying samples and Salvador Fernández-Arroyo, Isabel Borrás-Linares and David Arraez-Román from Functional Food Research and Development Center (Granada, Spain) for their invaluable help.



References

- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., et al. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, *12*, 1679-1719.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M. D., Fregapane, G. & G. Lercker (2009). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: An overview. *Italian Journal of Food Science*, *21*, 389-406.
- Bendini, A., Cerretani, L., Vecchi, S., Carrasco-Pancorbo, A. & G. Lercker (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4880-4887.
- Boselli, E., Di Lecce, G., Strabbioli, R., Pieralisi, G. & Frega, N. G. (2009). Are virgin olive oils obtained below 27 °C better than those produced at higher temperatures? *LWT - Food Science and Technology*, *42*, 748-757.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P. & Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5609-5614.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical reviews in food science and nutrition*, *49*, 218-236.



- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M. A. & Spencer, J. P. E. (2009). Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*, 897-903.
- De La Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M. & Lopez-Sabater M. C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4331-4340.
- Deiana, M., Corona, G., Incani, A., Loru, D., Rosa, A., Atzeri, A., et al. (2010). Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 3008-3016.
- Esti, M., Contini, M., Moneta, E., & F. Sinesio (2009). Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*, *113*, 1095-1100.
- Fernández-Jarne, E., Martínez-Losa, E., Prado-Santamaría, M., Brugarolas-Brufau, C., Serrano-Martínez, M., & Martínez-González M. Á. (2002). Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consumption: A case-control study in Spain. *International journal of epidemiology*, *31*, 474-480.
- Frankel, E. N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology*, *4*, 220-225.



- Fu, S., Arraez-Roman, D., Menendez, J. A., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 51-59.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., et al. (2009). Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*, 117, 589-598.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J.A., Segura-Carretero, A., et al. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51, 416-429.
- Incani, A., Deiana, M., Corona, G., Vafeiadou, K., Vauzour, D., Dessì, M. A., et al. (2010). Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H₂O₂-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 788-796.
- Kontou, N., Psaltopoulou, T., Panagiotakos, D., Dimopoulos, M. A., & Linos, A. (2011). The mediterranean diet in cancer prevention: A review. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1065-1078.



- Lavelli, V., Fregapane, G., & Desamparados Salvador, M. (2006). Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3002-3007.
- Lerma-Garcia, M. J., Simo-Alfonso, E. F., Chiavaro, E., Bendini, A., Lercker, G. & Cerretani, L. (2009). Study of Chemical Changes Produced in Virgin Olive Oils with Different Phenolic Contents during an Accelerated Storage Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7834-7840.
- Lozano-Sanchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, *21*, 201-211.
- Lozano-Sánchez, J., Giambanelli, E., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., et al. (2011). Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 11491-11500.
- Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A., Menendez, J. A. Oliveras-Ferraros, C., Cerretani, L., & Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9942-9955.
- Martínez-González, M. A., Fernández-Jarne, E., Serrano-Martínez, M., Martí, A., Martínez, J. A., & Martín-Moreno, J. M. (2002). Mediterranean diet and reduction



in the risk of a first acute myocardial infarction: An operational healthy dietary score. *European journal of nutrition*, 41, 153-160.

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

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, Jr. P. D., & Robards, K. (2005). Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9911-9920.

Psaltopoulou, T., Kosti, R. I., Haidopoulos, D., Dimopoulos, M., & Panagiotakos, D. B. (2011). Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: A systematic review and a meta-analysis of 13800 patients and 23340 controls in 19 observational studies. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1-16.

Rios, J. J., Gil, M. J. & Gutierrez-Rosales, F. (2005). Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1093, 167-176.

Rovellini, P., & Cortesi N (2002). Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Rivista Italiana della Sostanze Grasse*, 69, 1-14.



- Saitta, M., Salvo, F., Di Bella, G., Dugo, G. & La Torre, G. L. (2009). Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry*, *112*, 525-532.
- Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M. J., Quesada-Granados, J. J., Villalón-Mir, M. & Lopez de la Serrana, H. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *114*, 194-204.
- Suárez, M., Romero, M., Ramo, T. & Motilva, M. (2011). Stability of a phenol-enriched olive oil during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*, 894-903.
- Suarez, M., Macia, A., Romero, M., & Motilva, M. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, *1214*, 90-99.
- Suarez, M., Romero, M., Ramo, T., Macia, A., & Motilva, M. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1463-1472.
- Valli, E., Bendini, A., Cerretani, L., Fu, S., Segura-Carretero, A. & Cremonini, M. A. (2010). Effects of heating on virgin olive oils and their blends: Focus on modifications of phenolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 8158-8166.



Tables

Table 1. Proposed phenolic compounds and their derivatives characterized in EVOO and storage by-product by HPLC-ESI-TOF-MS

Table 2. Correlation among the main complex phenols and their oxidized and hydrolyzed derivatives obtained to EVOO. Half-life ($t_{1/2}$) and elimination and appearance rate constants (K_{el} and K_a) for the main secoiridoids and derivatives characterized in olive oil.

Table 3. Half-life ($t_{1/2}$) and elimination and appearance rate constants (K_{el} and K_a) for the main secoiridoids and derivatives characterized in storage by-products.



Table I. Proposed phenolic compounds and their derivatives characterized in EVOO and storage by-product by HPLC-ESI-TOF-MS.

Peak	Phenolic and other polar compounds				EVOO			Waste		
	Compound	Molecular Formula	T_r (min)	m/z calcd	m/z exptl	Error	$mSigma$	m/z exptl	Error	$mSigma$
1	Quinic acid	$C_7H_{12}O_6$	2.1	191.0561	191.0561	0.1	10.4	191.0592	4.8	2.3
2	Oxidized hydroxytyrosol	$C_8H_8O_3$	3.9	151.0401	151.0409	-4.9	5.9	151.0410	-5.3	32.7
3	Uk1	$C_9H_{14}O_6$	5.0	217.0718		ND ^a		217.0727	-4.6	24.6
4	Uk2	$C_7H_{10}O_4$	6.7	157.0506		ND ^a		157.0516	-3.7	7.1
5	Hydroxytyrosol	$C_8H_{10}O_3$	8.1	153.0557	153.0560	1.7	13.4	153.0546	-2.1	24.1
6	Hydrated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	$C_9H_{14}O_5$	8.3	201.0768		ND ^a		201.0778	4.5	22.3
7	Hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	$C_9H_{12}O_5$	9.2	199.0618		ND ^a		199.0615	1.7	37.7
8	Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$	9.9	137.0608	137.0608	0.1	11.0	137.0599	-2.9	25.5
9	Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	$C_{10}H_{14}O_5$	10.4	213.0768	213.0758	4.8	13.9	213.0768	0.4	40.6
10	Uk3	$C_{20}H_{24}O_9$	10.7	407.1348		ND ^a		407.1352	-1.0	10.2
11	Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	$C_9H_{12}O_4$	11.0	183.0663	183.0664	-0.7	15.4	183.0676	2.5	33.1
12	Hydroxy- decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (I)	$C_{17}H_{30}O_7$	12.0	335.1136	335.1119	5.0	11.7	335.1121	3.9	15.9
13	Uk4	$C_{17}H_{18}O_6$	12.2	317.1031		ND ^a		317.1040	-3.0	16.6
14	Dehydro -oleuropein aglycone or isomer (I)	$C_{10}H_{20}O_8$	12.6	375.1085	375.1080	1.4	32.9	375.1103	-5.2	26.6
15	Uk5	$C_9H_{14}O_2$	13.5	153.0921		ND ^a		153.0935	-4.9	19.0
16	Aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	$C_{10}H_{16}O_5$	14.0	215.0925		ND ^a		215.0945	4.3	11.8
17	Hydroxytyrosol acetate	$C_{10}H_{12}O_4$	14.4	195.0663	195.0659	1.7	49.8		ND	
18	Uk6	$C_{11}H_{16}O_6$	14.7	243.0874		ND ^a		243.0892	-5.4	13.6
19	Uk7	$C_{11}H_{16}O_6$	15.2	243.0874		ND ^a		243.0891	-5.2	25.7
20	Elenolic acid	$C_{11}H_{14}O_6$	15.4	241.0718	241.0726	3.4	28.5	241.0727	3.6	19.7
21	Hydroxylated form of elenolic acid	$C_{11}H_{14}O_7$	15.9	257.0667	257.0666	0.1	9.6	257.0667	0.1	9.7
22	Decarboxymethyl-oleuropein aglycone	$C_{17}H_{30}O_6$	16.6	319.1187	319.1169	4.7	1.8	319.1167	5.4	11.6



23	Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer(II)	C ₁₇ H ₃₀ O ₇	16.9	335.1136	335.1125	3.3	16.1	335.1120	4.7	25.2
24	Syringaresinol	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	18.2	417.1555	417.1519	5.3	8.5	417.1533	3.9	21.0
25	Uk8	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	18.8	257.1031		ND ^a		257.1044	-3.4	22.3
26	Pinoresinol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	18.9	357.1344	357.1324	5.8	3.1		ND ^a	
27	Decarboxymethyl-ligstroside aglycone	C ₁₇ H ₃₀ O ₅	19.2	303.1229	303.1221	4.8	2.1		ND ^a	
28	Acetoxypinoresinol	C ₂₂ H ₃₄ O ₈	19.4	415.1398	415.1382	5.7	2.4	415.1395	3.4	14.7
29	Ligstroside aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	19.9	361.1293	361.1279	4.6	10		ND ^a	
30	Ligstroside aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	20.4	361.1293	361.1276	4.7	14.2		ND ^a	
31	Ligstroside aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	20.7	361.1293	361.1277	4.5	10.4		ND ^a	
32	Uk9	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁	21.4	541.1715		ND ^a		541.1716	-0.1	8.8
33	Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (II)	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	21.6	375.1085	375.1081	1.2	51.2		ND ^a	
34	Uk10	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	22.7	379.1398		ND ^a		379.1412	-3.5	28.4
35	10-Hydroxy-oleuropein aglycone	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	22.9	393.1191	393.1178	3.2	19.4		ND ^a	
36	Oleuropein aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	23.1	377.1242	377.1242	0.1	5.8	377.1221	5.2	35
37	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	23.8	285.0405	285.0407	1	42.3	285.0419	6.0	35.8
38	Oleuropein aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	24.3	377.1242	377.1249	-2.5	10.3	377.1242	-2.7	13.7
39	Oleuropein aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	24.9	377.1242	377.1240	0.4	22.1		ND ^a	
40	Ligstroside aglycone or isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	25.5	361.1293	361.1284	2.4	14.0		ND ^a	
41	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	25.8	269.0455	269.0451	1.5	16.6	269.0449	5.0	19.5
42	Methyl-oleuropein aglycone	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	26.0	391.1398	391.1389	2.4	17.3		ND ^a	

^a ND, compounds no detected



SECCIÓN I

Table 2. Correlation among the main complex phenols and their oxidized and hydrolyzed derivatives obtained to EVOO. Half-life ($t_{1/2}$) and elimination and appearance rate constants (K_{el} and K_a) for the main secoiridoids and derivatives characterized in olive oil.

Ratio secoiridoid complex/simple phenols	Exponential curve		r^2
Decarboxymethyl oleuropein aglycone model: DOA / (HYTY+Ox-HYTY+DEA)	$y = 25.79e^{-0.0059x}$		0.972
Oleuropein aglycone model: Ol Agl / (HYTY+Ox-HYTY+EA)	$y = 6.12e^{-0.0053x}$		0.954
Main oleuropein aglycone derivatives model: (DOA+Ol Agl+OH-DOA I) / (HYTY+Ox-HYTY+EA+DEA+10-OH-Ol Agl+ OH-DOA II)	$y = 17.22e^{-0.0054x}$		0.952
Compound	Half-life ^a	K_{el} ^b	K_a ^b
Oleuropein aglycone (Ol Agl)	405±38	1.72±0.05	-
Decarboxymethyl oleuropein aglycone (DOA)	445±31	1.6±0.1	-
Hydroxy- decarboxymethyl oleuropein aglycone (I) (OH-DOA I)	86±7	8.0±0.6	-
Hydroxy- decarboxymethyl oleuropein aglycone (II) (OH-DOA II)	-	-	6.3±0.4
Ligstroside aglycone (Lig Agl)	-	3.8±0.4	4.8±0.4
Decarboxymethyl-ligstroside aglycone	-	7.8±0.5	12.6±0.5
Hydroxytyrosol (HYTY)	-	5.46±0.04	9.2±0.7
Oxidized hydroxytyrosol (Ox-HYTY)	-	10.9±0.9	13.7±0.9
Tyrosol	-	-	5.9±0.3
Elenolic acid (EA)	-	9.9±0.6	13.8±0.3
Dyaldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (DEA)	-	-	5.5±0.2

^a Value expressed in days; ^b Value = $(X \pm SD) \times 10^{-3}$ mg compound/kg EVOO per day



Table 3. Half-life ($t_{1/2}$) and elimination and appearance rate constants (K_{el} and K_a) for the main secoiridoids and derivatives characterized in storage by-products.

Compound	K_{el}^a	K_a^a
Oleuropein aglycone	14.3±0.9	16.3±0.8
Decarboxymethyl oleuropein aglycone	14.0±0.6	5.8±0.2
Hydroxy- decarboxymethyl oleuropein aglycone (I)	19.6 ± 0.3	-
Hydroxy- decarboxymethyl oleuropein aglycone (II)	-	20.6±0.3
Hydroxytyrosol	-	469±22
Oxidized hydroxytyrosol	-	2484±71
Tyrosol	3.33±0.04	25±2
Elenolic acid	16.2±0.3	50±1

^a Value = $(X \pm SD) \times 10^{-3}$ mg compound/kg storage by-product per day



Figure Captions

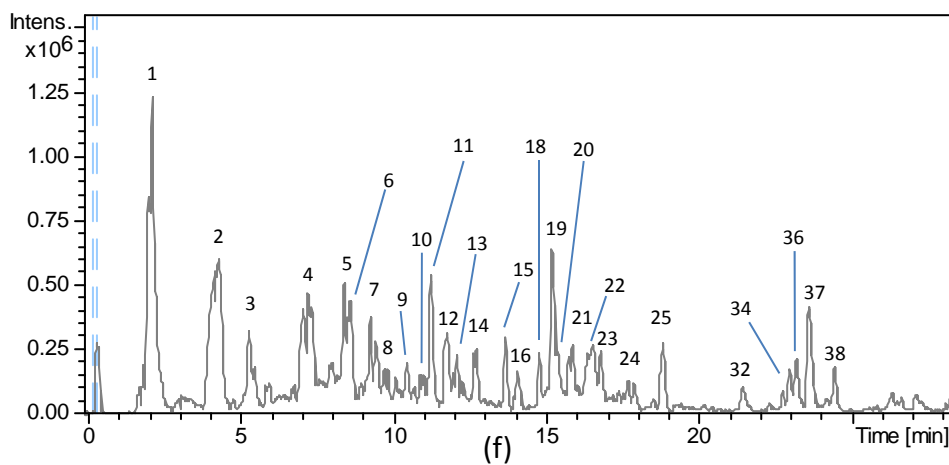
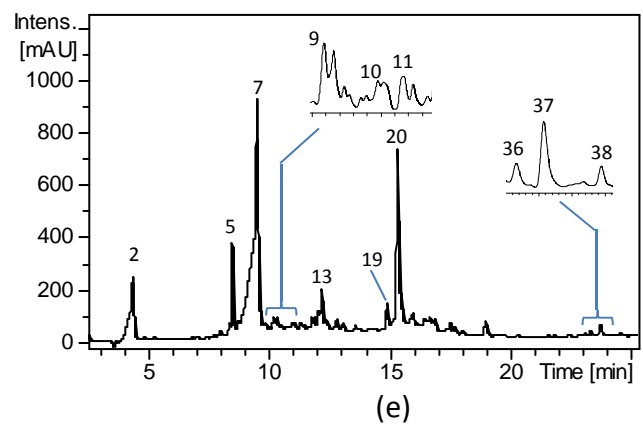
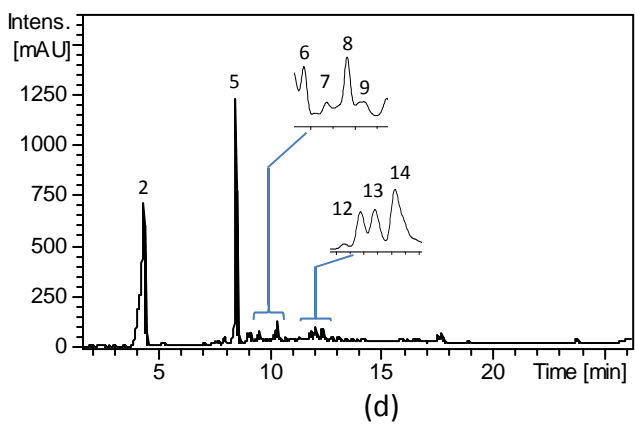
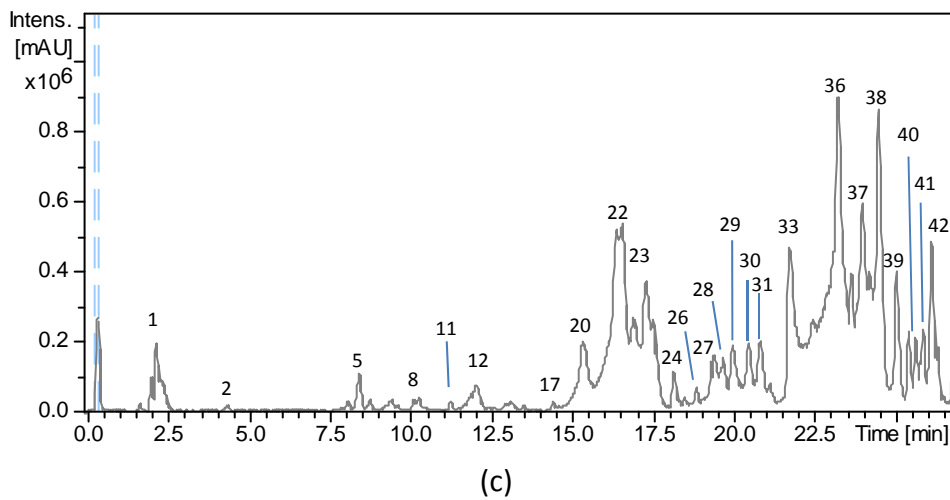
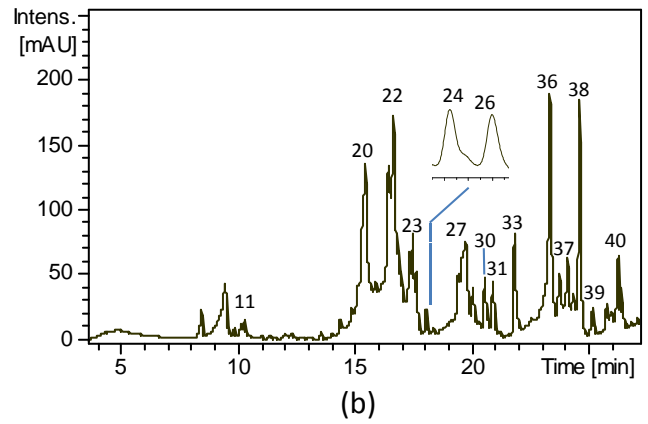
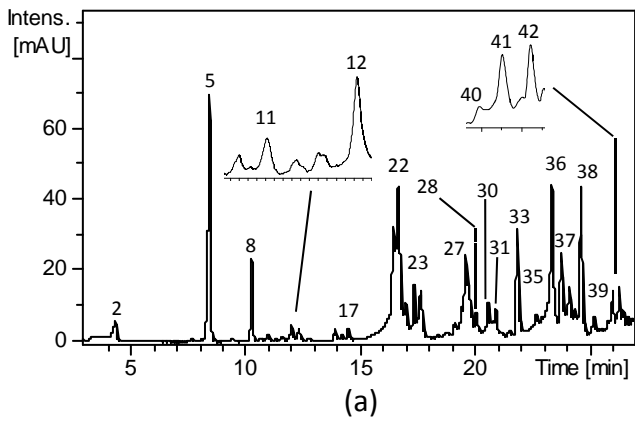
Fig.1. HPLC-UV chromatograms detected at 280nm (a, d) and 240 (b, e) nm of a representative EVOO phenolic extract (a, b) and by-products extract one (d, e). Base peak chromatograms (BPC) of the same and EVOO phenolic (c) and solid waste extract (f) obtained by HPLC-ESI-TOF.

Fig.2. (a) Main phenolic compounds and derivate structures identified in samples. Secoiridoid aglycones: oleuropein aglycone ($R_1=OH$), ligstroside aglycone ($R_1=H$), decarboxymethyl oleuropein aglycone ($R_2=OH$, $R_3=H$), decarboxymethyl ligstroside aglycone ($R_2=H$, $R_3=H$), and hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone ($R_2=R_3=OH$). Lignans: pinoresinol ($R_4=R_5= R_6=H$), acetoxypinoresinol ($R_4=COOCH_3$, $R_5=R_6=H$), and syringaresinol ($R_4=H$, $R_5= R_6=OCH_3$). Flavones: apigenin ($R_7=H$) and luteolin ($R_7= OH$). **(b)** Total phenolic content in EVOO and by-product **(c)** for each polyphenol family calculated as sum of the individual phenolic-compound concentrations.

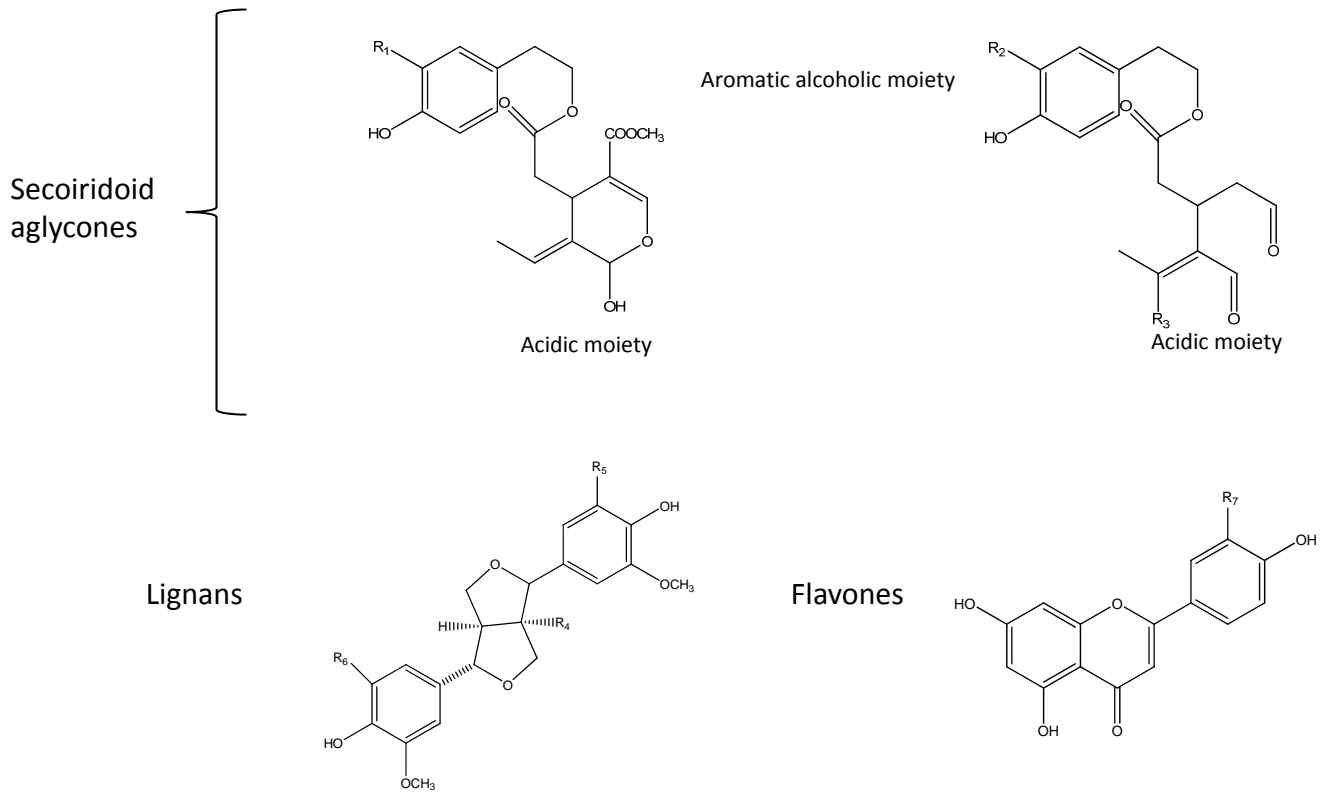
Fig. 3. Monitoring of the individual phenolic compound in EVOO over time.

Fig. 4. Time course of the individual phenolic compounds and derivatives in storage by-products.

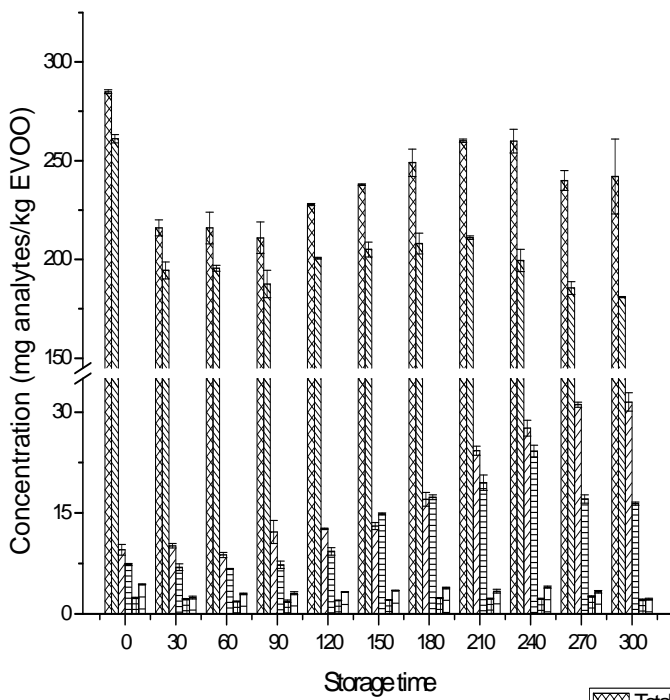




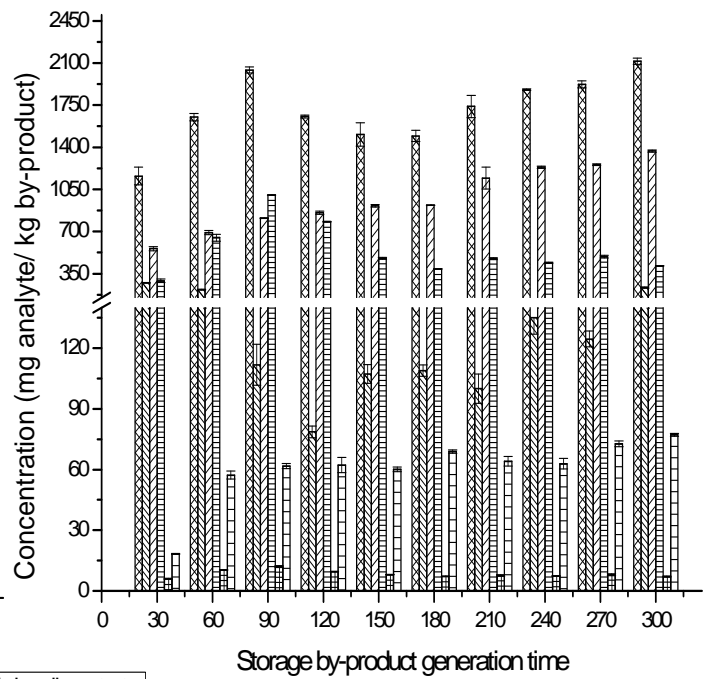
SECCIÓN I



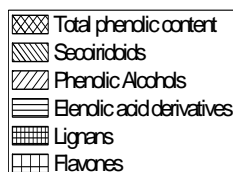
(a)

