

**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA, PARA LA DETERMINACIÓN DE  
COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA**

**Antonelli S.<sup>1</sup>, Pozas S.<sup>1</sup>, Sepúlveda B.<sup>2</sup>, Tapia F.<sup>3</sup>, Saavedra J.<sup>4</sup>, Romero N.<sup>1</sup>**

- 1 Departamento Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. s\_antonelli@ug.uchile.cl  
2 Educación Continúa/Postítulo Universidad de Chile  
3 INIA Intihuasi, La Serena, Chile.  
4 Escuela de Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Palabras claves: Validación, Fenoles, Aceite de Oliva.  
Área temática: Alimentos funcionales, nutrición y biotecnología.



**INTRODUCCIÓN**

La adherencia a una dieta mediterránea se asocia a un riesgo reducido de morbilidad y mortalidad. En donde el aceite de oliva virgen extra (AOVE), es la principal fuente de grasas (Servili et al., 2013). El AOVE se obtiene de la fruta del olivo (*Olea europaea* L.), mediante procesos mecánicos o físicos (ChileOliva, 2019). Se caracteriza por tener un flavor herbáceo, frutado y verde. Su composición integra compuestos fenólicos (Bendini et al., 2007) que otorgan las propiedades antioxidantes y características organolépticas de la pungencia, astringencia y amargor (González, 2020). También participan en la reducción del riesgo de: enfermedades cardiovasculares, la ocurrencia de diabetes mellitus II, desórdenes intestinales inflamatorios y de alzhéimer, entre otros (Foscolou et al., 2018, Servili et al., 2013, Incani et al., 2016). La presencia de compuestos fenólicos en el AOVE depende de factores agroclimáticos (altitud, latitud, temperaturas máximas y mínimas, etc.), del manejo agronómico (riego, fertilización, poda, etc.), además del método de extracción y procesamiento (Pedan et al., 2019; Sepúlveda, 2015). Para determinar el perfil fenólico del AOVE, surge la necesidad de validar previamente la metodología analítica, permitiendo asegurar con fundamento estadístico características adecuadas de desempeño del método, con el objetivo que los resultados obtenidos sean confiables, reproducibles y verídicos.

**OBJETIVO**

El objetivo es determinar los parámetros de validación, los cuales incluyen la precisión (interdía e intradía), límite de detección y cuantificación, linealidad, sensibilidad y recuperación, utilizando la norma ISP, 2010.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron estándares Sigma de los fenoles: Tirosol, Acetato de Hidroxitirosol, Acetato de Tirosol, Ácido Transferúlico, Ácido p-cumárico, Luteolina, Luteolina 7 metil éter, Apigenina, Ácido Vainillico, Vainillina, Pinoresinol, Ácido siríngico e Hidroxitirosol. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó empleando los siguientes estándares internos: Ácido p-hidroxifenilacético para los fenoles determinados a 280 nm y Ácido o-cumárico, para 335 nm. Los datos obtenidos serán comparados con los de la literatura Mateos et al. (2001), y la norma COI/T.20/Doc. n° 29. La determinación de los fenoles se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE), según la metodología de Fuentes et al. (2018), y se utilizó un HPLC-DAD Waters de fase reversa, equipado con bomba binaria 1525, horno 5CH, autosampler 2707, y con el software cromatográfico EMPOWER SINGLE SYSTEM. El análisis por HPLC, se realizó a 20 µL de muestra y/o estándar, a una temperatura de 20°C y utilizando como fase móvil 0,5% de ácido ortofosfórico (99,5% de agua miliQ) y metanol/acetoneitrilo 50/50% V/V, a un flujo 1 ml/min. v/v (agua) y metanol/acetoneitrilo 50/50% v/v, flujo 1 mL/min. Primero se obtuvo los tiempos de retención y espectros de los 13 estándares mediante inyecciones por triplicado de cada uno pesando 1 mg aproximado de los Estándares externos en un matraz aforado de 10 mL, tomando una alícuota de 250 µL. Se utilizó una alícuota de 500 µL para los estándares internos. Se cuantificaron los compuestos fenólicos en dos muestras de AOVE, pesando 2,5 g de aceite, a temperatura ambiente y a -3±1°C. A partir de la información, se inyectaron curvas de calibración por triplicado, determinando sensibilidad e intervalo lineal del método. Para obtener los límites de detección y cuantificación, se utilizó una matriz blanco. Se escogió un AOVE variedad Arbequina para la determinación de los parámetros de precisión (intradía e interdía).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se busca la verificación de determinados parámetros para comprobar que el método es idóneo para la determinación de Fenoles. Para la obtención de la selectividad y garantizar que la señal producida en la etapa de medición solo se debe al analito de interés, y no a la presencia de interferencias en la muestra se inyectaron los estándares de cada fenol y de los estándares internos, y se obtuvieron los tiempos de retención y espectros de cada uno, para ser posteriormente identificados en muestras de AOVE variedad Arbequina (Figura 1).