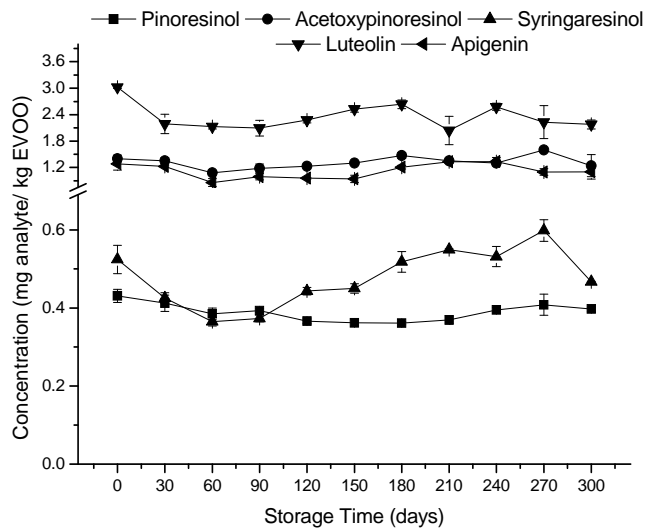
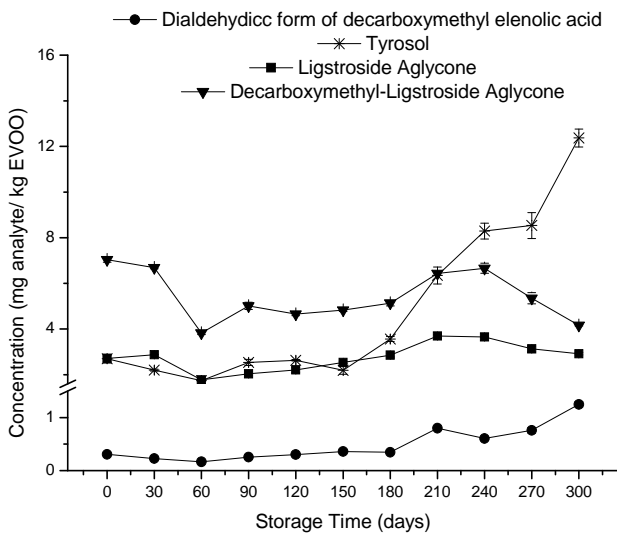
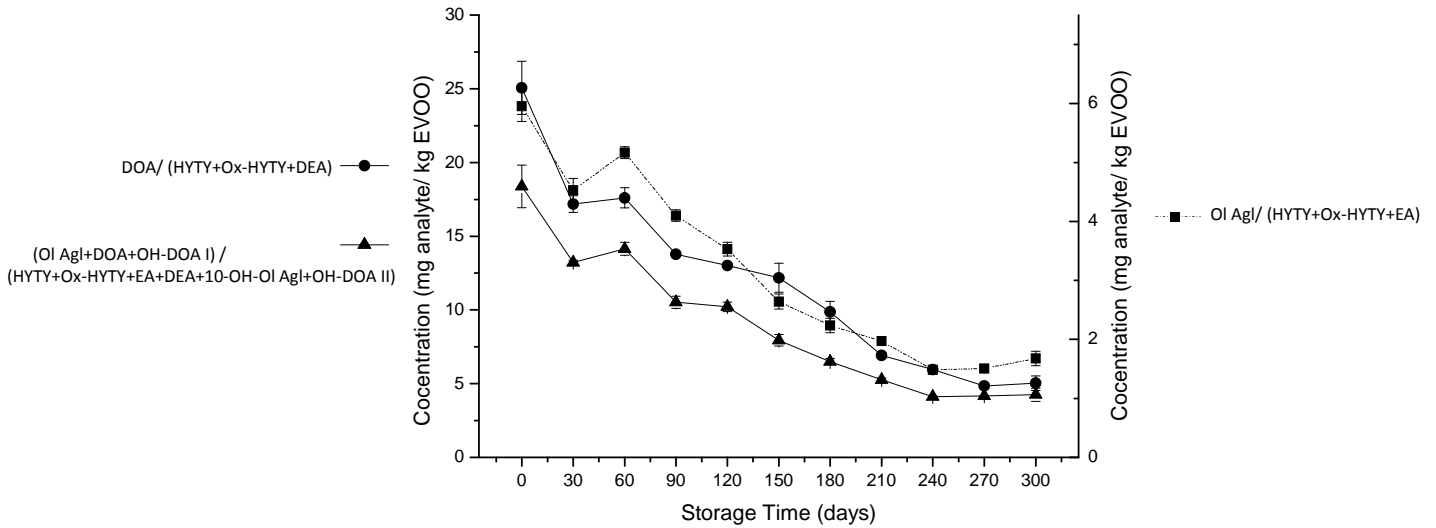
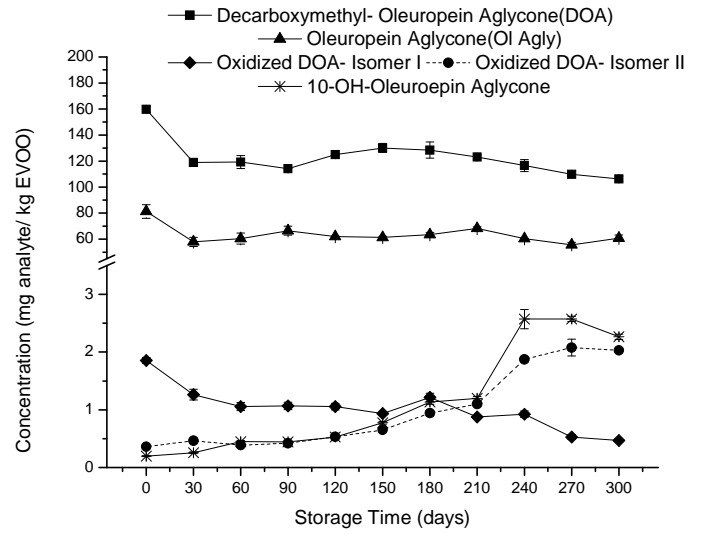
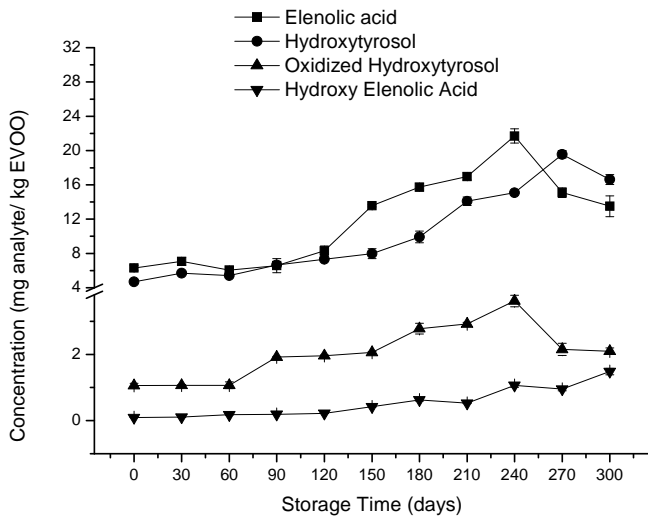


(b)

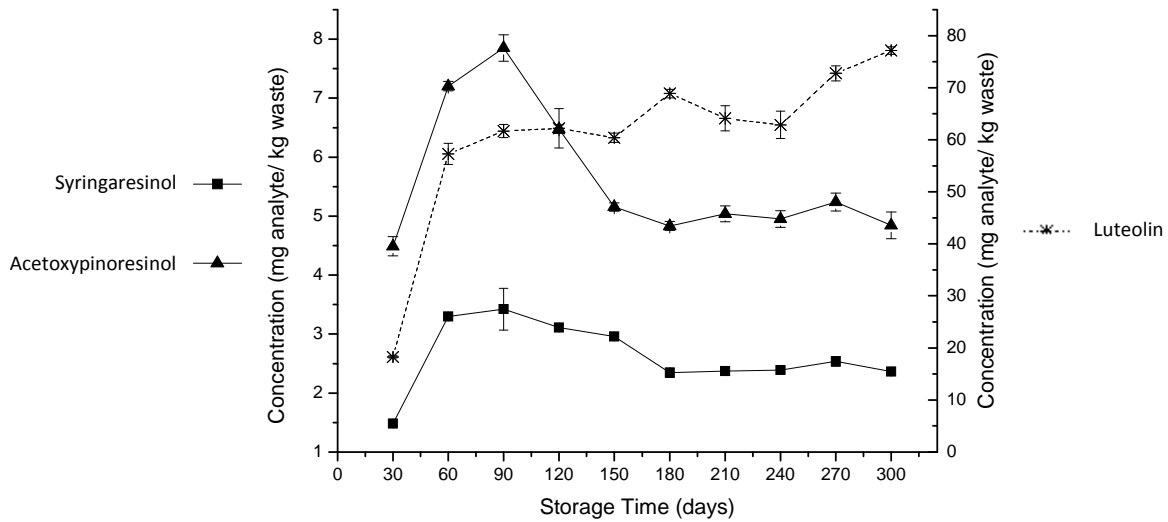
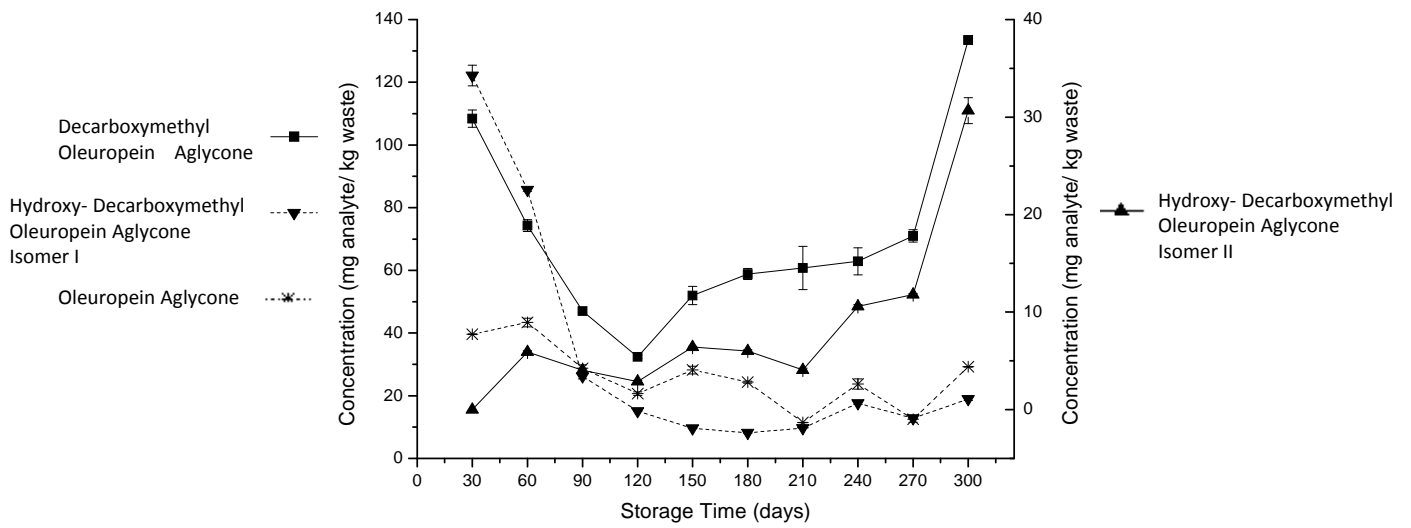
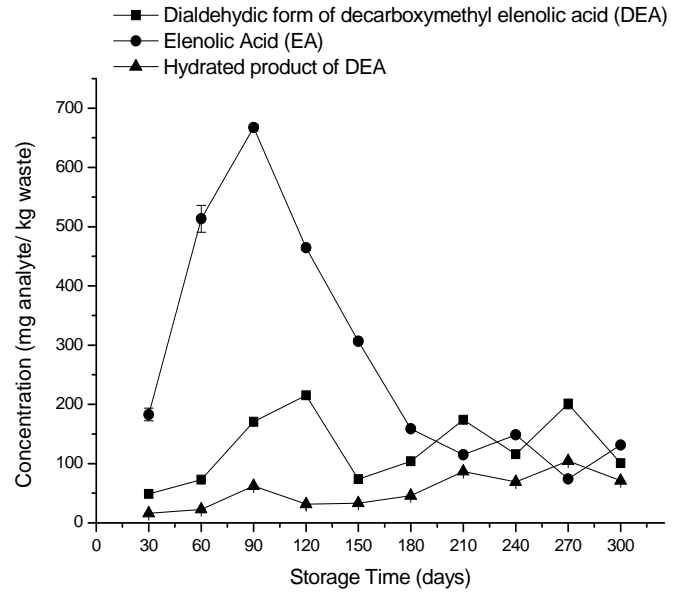
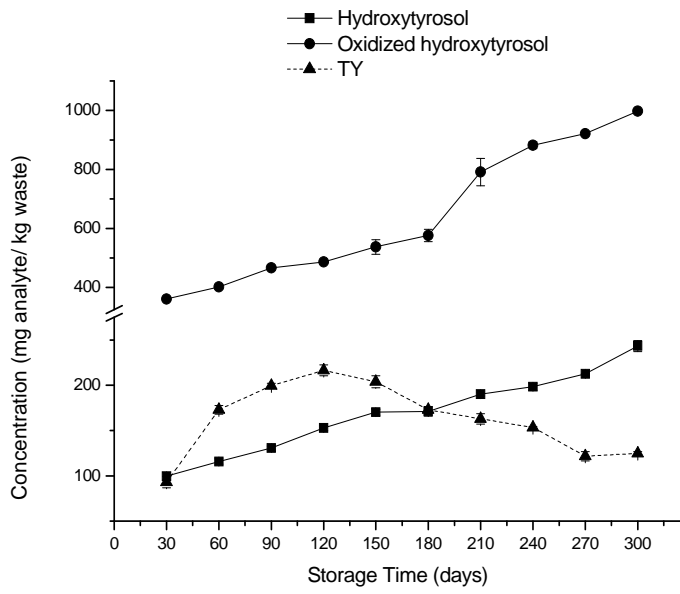


(c)





SECCIÓN I



Supporting Information

Table 1S. Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of EVOO. Value = $X \pm SD$

Table 2S. Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of wastes. Value = $X \pm SD$



Table 1S (a). Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of EVOO. Value = $\bar{X} \pm SD$

Sample	Hojiblanca EVOO variety							
	0	30	60	90	120	150		
Storage Time (days)								
<i>Total Phenyl Alcohol Contents</i>	9.5±0.8	10.2±0.3	8.8±0.4	12±2	12.6±0.1	13.1±0.5		
Hydroxytyrosol	4.7±0.2	5.7±0.08	5.4±0.1	6.7±0.2	7.33±0.02	7.9±0.6		
Tyrosol	2.71±0.03	2.20 ± 0.04	1.744 ± 0.04	2.5 ± 0.1	2.63 ± 0.03	2.2 ± 0.2		
Hydroxytyrosol acetate	1.14±0.02	1.11±0.04	0.60±0.03	0.809±0.009	0.78±0.05	0.52±0.01		
Oxidized hydroxytyrosol	1.06±0.07	1.06±0.02	1.07±0.09	1.92±0.02	1.96±0.03	2.06±0.03		
<i>Total Secoiridoid Contents</i>	261±2	195±4	195±1	186±7	200.6±0.4	205.1±3.8		
Oleuropein aglycon	81±5	58±3	60±4	66±3	62.1±0.3	61.2±0.9		
Decarboxymethyl-oleuropein aglycone	160±2	119±2	119±5	114.03±0.02	124.8±0.2	130±3		
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (I)	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ		
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (II)	3.49±0.05	3.8±0.2	2.60±0.08	2.9±0.2	3.05±0.09	2.6±0.1		
Methyl-oleuropein aglycone	3.7±0.2	2.6±0.1	1.37±0.09	2.0±0.1	1.72±0.09	1.44±0.07		
10-Hydroxy-oleuropein aglycone	0.195±0.007	0.26±0.01	0.45±0.02	0.44±0.01	0.53±0.01	0.77±0.02		
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (I)	1.85±0.05	1.26±0.09	1.06±0.07	1.08±0.07	1.06±0.06	0.94±0.03		
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (II)	0.361±0.004	0.47±0.01	0.388±0.003	0.421±0.001	0.53±0.02	0.65±0.02		
Ligstroside aglycone	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.78 ± 0.05	2.0 ± 0.2	2.21 ± 0.02	2.54 ± 0.06		
Decarboxymethyl-ligstroside aglycone	7.033 ± 0.006	6.69 ± 0.05	3.83 ± 0.08	5.02 ± 0.06	4.65 ± 0.07	4.83 ± 0.05		
<i>Total Lignan Contents</i>	2.4±0.1	2.19±0.07	1.87±0.05	1.9±0.1	1.99±0.03	2.08±0.01		
Pinoresinol	0.43±0.02	0.41±0.02	0.39±0.02	0.393±0.005	0.366±0.006	0.362±0.008		
Acetoxypinoresinol	1.40±0.08	1.35±0.07	1.08±0.04	1.18±0.09	1.23±0.03	1.30±0.03		
Syringaresinol	0.52±0.04	0.43±0.01	0.36±0.01	0.367±0.009	0.443±0.009	0.45±0.01		
<i>Total Flavone Contents</i>	4.39±0.05	2.4±0.2	2.9±0.1	3.1±0.2	3.24±0.06	3.47±0.02		
Luteolin	3.02±0.03	1.2±0.1	2.13±0.05	2.1±0.2	2.28±0.07	2.53±0.07		
Apigenin	1.3±0.1	1.22±0.02	0.86±0.06	0.99±0.08	0.96±0.02	0.94±0.08		
<i>Total Elenolic Acid and Derivatives Content</i>	7.3±0.2	6.9±0.5	6.71±0.04	7.3±0.6	9.3±0.5	14.9±0.2		
Elenolic acid	6.3±0.3	6.1±0.5	6.06±0.05	6.6±0.1	8.3±0.6	13.6±0.1		
Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	0.31±0.02	0.228±0.007	0.169±0.001	0.26±0.02	0.304±0.005	0.36±0.02		
Hydroxy elenolic acid	0.18±0.03	0.207±0.003	0.175±0.004	0.196±0.001	0.218±0.005	0.42±0.01		
Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	0.46±0.03	0.53±0.05	0.301±0.009	0.28±0.01	0.459±0.003	0.55±0.02		
<i>Total Phenolic Contents</i>	285±1	216±4	216±8	211±8	227.8±0.5	237.9±0.5		
<i>Other Polar Compounds : Quinic acid</i>	8.1±0.6	7.0±0.2	7.8±0.3	7.3±0.5	7.4±0.2	7.9±0.2		

NQ: Not quantified. Compound detected, but their concentration is between the detection and quantification limits.



Table 1S (b). Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of EVOO. Value = X ± SD

Sample	Hojiblanca EVOO variety				
	180	210	240	270	300
Storage Time (days)	180	210	240	270	300
<i>Total Phenyl Alcohol Contents</i>	17±1	24.3±0.7	27.1±0.9	31.1±0.4	32±1
Hydroxytyrosol	9.9±0.7	14.1±0.5	15.1±0.1	19.6±0.4	16.6±0.6
Tyrosol	3.6 ± 0.1	6.3 ± 0.3	8.3 ± 0.6	8.5 ± 0.7	12.4 ± 0.4
Hydroxytyrosol acetate	0.76±0.07	0.90±0.06	0.842±0.004	0.71±0.06	0.45±0.001
Oxidized Hydroxytyrosol	2.8±0.1	2.92±0.05	3.6±0.2	2.15±0.18	2.09±0.09
<i>Total Secoiridoid Contents</i>	208±5	211.0±0.8	199±5	186±3	180.9±0.2
Oleuropein aglycone	64±2	68±1	60.4±0.2	56±2	61±3
Decarboxymethyl-oleuropein aglycone	129±6	123±2	117±5	110±2	106±2
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (I)	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (II)	3.5±0.2	3.99±0.04	4.1±0.3	3.9±0.2	3.21±0.05
Methyl-oleuropein aglycone	1.71±0.09	2.5±0.2	2.8±0.2	2.4±0.1	2.15±0.03
10-Hydroxy-oleuropein aglycone	1.14±0.04	1.20±0.03	2.6±0.2	2.57±0.05	2.26±0.05
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (I)	1.22±0.07	0.88±0.02	0.92±0.05	0.53±0.05	0.47±0.01
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (II)	0.94±0.04	1.10±0.04	1.88±0.05	2.08±0.05	2.029±0.008
Ligstroside aglycone	2.9 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.66 ± 0.02	3.1 ± 0.3	2.92 ± 0.05
Decarboxymethyl ligstroside aglycone	5.14±0.02	6.4 ± 0.4	6.66 ± 0.09	5.35 ± 0.05	4.16 ± 0.03
<i>Total Lignan Contents</i>	2.4±0.1	2.27±0.03	2.24±0.07	2.61±0.08	2.1±0.1
Pinosresinol	0.361±0.004	0.37±0.01	0.395±0.006	0.41±0.03	0.397±0.005
Acetoxypinosresinol	1.47±0.07	1.35±0.03	1.31±0.04	1.60±0.05	1.24±0.09
Syringaresinol	0.52±0.03	0.549±0.002	0.53±0.03	0.60±0.03	0.467±0.001
<i>Total Flavone Contents</i>	3.8±0.1	3.4±0.3	4.0±0.2	3.3±0.2	2.2±0.1
Luteolin	2.64±0.09	2.0±0.1	2.58±0.08	2.2±0.2	1.2±0.1
Apigenin	1.21±0.04	1.33±0.04	1.3±0.1	1.10±0.08	1.1±0.1
<i>Total Elenolic Acid and Derivatives Content</i>	17.3±0.4	20±1	24.2±0.9	17.1±0.6	16.5±0.2
Elenolic acid	15.7±0.4	16.9±0.4	21.7±0.8	15.1±0.6	14±1
Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	0.35±0.03	0.80±0.01	0.61±0.03	0.76±0.05	1.25±0.05
Hydroxy elenolic acid	0.62±0.03	0.52±0.01	1.07±0.06	0.95±0.05	1.48±0.02
Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	0.69±0.06	0.588±0.005	0.44±0.02	0.30±0.03	0.224±0.003
<i>Total Phenolic Contents</i>	249±7	260.2±0.9	260±6	240±5	242±19
<i>Other Polar Compounds</i> : Quinic acid	7.5±0.4	7.9±0.3	6.4±0.5	4.4±0.3	4.7±0.2

NQ: Not quantified. Compound detected, but their concentration is between the detection and quantification limits.



Table 2S (a). Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of storage by-product. Value = $X \pm SD$

Sample	Wastes					
	30	60	90	120	150	
Storage by-product generation time (days)						
<i>Total Phenyl Alcohol Contents</i>	558±17	690±17	810±3	856±13	912±11	
Hydroxytyrosol	100±4	116±3	131±2	153±3	170±3	
Tyrosol	93±6	173±5	200±3	216±6	204±7	
Oxidized Hydroxytyrosol	361±7	402±7	466±2	487.1±0.3	538±5	
<i>Total Secoiridoid Contents</i>	273±3	217±2	112±10	79±2	107±5	
Oleuropein aglycon	39.61±0.08	43±1	29±1	20.7±0.6	28±1	
Decarboxymethyl-oleuropein aglycone	108±3	74±2	47.0±0.5	32.4±0.6	52±3	
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (I)	3.0±0.2	7.7±0.6	6.7±0.2	7.9±0.6	10±0.2	
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (I)	122±3	85.7±0.5	26.2±0.8	15.12±0.05	9.62±0.08	
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (II)	NQ	5.9±0.1	4.1±0.1	2.9±0.1	6.41±0.09	
<i>Total Lignan Contents</i>	6.0±0.2	10.4±0.1	11.4±0.5	9.6±0.1	8.1±0.1	
Acetoxypinosinol	4.5±0.2	7.20±0.08	7.9±0.2	6.48±0.07	5.16±0.07	
Syringaresinol	1.48±0.03	3.29±0.05	3.42±0.06	3.11±0.05	2.96±0.04	
<i>Total Flavone Contents</i>	18.3±0.2	57±2	62±1	62±4	60.08±1.08	
Luteolin	18.3±0.2	57±2	62±	62±4	60.08±1.08	
<i>Total Elenolic Acid and Derivatives Content</i>	291±15	648±27	1004±1	781±3	477±8	
Elenolic acid	183±11	513±23	667±6	464±4	307±4	
Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	49.0±0.9	72.8±0.9	171±3	215±2	74±4	
Hydrated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	15.9±0.3	22.8±0.2	62.3±0.3	31.4±0.2	33±0.9	
Hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	16.3±0.1	22.1±0.3	26.7±0.5	23.0±0.6	23.5±0.3	
Aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	7.7±0.2	14.1±0.2	43±1	47.7±0.4	36.9±0.5	
Hydroxy elenolic acid	5.1±0.2	10.9±0.3	20.6±0.7	16.23±0.03	9.2±0.4	
Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	4.4±0.2	5.8±0.2	7.0±0.3	5.85±0.09	12.3±0.6	
<i>Total Phenolic Contents</i>	1161±73	1650±31	2042±25	1656±12	1506±97	
			<i>Other Polar Compounds</i>			
Quinic acid	533±21	673±23	739±13	694±21	659±25	

NQ: Not quantified. Compound detected, but their concentration is between the detection and quantification limits.

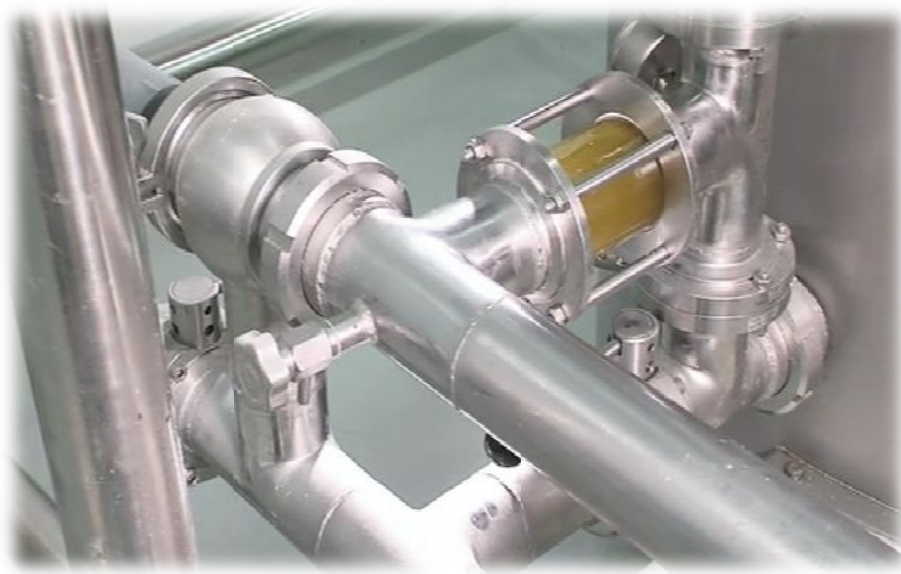


Table 2S (b). Quantitative results expressed in mg analyte/ kg of storage by-product. Value = $X \pm SD$

Sample	Hojiblanca EVOO variety				
	Phenolic Compounds and Derivatives				
Storage by-product generation time (days)	180	210	240	270	300
<i>Total Phenyl Alcohol Contents</i>	918.6±0.2	1144±90	1234±9	1256±7	1369±10
Hydroxytyrosol	171±5	190±2.2	198±4	212±0.7	243±6
Tyrosol	173±3	163±6	153.5±0.9	122±5	125±2
Oxidized Hydroxytyrosol	576±2	791±7	882±12	921±2	998±5
<i>Total Secoiridoid Contents</i>	109±3	100±7	135±8	125±4	234±5
Oleuropein aglycon	24.4±0.4	11.44±0.02	24±2	12.5±0.9	29.21±0.04
Decarboxymethyl oleuropein aglycone	59±2	61±7	63±4	71±2	133.5±0.8
Dehydro-oleuropein aglycone or isomer (I)	11.5±0.5	13.5±0.3	18.9±0.6	15.0±0.4	23.2±0.3
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (I)	8.2±0.2	9.69±0.07	17.6±0.4	12.8±0.1	19.0±0.5
Hydroxy-decarboxymethyl oleuropein aglycone or isomer (II)	6.0±0.1	4.1±0.2	10.6±0.2	11.80±0.09	31±1
<i>Total Lignan Contents</i>	7.18±0.04	7.4±0.4	7.3±0.1	7.9±0.5	7.2±0.2
Acetoxy-pinioresinol	4.83±0.08	5.0±0.1	4.9±0.1	5.2±0.2	4.8±0.2
Syringaresinol	2.35±0.08	2.37±0.07	2.39±0.04	2.54±0.08	2.364±0.003
<i>Total Flavone Contents</i>	68.9±0.8	64±2	63±3	73±1	77.1±0.7
Luteolin	68.9±0.8	64±2	63±3	73±1	77.1±0.7
<i>Total Elenolic Acid and Derivatives Content</i>	389±2	474±7	439±5	491±10	414±1
Elenolic acid	159±4	115±3	149±4	74±2	131±3
Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	104±2	174±4	115.9±0.5	201±8	101±4
Hydrated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	46±0.4	86.8±0.3	69±1	104±1	71.1±0.5
Hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	23±1	37±4	36.9±0.3	26±2	41±1
Aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	30.1±0.7	32.9±0.5	27.2±0.7	27.3±0.4	17.9±0.1
Hydroxy elenolic acid	12.0±0.1	9.9±0.5	23.5±0.6	37.0±0.4	33.1±0.2
Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	14.4±0.4	20.8±0.3	18.38±0.05	23±1	19.5±0.3
<i>Total Phenolic Contents</i>	1494±48	1739±93	1878±6	1922±29	2115±25
	<i>Other Polar Compounds</i>				
Quinic acid	540.3±8	733±13	686±21	670±12	652±10



New advances in extra-virgin olive oil filtration systems



Nuevas perspectivas en tecnología de filtración del aceite de oliva virgen extra

Sección II

**Filtration process of extra-virgin olive oil:
effect on minor components, oxidative stability and
sensorial and physicochemical characteristics**



**Filtración del aceite de oliva virgen extra: efecto en
los componentes minoritarios, estabilidad
oxidativa y características físico-químicas y
sensoriales**

CAPÍTULO 4



Review

Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics

J. Lozano-Sánchez^a,
 L. Cerretani^{b,*}, A. Bendini^b,
 A. Segura-Carretero^a and
 A. Fernández-Gutiérrez^a

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^bDipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, I-47521 Cesena (FC), Italy (Tel.: +39 0547338121; fax: +39 0547382348; e-mail: lorenzo.cerretani@unibo.it)

The aim of this review is to describe different filtration systems of extra virgin olive oil (EVOO): a) to remove suspended solids, b) to eliminate humidity and making the oil brilliant, c) cross-flow filtration and d) new filtration systems based on filter bag and the flow of an inert gas. During filtering operations quantitative and qualitative changes take place, especially on minor components, which are of great value in establishing of the quality of

EVOO. The present review focuses on the effect of these different filtration systems in the minor fraction of EVOO with particular emphasis on waxes, carbonyl compounds, pigments, lipophilic and hydrophilic phenols, phospholipids and proteins.

Introduction

The Mediterranean region is positioned at the convergence of the hot Saharan and the cool Atlantic climates. Its geographical position, at the intersection between the Eurasian and the African continents, results in a dry subtropical climatic zone characterized by dry summers with high sun exposure, and mild winters, such as rainfall mostly in spring and autumn. It provide a favourable extended growing season for the olive tree (Boskou, 2006). The most widespread species of olive is the *Olea europaea*. The Mediterranean area provides 97% of the total olive production of the world, and the olive oil industry is an important activity, producing 95% of the olive oil worldwide (Aragón & Palancar, 2001).

Extra virgin olive oil (EVOO) is produced exclusively by mechanical and physical processes. The steps of the production process include collecting, washing, and pressing of olives, malaxation of olive paste, centrifugation, decantation, storage, filtration and packaging (bottling) (EC Regulation, 2001). Virgin olive oil may be consumed fresh as obtained from olives, but it is normally stored in large containers in the dark at controlled temperature. Finally, oil is bottled under anaerobic conditions. However, the majority of industries, previous to storage of oil, utilize a filtration process as a final step to remove suspended solids or humidity.

Olive oil can be divided into major and minor fractions based on its chemical composition. The major components, which include triacylglycerols, represent more than 98% of total oil weight. Minor components, which are present in very low amounts (about 2% of oil weight), include more than 300 different chemical compounds (Quiles, Ramirez-Tortosa, & Yaqoob, 2006). This fraction includes non-glyceride esters, aliphatic and triterpene alcohols, sterols, hydrocarbons, pigments, lipophilic and hydrophilic phenols, and finally volatile compounds. These minor compounds are present exclusively in virgin olive oil (VOO). The refining process expunges or decreases most of these compounds.

There are many technological factors that can influence the content of minor components. The effects of the washing operation, mechanical extraction, and malaxation

* Corresponding author.



parameters (such as time and temperature of treatment and the air and inert gas exposure time of olive paste), separation systems (two or three-phase centrifugal decanter) as well as the changes in minor compounds of olive oil during storage have been evaluated for different authors (Angerosa et al., 2004; Chiacchierini, Mele, Restuccia, & Vinci, 2007; Gallina-Toschi, Cerretani, Bendini, Bonoli-Carbognin, & Lercker, 2005; Di Lecce, Bendini, Cerretani, Bonoli-Carbognin & Lercker, 2006; Servili et al., 2004).

The filtration procedure is specially important as a final step of the elaboration process. During filtering, quantitative and qualitative changes take place, especially on minor components. The present review focuses on the different filtration systems of EVOO and their effect on the minor fraction with particular emphasis on waxes, carbonyl compounds, pigments, lipophilic and hydrophilic phenols, phospholipids and proteins.

Filtration systems of EVOO

Cloudy virgin olive oil is the fresh olive juice obtained by mechanical and physical processes to final filtration and bottling. The filtration process of EVOO is a procedure carried out in two steps: first, the suspended solids are removed, and second elimination of humidity gives the oil a brilliant aspect (Civantos, 1999). Normally, organic or inorganic materials are used in conjunction with a variety of filtration equipment to enhance or enable to suspended solids and water-oil separations. The nature of these materials, often called filter aids, depends on the final objective.

Filtration process to remove suspended solid

This process is indicated for EVOO with high content of suspended solids. Generally, the filtration equipment is used

in conjunction with different filter aids to remove suspended solids. This step requires a preliminary phase during which the surface of the filtration equipment is recovered with a filter aid, which is deposited by filtration of specially prepared mixes for the formation of the cake layer, called precoat filtration (Civantos, 1999). Filter aids for precoat filtration can be produced from a wide variety of raw materials. Commonly utilized filter aids include diatomite with different particle sizes, and consequently, different permeabilities.

Diatomite, known also as diatomaceous earth, is a classic material used as a precoat. This filter aid is derived from the fossilized remains of microscopic algae (class *Bacillariophyceae*). Their chemical composition is largely silica (95–98%). Inevitably, some variations exist in the chemical composition of the different types of commercial diatomaceous earth, but in general these differences are relatively small and due to different concentrations of impurities (alumina, iron oxide and alkaline earth oxides). However, when an analysis on the particle size is carried out, the variations are more significant (Purchas & Sutherland, 2002). Industrially, the preliminary phase is carried out with mixtures of different particle size (1–100 µm) from filter aids (Civantos, 1999). Fig. 1 represents the flow diagram of filtration. Before filtering olive oil, three precoat layers are normally deposited in filter tank. To achieve this, different diatomaceous earths (A, B and A') are mixed with EVOO. In the next step the different mixers are passed through the filter tank (F2, F4 and F6). The diatomaceous earths are deposited in the filtration equipment and the precoat layers are formed. The first and third precoat layers constituted by F2 and F6, respectively contain mostly coarse-grained particles (average particle size 7–17 µm), and the second

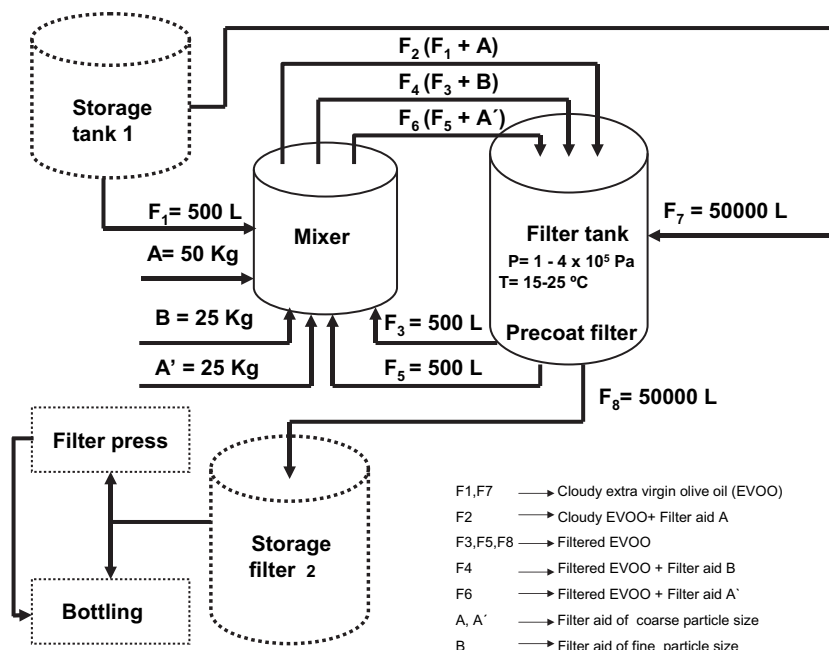


Fig. 1. Flow Diagram of the industrial filtration process to remove suspended solid of virgin olive oil (EVOO) with a diatomite filter aid.



(F4) contains mostly fine-grained particles (average particle size 2.7–6 μm). Finally, filtration is carried out under a constant flow and increasing differential pressure. After the filter cake has completely been filled by suspended solid, the system (Filter tank) reaches a maximum pressure (4×10^5 Pa) and the filtration cycle is completed. The precoat layer can be seen as a kind of membrane, which can be dynamically generated. Normally, 50,000 L (F7) of cloudy olive oil can be filtered with 100 kg of diatomaceous earth, but the final amount of oil depends on several factors (i.e. humidity and olive cultivar of origin of EVOO).

In recent years, filter aids based on organic fibrous materials are becoming increasingly popular. Normally, the fibrous products used to filter cloudy olive oil are cellulose fibres. In comparison with diatomite, natural cellulose fibres have several technological advantages in terms of precoat filtration. Their fibrous structure, rough surface, large porosity and elastic behaviour against pressure of celluloses produce a mechanically stable structure of the filter cake. As a result, the specific consumption can be up to 70% less (in comparison with mineral filter aids), with higher flow rates and longer cycle times (Gerdes, 1997).

Filtration to eliminate humidity and make the oil brilliant

This process is carried out to remove humidity of EVOO and to offer an impeccable commercial presentation. In this case, traditional filter presses are used, and two different non powder filters aid are utilized (a compact cloth) cotton or cellulose paper. On occasion, anhydrous Na_2SO_4 may be used as filter aid to remove humidity (Civantos, 1999). Normally, this process is carried out after of the filtration process to remove suspended solids and before storage. Filter press is constituted by filter plates used to constitute different chamber. The filter aid used in this process is introduced among the filter plates of the filtration equipment. The system is pressurized by a hydraulic closure. Olive oil is passed through each chamber of the filter press and humidity is removed.

Cross-flow filtration

Filtration is characterized by perpendicular flow through the filter. In recent years, cross-flow filtration has been proposed as interesting and alternative method to conventional filtration. Sometimes referred to as Tangential Flow Filtration, this technique involves flow that is parallel to the membrane. Cross-flow is used most often, especially in situations that require the filtration of very large volumes of fluid, or the separation of very high levels of solids. Membrane processes are extensively used, within the food industry, in the production of fruit juices, vegetable soups and milk. However, this has not been broadly extended to the olive oil industry.

The fluid is conducted at high speed diagonally to the membrane surface thus preventing the spontaneous formation of a coating and inhibiting the growth of the filter cake,

which allows for high filtrate fluxes. The constant flow ensures a clean surface of the membrane which is essential for high and stable filtration performance. The feed stream forms a recirculation loop, where the feed stream passes across the membrane, or more commonly through the centre lumen of a membrane tube.

The membrane process development generally involves screening of commercially available membranes under different operating variables such as velocities, temperature and pressure. The separation characteristics of membranes are dependent not only on the physicochemical properties of the membrane, but also on the feed characteristics and operating variables. The influence of operating parameters on filtration process under cross-flow condition has been studied (Li, Hess, & Höflinger, 2003). In the food industry, the filtration modules are equipped with capillary membranes of a nominal pore size in the range of those used for microfiltration (100–10,000 nm), ultrafiltration (10–100 nm), and nanofiltration (1–10 nm). Microfiltration systems can operate in the 1.38×10^5 – 2.76×10^5 Pa range, while some ultrafiltration and nanofiltration systems will often require pressures that greatly exceed 6.89×10^5 Pa (Cheryan, 1998).

Based on the knowledge of the characteristics of olive oil and their composition, one can select a suitable membrane process. In a typical tubular filtration, EVOO flows through the tubular modules at high velocity, which is sufficient to maintain turbulent flow. Microfiltration (CFMF) and ultrafiltration (CFUF) have also been used to filter virgin olive oil. In this case, different types of commercial inorganic membranes with tubular mono- or multi-channel configuration are used for CFMF (Carbosep M14) and CFUF (Kerasep K15, Carbosep M1 and Tami T50). Fig. 2a shows a scheme of cross-flow process.

New filtration systems

With regard to new filtration systems, two processes have been recently established by Italian researchers. The first, developed by Filterflo of Binasco (Milano, Italy), consists in the use of a filter bag system, previously applied in the enology sector (Malugade & Wessel, 1996). The filtration equipment developed by Filterflo is constituted by two compartments, a cylindrical tube and filter bag. As far as, the filter bag is concerned, it is made up of a unique bag (usually of polypropylene) and its support. The filter bag is introduced into the cylindrical tube and the system is pressurized by a hydraulic closure. Olive oil is directly conducted from storage tanks to filtration equipment. The fluid passes across the filter bag and suspended solids are removed. On occasion, similar to the other filtration systems described, different materials selected by the manufacturer may be used as filter aids in order to improve the filtration process. The main advantages of this system are its wide versatility and easy maintenance that permits an optimal level of oil limpidity. The second system, patented by the University of Bologna and Sapio (Cerretani, Rocculi,



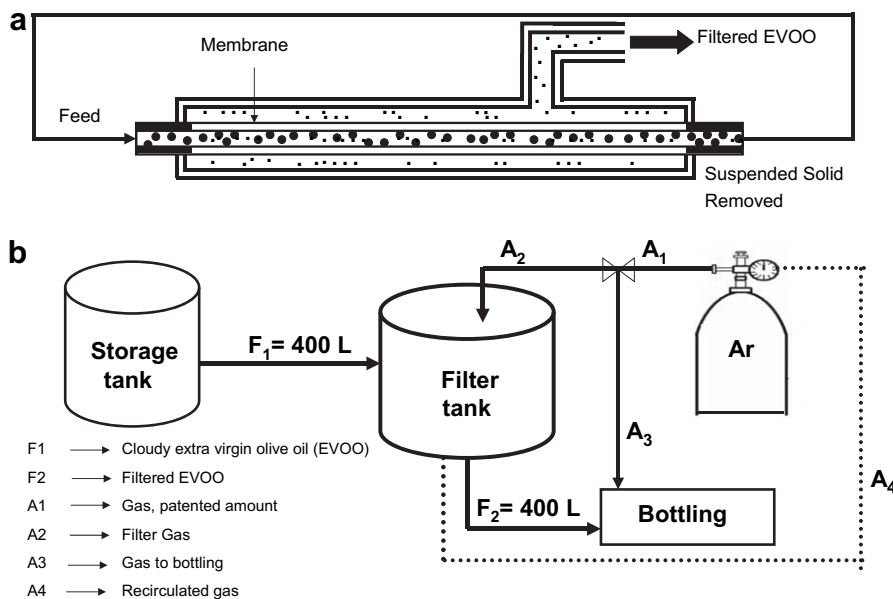


Fig. 2. Different filtration processes. (a) Cross-Flow filtration. (b) Flow Diagram of the industrial filtration process to remove suspended solids with a gas filter aid. The oil is introduced in the filter tank and the inert gas (nitrogen or argon) is conducted directly in the centre of olive oil mass. It generates a circular movement of the oil mass that facilitates the precipitation of suspended solids.

Bendini, Romani, & Bacci, 2009), is a new filter system based on the flow of an inert gas. Fig. 2b shows a scheme of this process. In this case, we can consider that the filtration equipment is constituted by two different modules. The first module consists in a typical tank, where the olive oil is introduced and the filtration process is carried out. The second module is the storage tank of inert gas utilized as filter aid. Nitrogen and argon can be used in this system. This module has an insertion dispositive connected by the bottom filter tank that introduces a constant inert gas flow directly in the centre of the olive oil mass. The gas insertion generates a circular movement of the oil mass that it facilitates the precipitation of the suspended solids. It is important to underline that this new process avoids the use of organic materials that come into contact with oil.

Moreover, at the end of the filtration step, the EVOO is already under inert gas that, by reducing the presence of oxygen, provides a more suitable condition that prolongs the shelf life of the oil. The patented system can be adapted both to small or large milling companies, and models with different working capacities have been proposed (50, 150 and 300 L/h).

Effect of different filtration systems on minor compounds

The olive oil is a turbid and opalescent juice extracted from the fruit of the olive tree *O. europaea*, and it can be consumed without any refining treatment. However, its crude form called virgin olive oil has impurities (suspended solid) that can compromise its quality since they facilitate hydrolysis or rancidity. The information concerning the chemical characterization of the suspended solids indicates

that they are derived from olive fruit, sugars, enzymes, proteins, phospholipids, vegetative water, and waxes.

Although filtration of this oil removes these suspended solids, this can also cause small changes in the oil, especially on the minor fraction, such as reduction of the carbonyl compounds, total phenols and chlorophyll content. These effects will be detailed in the next section.

Waxes

Waxes are present on the external cuticle of the olive fruit and leaves to form a surface hydrophobic layer. These compounds are esters of long chain aliphatic alcohols (C_{27} – C_{44}) and fatty acids. The wax content is related to the turbidity of EVOO because the suspended solid are also derivated from waxes, as it has been previously described. It is known that the turbidity of olive oils can be caused by crystallization of waxes due to their low solubility in oil, and is generally facilitated by low temperature. Parenti *et al.* (2008) studied the nature of the material responsible for the physicochemical status of veiled olive oil. These authors classified 24 unfiltered EVOOs in three different groups only on the basis of their visual aspect and their absorbance values. After this, the chemical analysis were performed. Concerning the minor compounds, significant differences were found among the three turbidity classes. As far as, the wax content is concerned, the quantity of waxes showed the highest correlation across the turbidity classes. From the results obtained by Parenti *et al.* (2008) we can concluded that highly turbid EVOO often corresponds to the high wax concentration.

The filtration process affects the amount and nature of waxes in olive oil. The wax content of unfiltered olive oil

has been studied, but the different content in unfiltered and filtered olive oil has not been reported.

Carbonyl compounds

Several volatile aldehydes, ketones and esters are retained by EVOO during mechanical extraction. These carbonyl compounds, by stimulating olfactory receptors, contribute to its flavor and fruity taste and are very decisive in determining its sensorial quality (Tura, Failla, Bassi, Pedò, & Serraiocco, 2008).

The levels of some carbonyl compounds are significantly reduced by filtration. Bottino *et al.* (2004) examined the effect of membrane cross-flow filtration as an innovative filtration process for EVOO. The experimental results showed that cross-flow filtration significantly reduces the levels of short- and medium-chain carbonyl compounds (C5–C13). Bottino, Capannelli, Mattei, Rovellini, and Zunin (2008) evaluated the effect of the micro- and ultrafiltration on some minor compounds of EVOO using different commercial membranes (Carbosep M14 membrane to CFMF and Kerasep K15, Tami T50 and Carbosep M1 membranes to CFUF). The concentration of carbonyl compounds was reduced from 618 mg/kg in crude olive oil to a final value of 254, 213, 199 and 171 mg/kg in olive oil filtered with Carbosep

M14, Kerasep K15, Tami T50 and Carbosep M1 membranes, respectively. These values are summarized in Table 1.

The CFMF and CFUF of olive oil showed different effects in terms of the content of carbonyl compounds. Comparing both cross-flow filtration systems, the maximum concentrations of these compounds were obtained from filtered olive oils with Carbosep M14. Microfiltration has lesser effect on these compounds compared to ultrafiltration.

Pigments

Pigments are of two distinct families of compounds, namely chlorophyll and carotenoid pigments. Among these, chlorophylls are the most important. Chlorophylls a and b, and their oxidation products pheophytins a and b, are naturally present in olive oil and contain four pyrrole rings (also called porphyrin) with a magnesium atom in the centre and a long chain alcohol esterified denominated phytol.

During the storage period, there are changes of the pigment profile consist in no loss of pigments; rather, qualitatively there is a general shift in the chlorophyll pheophytinization reaction initiated during the extraction process of EVOO, as a consequence of the released acidity, implying that pheophytin a is the major components of the chlorophyll (Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca, & Mínguez-Mosquera, 2005).

Table 1. Filtration process of EVOO. Effect on minor compounds without storage

Minor compound	EVOO variety	Amount on crude olive oil (mg/kg)	Filtration system	Filtration scale	Amount on filtered olive oil (mg/kg)	Reference
Waxes		134.56–238.71	–	–	–	Parenti <i>et al.</i> (2008)
Carbonil compounds	N.d.	618	Kerasesp K15 membrane	Pilot plant	213	Bottino <i>et al.</i> (2008)
			Carbosep M14 membrane	Pilot plant	254	
			Carbosep M1 membrane	Pilot plant	171	
			Tami T-50	Pilot plant	199	
Chlorophyll	N.d.	5.5	Kerasesp K15 membrane	Pilot plant	4.6	Bottino <i>et al.</i> (2008)
			Carbosep M14 membrane	Pilot plant	4.1	
			Carbosep M1 membrane	Pilot plant	0.8	
Tocopherols	Picual	172.4	Paper filters	Laboratory	160.6	Brenes <i>et al.</i> (2001)
	Picual	196	Paper filters	Laboratory	193	Fregapane <i>et al.</i> (2006)
Hydrophilic phenolics	Picual	1195 ^a	Paper filters	Laboratory	1076 ^a	Brenes <i>et al.</i> (2001)
	N.d. (sample 1)	178	Paper filters	Laboratory	148	Tsimidou <i>et al.</i> (2005)
	N.d. (sample 1)	109	Paper filters	Laboratory	89	Koidis and Boskou (2006)
	Picual	2239 ^a	Paper filters	Laboratory	2239 ^a	Fregapane <i>et al.</i> (2006)
			Paper filters + Na ₂ SO ₄	Laboratory	2239 ^a	
	N.d. (sample 1)	177.4	Cotton	Laboratory	188.7	Gómez-Caravaca <i>et al.</i> (2007)
			Paper filters + Na ₂ SO ₄	Laboratory	207.1	
Phospholipids	N. d. (sample 1)	61.7	Kerasesp K15 membrane	Pilot plant	101	Bottino <i>et al.</i> (2008)
			Carbosep M14 membrane	Pilot plant	99	
			Carbosep M1 membrane	Pilot plant	34	
			Tami T-50	Pilot plant	31	
Water content	N.d. (sample 1)	1070	Cotton	Laboratory	700	Gómez-Caravaca <i>et al.</i> (2007)
			Paper filters + Na ₂ SO ₄	Laboratory	935	

N.d., no data reported. – value not determined. Each author used different available commercial standards.

^a μM/kg.



These compounds are responsible for the greenish colour in oil. Colour is a sensory property with a strong influence on food acceptance. This parameter contributes decisively to initial perceptions about food quality. As with other oils, the colour of olive oil depends not only on fruit ripeness, but also on the olive variety, cultivation area, harvest time and processing methods (Cerretani, Motilva, Romero, Bendini, & Lercker, 2008; Escolar, Haro, & Ayuso, 2007). Moreover, these pigments have a influence on oxidative stability of olive oils. Oxygen and light are two well-known oxidation-producing factors. Chlorophyll and pheophytin have antioxidant and pro-oxidant properties. In the presence of light, both compounds promote lipid oxidation by activated oxygen producing singlet oxygen, that decrease the shelf life. However, these pigments are desirable due to their antioxidant nature in the dark. It may be deduced that in the storage conditions of the oils, in darkness, chlorophyll and pheophytin improve the oil stability.

Cross-flow filtration process affects the total chlorophyll content. Chlorophyll losses have been observed as consequence of membrane filtration of EVOO (Bottino et al., 2008). The amount of these compounds in filtered oils appears to be lower. These values are summarized in Table 1.

Lipophilic phenols

The most important lipophilic phenols present in olive oil are tocopherols, and nearly 95% of the total ones is α -tocopherol. These compounds, included in the designation vitamin E, contain a chromanol ring and a hydrophobic side chain denominated phytyl. Tocopherols, with a hydroxyl group that can donate a hydrogen atom to reduce free radicals, are powerful antioxidants and contribute to increase the olive oil shelf life.

Brenes, Garcia, Garcia, and Garrido (2001) reported similar values of α -tocopherol on unfiltered and filtered olive oil from different olive varieties (Table 1). These results were consistent with those obtained by Fregapane, Lavelli, Leon, Kapuralin, and Salvador (2006). These authors investigated the effect of the filtration on EVOO from different olive cultivars: Picual, Cornicabra, Arbequina, Taggiasca, and Colomabaia. Two different filtration processes were performed: filter paper without and with anhydrous Na_2SO_4 . Samples were filtered through filter paper, and the concentration of α -tocopherol was tested during an eight month period. In any case, filtration had no effect on α -tocopherol content.

Hydrophilic phenols

Hydrophilic phenols are a heterogenic group of diverse nature, such as phenolic acids and alcohols, secoiridoids, lignans and flavones. These compounds are peculiar to virgin olive oil: they are not present in any other vegetable oil.

Hydrophilic phenols are important due to their nutritional and technological properties. Their antioxidant function has been related to the preventive action on certain diseases such as atherosclerosis (anti-inflammatory

activity) (Huang & Sumpio, 2008) and cancer (Giovannini et al., 2008; Menendez et al., 2007; Tripoli et al., 2005) by effect on prevention of DNA damage and inhibition of the development of various types of tumours. Polyphenols also have important technological value due to their influence on sensory characteristics (Baccouri et al., 2008; Bendini et al., 2007; Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Rosales, Perdiguerro, Gutierrez, & Olias, 1992) and the shelf life of virgin olive oil.

The evolution of phenolic compounds has been studied on filtered and non filtered virgin olive oils for different authors. The total phenolic content is reduced by filtration (Koidis & Boskou, 2006) (Table 1). This behaviour can be explained by the variation in water content of EVOO. In fact, it is assumed that the majority of phenolic compounds, having amphiphilic characteristics, are located around water droplets on olive oil. The filtration process removes humidity, and the water content is reduced together with a proportion of the phenolic compounds (Gómez-Caravaca et al., 2007).

Free phenols, such as hydroxytyrosol (HYTY) and tyrosol (TY) change their concentration during EVOO storage. These changes were studied on filtered and non filtered EVOO from Picual, Hojiblanca and Arbequina varieties by Brenes et al. (2001). HYTY and TY increased their concentrations during storage, and a higher increase in both compounds was observed on non filtered compared to filtered samples (Brenes et al., 2001). Tsimidou, Georgiou, Koidis, and Boskou (2005) evaluated the phenol content in both unfiltered and filtered olive oil. The filter aid used in this laboratory-scale study was cellulose paper. It was found that the levels of TY and HYTY were significantly decreased during storage, and that the loss in free phenols was more rapid in filtered oils. Likewise, Fregapane et al. (2006) studied the composition of the phenolic fraction on different varieties from EVOO. In almost all varieties, the initial amount of these compounds was higher in unfiltered than in filtered olive oil both without storage. An increase in HYTY and TY content was observed during storage, and was also greater in unfiltered olive oil. Gómez-Caravaca et al. (2007) filtered olive oil using two filter aids: cotton and paper plus anhydrous sodium sulphate. In general, HYTY showed a significant decrease after filtration with cotton with respect to the unfiltered olive oils. However, an apparent increase in the levels of this compound was produced on filtered EVOOs with paper plus anhydrous sodium sulphate. The levels of TY decreased in some filtered samples and apparently increased in other ones by both filtration processes. These authors hypothesized that in polar matrix such as unfiltered EVOO, the affinity of phenols to solvent extraction (methanol/water, 60/40 v/v) is more difficult and lower than in a filtered EVOO, and the majority of phenol compounds located around water droplets remain in unfiltered olive oil. The partial elimination of water during the filtration process permits a greater availability of phenols for extraction with a polar solvent mixture. This fact would produce an



apparent increase on the levels of these compounds by filtration process.

As far as, the secoiridoid aglycons are concerned, all these compounds decrease in concentration during storage. This can be partially explained by hydrolysis of these compounds. Secoiridoid aglycons are derivatives of hydroxytyrosol (3,4-DHEPA) and tyrosol (*p*-HPEA) linked to the aldehydic and dialdehydic forms of elenolic acid. The hydrolysis reaction of the ester bond between HYTY or TY and the rest of the molecule produces an increased of phenol acid concentrations and a decrease of secoiridoid aglycons. As can be seen in the study by Brenes *et al.* (2001), filtration of oil had a large effect on the hydrolysis of secoiridoid aglycons. The increase in hydroxytyrosol and tyrosol for unfiltered EVOO was higher than for filtered ones. In this manner, oil filtration reduces the rate of hydrolysis of secoiridoid aglycons. In addition, the study reported that the concentration of the lignans 1-acetoxypinoresinol and pinoresinol was unaffected by filtration. Other minor compounds such as the flavonoids luteolin and apigenin were examined, and the same results were obtained. Fregapane *et al.* (2006) obtained similar values of oleuropein and ligstroside in filtered and unfiltered EVOO during storage. The concentration of these compounds was apparently not affected by filtration. However, Bottino *et al.* (2008), observed that cross-flow filtration always led to a sharp decrease in these compounds.

Generally, secoiridoid aglycons decrease in concentration over time, while HYTY and TY increase in concentrations either with and without filtration of oil. Table 2 summarizes the effect of filtration on the antioxidant profile.

Phospholipids

Little is known about this class of compounds in olive oils.

Koidis and Boskou (2006) tested these compounds in cloudy and filtered EVOO and found that the major compounds were phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and phosphatidylserine. These compounds are related to suspended solids and turbidity. Levels of total phospholipids in veiled and filtered samples have been reported to range from 21 to 124 mg/kg (Koidis and Boskou 2006), and all the cloudy EVOO showed a higher phospholipid content than filtered ones. In a recent study (Hatzakis, Koidis, Boskou, & Dais, 2008), high resolution 31P NMR spectroscopy was used to analyze 12 Greek virgin olive oil samples, three samples of refined olive oils and two samples of olive-pomace. The VOO samples had a concentration of phospholipids that ranged from 11 to 157 mg/kg, although no phospholipids were detected in the three refined olive oils, confirming that phospholipids were removed by refining. The main phospholipids found in VOO were phosphatidic acid, lyso-phosphatidic acid, and phosphatidylinositol. Moreover, the presence of the

Table 2. Influence of laboratory filtration scale on the concentration of antioxidant compounds at the beginning of storage

Minor compound	EVOO variety	Time of storage (days)	Amount on crude olive oil (mg/kg)	Filtration system	Amount on filtered olive oil (mg/kg)	Reference	
Tocopherols	Picual	340	115	Paper filters	134	Brenes <i>et al.</i> (2001)	
	Arbequina	340	112.6	Paper filters	105.6		
	Hojiblanca	340	97.4	Paper filters	103.2		
	Picual	90	216	Paper filters	210	Fregapane <i>et al.</i> (2006)	
		240	164	Paper filters	157		
		90	216	Paper filters + Na ₂ SO ₄	210		
		240	164	Paper filters + Na ₂ SO ₄	153		
		Arbequina	90	212	Paper filters		215
			240	193	Paper filters		192
			90	212	Paper filters + Na ₂ SO ₄		207
240	193	Paper filters + Na ₂ SO ₄	191				
Hydrophilic phenolics	Picual	340	972.1 ^a	Paper filters	872.4 ^a	Brenes <i>et al.</i> (2001)	
	Arbequina	340	1276 ^a	Paper filters	1386.6 ^a		
	Hojiblanca	340	589.3 ^a	Paper filters	581 ^a	Tsimidou <i>et al.</i> (2005)	
		N.d. (sample 5)	30	308	Paper filters		215
	N. d. (sample 6)	270	231	Paper filters	80		
		30	333	Paper filters	194		
	Picual	270	175	Paper filters	49	Fregapane <i>et al.</i> (2006)	
		90	1845 ^a	Paper filters	1811 ^a		
	240	1708 ^a	Paper filters	1649 ^a			
	Arbequina	90	1845 ^a	Paper filters + Na ₂ SO ₄	1720 ^a		
		240	1708 ^a	Paper filters + Na ₂ SO ₄	1659 ^a		
	Arbequina	90	299 ^a	Paper filters	269 ^a		
		240	252 ^a	Paper filters	209 ^a		
90		299 ^a	Paper filters + Na ₂ SO ₄	253 ^a			
240	252 ^a	Paper filters + Na ₂ SO ₄	241 ^a				

N.d. no data reported. Each author used different available commercial standards.