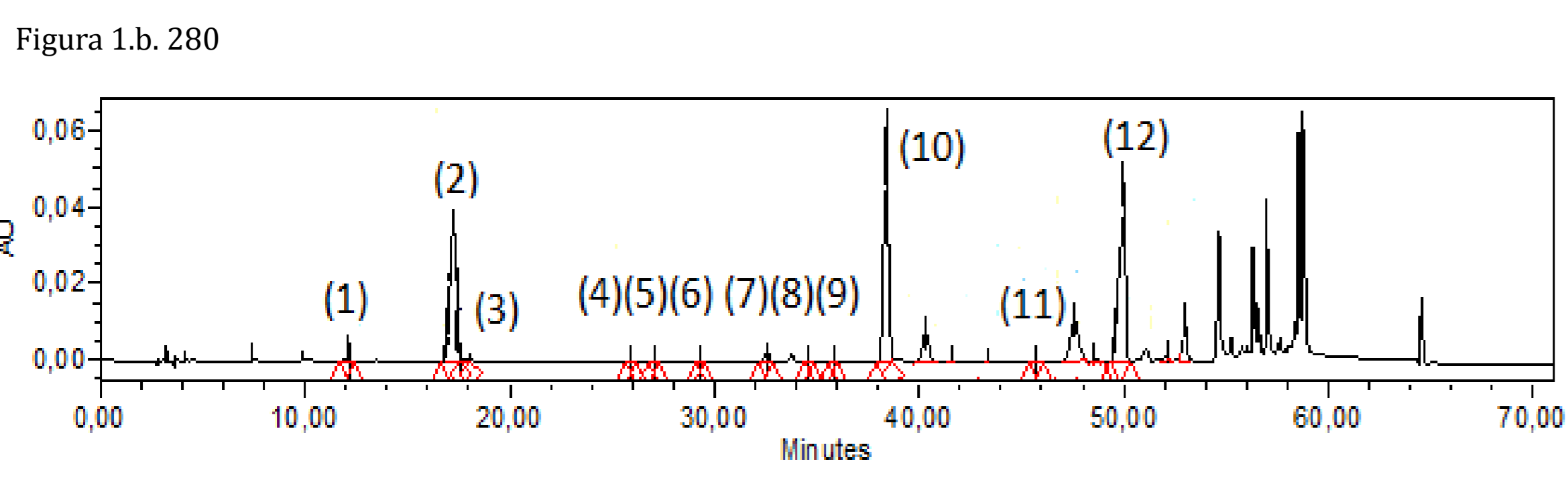
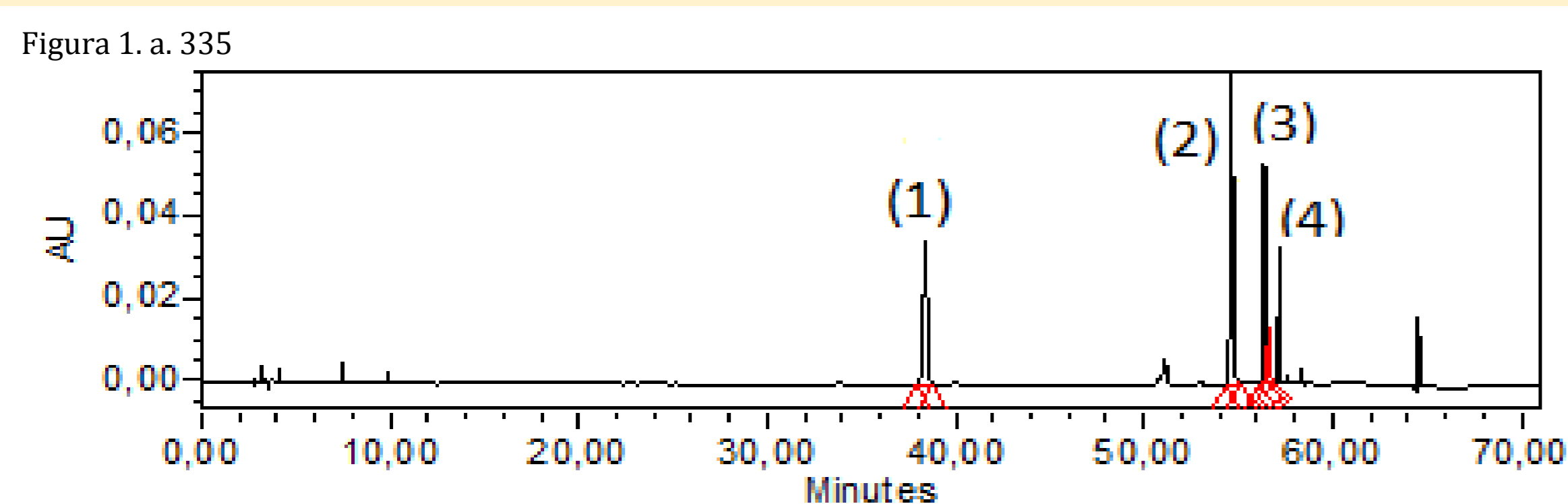