^a μM/kg units.



lyso-phosphatidic acid and lyso-phosphatidylinositol in olive oils is reported for the first time.

Proteins

Proteins of olive oil are derived from the fruit and transferred to the crude oil in the crushing stage. These compounds have been related to the appearance of veiled oil and oxidative stability. The protein content in olive oils has been reported by [Hidalgo, Alaiz, and Zamora \(2001\)](#), who found similar protein contents in filtered and unfiltered oils. These results are in accordance with those reported by [Koidis *et al.* \(2006\)](#). In the latter investigation, 23 unfiltered and filtered virgin olive oils were analysed. In almost all cases, any observed differences between the protein content of unfiltered and filtered olive oils were not statistically significant.

The filtration process did not produce any reduction in the content of protein.

Effect of filtration on sensorial and physicochemical characteristics

Physicochemical characteristics

Colour variations in olive oil are related to differences in pigment composition, which are mostly carotenoids and chlorophylls, as it has been previously described.

The colour can range from pale yellow to deep green. The CIEL a^* b^* co-ordinate system and CIEXYZ space have been used to evaluate the colour of olive oil ([Bottino *et al.*, 2004](#); [Escolar *et al.*, 2007](#); [Moyano, Melendez-Martinez, Alba, & Heredia, 2008a, 2008b](#)). Lightness is measured by the first value, (L, L^*), redness using the second value, (a , a^*), and yellowness using the third value (b , b^*).

[Bottino *et al.* \(2004\)](#) did not find significant differences in colour between crude and filtered olive oil. These results are concordant with those obtained by [Bottino *et al.* \(2008\)](#). [Gómez-Caravaca *et al.* \(2007\)](#) evaluated the effect of filtration with cotton and paper on physicochemical characteristics. The lightness of EVOO increased after filtration because the filtration process retains a large amount of particles in suspension. Likewise, the a^* and b^* values increased after filtration, and in contrast the intensity of green was minimized.

Sensory characteristics

Sensory evaluation is one of the most informative analyses as far as the quality of EVOO is concerned. The studies by [Bottino *et al.* \(2004\)](#) and [Bottino *et al.* \(2008\)](#) showed that similar aroma values for crude and filtered olive oils were obtained with a panel test. In the investigation by [Fregapane *et al.* \(2006\)](#), a significant decrease was seen in fruitiness, pungency and bitterness attributes after filtration. However, these sensory assessments showed similar values for both filtration systems (paper filter without and with anhydrous Na_2SO_4). On the other hand, the rancid defect values observed were higher in unfiltered olive oils than in filtered oils. [Rotondi and Mari \(2006\)](#) examined

the effect of filtration of 52 virgin olive oils from different olive varieties at 10 days, 6 and 12 months after filtration. At 10 days, the unfiltered olive oils showed intensities of fruitiness, pungency and bitterness attributes that were similar to filtered olive oil. At six months, the effect of filtration was more marked. The filtered oils showed a tendency to maintain the fruitiness attribute, while this parameter decreased in crude oils. Likewise, filtered oils showed a higher intensity than unfiltered ones for other attributes. The most substantial differences were seen at 12 months when filtered oils demonstrated the capacity to maintain a high intensity of positive attributes in comparison with crude ones.

Influence of filtration procedure on oxidative stability and the conservation of EVOO

Free acidity

Lipid hydrolysis generates free fatty acids by chemical or enzymatic reaction. This phenomenon is of particular interest in water-containing lipid matrices, such as virgin olive oil. Free acidity affects susceptibility to oxidative degradation and also contributes to the reduction of the shelf life of EVOO.

Suspended solids may also play a stabilizing role for hydrolytic degradations. Some authors ([Frega, Mozzon, & Lercker, 1999](#)) suggested reactions between suspended solids and free fatty acids with production of a precipitated residue, a state in which they are not capable of oxidative reaction. Therefore, filtration to remove suspended solids produces a reduction of the shelf life of EVOO. [Frega *et al.* \(1999\)](#) demonstrated that when the suspended materials were totally eliminated by filtration, the susceptibility to oxidative degradation was higher in filtered olive oils than unfiltered ones. Furthermore, the suspended solids are related with hydrophilic phenols and it is well-known their antioxidant properties.

In contrast, the effect of olive oil acidity on the minor fraction has been evaluated by several authors. [Brenes *et al.* \(2001\)](#) examined this effect on the hydrolysis of secoiridoid aglycons and showed that changes in the phenolic compounds produced at the beginning of the storage were associated with the oil acidity and influenced by filtration. Since it is known that free acidity increases hydrolysis of phenolic compounds and the oxidation rate ([Lercker, Frega, Bocci, & Servidio, 1994](#)), both of which are linked to the shelf life of EVOO. [Fregapane *et al.* \(2006\)](#), reported that the oil filtration reduced the rate of hydrolysis of the triacylglycerol matrix.

Water content

Part of the total water content present in a food is bound and part is free and available for chemical and enzymatic reactions, and it is well-known that the presence of this free phase in oil accelerates the deterioration of the oil for hydrolytic processes in EVOO samples, even if contradictory results have been reported ([Frega *et al.*, 1999](#);



Lercker *et al.*, 1994). The water content is reduced by filtration because the filter cake used retained this fraction of the EVOO. Brenes *et al.* (2001) found no water after filtration. As expected, Fregapane *et al.* (2006) obtained the highest polar phase content in unfiltered olive oils which also decreased in filtered oils. Gómez-Caravaca *et al.* (2007) used two different filtration systems: cotton and paper with anhydrous sodium sulphate to filter eight samples of EVOO. All samples filtered with cotton showed a significant decrease in the quantity of water. However, samples that were filtered using paper with anhydrous Na₂SO₄ presented a significant decrease in only four of the eight samples.

Oxidative stability

Four different analytical determinations are realised by establish the oxidative stability of EVOO: Peroxide value, Rancimat oxidative stability, Oxidative Stability Index, and K₂₃₂ and K₂₇₀.

Tsimidou *et al.* (2005) evaluated the loss of stability in veiled and filtered olive oils, and it was seen that filtration did not affect the levels of peroxide values in most of the samples without storage. These authors carried out a shelf life test during storage. Monitoring of samples revealed significant differences between unfiltered and filtered olive oils in terms of peroxide values, and unfiltered oils appeared to be better protected against oxidative deterioration. Fregapane *et al.* (2006) affirmed that filtration caused an increase in the rate of peroxide formation.

Similar values of Rancimat oxidative stability have been obtained by different authors for unfiltered and filtered olive oils determined at the moment of filtration, prior to storage (Fregapane *et al.*, 2006; Tsimidou *et al.*, 2005). Their value was found to decrease linearly from the beginning of the storage, and the loss in stability was in all cases significantly higher for filtered samples than for the corresponding unfiltered ones.

Gómez-Caravaca *et al.* (2007) demonstrated that the Oxidative Stability Index (OSI) decreases after filtration. These authors used two different filter aids, as it has been previously described: cotton and paper plus Na₂SO₄. Two conclusions were obtained. First, the effect of the filtration process in OSI values was more pronounced in olive oils that showed a higher OSI value before filtration. Second, in all samples filtered with paper plus Na₂SO₄, the OSI values were lower compared to those filtered with cotton. The origin of this difference could be attributed to different nature of filter aids and their different effect on water content and phenolic compounds. Considering the results obtained both filter aids, it can be affirmed that the oxidative stability of virgin olive oil is lower when the water content is decreased (after filtration), which is related either to a reduction in the antioxidant activity of hydrophilic phenols. In particular, phenolic compounds, have amphiphilic characteristic, are oriented in the water-oil interface and became more protective against oxidation

higher activity in water-in-oil emulsion (Bendini *et al.*, 2007). The filtration system reduces the water content. As a consequence, unfiltered olive oils may be more stable.

Experimental data by Brenes *et al.* (2001) showed a slight decrease in K₂₃₂ and K₂₇₀ values following filtration. However, similar values have been obtained on crude and filtered olive oils by Bottino *et al.* (2004) and Tsimidou *et al.* (2005) using membrane cross-flow filtration and filter paper, respectively. Bottino *et al.* (2008) evaluated this parameter and reported higher K₂₃₂ and K₂₇₀ values on filtered oils with different commercial membranes (Carbosep M14, Kerasep K15, Carbosep M1 and Tami T50).

Conclusions

The positive or negative effects of the filtration process on shelf life of olive oil are controversial, and different authors have reported both advantages and disadvantages concerning filtration of olive oil. Some assumptions have been made for the explanation of the higher stability of veiled olive oil. The suspended materials contain chemical compounds that act as antioxidants; the elimination of the filtration step is therefore highly desirable to extend the shelf life of the oil. Moreover, phenolic compounds are a powerful antioxidant more protective against oxidation in a water-in-oil emulsion, but the filtration system reduces the water content. As a consequence, unfiltered olive oils may be more stable.

However, the higher polar phase content in unfiltered olive oils may augment alteration of virgin olive oil, although only after several months of storage, especially at an inappropriate temperature, mainly affecting free acidity, sensory attributes and the formation of simple phenols due to the hydrolysis rate of secoiridoid derivatives.

We can conclude that, the filtration procedure, as a final step, is especially important to the quality of EVOO and the consumer acceptance. Future trends to improve this step in EVOO production could be evaluate the effect of different filtration systems described in this work on shelf life and quality of EVOO. This work could be realised to industrial scale, by the same researchers and using a representative number of virgin olive oil varieties for each filtration system in order to compare these results. The best filtration system obtained in this future work could be taken into consideration by olive oil producers in order to improve the quality level of EVOO.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for the project (AGL2008-05108-C03-03) and a grant (FPU, AP2007-03245) and to Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for the project P07-AGR-02619.



References

- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. F. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, *1054*, 17–31.
- Aragón, J. M., & Palancar, M. C. (2001). *Present and future of Alpeorajo*. S.A.Madrid, Spain: Editorial Complutense.
- Baccouri, O., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., & Ben Miled, D. (2008). Phenol content as correlated to antioxidant activity and gustative characteristics of Tunisian monovarietal virgin olive oils. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, *85*, 189–195.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., et al. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, *12*, 1679–1719.
- Boskou, D. (2006). Characteristic of the olive tree and olive fruit olive oil composition. In: *Olive oil chemistry and technology* (2nd ed.). (pp. 13–19) American Oil Chemists Society.
- Bottino, A., Capannelli, G., Comite, A., Ferrari, F., Marotta, F., Mattei, A., et al. (2004). Application of membrane processes for the filtration of extra virgin olive oil. *Journal of Food Engineering*, *65*, 303–309.
- Bottino, A., Capannelli, G., Mattei, A., Rovellini, P., & Zunin, P. (2008). Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*, 1109–1115.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., & Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5609–5614.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., et al. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8918–8925.
- Cerretani, L., Motilva, M. J., Romero, M. P., Bendini, A., & Lercker, G. (2008). Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, *226*, 1251–1258.
- Cerretani, L., Rocculi, P., Bendini, A., Romani, S., & Bacci, A. (2009). *Oil clarifying process and apparatus for implementing the process*. World Patent Application no. WO 2009/107096; Kind Code: A2 of September, 3, 2009.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*, (2nd ed.). Lancaster, Pa: Technomic Pub..
- Chiacchierini, E., Mele, G., Restuccia, D., & Vinci, G. (2007). Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends in Food Science and Technology*, *18*, 299–305.
- Civantos, L. (1999). *Obtención del aceite de oliva virgen. El envasado del aceite de oliva*. Editorial Agrícola Española. pp. 223–235.
- Di Lecce, G., Bendini, A., Cerretani, L., Bonoli-Carbognin, M., & Lercker, G. (2006). Shelf stability of extra virgin olive oil under domestic conditions. *Industria Alimentari*, *461*, 873–880.
- Escolar, D., Haro, M. R., & Ayuso, J. (2007). The color space of foods: virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2085–2093.
- European Community (2001). Commission regulation No 1513/2001 of 23 July 2001 amending regulations No 136/66/EEC and (EC) No 1638/98 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. *Official Journal of the European Communities*, *L201*, 4–7.
- Frega, N., Mozzon, M., & Lercker, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *76*, 325–329.
- Fregapanè, G., Lavelli, V., Leon, S., Kapuralin, J., & Salvador, M. D. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*, 134–142.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *82*, 32–39.
- Gallina-Toschi, T., Cerretani, L., Bendini, A., Bonoli-Carbognin, M., & Lercker, G. (2005). Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: an analytical approach by traditional and high resolution techniques. *Journal of Separation Science*, *28*, 859–870.
- Gerdes, E. (1997). Precoat filtration with organic filter aids. *Filtration and Separation*, *34*, 1040–1043.
- Giovannini, C., Scazzocchio, B., Matarrese, P., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., et al. (2008). Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*, 118–128.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*, *2*, 671–678.
- Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., & Dais, P. (2008). Determination of phospholipids in olive oil by 31P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 6232–6240.
- Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2001). Determination of peptides and proteins in fats and oils. *Analytical Chemistry*, *73*, 698–702.
- Huang, C. L., & Sumpio, B. E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, *207*, 407–416.
- Koidis, A., & Boskou, D. (2006). The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*, 323–328.
- Lercker, G., Frega, N., Bocci, F., & Servidio, G. (1994). "Veiled" extra virgin olive oil: dispersion response related to oil quality. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *71*, 657–658.
- Li, X.-Z., Hess, H., & Höflinger, W. (2003). Influence of operating parameters on precoat layers built up under crossflow condition. *Separation and Purification Technology*, *31*, 269–280.
- Malugade, D., & Wessel, M. A. (1996). *Filter bag system with multi-filter adaptability*. World Patent Application no. WO9600605; Kind Code: A1, 1996.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., et al. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin (TM)) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biomed Central Cancer*, *7*.
- Moyano, M. J., Melendez-Martinez, A. J., Alba, J., & Heredia, F. J. (2008a). A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (I): CIE XYZ non-uniform colour space. *Food Research International*, *41*, 505–512.
- Moyano, M. J., Melendez-Martinez, A. J., Alba, J., & Heredia, F. J. (2008b). Comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform colour spaces. *Food Research International*, *41*, 513–521.
- Parenti, A., Spungnoli, P., Baldi, E., Masella, P., Calamai, L., & Mattei, A. (2008). Preliminary observations on veiled olive oil turbidity with regards to wax content. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, *85*, 221–228.
- Purchas, D. B., & Sutherland, K. (2002). Packed beds. *Handbook of Filter Media*, *10*, 411–452.
- Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, M. C., & Yaqoob, P. (2006). *Olive oil & health*, (1st ed.). CAB International.
- Rosales, F. G., Perdiguero, S., Gutierrez, R., & Olias, J. M. (1992). Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *69*, 394–395.
- Rotondi, A., & Mari, M. (2006). Tra oli filtrati e velati il tempo fa la differenza. *Olivo e olio*, *9*, 12–15.



- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, *1054*, 113–127.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity, beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, *18*, 1–17.
- Tsimidou, M. Z., Georgiou, A., Koidis, A., & Boskou, D. (2005). Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*, *93*, 377–383.
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, *118*, 139–148.



**New filtration systems for extra-virgin olive oil:
effect on antioxidant compounds, oxidative
stability, and physicochemical and sensory
properties**



**Efecto de los nuevos sistemas de filtración en la
fracción fenólica del aceite de oliva virgen extra**

CAPÍTULO 5

New Filtration Systems for Extra-Virgin Olive Oil: Effect on Antioxidant Compounds, Oxidative Stability, and Physicochemical and Sensory Properties

Jesús Lozano-Sánchez,^{†,‡} Lorenzo Cerretani,[§] Alessandra Bendini,[§] Tullia Gallina-Toschi,[§] Antonio Segura-Carretero,^{*,†,‡} and Alberto Fernández-Gutiérrez^{†,‡}

[†]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

[‡]Functional Food Research and Development Center, Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento s/n, E-18100 Granada, Spain

[§]Department of Food Science, Alma Mater Studiorum—University of Bologna, P.zza Goidanich 60, I-47521 Cesena (FC), Italy

ABSTRACT: The purpose of this work was to evaluate some new filtration systems in relation to the quality of extra-virgin olive oil (EVOO). Filtration processes were undertaken using a polypropylene filter bag and two different inert gas flows as filter aids (argon and nitrogen). Qualitative and quantitative variations of the glyceride composition, antioxidant and pro-oxidant compounds, and water content were correlated with the oxidative stability to establish the effect on EVOO shelf life. The influence on physicochemical and sensorial properties was also evaluated. After filtration, the oxidative stability was reduced. The behavior of the polyphenols and water content on the filtration process could explain the lowest oxidative stability of filtered EVOO. Moreover, the results of the sensorial analysis confirmed that filtration using inert gases did not decrease the intensity of the main positive sensory attributes. The results could help olive-oil producers to improve EVOO quality and establish optimal storage conditions.

KEYWORDS: olive oil, filtration, filter bag, nitrogen/argon gas flow, oxidative stability, chlorophylls, tocopherols, polyphenols, sensory properties

INTRODUCTION

Cloudy extra-virgin olive oil (EVOO) is the fresh olive juice obtained exclusively by mechanical and physical processes. The extraction process includes the following main steps: collecting, washing, and pressing of olives, malaxation of olive paste, centrifugation, decantation, storage, and packaging (bottling). However, European Community Regulation establishes the possibility of including EVOO filtration prior to the bottling of oil.¹ Filtration is especially important as a final step to remove suspended solids or moisture and make the olive oil more brilliant for consumer acceptance. Different filtration systems have been applied in the olive-oil industry: conventional filtration systems (filter tanks and filter presses) and cross-flow filtration (tangential flow filtration).^{2,3}

Conventional filtration systems use organic or inorganic filter aids in conjunction with filtration equipment (tanks or presses) to enhance or enable suspended solids and water–oil separations. Diatomaceous earth and cellulose fibers are commonly used as filter aids,^{3–5} which are deposited on the surface of the filtration equipment by filtering specially prepared mixes.² On occasion, nonpower filter aids such as cotton or cellulose paper may be used instead of diatomaceous earth and cellulose fibers in filter presses.⁶

Tangential filtration systems have been characterized by perpendicular flow through the membrane in several studies using olive oil and different membrane types at the laboratory scale.⁷ However, this procedure is not widespread in the olive oil industry due to the characteristics, composition, and physicochemical properties of olive oil.

In recent years, two new filtration systems have been proposed as alternative processes to conventional and tangential filtering.² The first uses a filter-bag system as an innovative technique in the olive-oil sector. Olive oil is directly introduced into the filtration equipment constituted by the polypropylene filter bag. The fluid passes across the filter bag, and suspended solids are removed. The second system is a new filtration methodology based on the flow of an inert gas (nitrogen or argon), which is introduced directly in the center of the olive-oil mass. The gas insertion generates a circular movement of the oil mass that facilitates the separation of the suspended solids. It is important to underline that this new process prevents organic matters from coming into contact with the olive oil.

EVOO is a food credited with providing multiple health benefits for humans related mainly to minor components.^{8–12} During these filtering operations, quantitative and qualitative changes take place, especially on these minor components, which are of great value in establishing the quality and health value of EVOO.^{13,14} The effects of conventional and cross-flow filtration on the oxidative stability, sensorial and physicochemical characteristics, and antioxidant components have been reported in the past decade.^{2,6,15,16} However, the impact of the

Received: December 28, 2011

Revised: March 11, 2012

Accepted: March 21, 2012

Published: March 21, 2012



new filtration systems on these characteristics has not been evaluated.

The aim of this work was to evaluate the new filtration systems, based on a filter bag and inert gas flow, in relation to the quality of EVOO with particular emphasis on water content, oxidative stability, pigments, antioxidant compounds, and physicochemical as well as sensory properties. This is the first available comparison between filtered and unfiltered EVOOs using new filtration systems.

MATERIALS AND METHODS

Samples. The EVOO used in this study was of the Peranzana olive variety. In November 2010, olives were collected in the south of Italy (Foggia, Apulia Region) and processed by continuous industrial plants equipped with a hammer crusher, a horizontal malaxator, and a two-phase decanter. Cloudy olive oil was filtered at room temperature using new filtration systems based on three different filter aids: (a) a polypropylene bag, (b) argon gas flow, and (c) nitrogen gas flow. Fifty liters of EVOO was filtered for each new filtration system in triplicate. Filtered samples were stored in bottles without headspace at room temperature and in darkness before analysis.

Filter-bag equipment (developed by Filterflo) consisted of two compartments, a cylindrical tube and filter bag, made up of a unique polypropylene bag (1–5 μm i.d.) and its support. The filter bag was introduced into the cylindrical tube, and the system was pressurized by hydraulic closure. Cloudy olive oil was directly conducted from storage tanks to filter tank, passing through the filter bag.

Filtration equipment based on the flow of an inert gas consisted of a filter tank and inert gas tank developed and patented by University of Bologna and Sapiro.¹⁷ Cloudy olive oil was placed in the 50 L filter tank and connected at the bottom to the tank of inert gas, using an insertion device. The flow rate of both gases injected directly into the center of the olive-oil mass was 15 L/min.

Chemicals and Apparatus. All chemicals were of analytical reagent grade. Potassium and sodium hydroxides, methanol, *n*-hexane, cyclohexane, isopropanol, and isooctane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid was purchased from Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Hydranal-Tritan 2 and Hydranal-solvent oil were from Riedel-deHaën (Seelze, Germany). Standards of α -tocopherol, hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin, apigenin, and quinic acid were purchased by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and (+)-pinoselinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland). Oleuropein was purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Double-deionized water with conductivity less than 18.2 M Ω was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). The vacuum pump used for this work was a Millipore pump model WP6222050 (Millipore).

Analytical Determination of the Quality Indices. Free acidity, peroxide value (PV), and UV spectrophotometric indices (K_{232} and K_{270}) were determined according to the analytical methods described in EEC Regulations 2568/91 and the following amendments.¹ All parameters were determined in triplicate for each sample. Free acidity was given as a percentage of oleic acid and PV expressed in milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (mequiv O₂/kg). Spectrophotometric determinations were made using an UV-vis 1800 instrument (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The K_{232} and K_{270} extinction coefficients were calculated from absorption at 232 and 270 nm, respectively. Oil samples were previously diluted (1:10 v/v) in isooctane when the K_{232} extinction coefficient was analyzed.

Fatty Acid (FA) Composition. The FA composition of filtered and unfiltered oil samples was determined as fatty acid methyl esters (FAMES) after alkaline treatment, obtained by mixing 0.05 g of oil dissolved in 2 mL of *n*-hexane with 1 mL of 2 N potassium hydroxide in methanol; before the gas chromatographic analysis, the upper phase containing FAME was diluted 1:10 with *n*-hexane. A gas chromatograph (GC) Clarus 500 Perkin-Elmer (Shelton, CT) equipped with an autosampler, split/splitless injector, and flame ionization detector (FID) was used for this determination. The chromatographic analysis

was performed according to Maggio et al.¹⁸ Analytes were separated on a RTX-2330 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.2 μm film thickness) from Restek (Bellefonte, PA) and helium as the carrier gas (flow rate, 0.8 mL min⁻¹; split ratio of 1:30, v/v). The injection volume into a split GC port was 1 μL . The column temperature was held at 140 °C for 5 min and then increased by increments of 2.5 °C min to 240 °C. The FID and the injector temperatures were both set at 250 °C. Gas chromatographic data were processed by the software Total-Chrom Navigator (version 6.2.1) from Perkin-Elmer, and the FA composition was expressed as weight percentage of total FAMES present (g/100 g of FAME). Three replicates were prepared and analyzed per sample.

Water Content in Filtered and Unfiltered Olive-Oil Samples.

The water content was analyzed with a TitroMatic 1S instrument (Crison Instruments, S.A.; Alella, Barcelona, Spain) following the method described by Gomez-Caravaca et al.⁹ Filtered and unfiltered EVOOs were dissolved in a solution of chloroform/Hydranal-solvent 2:1 (v/v), and the titrating reagent (Hydranal-Titran 2) was added until the equivalence point was reached. Each sample was introduced three times, and the quantity of the sample was measured with the back-weighting technique. The quantity of water was expressed as mg of water/kg of oil ($n = 3$). The RSD of the water method was 1.5.

Oxidative Stability Index (OSI) Time. The oxidative stability under forced conditions was determined using an eight-channel oxidative stability instrument (OSI) (Omnion, Decatur, IL). The OSI time was determined according to Maggio et al.¹⁸ Briefly, samples (5 g) were loaded onto each channel and heated at 110 °C under atmospheric pressure. At this stage, the air flow was injected into the center of the sample mass to bubble through the oil at 150 mL min⁻¹, generating a conductivity increase due to short-chain volatile acid formation. This increase, measured in distilled water channels directly connected to the sample ones, determined an induction period (OSI time), expressed in hours and hundreds of hours. OSI time was tested three times for each sample.

Pigments. The total chlorophyll and carotenoid contents were calculated by spectrophotometric method at 670 and 470 nm, respectively. The absorption at 670 nm is usually considered to be related to the chlorophyll fraction (pheophytin "a" as its major component) and 470 nm to the absorption of the carotenoid fraction (lutein). EVOOs (7.5 g) were accurately weighted and dissolved in 25 mL of cyclohexane, and their concentrations were calculated using the absorbance value and specific extinction coefficients (613 for pheophytin "a" and 2000 for lutein) according to Minguez-Mosquera et al.¹⁹ Three replicates were prepared and analyzed per sample.

Antioxidant Compounds. Analytical methods to characterize the phenolic profile in filtered and unfiltered EVOOs were performed in an Agilent 1200-RRLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) of the Series Rapid Resolution equipped with a vacuum degasser, autosampler, a binary pump, and a diode array detector (DAD) detector.

Regarding lipophilic fraction of phenols, 0.3 g of samples was dissolved in 10 mL of isopropanol and filtered through a 0.25 μm filter before the RRLC analysis to characterize the individual content of tocopherols. The chromatographic separation of these compounds was performed on a 150 mm \times 4.6 mm i.d., 120 Å, Cosmosil π NAP column (CPS Analytica, Milan, Italy). The mobile phases used were water with 0.2% phosphoric acid as eluent A and methanol as eluent B in isocratic gradient (10:90, v/v). The flow rate was 1 mL/min, and analyses were made at room temperature. The injection volume in the RRLC was 20 μL . The total run time was 30 min. Tocopherols separated were quantified with DAD detector at 295 nm. A calibration curve was calculated by using six points of α -tocopherol at different concentrations, estimated from the amounts of the analytes in samples, and was linear over the range studied ($r^2 = 0.999$). Results were given in mg of α -tocopherol per kg of oil.

Polar phenols were isolated from the EVOO using solid-phase extraction (SPE) with Diol-cartridges (bed weight 1000 mg, 6 mL of tube size), following the method described by Lozano-Sanchez et al.²⁰ EVOO (60 g) was dissolved in *n*-hexane and loaded into the column. The cartridge was washed with 15 mL of *n*-hexane. Finally, the sample



Table 1. Quality Indices and FA Composition of Filtered and Unfiltered EVOOs^a

quality indices	unfiltered EVOO	filtered EVOO			legal Limits ^b
		filter bag	argon gas	nitrogen gas	
PV	6.82 a ± 0.12	2.46 b ± 0.04	1.84 b ± 0.01	1.84 b ± 0.06	≤20
K ₂₃₂	1.56 a ± 0.09	1.61 a ± 0.04	1.64 a ± 0.05	1.60 a ± 0.08	≤2.5
K ₂₇₀	0.11 b ± 0.00	0.15 a ± 0.00	0.16 a ± 0.00	0.10 b ± 0.00	≤0.22
FA	0.28 a ± 0.01	0.28 a ± 0.00	0.21 b ± 0.00	0.22 b ± 0.00	≤0.8
FA composition	unfiltered EVOO	filter bag	argon gas	nitrogen gas	legal limits/usual range ^b
C16:0	12.53 a ± 0.17	12.65 a ± 0.18	12.63 a ± 0.04	12.58 a ± 0.14	7.5–20
C16:1 n-9	0.09 a ± 0.00	0.09 a ± 0.00	0.09 a ± 0.01	0.09 a ± 0.02	
C16:1 n-7	0.75 a ± 0.05	0.75 a ± 0.01	0.74 a ± 0.01	0.74 a ± 0.01	0.3–3.5
C17:0	0.05 a ± 0.00	0.05 a ± 0.00	0.04 a ± 0.00	0.04 a ± 0.00	≤0.3
C17:1	0.08 a ± 0.00	0.07 a ± 0.00	0.08 a ± 0.00	0.07 a ± 0.00	≤0.3
C18:0	1.98 a ± 0.04	2.00 a ± 0.02	2.00 a ± 0.05	2.00 a ± 0.05	0.5–5
C18:1 n-9	71.10 a ± 0.23	71.34 a ± 0.03	71.30 a ± 0.00	71.42 a ± 0.07	55–83
C18:1 n-7	2.59 a ± 0.15	2.46 a ± 0.01	2.46 a ± 0.00	2.44 a ± 0.01	
C18:2 n-6	9.17 a ± 0.13	9.22 a ± 0.05	9.22 a ± 0.02	9.23 a ± 0.02	3.5–21
C20:0	0.41 a ± 0.03	0.35 a ± 0.02	0.36 a ± 0.00	0.36 a ± 0.02	≤0.6
C18:3 n-3	0.70 a ± 0.02	0.70 a ± 0.01	0.70 a ± 0.00	0.70 a ± 0.02	≤1
C20:1	0.30 a ± 0.01	0.31 a ± 0.02	0.30 a ± 0.01	0.31 a ± 0.02	≤0.4
MUFAs/PUFAs	7.53 a ± 0.08	7.56 a ± 0.05	7.52 a ± 0.02	7.56 a ± 0.04	
C18:1/C18:2	7.75 a ± 0.08	7.74 a ± 0.05	7.73 a ± 0.02	7.74 a ± 0.02	

^aPV, PV expressed as mequiv O₂/kg; K₂₃₂ and K₂₇₀, specific absorptions at 232 and 270; FA, free acidity given as a percentage of oleic acid; and FA composition, weight percentage of total FAMES present (g/100 g of FAME). Values with the same letter in a line are not significantly different at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$). ^bLegal limits and/or usual ranges are in accord to the values reported in Reg. UE 61/2011.

was recovered by passing through 40 mL of methanol, and the solvent was evaporated under vacuum. The residue was dissolved with 2 mL of methanol and filtered through a 0.25 μm filter before the RRLC analysis. For the qualitative and quantitative characterization of phenolic extract, RRLC was coupled to a time-of-flight mass spectrometer detector microTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), which was equipped with a model G1607A ESI interface (Agilent Technologies) operating in negative ion mode. A 150 mm \times 4.6 mm i.d., 1.8 μm , Zorbax Eclipse Plus RP-C18 column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) was used for analytical analysis. The mobile phases used were 0.25% acetic acid as eluent A and methanol as eluent B. The total run time was 27 min using a previously reported multistep linear gradient.²⁰ The flow rate was 0.80 mL/min, and consequently, the use of a splitter was required for the coupling with the MS detector, as the flow which arrived to the TOF detector had to be 0.2 mL/min to ensure reproducible results and stable spray.

External mass spectrometer calibration was performed with sodium acetate clusters [5 mM sodium hydroxide in water/2-propanol 1/1 (v/v), with 0.2% of acetic] in quadratic high precision calibration (HPC) regression mode. The optimum values of the source and transfer parameters were established according to Lozano-Sánchez et al.²⁰ The widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions has been established at 10 ppm for most of the compounds.

The phenolic compounds were identified by comparing both retention times and MS data from samples and standards. The remaining compounds for which no commercial standards were available were identified by the interpretation of the information generated by the DAD, TOF analyzer, and the information reported (most compounds were previously described in olive oil). Quantification was made by RRLC-ESI-TOF-MS. Seven standard calibration curves of the main compounds found in the samples were prepared using seven commercial standards. All calibration curves showed good linearity over the study range ($r^2 = 0.995$). The individual concentrations were determined using the area of each individual compound (three replicates) and by interpolation of the corresponding calibration curve. Results are given in mg of analyte per kg of oil.

Physicochemical and Sensorial Analysis. Color was expressed with the chromatic coordinates L^* , a^* , b^* adopted by the CIE in 1976,

where L^* is the brightness varying from 0 to 100, while a^* (from green to red) and b^* (from blue to yellow) are two chromatic components ranging between -120 and 120 .²¹ The CIELab color space analyses were conducted using a ColorFlex instrument (HunterLab, Reston, VA). Three replicates were analyzed per sample.

Sensory analysis was performed by a fully trained analytical taste panel for virgin olive oil of Dipartimento di Scienze degli Alimenti of Università di Bologna (recognized by the Italian Ministry of Agriculture, Food, and Forestry Policy-Mipaaf). Quantitative descriptive analysis (QDA) was applied to identify different sensory profiles between tested EVOO. Each taster was asked to identify olfactory and gustatory characteristics in samples (specifying the difference in terms of major or minor presence of bitter and/or pungent attributes). Each oil sample was analyzed by 10 tasters during three different sessions using the sensory ballot reported by Cerretani et al.²² Samples were randomly distributed among the assessors.

Statistical analysis. Data were analyzed using Origin (version Origin Pro 8 SR0, Northampton, MA) to perform one-way-analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$) to identify significant differences among all parameters analyzed in filtered and unfiltered EVOO.

RESULTS AND DISCUSSION

Compositional Analysis. Table 1 includes the legal quality indices and FA composition in samples. Specific absorptions at 232 and 270 nm, PV, and free acidity (FA) were widely within the legal limits for EVOO category. A slight increase in K₂₇₀ values was evidenced for filtered EVOO using argon gas flow and filter-bag systems. In any case, filtration did not have effects on the K₂₃₂ values. On the other hand, the PV was reduced to less than half of the genuine value in unfiltered EVOO. The FA values showed only a slight but significant decrease when the inert gas-flow filtration procedures were applied.

Regarding FA content, percentages of palmitic, oleic, linoleic, and linolenic acids covered the usual range in olive oils. No differences were found among samples concerning MUFAs/PUFAs and C18:1/C18:2 ratios. In any case, filtration had no effect on FA composition.



Table 2. Quantitative Results (Value = $X \pm SD$)^a

	unfiltered EVOO (mg analyte/kg)	filtered EVOO (mg analyte/kg)		
		filter bag	argon gas	nitrogen gas
water content	2618.33 \pm 21.52	882.13 \pm 3.02	856.66 \pm 5.50	1337.49 \pm 27.48
OSI time (h)	27.13 \pm 0.59	25.40 \pm 0.06	25.10 \pm 0.09	26.45 \pm 0.06
carotenoids	4.37 \pm 0.09	2.18 \pm 0.01	2.47 \pm 0.01	2.64 \pm 0.08
chlorophylls	9.59 \pm 0.09	2.88 \pm 0.01	3.29 \pm 0.04	3.74 \pm 0.10
total pigments	13.96 \pm 0.07	5.05 \pm 0.01	5.74 \pm 0.03	6.38 \pm 0.30
α -tocopherol	239.79 \pm 8.14	230.57 \pm 5.60	228.80 \pm 5.60	231.55 \pm 6.24
δ -tocopherols	55.52 \pm 0.82	56.80 \pm 3.17	57.21 \pm 0.72	56.10 \pm 0.07
total lipophilic phenols	295.31 \pm 8.84	287.37 \pm 7.89	286.02 \pm 6.18	294.26 \pm 7.58
total hydrophilic phenols	193.77 \pm 9.72	230.61 \pm 6.21	379.38 \pm 8.92	211.43 \pm 9.54

^aValues with the same letter in a line are not significantly different at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

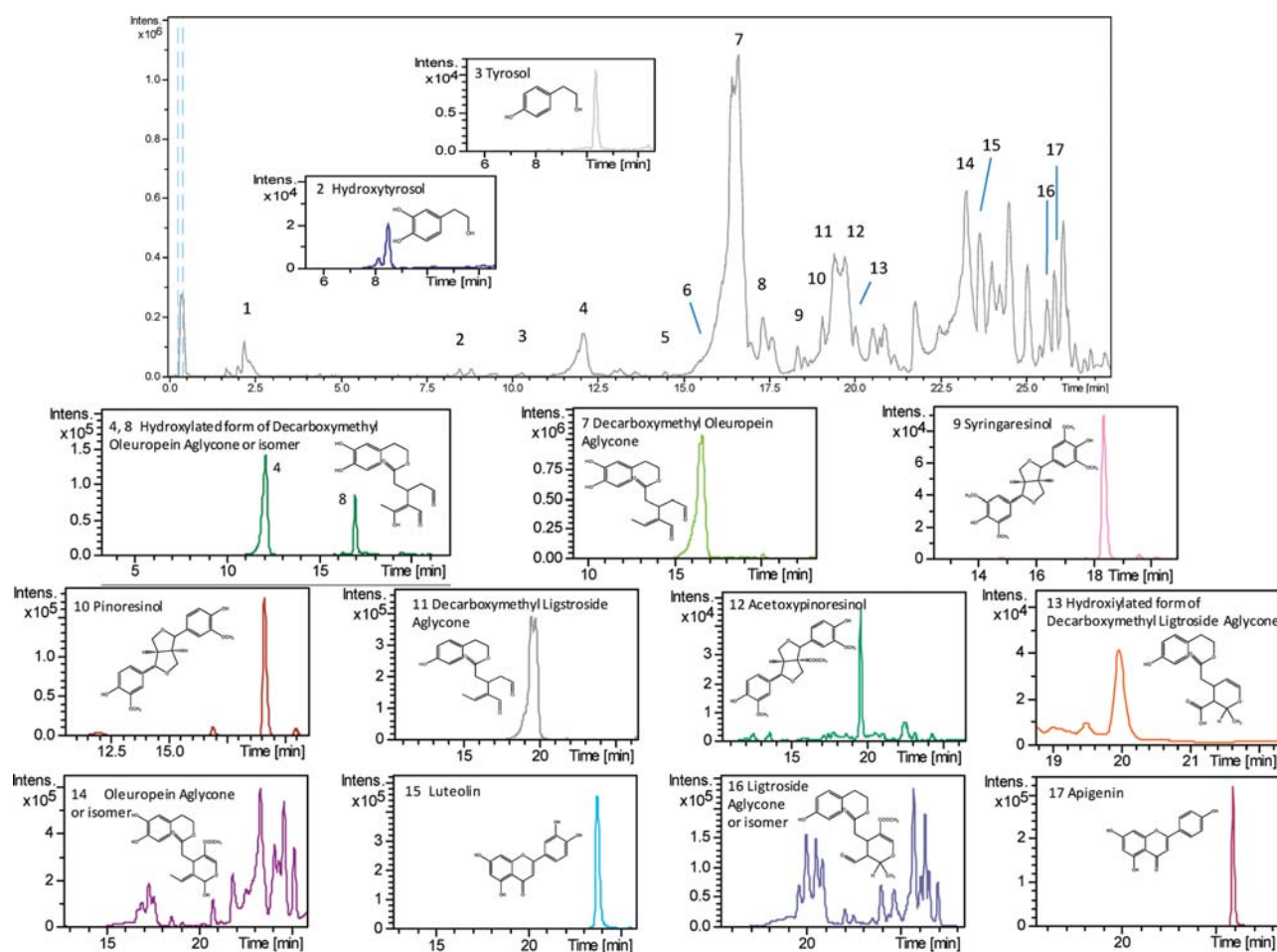


Figure 1. Top: base peak chromatogram (BPC) of the representative Peranzana EVOO phenolic extract obtained by RRLC-ESI-TOF-MS. Bottom: EIC of the main phenolic compounds identified in samples and their structures. Each compound has been numbered using the elution order obtained by RRLC-ESI-TOF-MS.

Water Content and OSI Time. Table 2 includes water content, OSI, pigments, and antioxidant compounds in samples. As expected, the highest water content was registered in unfiltered olive oil. The quantity of water significantly decreased in all filtered samples. Among these, olive oils filtered using argon gas flow and a filter bag had the lowest polar-phase contents. These systems could be considered the most effective ones for reducing the water content.

There was a slight tendency of OSI time to decrease after filtration. This effect was more pronounced when the argon gas and filter bag were used as filter aids than when nitrogen gas was used. These differences could be related to the relation between water content and antioxidant capacity of polyphenols. Indeed, different authors have demonstrated that polar-phenolic compounds oriented in the water-in-oil emulsion interface are more protective against oxidation.²³ As a consequence, the



Table 3. Main Phenolic and Other Polar Compounds Identified in Peranzana Monovarietal EVOO by RRLC-ESI-TOF

peak	compds	retention time (min)	m/z		molecular formula	error	σ
			exptl	calcd			
1	quinic acid	2.2	191.0564	191.0561	C ₇ H ₁₂ O ₆	-1.6	0.014
2	hydroxytyrosol	8.5	153.0546	153.0557	C ₈ H ₁₀ O ₃	7.6	0.006
3	tyrosol	10.3	137.0608	137.0608	C ₈ H ₁₀ O ₂	0.3	0.035
4	hydroxylated form of decarboxymethyl-oleuropein aglycon or isomer	12.1	335.1140	335.1136	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	-1.0	0.004
5	hydroxytyrosol acetate	14.5	195.0654	195.0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	4.6	0.013
6	elenolic acid	15.3	241.0713	241.0718	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	2.9	0.039
7	decarboxymethyl oleuropein aglycon	16.3	319.1204	319.1187	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	-5.3	0.027
8	hydroxylated form of decarboxymethyl-oleuropein aglycon or isomer	16.6	335.1132	335.1136	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	1.3	0.010
9	syringaresinol	18.3	417.1540	417.1555	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	3.5	0.030
10	pinosresinol	19.0	357.1335	357.1344	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	2.4	0.007
11	decarboxymethyl ligstroside aglycon	19.4	303.1247	303.1229	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	-2.9	0.015
12	acetoxypinosresinol	19.5	415.1366	415.1398	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	7.8	0.023
13	hydroxylated form of decarboxymethyl- ligstroside aglycon	19.9	319.1179	319.1187	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	2.7	0.026
14	oleuropein aglycon	23.1	377.1266	377.1242	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	-6.4	0.046
15	luteolin	23.6	285.0416	285.0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-4.1	0.024
16	ligstroside aglycon	25.5	361.1283	361.1293	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	2.9	0.019
17	apigenin	25.8	269.0460	269.0451	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-1.8	0.034

Table 4. Quantitative Results of the Individual Phenolic Compounds (Value = X ± SD)^a in the Unfiltered and Filtered Peranzana Monovarietal EVOOs

compds	unfiltered EVOO (mg analyte/kg)	filtered EVOO (mg analyte/kg)		
		filter bag	argon gas	nitrogen gas
total phenyl alcohol contents	2.36 b ± 0.11	2.28 c ± 0.11	3.64 a ± 0.15	2.77 b ± 0.10
hydroxytyrosol	0.94 b ± 0.03	0.61 c ± 0.04	1.10 a ± 0.04	0.94 b ± 0.05
tyrosol	1.02 c ± 0.09	1.20 c ± 0.11	2.02 a ± 0.09	1.44 b ± 0.06
hydroxytyrosol acetate	0.40 b ± 0.02	0.48 a ± 0.03	0.52 a ± 0.05	0.39 b ± 0.01
total secoiridoid contents	181.40 b ± 9.30	219.52 c ± 17.12	364.96 a ± 10.67	199.35 b ± 5.34
hydroxy D-oleuropein aglycon	1.19 c ± 0.04	0.73 d ± 0.05	2.85 a ± 0.09	1.50 b ± 0.13
elenolic acid	0.62 b ± 0.05	0.33 d ± 0.02	0.87 a ± 0.05	0.50 c ± 0.04
oleuropein aglycon	47.19 b ± 2.84	48.20 b ± 3.99	93.48 a ± 5.53	44.49 b ± 2.84
decarboxymethyl oleuropein aglycon	108.59 c ± 5.55	135.58 b ± 9.08	198.12 a ± 6.91	115.88 c ± 3.50
hydroxy D-oleuropein aglycon	0.27 b ± 0.01	0.34 b ± 0.02	1.05 a ± 0.00	0.31 b ± 0.01
ligstroside aglycon	3.08 c ± 0.19	3.62 b ± 0.18	4.92 a ± 0.39	2.91 c ± 0.10
decarboxymethyl ligstroside aglycon	20.29 c ± 1.58	30.53 b ± 2.68	63.34 a ± 2.76	33.50 b ± 1.66
hydroxy D-ligstroside aglycon	0.24 b,c ± 0.01	0.21 c ± 0.014	0.37 a ± 0.02	0.27 b ± 0.01
total lignan contents	4.16 b ± 0.12	3.70 c ± 0.18	4.45 a ± 0.14	4.05 b ± 0.08
pinosresinol	2.45 a,b ± 0.09	2.11 c ± 0.09	2.58 a ± 0.10	2.42 b ± 0.05
acetoxypinosresinol	0.70 a ± 0.01	0.54 c ± 0.02	0.63 b ± 0.03	0.63 b ± 0.01
syringaresinol	1.01 b ± 0.04	1.04 b ± 0.09	1.24 a ± 0.04	1.00 b ± 0.04
total flavone contents	5.84 b ± 0.17	5.11 c ± 0.15	6.33 a ± 0.12	5.26 b ± 0.17
luteolin	3.53 b ± 0.15	3.32 b ± 0.17	4.13 a ± 0.09	3.45 b ± 0.11
apigenin	2.31 a ± 0.08	1.79 b ± 0.09	2.20 a ± 0.05	1.81 b ± 0.08
other polar compounds: quinic acid	1.12 c ± 0.07		4.14 a ± 0.14	2.34 b ± 0.18

^aValues with the same letter in a line are not significantly different at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

oxidative stability of virgin olive oil is lower when the water content is decreased after filtration.

Pigments and Antioxidant Compounds. Filtration systems affected the amount and nature of pigments in olive oil. Regarding carotenoids, significant differences were found between filtered and unfiltered olive oils. All filtration systems reduced to half or less the content tested in crude olive oils. The chlorophyll concentration in all filtered olive oils was 3-fold lower than unfiltered ones, perhaps because these compounds are removed together with the by-product generated after filtration. Future research is needed to evaluate the composition of these wastes.

Regarding phenolic fraction, the most important lipophilic phenols identified by RRLC-DAD in olive oil were α - and δ -tocopherols. Experimental data showed similar values of both α - and δ -tocopherols in filtered and unfiltered olive oil by different systems. In any case, new filtration systems had no effect on lipophilic phenol content. These results were consistent with those reported by other authors who evaluated the effect of conventional filtration system on the tocopherol content.^{15,24}

The total polar phenolic content, tentatively calculated as the sum of the individual phenolic-compound concentrations, was increased by all the filtration systems. However, significant



differences were found only in samples filtered with the filter bag and argon gas flow. The apparent increase could be attributed to the reduction in the water content. In water-in-oil emulsion, hydrophilic polyphenols are stabilized around water droplets, and the affinity of the phenolic compounds to solvent extraction is lower than nonpolar matrix. However, the partial elimination of water during the filtration process permits a greater availability of hydrophilic polyphenols for extraction with a polar solvent mixture.² This apparent rise in levels of these compounds by filtration has also been mentioned by different authors on applying the conventional filtration systems at the laboratory scale.^{6,15,25} It should be considered that total polar phenols apparently increased after filtration due to the extraction in unfiltered EVOO and did not allow the complete recovery of these analytes due to the higher water content.

Behavior of Individual Polar Phenols in Filtration Process. Figure 1 shows the chromatogram of olive-oil polyphenolic extract and extracted ion chromatogram (EIC) of the main hydrophilic polyphenols identified in the samples. Table 3 includes the polar compounds identified in Peranzana olive-oil samples and the information generated by TOF analyzer. A total of 17 compounds were characterized in EVOO phenolic extract. Among these, 15 compounds were from different polyphenolic families (simple phenols, flavonoids, lignans, and secoiridoids). Peaks 2 and 3 were identified as the phenolic alcohols hydroxytyrosol and tyrosol, respectively. Peak 5 had a deprotonated molecule at m/z 195, corresponding to a derivative of simple phenols (hydroxytyrosol acetate), which has previously been described in the literature.²⁶

The main secoiridoids identified in samples were decarboxymethyl oleuropein aglycone (peak 7), oleuropein aglycone (peak 14), ligstroside aglycone (peak 16), and their hydroxylated forms (peaks 4, 8, and 13). Elenolic acid (peak 6), considered a derivative of secoiridoid group, was also identified in all samples. Concerning lignans, the spectra generated for peaks 9, 10, and 12, yielded deprotonated molecules at m/z 417, 357, and 415, respectively. According to literature reports, these peaks were assigned to syringaresinol, pinosresinol, and acetoxypinosresinol.^{20,27}

With regard to flavons, peak 15 had a deprotonated molecule at m/z 285 and 23.6 min and peak 17 at m/z 269 and 25.8 min, which were identified as luteolin and apigenin, respectively. Concerning the other polar compounds, quinic acid was also identified in the extracts deriving from all EVOO.

Table 4 includes quantitative results of the individual hydrophilic polyphenols. The phenolic compounds hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin, apigenin, and (+)-pinosresinol, as well as quinic acid, were quantitated by the calibration curves drawn from their respective commercial standards. The other phenolic compounds, which had no commercial standards, were tentatively quantitated using other compounds with similar structures. The secoiridoid and lignan groups were quantitated using oleuropein and (+)-pinosresinol standards, respectively. The elenolic acid concentrations were expressed as oleuropein. It should be taken into account that the response of standards may differ from that of the analytes with similar structure present in samples, and consequently, the quantitation of these compounds is an estimation of their actual concentration.

The concentration of most polar-phenolic compounds seemed to increase after filtration. Among these, mainly hydrophilic phenols belonging to secoiridoid group were responsible for the apparent increase in the total polar phenolic

content. The amounts of oleuropein aglycone, decarboxymethyl oleuropein aglycone, and decarboxymethyl ligstroside aglycone increased the most after filtration. These increases have also been mentioned by other authors when conventional filtration systems were applied.⁶ However, this effect is related to the fact that filtration reduces the water content, and the polar phenols are more prone to solvent extraction, as noted above. Indeed, the higher concentrations of secoiridoids and derivatives were detected in filtered samples with argon gas flow, showing the lower content in water.

Regarding filter-bag system, while the total content on secoiridoids was also increased in filtered EVOOs, this filtration procedure did not have the same effect on the other phenolic compounds. Indeed, phenyl alcohols, lignans, and flavones were decreased after filtration using the polypropylene filter bag. Given that some of these compounds were not decreased by the inert gas-flow filtration system, it could be surmised that filter-bag filtration had the highest retention power of these minor compounds. The origin of this difference could be attributed to the different nature of filter aids. Future research is warranted to evaluate the phenolic composition in wastes generated during filtration by different systems.

With respect to other polar compounds, quinic acid was also increased in filtered EVOO by inert gas flow (argon and nitrogen), while an opposite trend was found for the filter-bag system. This compound was removed from the olive oil matrix when polypropylene filter bag was used as the filter aid.

Relationship between EVOO Oxidative Stability and Antioxidant Compounds. EVOO oxidative stability is influenced by different parameters, mainly temperature, exposure to light, the presence or absence of oxygen, FA composition (unsaturation rate), and composition on minor components, which may be antioxidant and pro-oxidant constituents.²⁸

In terms of the FA composition, the same trend was found in EVOO with all of the filtration systems: filtered and unfiltered EVOO did not significantly differ. In this way, filtration processes did not affect the glyceride composition, and all olive oils (filtered and unfiltered) were constituted by the same glyceride matrix. Therefore, the oxidative stability depended on the concentrations of pro-oxidant and antioxidant constituents: chlorophylls, tocopherols, and polar phenols.

Among these, chlorophylls may act as protectors, capturing free radicals in the dark, improving oil stability. Indeed, the chlorophylls may interrupt the chain reaction of autoxidation by acting as electron donors to the free and peroxy radicals generated in the early phases. However, when exposed to light, these compounds stimulate the autoxidation by activated oxygen, producing singlet oxygen and generating allyl hydroperoxides, thereby decreasing the shelf life of the oil.²⁹ Thus, the behavior of chlorophylls depends on the storage conditions.

Because the amount of these compounds in filtered oils appears to be lower, it suggests that their oxidative stability in darkness would be lower than for unfiltered EVOOs. Nevertheless, when oil is exposed to light, filtration reduces susceptibility to oxidative reactions. Consequently, special attention should be given to storage conditions.

On the other hand, it is well-known and widely accepted that in the EVOO matrix the antioxidant activity of chlorophylls is lower than other minor constituents such as tocopherols and polar phenols.^{28,30} Indeed, it has been reported that OSI values depend on the qualitative and quantitative compositions of FAs, tocopherols, and polar-phenolic compounds.³¹ Given that



Table 5. Values of $L^*a^*b^*$ Coordinates of the EVOOs^a

	unfiltered	SD	filter bag	SD	argon gas	SD	nitrogen gas	SD
L^*	41.14 d	0.82	46.37 c	0.23	53.28 a	0.39	51.33 b	0.95
a^*	3.01 a	0.27	2.34 b	0.05	1.98 b	0.03	2.35 b	0.19
b^*	64.89 c	0.98	74.39 b	0.42	82.16 a	0.51	75.65 b	1.52

^aValues with the same letter in a line are not significantly different at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$). SD, standard deviation.

the qualitative and quantitative compositions in FAs and tocopherols were very similar for all of the samples, the differences in oxidative stability could be linked to the polar-phenolic compounds and their antioxidant capacity.

Hydrophilic phenols and, in particular, *ortho*-diphenols are reported to be the highest contributors to oxidative stability in virgin olive oils.^{28,30,32–34} The *ortho*-diphenolic compounds characterized in these samples were hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, oleuropein aglycone, decarboxymethyl oleuropein aglycone, and their hydroxylated derivatives and luteolin. The major total polar phenol content and *ortho*-diphenols composition were obtained in filtered samples, which showed the lowest OSI time values. No correlation was found between a major content in hydrophilic phenols and OSI time values.

This trend in oxidative stability may be attributed to the influence of the water content in the polar-phenol extraction and its antioxidant activity. First, as indicated above, the lower water content in filtered EVOO to facilitate phenolic compound extraction gave higher polar-phenol concentrations than did unfiltered EVOO. Second, polar antioxidants are more effective in a water-in-oil emulsion system due to their orientation of polar-phenolic compounds at the water–oil interface, and the active surface of water droplets influences protection against the oxidation of oil. Thus, water content reduction after filtration provides a less antioxidant capacity of hydrophilic phenols and consequently lower OSI time values.

Physicochemical and Sensorial Properties. Table 5 shows the oil color measurement by tristimulus coordinates L^* , a^* , and b^* of the CIELAB chromatic space. Concerning the a^* and b^* values, corresponding to the green and yellow zones, respectively, the filtered EVOOs after the application of argon gas-flow filtration registered values significantly different from samples treated by nitrogen gas and the filter bag, while the unfiltered EVOOs were the richest in green color (higher value of a^*) and the poorest in yellow (lowest value of b^*). These trends among unfiltered EVOOs and the filtered samples can be considered consistent with a general loss in pigments (spectrophotometric data relative to chlorophylls, carotenoids, and total pigments) due to the application of the different treatment systems.

The luminosity value (L^*) was significantly lower in unfiltered samples than EVOOs treated with inert gases. However, the luminosity observed for the sample filtered by filter bag reached a middle value. The increase of the L^* values agreed with the general reduction in the pigment content in the oils, the pigments being able to capture part of the light, instead of transmitting it.

The sensory profile of the filtered and unfiltered EVOO is depicted in Figure 2 according to the sensory attributes. None of the EVOO samples included in this study presented any organoleptic defects. In terms of bitter and pleasant flavors, quantitative descriptive sensory analysis evidenced a trend toward enhanced gustatory attributes due to filtration. The fruity olive attribute, expressed as the olfactory intensity value, showed the same intensity value in unfiltered EVOOs and

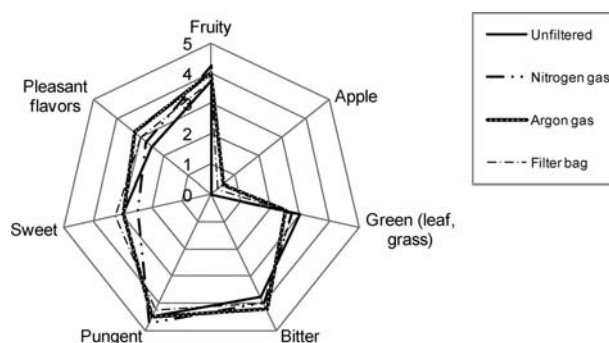


Figure 2. Sensory profiles of the filtered and unfiltered EVOOs.

those filtered by the bag system. This value, 3.75 for both kinds of samples, was lower than in samples filtered by nitrogen and argon gas flow (4.25 and 4, respectively).

Regarding apple and sweet attributes, the intensity was higher in samples filtered using argon gas flow and the polypropylene filter bag than in unfiltered EVOO samples. However, the intensity of the green perception diminished from unfiltered EVOOs (3) to filtered EVOOs (2.75, 2.5, and 2.75 for filter bag, argon, and nitrogen gas-flow system, respectively). Finally, the greater intensity of pungency was found in filtered samples, when nitrogen and argon gas were used as filter aids.