Figura 1.a. Compuestos fenólicos encontrados en el AOVE de Arbequina a 335 nm. (1) Estándar interno Ácido o-cumárico. (2) Luteolina. (3) Apigenina. (4) Luteolina 7 metil éter. Figura 1.b. Los compuestos fenólicos encontrados a 280 nm (1) Hidroxitirosol. (2) Ácido para hidroxifenilacético. (3) Tirosol. (4) Ácido Vainillico. (5) ácido Siríngico. (6) Vainillina. (7) Acetato de Hidroxitirosol. (8) ácido p-cumárico. (9) ácido transferúlico. (10) ácido o-cumárico. (11) Acetato de Tirosol. (12) Pinoresinol.

Con el fin de determinar la linealidad se construyeron curvas de calibración de los 13 estándares (Figura 2), determinando la pendiente y el coeficiente de correlación para cada estándar. Además, se logra determinar el tiempo de retención y selectividad de cada señal en las longitudes de onda correspondientes.

En las curvas de calibración se consideraron 5 niveles de concentración, obteniéndose la sensibilidad para cada uno de los fenoles estudiados, cuyos coeficientes de correlación fueron en todos los casos, igual o superior a 0,99. Además los %CV oscilan de 0 a 0,7.

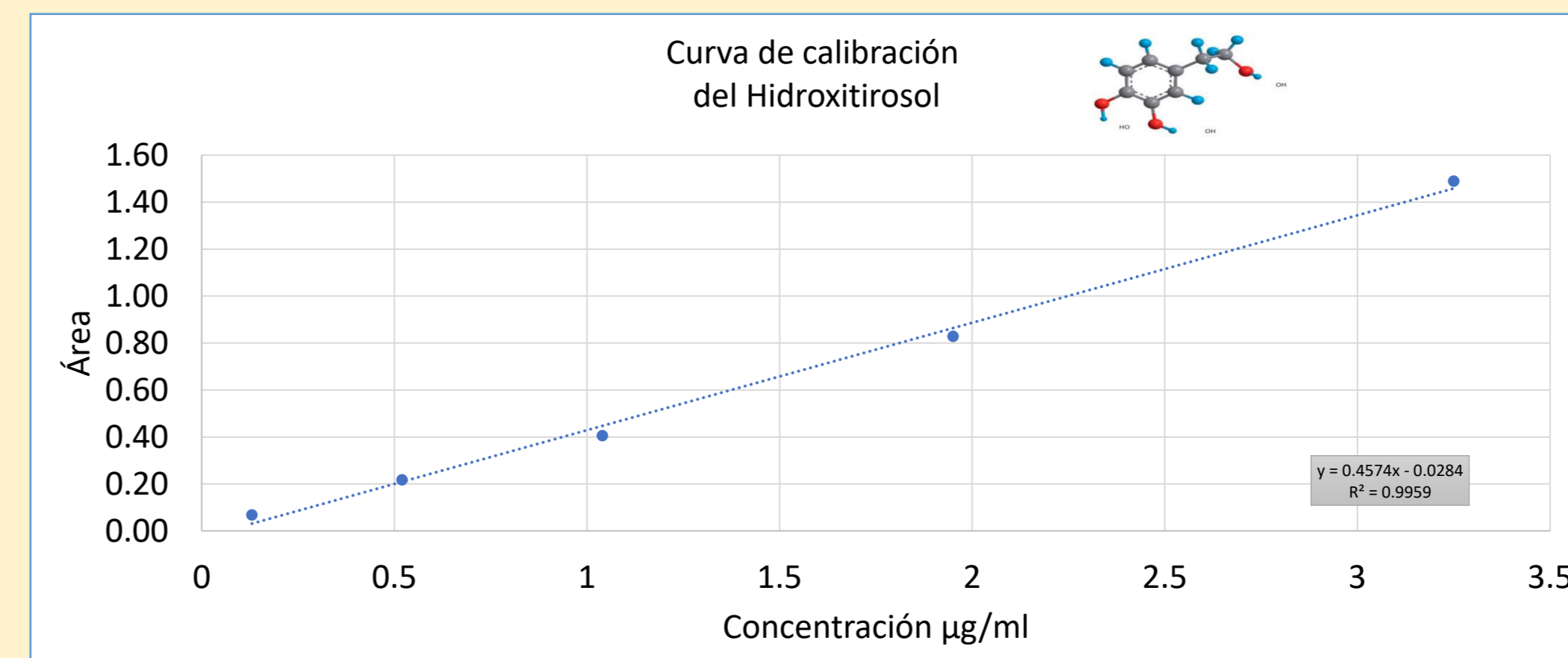


Figura 2. Curva de calibración modelo obtenido del Hidroxitirosol.

De acuerdo al criterio de aceptación el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,99; por lo tanto, se acepta la linealidad de estas curvas, lo que implica que el modelo entrega respuestas proporcionales a la concentración del analito.

Tabla 1. RESUMEN DE PARAMETROS DE VALIDACIÓN DE FENOLES POR HPLC EN ACEITE DE OLIVA.