The positive and negative effects of the new filtration process on the shelf life and physicochemical and organoleptic properties of olive oil were tested. Although no effects on the glyceride matrix or tocopherol concentrations were found, other related compounds with the oxidative stability were affected. Indeed, the highest content in *ortho*-diphenols, which are reported to be the highest contributors to oxidative stability, was obtained in filtered EVOO. However, the lowest OSI time values were registered in filtered EVOO. It could be due to the fact that these compounds are a powerful antioxidants more protective against oxidation in a water-in-oil emulsion. Because the filtration reduces the water content, unfiltered olive oils may be more stable. This may be considered a negative effect of the filtration process. Nevertheless, it should be taken into account that EVOO is generally stored in the mill until commercialization. During this storage time, the higher polar phase content in unfiltered olive oils may increase the alteration of virgin olive oil, mainly affecting free acidity or generating off-flavors. On the other hand, new filtration processes reduce the chlorophyll content and consequently susceptibility to oxidative reactions when exposed to light. Special attention should be given to the storage conditions. Furthermore, it is important to emphasize that the results of the sensorial analysis confirmed that filtration using inert gas does not lower the intensity of the main organoleptic attributes that contribute to the consumer acceptance. Because this system avoids the use of organic materials that come into contact with oil, it could be a valuable alternative to conventional filtration processes.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34 958249510. Fax: +349582495. E-mail: ansegura@ugr.es.

Funding

We are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for Projects AGL2008-05108-C03-03 and AGL2011-29857-C03-02 and a grant (FPU, AP2007-03245) and to the Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for Projects P09-CTS-4564, P10-FQM-6563, and P11-CTS-7625 and to GREIB.PT.2011.18 projects.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) European Community. Council Regulation No. 1513/2001 of 23 July 2001 amending Regulations No. 136/66/EEC and (EC) No. 1638/98 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. *Off. J. Eur. Comm.* **2001**, *L201*, 4–7.
- (2) Lozano-Sanchez, J.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Filtration process of extra virgin olive oil: Effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 201–211.
- (3) Masella, P.; Parenti, A.; Spugnoli, P.; Baldi, F.; Mattei, A. A predictive classification model for the management of virgin olive oil filtration at industrial scale. *Sep. Sci. Technol.* **2011**, *46*, 1709–1715.
- (4) Sawalha, S.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterization of phenolic compounds in diatomaceous earth used in the filtration process of olive oil by HPLC-ESI-TOF (MS). *Agro Food Ind. Hi-Tech* **2009**, *20*, 46–50.
- (5) Lozano-Sanchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1146–1150.
- (6) Gomez-Caravaca, A. M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Lercker, G. Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *Am. J. Food Technol.* **2007**, *2*, 671–678.
- (7) Bottino, A.; Capannelli, G.; Comite, A.; Ferrari, F.; Marotta, F.; Mattei, A.; Turchini, A. Application of membrane processes for the filtration of extra virgin olive oil. *J. Food Eng.* **2004**, *65*, 303–309.
- (8) Deiana, M.; Incani, A.; Rosa, A.; Corona, G.; Atzeri, A.; Loru, D.; Paola Melis, M.; Assunta Dessi, M. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H₂O₂ induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2984–2990.
- (9) Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessià, M. A.; Spencer, J. P. E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 897–903.
- (10) Incani, A.; Deiana, M.; Corona, G.; Vafeiadou, K.; Vauzour, D.; Dessi, M. A.; Spencer, J. P. E. Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H₂O₂-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 788–796.
- (11) Deiana, M.; Corona, G.; Incani, A.; Loru, D.; Rosa, A.; Atzeri, A.; Paola Melis, M.; Assunta Dessi, M. Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3008–3016.
- (12) Oliveras-Ferreros, C.; Fernández-Arroyo, S.; Vazquez-Martin, A.; Lozano-Sánchez, J.; Cufí, S.; Joven, J.; Micol, V.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A.; Menendez, J. A. Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 1533–1547.
- (13) Koidis, A.; Boskou, D. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 323–328.
- (14) Tsimidou, M. Z.; Georgiou, A.; Koidis, A.; Boskou, D. Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chem.* **2005**, *93*, 377–383.
- (15) Fregapane, G.; Lavelli, V.; Leon, S.; Kapuralin, J.; Salvador, M. D. Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 134–142.
- (16) Bottino, A.; Capannelli, G.; Mattei, A.; Rovellini, P.; Zunin, P. Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 1109–1115.
- (17) Cerretani, L.; Roculi, P.; Bendini, A.; Romani, S.; Bacci, A. Oil clarifying process and apparatus for implementing the process. World Patent Application WO 2009/107096, 2009.
- (18) Maggio, R. M.; Valli, E.; Bendini, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Toschi-Gallina, T.; Cerretani, L. A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chem.* **2011**, *127*, 216–221.
- (19) Minguez-Mosquera, M. I.; Rejano, L.; Gandul-Rojas, B.; Sanchez, A. H.; Garrido-Fernandez, J. Color-pigment correlation in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 332–336.
- (20) Lozano-Sanchez, J.; Segura-Carretero, A.; Menendez, J. A.; Oliveras-Ferreros, C.; Cerretani, L.; Fernandez-Gutierrez, A. Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9942–9955.
- (21) Kilic, K.; Onal-Ulusoy, B.; Boyaci, I. H. A novel method for color determination of edible oils in L*a*b* format. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 157–164.
- (22) Cerretani, L.; Biasini, G.; Bonoli-Carbognin, M.; Bendini, A. Harmony of virgin olive oil and food pairing: A methodological proposal. *J. Sens. Stud.* **2007**, *22*, 403–416.
- (23) Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, 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.
- (24) Romero, C.; Brenes, M.; Garcia, P.; Garrido, A. Hydroxytyrosol 4-beta-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3835–3839.
- (25) Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Garrido, A. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5609–5614.
- (26) Ouni, Y.; Taamalli, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A.; Zarrouk, M. Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1263–1267.
- (27) Suarez, M.; Macia, A.; Romero, M.; Motilva, M. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1214*, 90–99.
- (28) 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.* **2005**, *53*, 5766–5771.
- (29) Giuliani, A.; Cerretani, L.; Cichelli, A. Chlorophylls in olive and in olive oil: Chemistry and occurrences. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 678–690.
- (30) Mateos, R.; Dominguez, M.; Espartero, J.; 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.
- (31) Bendini, A.; Valli, E.; Cerretani, L.; Chiavaro, E.; Lercker, G. Study on the effects of heating of virgin olive oil blended with mildly



deodorized olive oil: Focus on the hydrolytic and oxidative state. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10055–10062.

(32) Velasco, J.; Dobarganes, C. Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 661–676.

(33) Cerretani, L.; Bendini, A.; Gallina-Toschi, T.; Lercker, G.; Rotondi, A. Influence of two process variables on the oxidative stability of extra-virgin olive oils (cv. Peranzana) obtained from different extraction technologies. *Ind. Aliment. Italy* **2006**, *455*, 133–140.

(34) Bendini, A.; Cerretani, L.; Vecchi, S.; Carrasco-Pancorbo, A.; Lercker, G. Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4880–4887.



**Characterisation of the phenolic compounds
retained in different organic
and inorganic filter aids used for filtration of extra-
virgin olive oil**



**Caracterización de los compuestos fenólicos
retenidos en diferentes coadyuvantes de
naturaleza orgánica e inorgánica utilizados en el
proceso de filtración**



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil

J. Lozano-Sánchez, A. Segura-Carretero*, A. Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, University of Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2009

Received in revised form 22 June 2010

Accepted 11 July 2010

Keywords:

Filtration process

Diatomaceous earth

Organic filter aids

Extra virgin olive oil

Phenolic contents

HPLC

ESI-TOF

Spectrophotometric determination

ABSTRACT

The aim of this work was to identify and quantify some of the phenolic compounds retained by different filters used for the filtration of two varieties of extra virgin olive oil (Arbequina and Picual). This was performed by HPLC–ESI–TOF and Folin–Ciocalteu spectrophotometric technique. A significant loss in the phenolic concentration with all the tested filter aids was observed. This suggests that the organic filter aids present a higher performance than traditional industrial filters on a laboratory scale, although they show more retentive power regarding the phenolic concentration.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Extra virgin olive oil (EVOO) presents physiological properties that make it a functional food. From a chemical point of view, olive oil can be divided into major and minor fractions. The major one includes glycerols which represents approximately 98% of the total, also known as the acylglycerol fraction. In the minor fraction, different chemical compounds can be found such as tocopherols, polyphenols, aromatic hydrocarbon compounds, aliphatic and triterpenic alcohols, sterols and volatile compounds. Amongst all of these, the phenolic compounds have a significant importance for their nutritional and technological properties. Their antioxidant function and anti-inflammatory effect (Perona, Cabello-Moruno, & Ruiz-Gutierrez, 2006) have been related to the preventive action on certain diseases such as atherosclerosis (Huang & Sumpio, 2008) and cancer (Giovannini et al., 2008; Menendez et al., 2007). Polyphenols also present an important technological value due to their influence on sensory characteristics (Baccouri et al., 2008; Bendini et al., 2007; Carrasco-Pancorbo et al., 2005) and the shelf life of virgin olive oil.

There are multitude of factors that influence the polyphenolic content of EVOO including agronomic conditions (Servili et al., 2007; Tovar, Motilva, & Romero, 2001), climate, degree of ripening (Bonoli, Bendini, Cerretani, Lercker, & Toschi, 2004), olive variety

and production process (Servili, Taticchi, Esposito, Selvaggini, & Montedoro, 2002).

EVOO is exclusively produced through mechanical and physical processes (European Community, Commission Regulation, 2001). The steps of the production process are: collecting, washing, pressing, decantation, centrifugation, storage, filtration and bottling. The effects of pressing, centrifugation and storage on the polyphenolic content in olive oil have been widely studied (Angerosa, Mostallino, Basti, Vito, & Serraiocco, 2000; Morello, Motilva, Tovar, & Romero, 2004; Parenti, Spugnoli, Masella, & Calamai, 2008; Servili et al., 2007). However, there is little information available on the filtration procedure. As a final step in the elaboration process, the filtration may affect the polyphenolic content in olive oil. This process can be carried out with various materials in combination with filtration hardware to improve filtration performance. These materials, denominated filter aids, can be produced from a wide variety of raw materials and their use depends on the final purpose. The olive oil can also be filtered to obtain an impeccable commercial presentation and to remove humidity. In this case cotton or paper filters can be used in the filtration process. Their effect on phenolic fraction has been studied (Gómez-Caravaca et al., 2007; Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010) and it has showed a significant decrease in hydroxytyrosol on EVOO after cotton filtration to remove humidity. However, filtration with either cotton or paper plus anhydrous sodium sulphate led to an apparent increase in the phenolic content.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 249510.

E-mail address: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero).

Table 1
Filtration times of the different filter aids used in filtration process to laboratory scale.

Filter aids (1 g)	EVOO		Filtration times
	Variety	Quantity (g)	
Earth diatomaceous	Arbequina	70	5 h
	Picual	70	5 h 15 min
Filtracel® 1000	Arbequina	70	3 h 45 min
	Picual	70	4 h
Starch	Arbequina	70	3 h 30 min
	Picual	70	3 h 45 min
Vitacel® L90	Arbequina	70	3 h 30 min
	Picual	70	3 h 45 min

When the olive oil has a high content in suspended solids, the filtration process is carried out using diatomaceous earth. Diatomite is the fossilised remains of microscopic algae. It is mainly formed of silica and it presents great chemical stability. Recently, organic fibrous materials are becoming more and more popular and cellulose fibres and starch are possible candidates. The effect of diatomaceous earth and organic filter aids to measure the content in polyphenols has been not evaluated. This filtration system generates a solid waste that can be an alternative source of polyphenols.

The aim of this study was to evaluate the effect of filter aids on the phenolic content of EVOO. The characterisation of some of the retained phenolic compounds was achieved and the comparison between the results obtained by organic and inorganic filter aids was finally discussed.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The unfiltered olive oils used in this study were from two varieties (Arbequina and Picual) obtained from different geographic zones in Andalusia (Spain), the EVOOs were produced in the same year (September 2008) and from the same production plant (*Aceites Maeva S.L.*). Olives were processed by a continuous industrial plant equipped with a hammer crusher, a horizontal malaxator, and a two-phase decanter. Samples were stored in bottles without headspace at room temperature and in darkness before analysis.

2.2. Chemicals and apparatus

All chemicals were of analytical reagent grade and used as received. Methanol and *n*-hexane were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Sowinskiego, Poland). Acetic acid and acetonitrile were purchased from Fluka, Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), and Lab-Scan (Gliwice, Sowinskiego, Poland) respectively. Solvents were filtered using a Solvent Filtration Apparatus 58061 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Double-deionised water with conductivity less than 18.2 MΩ was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Folin–Ciocalteu's phenol reagent and anhydrous sodium carbonate were purchased from Fluka, Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and Panreac (Barcelona, Spain) respectively. Standards of hydroxytyrosol, tyrosol, vanillin, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, apigenin, were purchased by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), and (+)-pinoresinol was acquired from Arbo Nova (Turku, Finland). *Celite*®545 and *Kenite*®700, diatomaceous earth used in filtration process, were purchased from Brenntag Quimica (Sevilla, Spain) and World Minerals (Murat, France), respectively. Cellulose fibres (*Filtracel*®1000 and *Vitacel*®L90) and pregelatinised starch from corn were kindly provided by Verbiotech (Granada, Spain).

The vacuum pump used for this work was a Millipore pump model WP6222050 (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.3. Filtration process

The filtration methodology consisted in building the filtration column: 1 g of each used filter aid was placed in a 6 mL cartridge (the frits were previously inserted at the bottom of the cartridge). Cellulose fibres (*Filtracel*®1000 and *Vitacel*®L90), pregelatinised starch from corn and diatomaceous earth were used as filter aids. The filtration columns were connected to the vacuum system, and 70 g of EVOO was passed through the cartridge and collected. The relation between the filter aid and the olive oil (1 g/70 g) was selected accordingly to the same scale which is usually applied in the industry. Therefore, the proportions of diatomaceous earths were 0.75 g of *Celite*®545 and 0.25 g *Kenite*®700.

2.4. Extraction procedure of phenolic fraction retained from filter aids

A comparative study of various procedures with different conditions was performed to extract the phenolic compounds from the filter aids. The best results were obtained with this procedure: the cartridge used for filtering was washed with 20 mL of hexane to remove the lipophilic fraction. Then, 40 mL of methanol were passed through the cartridge and collected to remove the hydrophilic fraction. The methanol was finally evaporated under vacuum at 40 °C, and reconstituted in 1 mL of methanol.

2.5. HPLC analysis of phenolic compounds from filter aids

The qualitative analysis was performed using an Instrument Agilent 1200 HPLC system of the Series Rapid Resolution (RRLC). As a stationary phase a Zorbax Eclipse Plus C₁₈ analytical column (4.6 × 150 mm, 1.8 μm particle size) was used. Mobile phases A and B were water with 0.5% acetic acid, and ACN, respectively. The chromatographic method consisted of a linear gradient from 5% to 95% B during 23 min, from 23 to 25 min returning to initial conditions in two min, and finally a conditioning cycle of 10 min with the same conditions for the next analysis. The flow rate used was 0.80 mL/min. The temperature of the column was maintained at 25 °C. A volume of 10 μL of the methanolic extracts was injected.

2.6. MS analysis of phenolic compounds from filter aids

MS was performed using the microTOF™ (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) which was coupled to the HPLC system and equipped with an ESI interface operating in negative ion mode. Calibration was performed with sodium formate clusters (5 mM sodium hydroxide in water/isopropanol 1/1 (v/v), with 0.2% of formic) in quadratic + high precision calibration (HPC) regression mode. The calibration solution was injected at the beginning of the run and all the spectra were calibrated prior to polyphenol identification. The optimum values of source parameters were: capillary voltage of +4 kV; drying gas temperature, 190; drying gas flow, 8 L/min; nebulising gas pressure, 2 bar and end plate offset, −0.5 kV. The values of transfer parameters were: capillary exit, −120 V; skimmer 1, −40 V; hexapolo 1, −23 V, RF hexapolo, 50 Vpp and skimmer 2, −22.5 V. The source and transfer parameters were established for good sensitivity and reasonable resolution of the mass range for the compounds of interest (50–1000 *m/z*) in order to improved their ionisation performance.

The accurate mass data for the molecular ions were processed using the Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonik), software which provided a list of possible elemental formulas by using the Generate Molecular Formula™ Editor. The latter uses a CHNO algorithm providing standard functionalities such as minimum/maximum ele-



mental range, electron configuration, and ring-plus double bonds equivalent, as well as a sophisticated comparison of the theoretical with the measured isotopic pattern (Sigma-Value™) for increased confidence in the suggested molecular formula. The widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions has been established at 5 ppm (Ferrer, Garcia-Reyes, Mezcua, Thurman, & Fernandez-Alba, 2004) for most of the compounds.

2.7. Spectrophotometric determination of total phenolic content from olive oils

Spectrophotometric method based in Folin-Ciocalteu technique (Singleton & Rossi, 1956) was performed using a SPECTRON-IC® GENESYS™ 5 spectrophotometer (Spectronic Instruments Inc. Rochester, NY). To isolate the phenolic fraction of the filtered and

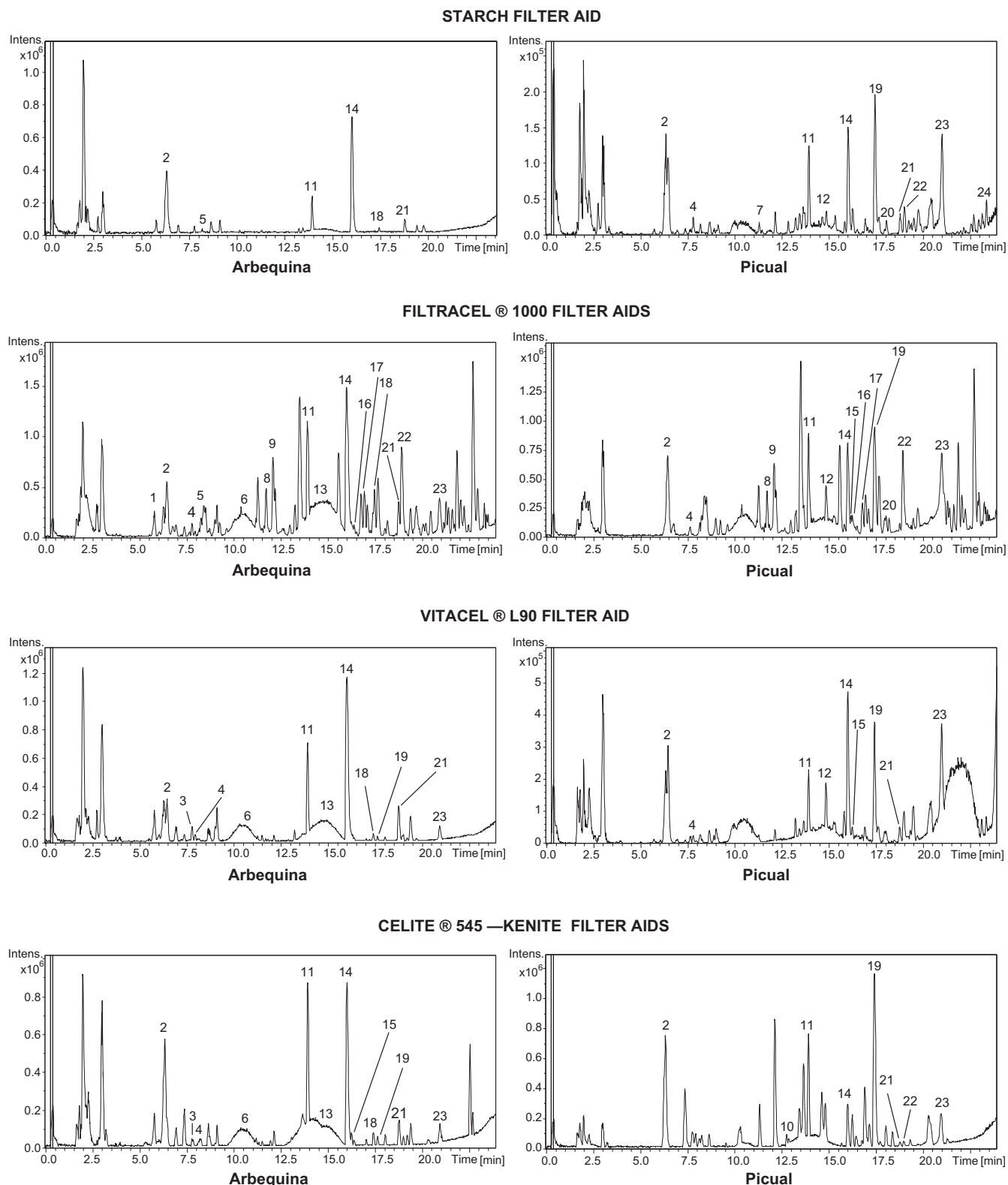


Fig. 1. BPC of all filter aids used to filter both varieties of EVOO (Arbequina and Picual) analysed by HPLC-ESI-TOF.



unfiltered olive oils, SPE with Diol-cartridges (Carrasco-Pancorbo, Neuss, Pelzing, Segura-Carretero, & Fernandez-Gutierrez, 2007) was used. These cartridges showed high recoveries of total phenols and good results were obtained. The extracts of olive oils were diluted 1:10 with methanol.

After this, a 50 µl aliquot of the diluted methanolic extracts of unfiltered and filtered olive oils were used in this determination. The absorbance was read at 725 nm and total polyphenols were expressed as caffeic acid equivalents. A calibration curve of freshly prepared caffeic acid solution was carried out. Three replicates of each analysis and for each calibration point were performed to obtain reproducible results. The curve absorbance versus concentration is described by the equation $A = 19.615C - 0.0253$ ($r = 0.98$).

2.8. Statistical analysis

Data were analysed using Origin (Version OriginPro 8 SR0, Northampton, USA) to perform one-way-analysis of variance (ANOVA) at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$) to identify significant differences between the retentive power from filters aids.

3. Results and discussion

3.1. Filtration rate

Table 1 summarises the filtration time required for each filter aid. Considering this variable, the organic filter aids were more efficient than industrial ones. In this preliminary study, the best technological alternatives for laboratory scale were starch and Vitacel®L90 filter aids. Filtracel®1000 required less filtration time than the industrial filter, but more than the other organic filters.

3.2. Identification of phenolic compounds in filter aids

The filter aid methanolic extracts obtained with the procedure detailed in the experimental section were analysed by HPLC–ESI–TOF. The resulting chromatograms are shown in Fig. 1 for the different filters used. The identification of phenolic compounds was

carried out comparing both retention times and MS spectral data from filter aid methanolic extracts and standards detailed in experimental section. Remaining compounds, for which there are not available commercial standards, were identified by the interpretation of their mass spectra provided by the TOF–MS and the information previously reported (most of these compounds have been previously described in olive oil) (Carrasco-Pancorbo et al., 2007; García-Villalba et al., 2010). Table 2 summarises the phenolic compounds tentatively identified in filter aids, including the retention time and molecular formula generated by TOF–MS analyser.

Different classes of the hydrophilic phenolics were retained in the filter aids: phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans and flavones. As far as phenolic acids are concerned, vanillin, vanillic, ferulic and *p*-coumaric acids were identified in different filter aids. Phenolic alcohols, tyrosol and hydroxytyrosol in addition to secoiridoids were found in all the filter aids. The most important secoiridoids retained in filter aids were: oleuropein aglycon (Ol Agl), 10-hydroxy-oleuropein aglycon (10-H-Ol Agl), decarboxymethylated derivatives of oleuropein aglycon (DOA), oxidation products of dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycone (Hydroxy-DOA) and ligstroside aglycon (Lig Agl). Regarding the lignans, (+)-pinoresinol (Pin), hydroxy-pinoresinol (H-Pin), and (+)-acetoxypinoresinol (Ac Pin) were detected. Two of these, Pin and H-Pin, were specifically identified in Filtracel filter aids whilst Ac Pin was found in all the filter aids. Finally, all the filters retained different flavones such as apigenin and luteolin. Other unknown compounds were also found in the filter aids.

3.3. Quantification of retentive power from filters aids

Table 3 summarises the results of the quantification of retentive power from filter aids in equivalents of caffeic acid. For both varieties, the Filtracel®1000 retained the highest amount of polyphenols, 23.3 mg caffeic acid/g filter aid and 5.91 mg caffeic acid/g filter aid for the Picual and Arbequina varieties, respectively. This could be explained by their composition which consists of 75% of cellulose and 25% of lignin. This composition facilitates the hydrophobic interaction between aromatic rings of both phenylpropyl

Table 2

Proposed phenolic compounds determined by HPLC-ESI-TOF in the extract of different filter aids: (+), compound identified in filter aid.

Peak	Compound	Molecular Formula	Retencion Time (min)	Starch Arbequina Olive oil	Starch Picual Olive oil	Filtracel Arbequina Olive oil	Filtracel Picual Olive oil	Vitacel Arbequina Olive oil	Vitacel Picual Olive oil	Industrial filter Arbequina Olive oil	Industrial filter Picual Olive oil
1	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	5.6			(+)	(+)				
2	HYTY	C ₈ H ₁₀ O ₃	6.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
3	<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	8.0					(+)		(+)	
4	TY	C ₈ H ₁₀ O ₂	8.1		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
5	4-hydroxy-benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	8.3	(+)		(+)					
6	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	10.8			(+)		(+)		(+)	
7	HYTY-Ac	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	11.3	(+)	(+)						
8	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	11.8			(+)	(+)				
9	H-Pin	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	12.1			(+)	(+)				
10	EA	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	12.4								(+)
11	Hydroxy-DOA	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	13.9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
12	Ol Agl or Isomer	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	14.8		(+)		(+)		(+)		
16			16.3			(+)	(+)				
20			17.9		(+)		(+)				
22			19.2		(+)	(+)	(+)				(+)
23			21.0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
13	DOA or Isomer	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	15.0			(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
15			16.2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
14	Lut	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	15.9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
17	Pin	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	16.6			(+)	(+)				
18	Ac Pin	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	17.4	(+)		(+)		(+)		(+)	
19	10-H-Ol-Agl	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	17.5		(+)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	Apig	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	18.7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
24	Lig Agl	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	23.4		(+)						(+)



Table 3
Retentive power from filters aids. Quantification of the total polyphenol content retained by the filters. The results are expressed as equivalents of caffeic acid (\pm SD).

	mg Caffeic acid/kg unfiltered olive oil	Olive oil filtered with	mg Caffeic acid/kg filtered olive oil	mg Caffeic acid/g filter aids
Picual variety	560 \pm 7	<i>Celite 545-Kenite</i>	502 \pm 2	4.04 c
	560 \pm 7	Starch	281 \pm 2	19.51 b
	560 \pm 7	<i>Filtracel</i> [®] 1000	227 \pm 0	23.3 a
	560 \pm 7	<i>Vitacel</i> [®] L90	480 \pm 10	5.23 c
Arbequina variety	274 \pm 6	<i>Celite 545-Kenite</i>	211 \pm 6	4.39 d
	274 \pm 6	Starch	194 \pm 5	5.57 d
	274 \pm 6	<i>Filtracel</i> [®] 1000	189 \pm 5	5.91 d
	274 \pm 6	<i>Vitacel</i> [®] L90	251 \pm 1	1.59 e

Within the same column, values followed by the same letter are not significantly different, $p \leq 0.05$.

alcohols and polyphenols. The retentive powers obtained with starch filter aid were 19.51 and 5.57 mg caffeic acid/g filter for the Picual and Arbequina varieties, respectively. This pronounced difference could indicate a selective retention of polyphenols. The most identified compounds in this filter belong to the group of secoiridoides and it is worthy to pointing out that their concentration in the Picual variety is higher than in the Arbequina variety.

4. Conclusions

Choosing the best filter aids for filtering virgin olive oil can only be done after careful consideration of all the relevant parameters processes and the most important is the extrapolation of the laboratory experiments to industrial scale. To establish which filter aid is more suitable it should be continuously and critically scrutinised with important criteria such as high retention capability, high flow rate, problem-free handling and environmentally friendly as well as physiological safety. The proposed filter aids in this paper present a high performance for filtration times to laboratory scale. We can conclude that organic filter aids could be an alternative to diatomaceous earth. The industrial scale filtration will be the next step in our research.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for the projects (AGL2008-05108-C03-03 and PCI2006-A7-0716) and a grant (FPU, AP2007-03245) and to Andalusian Regional Government Council of Innovation and Science for the project P07-AGR-02619. The authors also thank Aceites Maeva, S.L. for providing the samples.

References

- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., & Serraiocco, A. (2000). Virgin olive oil differentiation in relation to extraction methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(15), 2190–2195.
- Baccouri, O., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., & Ben Miled, D. D. (2008). Phenol content as correlated to antioxidant activity and gustative characteristics of Tunisian monovarietal virgin olive oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 85(3), 189–195.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., et al. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8), 1679–1719.
- Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., & Toschi, T. G. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7026–7032.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., et al. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8918–8925.

- Carrasco-Pancorbo, A., Neussus, C., Pelzing, M., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2007). CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*, 28(5), 806–821.
- European Community, Commission Regulation (2001). No 1513/2001 of 23 July 2001 amending Regulations No 136/66/EEC and (EC) No 1638/98 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. *Official Journal of the European Communities*, L201, 4–7.
- Ferrer, I., Garcia-Reyes, J. F., Mezcuca, M., Thurman, E. M., & Fernandez-Alba, A. R. (2004). Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. In *21st montreux symposium on liquid chromatography-mass spectrometry* (pp. 81–90). Switzerland: Montreux.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferreras, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, A. J., Segura-Carretero, A., et al. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 416–429.
- Giovannini, C., Scazzocchio, B., Matarrese, P., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., et al. (2008). Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(2), 118–128.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*, 2(7), 671–678.
- Huang, C. L., & Sumpio, B. E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, 207(3), 407–416.
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: Effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 201–211.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martín, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., et al. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin (TM)) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Bmc Cancer*, 7.
- Morello, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357–364.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P., & Calamai, L. (2008). The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(8), 735–741.
- Perona, S. J., Cabello-Moruno, R., & Ruiz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 429–445.
- Servili, M., Esposto, S., Lodolini, E., Selvaggini, R., Taticchi, A., Urbani, S., et al. (2007). Irrigation effects on quality, phenolic composition, and selected volatiles of virgin olive oils cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6609–6618.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Selvaggini, R., Montedoro, G.F. (2002). Effect of some technological parameters of mechanical extraction process on the flavour components of virgin olive oil. In: *10th Weurman flavour research symposium* (pp. 715–18). Beaune, France.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montedoro, G. F. (2007). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7028–7035.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1956). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Tovar, M. J., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5502–5508.



**Development of a new filtration process based on
the starch filter cake**



**Nuevas tendencias en filtración:
desarrollo y formulación de tortas filtrantes a base
de almidón**

CAPÍTULO 7



①9

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 374 247**

②1 Número de solicitud: 201101121

⑤1 Int. Cl.:
B01D 37/02 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **13.10.2011**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2012**④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.02.2012⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Granada
Hospital Real
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES
Torres Morente, S.A.**⑦2 Inventor/es: **Fernández Gutiérrez, Alberto;
Segura Carretero, Antonio y
Lozano Sánchez, Jesús**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Procedimiento para filtrar aceite usando tortas filtrantes de almidón nativo.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento para filtrar aceite de oliva usando tortas filtrantes de almidón nativo.

La presente invención describe un nuevo procedimiento de filtración de aceite, en particular de aceite de oliva, caracterizado por utilizar almidones nativos de diferente naturaleza como agentes filtrantes para formar la torta de filtración, que permite reducir el contenido en humedad del aceite y simplificar el proceso a un solo ciclo de filtración. La torta filtrante generada constituye un subproducto a base de almidón suplementado con triglicéridos, polifenoles y otros compuestos bioactivos del aceite, y puede ser utilizada en la industria alimentaria como ingrediente alimentario, como nutracéutico o como fuente de compuestos bioactivos. El aceite filtrado obtenido por este procedimiento presenta un nivel de humedad inferior al que presentan los aceites obtenidos por los procedimientos de filtración conocidos, lo que favorece su conservación y prolonga su vida útil.

ES 2 374 247 A1



ES 2 374 247 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para filtrar aceite usando tortas filtrantes de almidón nativo.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca dentro del campo de la producción oleícola. En particular, se refiere a un procedimiento de filtración de aceite, particularmente aceite de oliva para la reducción de la humedad del aceite filtrado basado en el empleo de una nueva torta filtrante de almidón nativo. La invención también se refiere al aprovechamiento de los subproductos de este procedimiento de filtración como fuente de compuestos bioactivos.

Estado de la técnica

El proceso de filtración del aceite de oliva virgen extra presenta como finalidad reducir la humedad y proporcionar al producto final una presentación comercial impecable. Hay dos tipos de filtración: uno, conocido como “desbastado”, indicado en aquellos aceites que contienen un alto contenido en sólidos, y otro, denominado “abrillantado”, cuya finalidad básica es la de reducir el contenido en humedad.

La diferencia entre ambos está en el dispositivo de filtración utilizado. Mientras el desbastado se lleva a cabo en tanques de filtración constituidos por bujías o placas dispuestas en posición horizontal o vertical, el abrillantado se lleva a cabo en filtros prensa que están constituidos por placas donde se introduce papel de celulosa o algodón. Ambos tienen en común que pueden utilizar coadyuvantes del proceso.

Estos coadyuvantes o agentes filtrantes son generalmente materiales pulverulentos que aceleran el proceso de filtración cuando los sólidos en suspensión del aceite son muy finos, facilitando la eliminación de impurezas presentes en el aceite. Las partículas de polvo del agente filtrante y los sólidos en suspensión son eliminados juntos como una mezcla de la torta formada, siendo éste el subproducto generado. El agente filtrante tradicionalmente utilizado es tierras de diatomeas debido a su porosidad y elevado poder hidrófilo. Estas tierras son obtenidas por tratamiento de los restos fósiles de algas microscópicas y están constituidas principalmente por sílice.

En los últimos años se han introducido nuevos agentes filtrantes orgánicos. Estos agentes filtrantes son polímeros de origen vegetal procedentes de madera o de fibras vegetales. Desde el punto de vista químico, están compuestos por una mezcla de celulosa (componente mayoritario), hemicelulosa y lignina, en función del procedimiento de extracción aplicado.

En la práctica industrial es necesario llevar a cabo más de un ciclo de desbastado y/o de abrillantado para conseguir un aceite filtrado con un contenido de humedad reducido adecuado y una presentación comercial impecable. Cada ciclo consiste en hacer pasar el aceite por el sistema de filtración que se esté utilizando en cada caso. El valor de humedad de aceite sometido a un solo ciclo de filtración, denominado “de primera pasada”, suele estar por encima del valor aceptado comercialmente (0.09%), necesitando pasar por más de un ciclo de filtración para reducir el contenido en humedad hasta niveles comercialmente aceptables. Cada nuevo ciclo conlleva iniciar el proceso con adición de más agente filtrante incrementando el coste del proceso de filtrado y el tiempo necesario empleado.

Compendio de la invención

En un aspecto la invención se refiere a un procedimiento de filtración de aceite, en particular de aceite de oliva que utiliza almidón nativo como agente de filtración (entendiendo como tal aquellos almidones que no han sido sometidos a ningún tipo de tratamiento físico o químico posterior a su extracción a partir de su fuente de obtención tal como semillas de cereales, tubérculos o frutas) que comprende la obtención de una torta filtrante a través de la cual se filtra el aceite de partida y que permite la reducción de la humedad del aceite filtrado de modo que con un solo ciclo de filtración es posible obtener un aceite filtrado con un contenido en humedad inferior al 0,09% en peso aceptable para su comercialización.

En otro aspecto la invención se refiere al uso de almidón nativo como agente filtrante en un procedimiento de filtración de aceite. Este material sustituye ventajosamente a las tierras de diatomeas u otros materiales convencionales que comprenden celulosa y lignina, y a sus mezclas con perlita.

En otro aspecto la invención se refiere a una torta filtrante que se obtiene del procedimiento de filtración de aceite, en particular de aceite de oliva, y constituye un subproducto revalorizable del mismo. Esta torta filtrante resultante, comprende almidón nativo suplementado con compuestos bioactivos procedentes del aceite filtrado, por ejemplo de aceite de oliva, como triglicéridos y polifenoles, entre otros. Este subproducto puede ser usado como un ingrediente alimentario con aplicaciones similares al almidón, es decir, por ejemplo como agente espesante, gelificante y de recubrimiento, mejorando las propiedades reológicas y fisicoquímicas de los alimentos a los que se incorpora pero con mayor valor añadido debido a su alto contenido en compuestos bioactivos del aceite.

Por tanto en otro aspecto la invención se relaciona con el empleo de la torta filtrante que se obtiene del procedimiento de filtración de aceite como ingrediente alimentario o nutracéutico.



ES 2 374 247 A1

Además en otro aspecto la invención se relaciona con el empleo de la torta filtrante como material de partida para la obtención de compuestos bioactivos del aceite, en particular del aceite de oliva. Dicha obtención se lleva a cabo mediante procedimientos que comprenden una o más etapas convencionales de purificación y/o extracción de compuestos bioactivos, por ejemplo, extracción sólido-líquido, spray dry, cromatografía preparativa, fluidos presurizados y fluidos supercríticos.

En otro aspecto la invención se refiere a un aceite obtenido mediante el procedimiento de filtración de aceite de la invención. En una realización particular dicho aceite es aceite de oliva. En otra realización particular dicho aceite se obtiene después de un único ciclo de filtración y se denomina “de primera pasada” y presenta un contenido en humedad inferior al 0,09% en peso.

Descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del procedimiento de filtración de aceite (de oliva) de la invención.

T1, tanque de almacenamiento de aceite de partida sin filtrar;

T2, tanque de almacenamiento de aceite filtrado;

A1, almidón nativo empleado como agente filtrante para obtener la torta filtrante;

A2, almidón nativo de diferente naturaleza que A1;

F1, cantidad inicial de aceite que se mezcla con el agente filtrante;

F2, mezcla de A1 y F1, que es bombeada al dispositivo de filtración (filtrador);

F3, aceite libre de almidón nativo el cual ha sido retenido en el dispositivo de filtración;

F4 y F5, mezcla de aceite y almidón nativo (A1) o (A2), que se introducen opcionalmente de forma sucesiva en el sistema de filtración para obtener la torta filtrante;

Fo, aceite de partida sin filtrar;

P, aceite filtrado.

Figura 2. Cromatograma del Ión Extraído (Extracted Ion Chromatogram, EIC) del analito de hidroxitirosol (HYTY) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas: (a) muestra el EIC del compuesto HYTY en el extracto metanólico obtenido de la torta filtrante de agente filtrante Celite®; (b) muestra el EIC del compuesto HYTY en el extracto metanólico obtenido de la torta filtrante de agente filtrante Vitacel®; (c) muestra el EIC del compuesto HYTY en el extracto metanólico obtenido de la torta filtrante de almidón de patata; (d) muestra el EIC del HYTY en el extracto metanólico obtenido de la torta filtrante de una mezcla de almidones de patata y de trigo.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en que los inventores han descubierto que es posible utilizar almidón nativo como agente filtrante obteniendo a partir del mismo una torta filtrante cuyo empleo resulta ventajoso en un procedimiento de filtración de aceite. En este sentido su empleo supone conseguir largos ciclos de vida útil, un aumento de los flujos de aceite de trabajo, ya que no atacan al material de los dispositivos de filtración convencionales (no resultan abrasivos frente a bujías, placas etc...). Además son seguros para su uso en contacto con alimentos y por lo tanto presentan ausencia de compuestos nocivos. Por otro lado presentan una mayor efectividad que los agentes filtrantes tradicionalmente utilizados para reducir la humedad y retener compuestos bioactivos de interés propios del aceite por ejemplo de oliva. Las tortas filtrantes así obtenidas como subproductos pueden ser reutilizadas y revalorizadas como fuente para la obtención de compuestos bioactivos o por aplicación directa como ingrediente alimentario o nutracéutico.

Por tanto en un aspecto la invención se refiere al uso de almidón nativo como agente filtrante en un procedimiento de filtración de aceite, en particular de aceite de oliva. En una realización particular hasta el 50% en peso del almidón nativo puede ser sustituido por otro o más agentes filtrantes. En una realización preferente dicho agente filtrante es celulosa.

El almidón nativo es un polisacárido vegetal formado por la unión de dos polímeros: amilosa (18-25%) y amilopectina (75-82%). La proporción entre ambos depende de la procedencia del almidón. La amilosa es un polímero lineal que tiene exclusivamente enlaces α (1 \rightarrow 4) entre los residuos de glucosa adyacentes. La estructura primaria sencilla de la amilosa permite una estructura secundaria regular de esta molécula: cada residuo forma un ángulo respecto al residuo precedente, lo cual favorece una conformación helicoidal, que queda estabilizada por la formación de enlaces por puentes de hidrógeno. La amilopectina es un polímero ramificado que contiene, además de los enlaces α (1 \rightarrow 4),



ES 2 374 247 A1

algunos enlaces α (1 \rightarrow 6). La naturaleza ramificada de la amilopectina inhibe la formación de hélices, puesto que la hélice requiere 6 residuos por cada vuelta, y hay un punto de ramificación cada 10-20 residuos.

5 En el gránulo de almidón, amilosa y amilopectina se asocian mediante enlaces de hidrógeno, originando regiones micelares cristalinas. La estructura química definida le atribuye las propiedades adecuadas para conseguir algunas de las ventajas de la presente invención.

10 La naturaleza orgánica de los almidones nativos hace que se comporten elásticamente frente a las caídas de presión, de forma que la torta filtrante obtenida no se rompe tan fácilmente, aumentando su vida útil. Cuando se utilizan almidones en la etapa de abrillantado, la limpieza posterior es facilitada por la adhesión de las fibras.

Además, al estar compuestas exclusivamente por almidones, las tortas filtrantes que se describen en esta invención no son contaminantes, ya que se descomponen de forma natural al ser residuos biodegradables.

15 En otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento de filtración de aceite, en particular de aceite de oliva, en adelante el procedimiento de la invención. El procedimiento de filtración de aceite de la invención que comprende el uso de almidón en lugar de los agentes filtrantes tradicionales, para formar una torta filtrante de forma previa, permite obtener una conformación específica de la misma, capaz de reducir de una forma más eficiente la humedad en el aceite de partida. De este modo un solo ciclo de filtración es suficiente para eliminar de forma satisfactoria la
20 humedad reduciendo su presencia a un contenido en humedad inferior al 0,09% en peso, y retener una gran cantidad de compuestos bioactivos. En una realización preferente la humedad se reduce a un contenido igual o inferior al 0,04% en peso.

El procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas:

- 25
- (i) Mezcla de almidón nativo con aceite de partida,
 - (ii) Homogeneización de la mezcla,
 - 30 (iii) Introducción de la mezcla en un sistema de filtración,
 - (iv) Recirculación de dicha mezcla en el interior del sistema de filtración
 - (v) Obtención de una torta filtrante en el interior
 - 35 (vi) Filtración de aceite de partida y
 - (vii) Recuperación de aceite filtrado y
 - 40 (viii) Recuperación de una torta filtrante suplementada en compuestos bioactivos del aceite.

En una realización particular el aceite es aceite de oliva.

45 Aunque el procedimiento de la invención se puede realizar con cualquier aceite o mezcla de aceites, en una realización particular se lleva a cabo con un aceite rico en compuestos bioactivos, por ejemplo con aceite de oliva caracterizado por su alto contenido en los mismos.

50 En la etapa (i) se lleva a cabo la mezcla de un almidón nativo con aceite. La presente invención contempla de acuerdo con una realización particular la sustitución en el procedimiento de hasta el 50% en peso del almidón nativo por otro u otros agentes filtrantes. Dicho agente filtrante puede ser en principio cualquier agente de uso alimenticio, por ejemplo celulosas. En general tal y como se muestra en la Figura 1 en un depósito auxiliar, se mezcla una cantidad de aceite con el almidón nativo. Las cantidades relativas de aceite y almidón necesarias en cada caso varían en función del contenido en humedad y de sólidos suspendidos del aceite de partida. Conociendo el valor de humedad del aceite
55 de partida sin filtrar, el experto en la materia puede ajustar fácilmente estas cantidades.

La homogeneización de la mezcla tiene lugar en el depósito auxiliar y se lleva a cabo batiendo el aceite con el almidón hasta obtener una mezcla homogénea donde el aceite adquiere una turbidez superior a la original, siendo prácticamente opaco al contener las partículas de agente filtrante en suspensión.

60 La mezcla homogénea se introduce en un dispositivo de filtración. La introducción puede hacerse por bombeo. Dicho dispositivo puede ser cualquier dispositivo convencional tal como un tanque de filtración o un filtro prensa. Una vez en el interior la mezcla se recircula durante un tiempo determinado y variable, hasta eliminar la turbidez de la mezcla homogénea anterior. Este hecho indica, que el almidón nativo ha sido retenido por el soporte de filtración que
65 hay en el interior del tanque o filtro prensa dando lugar a la torta filtrante.



ES 2 374 247 A1

Opcionalmente después de la obtención de una primera torta filtrante es posible repetir sucesivamente las etapas anteriores (i) a (v) con una nueva cantidad de aceite o con una cantidad proveniente del sistema de filtración (ver F₃ en la Figura 1) obteniéndose una torta filtrante de mayor grosor formada por capas depositadas consecutivamente de almidón nativo. Dichas capas, dos o más, pueden ser del mismo tipo de almidón o de diferentes tipos de almidón y a su vez pueden ser cada una de un único tipo de almidón o de mezclas de dos o más.

Una vez que se obtiene la torta filtrante, se lleva a cabo la etapa de filtración de aceite. Una cantidad de aceite de partida (F₀) se hace pasar por el dispositivo de filtración y por tanto a través de la torta filtrante. Se obtiene un aceite filtrado con un contenido reducido de humedad que se lleva a un tanque de almacenamiento T2. En una realización particular el aceite de partida se somete a una única etapa o ciclo de filtración reduciéndose su humedad a un contenido inferior al 0,09% en peso. El aceite recuperado se denomina de primera pasada. En otra realización particular el aceite se somete a más de una etapa o ciclo de filtración consecutiva reduciéndose aún más su contenido en humedad.

Durante el procedimiento de la invención se pueden realizar adiciones periódicas de almidón nativo repitiendo las etapas (i) a (v) para regenerar la torta filtrante.- En este sentido se puede ampliar la vida útil de la torta filtrante mediante adiciones periódicas de almidón nativo, modificando el índice de saturación de la torta y permitiendo filtrar una mayor cantidad de aceite de partida.

El diagrama de flujo del procedimiento de la invención se muestra en la Figura 1. En él se ilustra como una cantidad de almidón nativo o mezcla de almidones nativos (A1) se mezcla con aceite (F1) hasta su homogeneización y es bombeado (F2) al interior del dispositivo de filtración (filtrador). La mezcla es mantenida en recirculación hasta que el almidón es retenido por el soporte del sistema de filtración utilizado en cada caso (desbastado o abrillantado) formándose típicamente una capa de torta filtrante de varios milímetros sobre su superficie. El aceite filtrado (F3) puede destinarse ya a envasado o alternativamente se envía de nuevo al mezclador donde se le puede añadir más cantidad del mismo almidón (A1), o de otro almidón nativo de otro origen (A2). Las etapas de formación de torta filtrante puede repetirse (F4, F5, ..., F_n) para conseguir una torta filtrante de mayor espesor, más resistente, que permita filtrar una mayor cantidad de aceite en la etapa (vi). De este modo repitiendo la deposición de sucesivas capas estratificadas de almidón nativo es posible elaborar una torta filtrante más porosa para que el procedimiento de filtración se lleve a cabo con más facilidad. Esto último va a depender de las características del aceite (contenido en humedad y sólidos suspendidos que presenta). Una vez obtenida la torta filtrante, se da entrada al aceite a filtrar (F0) obteniendo un aceite con humedad reducida (P) y una torta filtrante suplementada con compuestos bioactivos procedentes del aceite.

Los inventores de la presente invención han observado que la naturaleza de los almidones condiciona que puedan o no ser utilizados durante el procedimiento. Así, todos los almidones nativos utilizados en diversos ensayos han dado buenos resultados, aún siendo de distinta procedencia: almidones de cereales como por ejemplo de trigo, arroz y maíz, y almidones de tubérculos como el de patata. Cualquier almidón nativo por tanto o mezcla de los mismos puede ser empleada en el procedimiento de la invención. Por la similitud estructural de los almidones, pueden utilizarse almidones nativos de otros cereales, tubérculos o frutas. Sin embargo, cuando los almidones han sido sometidos a algún tipo de tratamiento físico-químico diferente al realizado para su extracción, ya no pueden ser utilizados debido a que no se adhieren al soporte para formar la primera capa, y no son retenidos por los sistemas de filtración.

Este es el caso de algunos almidones como el almidón pregelatinizado de maíz, con el que se realizó un estudio a escala de laboratorio, donde al evaluar la funcionalidad del mismo se obtuvieron buenos resultados [Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. "Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil", *Food Chem.* 124 (2011) 1146-1150], pero que sin embargo, pierden su funcionalidad como agente filtrante al extrapolarlo a planta piloto o a escala industrial.

El pre-tratamiento realizado sobre el almidón nativo cambia las propiedades fisicoquímicas de los mismos, como el tamaño de partícula, y su comportamiento cuando se someten a presiones elevadas e incrementos de temperatura. Al modificarse sus características originales se impide la formación de la torta al no depositarse adecuadamente sobre los diferentes soportes, y se dificulta el proceso de limpieza y descarga de los tanques de filtración o filtros prensa.

Los inventores han realizado una comparativa entre tortas filtrantes compuestas por diferentes agentes filtrantes filtrando la misma cantidad de aceite de igual procedencia.

La Tabla 1 muestra los valores de humedad obtenidos para el aceite de partida antes de filtrar y una vez filtrado, empleando en el procedimiento los agentes filtrantes tradicionales (representativos de aquellos que son usados en la industria oleícola en la actualidad) así como el nuevo agente filtrante constituido a base de almidón nativo.

Tabla 1. Porcentaje medio de Humedad determinado en base al REGLAMENTO (CEE) No 2568/91 y posteriores modificaciones

Agente filtrante utilizado	% en peso
Aceite sin filtrar	0.24
Filtrado con Celite®	0.09
Filtrado con Vitacel®	0.13
Filtrado con Almidón Nativo	0.04

La mayor reducción de humedad en el aceite de partida se consigue cuando se emplea almidón nativo como agente filtrante, lo que es de especial importancia para evitar que se inicien reacciones de autoxidación de los lípidos presentes en la fracción mayoritaria del aceite. Cuando el aceite es desbastado o abrillantado empleando almidón nativo como único agente filtrante, se consigue una mayor reducción de humedad, de forma que el aceite puede ser envasado directamente sin llevar a cabo más de un ciclo de filtración, lo que no sucede con los agentes filtrantes tradicionales.

En otro aspecto la invención se refiere a la torta filtrante que se obtiene del procedimiento de filtración de aceite de la invención y que se obtiene como subproducto del mismo. Esta torta filtrante resultante, comprende almidón nativo suplementado con compuestos bioactivos procedentes del aceite, en particular del aceite de oliva, tales como triglicéridos y polifenoles, entre otros. Por compuestos bioactivos en el contexto de la invención han de entenderse los compuestos presentes en un aceite capaces de proporcionar un efecto terapéutico y/o profiláctico a un humano o animal. Es decir, que su administración afecta beneficiosamente a una o más de las funciones del organismo, mejora el estado de salud y/o reduce el riesgo de padecer determinadas enfermedades. Este subproducto puede ser usado como un ingrediente alimentario ya que tiene aplicaciones similares a las del almidón, es decir, por ejemplo como agente espesante, gelificante y de recubrimiento, mejorando las propiedades reológicas y fisicoquímicas de los alimentos a los que se incorpora pero con un valor añadido debido a su alto contenido en compuestos bioactivos del aceite en concreto. En una realización particular la torta comprende hasta un 50% en peso de otro agente filtrante de uso alimenticio en lugar de almidón nativo.

Por tanto en otro aspecto la invención se relaciona con el empleo de la torta filtrante que se obtiene del procedimiento de filtración de aceite de la invención como ingrediente alimentario o nutracéutico.

Además en otro aspecto la invención se relaciona con el empleo de la torta filtrante como material de partida para la obtención de compuestos bioactivos del aceite, en particular del aceite de oliva. Dicha obtención se lleva a cabo mediante procedimientos que comprenden una o más etapas convencionales de purificación y/o extracción de compuestos bioactivos, por ejemplo, extracción sólido-líquido, spray dry, cromatografía preparativa, fluidos presurizados y fluidos supercríticos. Ejemplos de dichos compuestos son los polifenoles, como por ejemplo el hidroxitirosol.

En otro aspecto la invención se refiere a un aceite obtenido mediante el procedimiento de purificación de aceite de la invención, denominado "de primera pasada" si se ha sometido a una sola etapa o ciclo de filtración, con un contenido reducido en humedad inferior al 0,09% en peso. En otra realización particular se obtiene un aceite que se ha sometido a más de una etapa o ciclo de filtración y presenta un contenido en humedad aún menor.

En la Tabla 2 quedan recogidos los datos de cuantificación que muestran el alto contenido en hidroxitirosol de la torta filtrante obtenido por el procedimiento de filtración de la invención utilizando aceite de oliva. El valor de concentración asciende al orden de 20 a 30 veces mayor que en el aceite de partida.

La Figura 2 representa el Cromatograma del Ion Extraído del hidroxitirosol (HYTY) en los diferentes filtros obtenido mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Como se muestra en la Tabla 2, la capacidad de retención de HYTY de este tipo de tortas de filtración es de 15 a 20 veces superior que en los agentes filtrantes inorgánicos (Celite®), y más del doble que los orgánicos (Vitacel®).



ES 2 374 247 A1

Tabla 2. Cuantificación del contenido en HYTY: mg analito/kg muestra. Valor= X ± SD

5	Recta de Calibrado	$y = 7008947.4233x - 71660.7107, R^2=0.9963$
	Muestra	mg de analito/ Kg de muestra
10	Aceite	3.708 ± 0.277
15	Celite®	5.116 ± 0.021
	Vitacel®	40.150 ± 0.423
20	Almidón Nativo Patata	93.426 ± 2.249
25	Mezcla de Almidones Nativos (Patata + Trigo)	71.095 ± 1.608

*Análisis de las muestras**Determinación de los parámetros de calidad del aceite filtrado y sin filtrar*

Los parámetros de calidad del aceite sin filtrar y filtrado han sido determinados en base al REGLAMENTO (CEE) No 2568/91 DE LA COMISIÓN de 11 de julio de 1991 [<http://vlex.com/vid/caracteristicas-aceites-orujo-analisis-15487866>] y sus posteriores modificaciones, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Caracterización cualitativa y cuantitativa de HYTY

La extracción sólido-líquido del analito de interés y el análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en los filtros se ha llevado a cabo de acuerdo con el procedimiento de extracción [Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. "Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil", *Food Chem.* 124 (2011) 1146-1150] y el método analítico descrito previamente [Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Menéndez, J.A.; Oliveras-Ferreros, C.; Cerretani, L.; Fernández-Gutierrez, A. "Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells". *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9942-9955.].

Modo de realización de la invención*Producción de tortas de filtración*

El procedimiento de filtración puede ser llevado a cabo en todos los tanques de filtración o filtros prensa que se encuentran disponibles en el mercado actual. A modo de ejemplo, no limitativo, se presentan los resultados obtenidos al utilizar un tanque de filtración constituido por 425 muelles de bujías, dotado con un depósito auxiliar con una capacidad de 250 litros donde se realiza la mezcla del aceite con el agente filtrante o con mezclas de los mismos.

Procedimiento 1

En el depósito auxiliar de 250 litros de capacidad, se mezclan 200 litros de aceite de oliva con 50 kg de almidón de patata (la relación almidón: aceite en la mezcla es 1:4). Se realiza el batido durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea y opaca con las partículas de almidón en completa suspensión. A continuación, la mezcla se bombea al interior del tanque de filtración y se mantiene en recirculación dentro del tanque durante 20 minutos, momento en el que el aceite adquiere su limpidez original, indicativo de que el almidón se ha depositado sobre las bujías y se ha formado la torta filtrante.

Se da paso al aceite a filtrar por el interior del tanque, trabajando a un caudal de 5200 l/h.



ES 2 374 247 A1

Procedimiento 2

En este caso, la materia prima para la elaboración de la torta es una mezcla de almidones de diferente procedencia: combinación de almidón de tubérculos con cereales, o de tubérculos entre sí o de cereales entre sí.

Para elaborar este tipo de tortas se introducen 200 litros de aceite de oliva y 25 kg de almidón de patata en el depósito auxiliar y se realiza un batido durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea y opaca. A continuación, la mezcla se bombea al interior del tanque de filtración y se mantiene en recirculación dentro del tanque durante 15 minutos momento en el que el aceite adquiere su limpidez original, indicativo de que el almidón se ha depositado sobre las bujías y se ha formado la primera capa de la torta filtrante constituida a base de almidón de patata. Se pasa nuevamente el mismo aceite que contenía en suspensión los primeros 25 kg de almidón de patata (200 litros) al depósito auxiliar donde se mezclan con otros 25 kg de almidón nativo, que puede ser de cereales. En ambos casos, se realiza el batido durante 10 minutos y la mezcla es bombeada al interior del tanque, manteniéndose en recirculación durante otros 10 minutos, formándose una nueva capa sobre la anterior.

Este tipo de tortas permiten filtrar aceite con una humedad de 0.24% en tanques constituidos por 425 muelles de bujías a un caudal de 5200 l/h en el caso de una torta constituida por la mezcla de almidón de patata y de trigo, y a 6300 l/h para el caso de una torta formada por almidón de patata y de arroz.

El tiempo que se tarda en filtrar 10.500 kg de aceite con los 50 kg de torta son de 120 minutos para la torta formada a base de almidón de patata solamente; 120 minutos para su mezcla con almidón nativo de trigo y 100 minutos para su mezcla con almidón nativo de arroz respectivamente (la relación agente filtrante:aceite filtrado en este caso es de 1:210 en todos los casos).

En la siguiente tabla se pueden observar los mejores valores de presión, caudales y tiempos correspondientes a las experiencias llevadas a cabo, siendo a modo de ejemplo, no limitativo, los resultados mostrados.

Procedimiento	Torta filtrante (50Kg)	Caudal (L/h)	Tf (min.)	ΔP (bares)
1	Almidón patata	5200	120	0.5
2	50:50 almidón patata: almidón trigo	5200	120	1.0
	50:50 almidón patata: almidón arroz	6300	100	0.5

* Los valores indicados en la tabla 3 son para relaciones 1:4 en la formación de la torta y 1:210 al final del proceso de almidones puros o sus mezclas: aceite con una humedad de partida de 0.24%. Tf = tiempo de filtración, sin tener en cuenta los tiempos de carga y descarga de los tanques provistos de bujías.

Los mejores resultados, en términos de caudal de trabajo, se han obtenido con el segundo procedimiento: torta constituida por la mezcla de almidón de patata: almidón de arroz. No se aprecian diferencias en los resultados obtenidos si en el segundo procedimiento se modifica el orden de mezcla de los agentes filtrantes con el aceite.

Respecto a la cantidad de HYTY retenido por estas tortas filtrantes, los resultados se muestran en la siguiente Tabla 4.

Muestra	mg de HYTY / Kg de muestra
Almidón Patata	93.426 \pm 2.249
Mezcla de Almidones (Patata + Trigo)	71.095 \pm 1.608



ES 2 374 247 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de filtración de aceite que comprende las siguientes etapas:

5

(ix) Mezcla de almidón nativo con aceite de partida,

(x) Homogeneización de la mezcla,

10

(xi) Introducción de la mezcla en un sistema de filtración,

(xii) Recirculación de dicha mezcla en el interior del sistema de filtración,

(xiii) Obtención de una torta filtrante en el interior,

15

(xiv) Filtración de aceite de partida, y

(xv) Recuperación de aceite filtrado, y

20

(xvi) recuperación de una torta filtrante suplementada en compuestos bioactivos del aceite.

2. Procedimiento de filtración de aceite según la reivindicación 1 en el que el aceite es de oliva.

25

3. Uso de almidón nativo como agente filtrante en el procedimiento de filtración de aceite.

4. Torta filtrante obtenible según el procedimiento de filtración de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende almidón nativo suplementado con compuestos bioactivos.

30

5. Empleo de la torta filtrante según la reivindicación 4, como ingrediente alimentario o nutracéutico.

6. Empleo de la torta filtrante según la reivindicación 5, como material de partida para la obtención de compuestos bioactivos de aceite.

35

7. Aceite obtenido mediante el procedimiento de purificación de aceite según las reivindicaciones 1 o 2, con un contenido en humedad inferior al 0,09% en peso.

40

45

50

55

60

65



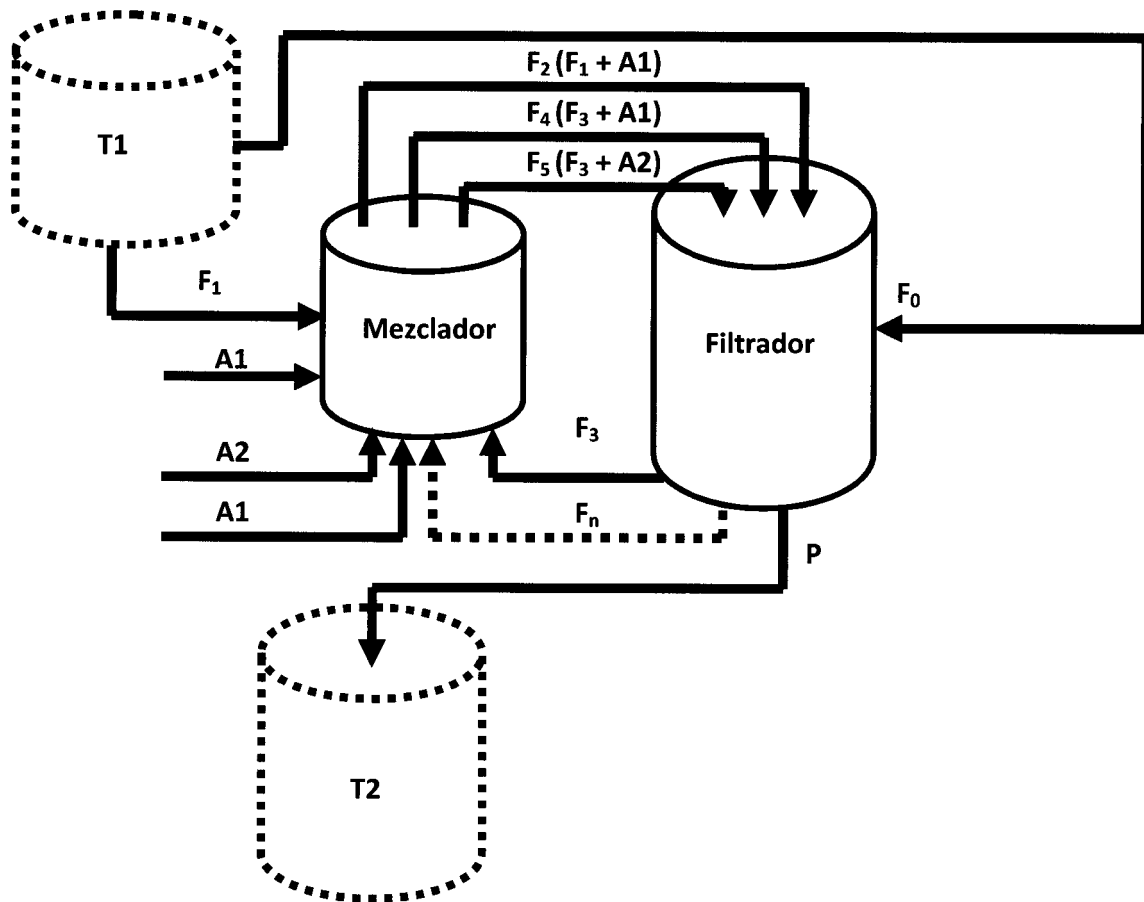


Figura 1



ES 2 374 247 A1

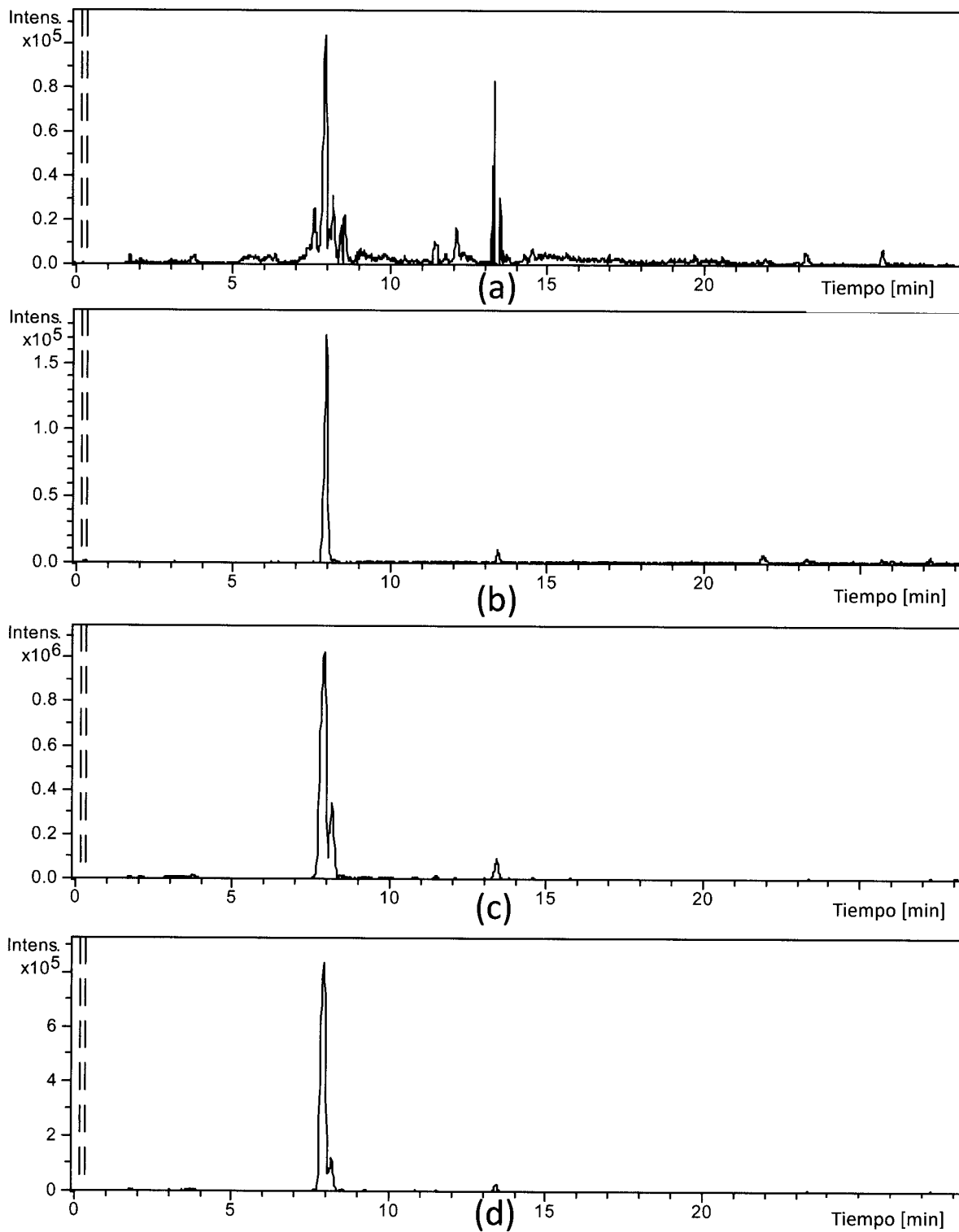


Figura 2



CONCLUSIONES

FINALES



Sección I

1. Se ha optimizado un método analítico mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS para una completa caracterización de los polifenoles presentes en el aceite de oliva, con una alta eficiencia en la separación cromatográfica, en menos de 27 minutos, de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos obtenidos mediante extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE). Se han determinado los límites de detección y cuantificación, la reproducibilidad y repetibilidad del método analítico. Se ha llevado a cabo la caracterización del perfil polifenólico de 14 aceites de distintas variedades de oliva españolas: Picual, Hojiblanca, Arbequina, Cornezuelo y Manzanilla. Se han identificado un total de 20 compuestos fenólicos, siendo los secoiridoides 3,4-DHPEA-EA y *p*-HPEA-EA así como sus derivados decarboximetilados e hidroxilados los mayoritarios en las muestras analizadas. Sin embargo, los aceites pertenecientes a la variedad de oliva Arbequina se han caracterizado por una concentración más baja en este grupo de compuestos siendo la cantidad de *p*-HPEA-EA de 10 a 20 veces menor que en otros aceites. Por el contrario, estas muestras han presentado una mayor concentración en lignanos, con elevadas cantidades de (+)-1-acetoxipinoresinol, compuesto no detectado en aceites obtenidos de las variedades de oliva Picual y Cornezuelo. Además se ha identificado hidroxipinoresinol en estos aceites, el cual no se ha detectado en ninguna otra variedad. Con respecto a otros polifenoles, la cantidad de flavonas es mayor en aceites pertenecientes a las variedades Hojiblanca, Arbequina y Manzanilla, y el contenido en alcoholes simples es más elevado en



CONCLUSIONES FINALES

aceites de la variedad de aceituna Picual y Manzanilla. Los datos de concentración obtenidos mediante HPLC-ESI-TOF-MS se han sometido a un análisis lineal discriminante (LDA) obteniendo una primera aproximación en la que diferentes compuestos (principalmente secoiridoides, compuestos estructuralmente relacionados con ellos, y lignanos) pueden actuar como discriminantes entre aceites obtenidos de diferentes variedades de oliva.

2. La bioactividad de estos extractos se ha evaluado en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3. Los ensayos llevados a cabo con los 14 extractos polifenólicos de estos aceites han mostrado un amplio rango de diferentes actividades citotóxicas, siendo la de los extractos enriquecidos en secoiridoides hasta 12 veces mayor comparada con los que presentan una concentración escasa o nula en estos compuestos.
3. Se ha caracterizado por primera vez el perfil fenólico de los subproductos sólido y acuoso generados durante el almacenamiento del aceite de oliva. Para ello, se han puesto a punto métodos de extracción sólido-líquido (solid-liquid extraction, SLE) y líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE) de los polifenoles presentes en el subproducto sólido y líquido respectivamente, seguido de su análisis mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/IT-MS. Se han identificado mediante la interpretación de los espectros de absorción molecular y la información generada por los analizadores de masas (masa exacta, fórmula molecular y patrón de fragmentación) un total de 13 compuestos fenólicos y 5 nuevos compuestos derivados de los polifenoles del aceite. El residuo



sólido se caracteriza por un elevado contenido en la forma dialdehídica decarboximetilada del ácido elenólico (600 mg/kg) y en 3,4-DHPEA (195 mg/kg). Además las cantidades encontradas de (+)-acetoxipinoresinol y de las flavonas luteolina y apigenina son mayores que las descritas en el aceite de oliva. El subproducto acuoso presenta una concentración aún superior en alcoholes fenólicos, siendo los valores de *p*-HPEA seis veces superior que en el subproducto sólido. En base a la caracterización cualitativa y cuantitativa llevada a cabo se han establecido rutas de degradación de los polifenoles principalmente basadas en reacciones de hidrólisis, oxidación, hidratación y pérdida de sustituyentes carboximetil (-COOCH₃). Parte de estas reacciones explican las elevadas cantidades de 3,4-DHPEA en ambos subproductos, alcanzando valores de 30 a 100 veces superior que las presentes originariamente en el aceite.

4. Se ha monitorizado la evolución de estos compuestos bioactivos durante el tiempo de almacenamiento del aceite y de generación de del subproducto mediante SPE/SLE-HPLC-ESI-TOF-MS. La evolución más interesante tanto en el aceite como en los subproductos es aquella experimentada por los alcoholes fenólicos, secoiridoides y sus derivados. En el aceite se produce un incremento de la concentración de alcoholes fenólicos 3,4-DHPEA y *p*-HPEA como consecuencia de la hidrólisis de los secoiridoides complejos. El incremento en *p*-HPEA se inicia en etapas avanzadas del almacenamiento, permaneciendo su concentración constante durante los primeros meses. La evolución de este alcohol está relacionada con el *p*-HPEA-EDA. Por el contrario, el 3,4-DHPEA incrementa su concentración desde el primer mes de



CONCLUSIONES FINALES

almacenamiento debido a la hidrólisis de los secoiridoides que poseen este compuesto como parte alcohólica de la molécula. Los principales responsables de este incremento son los compuestos 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA. La vida media de ambos es de 400 y 445 días, respectivamente. Se ha establecido una buena correlación entre la evolución de estos dos polifenoles y la aparición de sus productos de oxidación y de hidrólisis durante el de almacenamiento (valores de $r^2 > 0.95$ en todos los modelos exponenciales desarrollados). Las constantes de eliminación (K_{el}) de secoiridoides complejos y de aparición (K_a) de fenoles simples tanto en el aceite como en los subproductos explican la mayor concentración de 3,4-DHPEA en el subproducto que en el aceite desde el primer mes de almacenamiento. En el subproducto, la K_a de este compuesto es del orden de 50 veces superior que en el aceite. En esta matriz, los secoiridoides totales decrecen durante los primeros meses, para incrementar gradualmente a partir del cuarto mes. Sin embargo, los derivados del ácido elenólico, los lignanos, y las flavonas aumentan rápidamente en los primeros meses, para posteriormente disminuir con una tendencia final a permanecer constantes. Estos cambios observados en el subproducto son debidos a la hidrólisis, oxidación, hidratación, así como al enriquecimiento en polifenoles del propio aceite y dado los elevados niveles de enriquecimiento en algunos compuestos del aceite este subproducto es una fuente potencial de polifenoles susceptible de ser utilizada en el desarrollo y formulación de alimentos funcionales o nutraceuticos.



Sección II

5. Se han descrito los diferentes sistemas de filtración, incluyendo las nuevas tecnologías desarrolladas y aplicadas por diferentes investigadores. Se ha revisado la literatura científica acerca de los efectos positivos y/o negativos que la filtración ejerce en los polifenoles del aceite de oliva, poniendo de manifiesto una clara controversia entre los resultados obtenidos. La tecnología de filtración estudiada en la mayoría de los casos es a escala de laboratorio empleando para ello diferentes agentes filtrantes. La metodología analítica utilizada para evaluar el impacto de esta etapa también ha sido diferente en cada una de las investigaciones llevadas a cabo por los diferentes autores. Todo ello hace que exista disparidad entre los resultados obtenidos. En líneas generales, cuando el contenido en polifenoles totales se ha determinado mediante técnicas espectrofotométricas basadas en el reactivo del Folin Ciocalteu los autores coinciden en que la filtración disminuye el contenido en polifenoles. Sin embargo, este resultado ha sido diferente al obtenido cuando se ha evaluado el efecto de este proceso en los polifenoles de forma individual, empleando para ello cromatografía líquida y como sistemas de detección espectroscopía de absorción molecular UV-Vis. Los autores que han utilizado esta metodología analítica han determinado que la filtración o bien no afecta al contenido en polifenoles o produce un incremento aparente en estos compuestos.

6. Se ha comparado el efecto a escala piloto de dos nuevos sistemas de filtración, en saco y con gases, sobre las variaciones cualitativas y



CONCLUSIONES FINALES

cuantitativas en el perfil fenólico producidas por los diferentes agentes filtrantes utilizados: saco de polipropileno, nitrógeno y argón. Se han identificado mediante HPLC-ESI-TOF-MS un total de 17 compuestos diferentes en las muestras de aceite de oliva, de los cuales, 15 pertenecen a las diferentes familias de polifenoles, y 2 de ellos se corresponden con los ácidos elenólico y quínico. Todos los sistemas de filtración producen un incremento aparente del contenido total de polifenoles, siendo los principales polifenoles responsables del mismo pertenecientes al grupo de los secoiridoides: 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EA. Sin embargo, debido a la reducción del contenido en agua que lleva asociado el proceso de filtración, este efecto está más relacionado con una mayor facilidad de extracción con disolventes polares de los polifenoles en aceites filtrados (de naturaleza más apolar, con menor contenido en agua) que de aquellos aceites sin filtrar (de naturaleza más polar). Siguiendo esta línea, la mayor concentración de secoiridoides y sus derivados se ha encontrado en los aceites filtrados con gas argón, agente filtrante que ha mostrado una mayor capacidad para reducir el contenido en agua. El impacto de la filtración en saco sobre los secoiridoides y derivados es el mismo que en la filtración con gases. Sin embargo la utilización de un saco de polipropileno como agente filtrante reduce el contenido en algunos alcoholes fenólicos, lignanos y flavonas. Este coadyuvante de la filtración presenta un mayor poder de retención sobre este tipo de compuestos que los gases nitrógeno y argón. Se ha determinado la estabilidad oxidativa de los aceites sin filtrar y filtrados mediante el índice de estabilidad oxidativa (Oxidative Stability Index, OSI time), siendo mayor en aceites sin filtrar a pesar de presentar un menor contenido en *o*-difenoles. Esto está



relacionado por un lado, con una extracción incompleta de los polifenoles en aceites sin filtrar por su mayor contenido en agua, y por otro con una mayor capacidad antioxidante de los polifenoles en la interfase agua:aceite que se ve reducida al disminuir el contenido en agua con la filtración.

7. Se han caracterizado mediante HPLC-ESI-TOF-MS el perfil fenólico de los compuestos retenidos por diferentes agentes filtrantes de naturaleza tanto inorgánica como orgánica empleados como coadyuvantes en un proceso de filtración llevado a cabo a escala de laboratorio: tierras de diatomeas (Celite 545® y Kenite 700®), celulosa y sus mezclas con lignina (Vitacel®L90 y Filtracel®1000) y almidón pregelatinizado. Se ha evaluado de forma indirecta el poder retentivo de cada agente filtrante mediante determinación espectrofotométrica utilizando el reactivo del Folin-Ciocalteu. En todos los filtros utilizados se han identificado polifenoles pertenecientes a las diferentes familias de compuestos fenólicos retenidos: ácidos y alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos y flavonas. El agente filtrante que presenta una mayor capacidad de retención de polifenoles totales es Filtracel®.
8. Se ha desarrollado un nuevo procedimiento de filtración a nivel industrial caracterizado por utilizar almidones nativos de diferente naturaleza como agentes filtrantes para formar la torta de filtración, que permite reducir el contenido en humedad del aceite y simplificar el proceso a un solo ciclo de filtración. La torta filtrante generada constituye un subproducto a base de almidón suplementado con polifenoles que puede ser utilizado en la industria alimentaria como ingrediente alimentario, como



CONCLUSIONES FINALES

nutracéutico o como fuente de compuestos bioactivos. El valor de concentración en alcoholes fenólicos, principalmente 3,4-DHPEA, es del orden de 20 a 30 veces mayor que en el aceite de partida. La capacidad de retención de este compuesto por este tipo de tortas de filtración es de 15 a 20 veces superior que en los agentes filtrantes inorgánicos, y más del doble que los orgánicos tradicionalmente empleados en la industria oleícola a base de fibras de celulosa.



FINAL CONCLUSIONS



SECTION I

1. A rapid and sensitive HPLC-DAD-ESI-TOF-MS method to identify and quantify the olive oil phenolic compounds has been developed with a high efficiency on the chromatographic separation and good resolution in less than 27 min. Moreover, the validation of the proposed method has been carried out with the sensitivity, linearity, and precision parameters. This methodology has been applied to the analysis of the phenolic profile in fourteen EVOO belonging to the main Spanish olive varieties (Hojiblanca, Picual, Cornezuelo, Manzanilla, and Arbequina). A total of 20 compounds from different families have been characterized. Among them, 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EA and their hydroxylated and decarboxymethylated forms have been the main components of the phenolic fraction. However, the amount of these compounds in EVOO from Arbequina olive variety has been considerably less. Indeed, the quantity of *p*-HPEA-EA ranges from 10 to 20 times lower than in other olive oils. Nevertheless, the concentrations of lignans in Arbequina variety have been higher than in the other four. Hydroxypinoresinol has been found only in oils from Arbequina variety, which has also shown the highest amount of (+)-acetoxypinoresinol. As far as the amounts of flavones and phenyl alcohols are concerned, luteolin and apigenin are more abundant in Hojiblanca, Arbequina, and Manzanilla, while the content of phenyl alcohols such as 3,4-DHPEA and *p*-HPEA are the highest in Picual and Manzanilla EVOO varieties. Using the analytical data, a LDA model capable of classifying the EVOO samples according to their olive variety has been constructed. The main predictors, with large discriminant capabilities, are secoiridoids and their derivatives and lignans.



FINAL CONCLUSIONS

2. Anticancer activity *in vitro* of complex 14 phenolic extracts obtained from EVOO monovarietals has been evaluated in human breast cancer SKBR-3 cells. Cell viability assays carried out on the SKBR-3 cells have revealed a wide range of breast cancer cytotoxic potencies among individual crude phenolic extract. Remarkably, SKBR-3 cells sensitivity to crude EVOO phenolic extracts is up to 12 times higher in secoiridoids enriched-phenolic extracts than in secoiridoids-low/null EVOO-phenolic extracts.
3. Phenolic and other polar compounds of solid and aqueous wastes generated during EVOO storage have been reported for the first time. Different solid-liquid extraction (SLE) and liquid-liquid extraction (LLE) procedures have been evaluated to establish the best procedure to extract these compounds from by-products. After this, the analysis of the different phenolic extracts has been performed by HPLC-DAD-ESI-TOF/IT-MS. A total of 13 phenolic compounds and 5 further derivatives have been characterized using their retention time, UV absorbance maxima, MS data, and MS/MS fragmentation patterns. The main components of the phenolic fraction and its derivatives in solid waste extract are dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid (600 mg/Kg) and 3,4-DHPEA (195 mg/kg). Moreover, significant amount of (+)-acetoxypinoresinol, luteolin and apigenin has been detected. With regard to aqueous waste, the content of phenolic alcohols is significantly higher than in solid waste (i.e. *p*-HPEA is 6 times higher in aqueous than in solid waste). Different degradation pathways such as oxidation, hydrolysis, hydration, and loss of carboxylic and carboxymethyl groups have been tentatively



established on the basis of the main phenolic compounds identified in solid and aqueous wastes. Among them, the hydrolysis of complex phenols explains the highest amount of 3,4-DHPEA in both by-products in a range from 30 (solid waste) to 100 (aqueous waste) times higher than the value described in EVOO.

4. Changes in the phenolic patterns of an EVOO and in by-products during storage have been evaluated by SPE/SLE-HPLC-ESI-TOF-MS. The most relevant trends in both, EVOO and by-products, have been shown to phenolic alcohols, secoiridoids and its derivatives. Concerning EVOO, the time course of phenolic alcohols and elenolic acid derivatives was linked to the changes in secoiridoid aglycones. The lysis of the complex phenols during the oil storage led to a higher content of low-molecular-weight phenols. In this way, the amount of 3,4-DHPEA increased in parallel with the decrease of secoiridoid derivatives. With regard to *p*-HPEA, the content only increased starting from several months of storage. The change of this compound over time may be related to the *p*-HPEA-EDA. The increase in 3,4-DHPEA occurs mainly at the expense of the lysis of the 3,4-DHPEA-EA and 3,4-DHPEA-EDA. The half-life for both compounds is similar, 405 and 445 days, respectively. Different models have been analysed to establish the best mathematical function representative of the ratio between complex phenols and specific derivatives formed by hydrolysis over time. All compounds have shown a good correlation when an exponential model has been applied ($r^2 > 0.95$). On the other hand, by-products at all stages of the storage exhibit higher contents in 3,4-DHPEA than EVOO because its appearance rate constants (K_a) is 50 times higher in the by-products than in the EVOO. Total secoiridoids present in



FINAL CONCLUSIONS

storage by-products decrease during the first four months. After this time, 3,4-DHPEA-EDA and its hydroxylated derivative show a gradual increase, probably due to the contribution of the olive-oil polyphenolic composition. The opposite trend is followed by elenolic acid derivatives and lignans. Concerning flavones, luteolin quickly augments in the first period until the second month of by-product generation time, then remains almost constant to the end of the study. The changes of these compounds in by-product are related to the hydrolysis, oxidation, hydration, and the enrichment in polyphenols coming from olive oil. Given that this waste is enriched in polyphenols could be an alternative source of polyphenols with bioactive properties which, after suitable purification, could be used as ingredients in nutraceutical products and functional food.

SECTION II

5. An overview about different filtration systems including new filtration processes which have been recently established by several researchers has been carried out. This review focuses on the effect of these different filtration systems in the minor fraction of EVOO with particular emphasis on polyphenols. The positive or negative effects of the filtration process on these compounds are controversial, and different authors have reported both advantages and disadvantages concerning EVOO filtration. It should be taken into account that the applied technology is mainly on laboratory scale using different filter aids and the analytical methodology to evaluate this process which has not been the same in all researches. When the total phenolic content is analysed by spectrophotometric determination using Folin Ciocalteu reagent, it is reduced by



filtration. However, the determination of the phenolic compounds by HPLC-DAD has reported that the amount of polyphenols remain almost constant or seems to increase considerably after filtration process.

6. A comparison between the new filtration systems using polypropylene filter bag and inert gas flows (argon and nitrogen) as filter aids has been performed to establish the effects on the EVOO quality as well as qualitative and quantitative variations of the polyphenols. A total of 17 compounds have been characterized by HPLC-ESI-TOF-MS. Among these, 15 compounds belong to different phenolic families, one secoiridoid derivative (elenolic acid) and one polar compound (quinic acids). The concentration of the most phenolic compounds seems to increase after filtration. Among these, secoiridoid group are responsible for the apparent increase in the total phenolic content, mainly 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EA. However, this effect is related to the fact that filtration reduces the water content. In water-in-oil emulsion, hydrophilic polyphenols are stabilized around water droplets, and the affinity of the phenolic compounds to solvent extraction is lower than nonpolar matrix. Indeed, the higher concentrations of secoiridoids and derivatives have been detected in filtered samples with argon gas flow, showing a lower content in water. Regarding filter-bag system, while the total content of secoiridoids has also increased in filtered EVOOs, this filtration procedure does not have the same effect on the other phenolic compounds. Indeed, phenyl alcohols, lignans, and flavones are decreased after filtration using the polypropylene filter bag. Given that some of these compounds are not decreased by the inert gas-flow filtration system, it could be



FINAL CONCLUSIONS

surmised that filter-bag filtration has the highest retention power of these minor compounds. Oxidative stability index (OSI) time of unfiltered and filtered EVOO has been determined using an OSI instrument. There is a slight tendency of OSI time to decrease after filtration. However, the major *o*-diphenols concentrations, which are reported to be the highest contributors to oxidative stability in EVOO, have been tested in filtered samples. This trend in oxidative stability may be attributed to the influence of the water content in the polar-phenol extraction and its antioxidant activity. First, the lower water content in filtered EVOO facilitates phenolic compound extraction which gave higher phenol concentrations than unfiltered EVOO. Second, polar antioxidants are more effective in a water-in-oil emulsion system due to their orientation of polar-phenolic compounds at the water–oil interface, and the active surface of water droplets which influences protection against the oxidation of oil.

7. Characterization of the phenolic compounds retained in different inorganic and organic filter aids used for filtering EVOO on laboratory scale has been carried out by HPLC-ESI-TOF-MS. Filter aids used in this study have been: diatomaceous earth (Celite 545® and Kenite 700®), cellulose fibres (Vitacel®L90 y Filtracel®1000) and pregelatinised starch. The retention power has been evaluated using spectrophotometric technique based on Folin–Ciocalteu reagent. All filter aids have retained different classes of the hydrophilic phenolics: phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans and flavones. Among filter aids, the Filtracel®1000 has retained the highest amount of polyphenols.



8. A new filtration process using native starch as main filter aids has been developed to improve the conventional filtration systems. Filter cake, containing mainly native starch, removes suspended solids, moisture and makes the olive oil more brilliant in only one filtration cycle. The filter cake generated as by-product is enrichment in polyphenols coming from olive, which can be used in the development of the functional food, nutraceuticals or ingredients in food industry. The amount of 3,4-DHPEA in native starch filter cakes is in range of 20 to 30 times higher than unfiltered EVOO. The 3,4-DHPEA retention power ranges from 15 to 20 times higher than inorganic filter aids and twice more than other organic filter aids.