Compuesto	Longitud de Onda	Tiempo de retención	Rango (µg/mL)	Pendiente	Intercepto	Coeficiente de Correlación	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Repetibilidad X µg/mL	Repetibilidad %CV	Replicabilidad X µg/mL	Replicabilidad %CV
1 Hidroxitirosol	280	12.46	0.13 - 3.25	0.45504	-0.02496	0.996	0.09	0.13	0.10	2.1	0.095	4.3
2 Apigenina	335	54.73	0.48 - 21.60	5.29610	5.07164	0.999	0.01	0.02	0.09	5.1	0.094	10.4
3 Tirosol	280	17.00	0.54 - 4.95	0.28198	-0.05045	0.996	0.22	0.25	0.26	1.3	0.255	3.1
4 Ácido vainillico	280	22.43	0.17 - 2.04	0.87467	0.00616	0.987	0.01	0.02	0.01	7.9	0.006	6.1
5 Vainillina	280	25.66	0.10 - 1.04	1.89143	-0.03374	0.997	0.03	0.06	0.02	1.9	0.023	4.7
6 Luteolina 7 metil éter	335	56.48	1.00 - 50.00	2.11087	0.90824	0.997	0.04	0.12	0.12	3.1	0.127	11.7
7 Ácido Siríngico	280	24.21	0.10 - 1.02	1.55608	0.15168	0.987	0.01	0.03	0.00	5.5	0.000	7.8
8 Acetato de tirosol	280	37.72	5.00 - 200.00	0.01506	1.35439	0.998	0.11	0.11	0.70	6.1	0.653	10.3
9 Pinoresinol	280	45.09	92.50 - 4625.00	0.01004	-1.33173	0.992	0.16	0.16	91.37	4.0	92.084	6.0
10 Luteolina	335	51.26	2.85 - 28.50	9.38695	-21.35439	1.000	2.28	2.28	2.42	0.3	2.433	1.0
11 Acetato de Hidroxitirosol	280	29.73	1.04 - 19.50	0.39532	-0.05090	1.000	0.16	0.18	0.29	2.3	0.288	3.9
12 Ácido p-cumárico	280	30.66	0.13 - 5.20	3.16581	0.00871	0.999	0.01	0.04	0.00	12.8	0.000	12.7
13 Ácido transferúlico	280	36.46	0.18 - 1.08	1.50695	-0.06826	0.993	0.06	0.09	0.05	0.5	0.048	1.9

X: Promedio; LD: Límite de detección. LQ: Límite de cuantificación. CV: Coeficiente de Variación.

En las diferentes curvas de calibración se determinó la sensibilidad del método mediante el valor de la pendiente. Los valores de sensibilidad se obtuvieron dentro de un rango amplio de valores, en donde, el Pinoresinol posee el menor valor (0,001), mientras que el valor más alto es de la Luteolina (9,39). El rango de trabajo del método es superior a los LD y LC, lo que permite determinar concentraciones en una muestra real. El Límite de detección es la concentración mínima de un compuesto que puede ser detectada en una matriz, mientras que el límite de cuantificación corresponde a la concentración mínima de un analito que puede ser cuantificada en una matriz real. Para calcular los límites del método, se inyectó la matriz blanco, repitiéndose este procedimiento 10 veces, obteniéndose 10 mediciones para determinar la desviación estándar y posteriormente los límites. Los límites de cuantificación obtenidos oscilan entre 0,02 - 2,28 µg/mL, y los de detección entre 0,006 - 2,28 µg/mL. Para la obtención de la precisión se estudió como precisión intradía (repetibilidad), extrayendo 7 veces la misma muestra de AOVE en un día, y posteriormente en 7 días seguidos, obteniendo finalmente la precisión interdía (precisión intermedia) de los 13 fenoles cuantificados en el AOVE, variedad Arbequina. Los resultados de precisión intermedia mostraron un %CV en general mayor a los obtenidos en la repetibilidad. El mayor coeficiente de variación obtenido de replicabilidad es del Ácido p-cumárico (12,7); al igual que en repetibilidad (12,8). Según el Codex, para valores menores a 10<sup>-7</sup> se aplica la teoría de Horwitz Thompson que permite valores de CV% iguales o menores a 22% (ISP, 2010), por lo tanto los valores para repetibilidad o precisión intermedia serían aceptables.

**CONCLUSION**

Se logró obtener una metodología validada, para la determinación de fenoles en AOVE.

Agradecimientos al PROYECTO FONDECYT REGULAR 1191682.

**Bibliografía**

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Maio, I. D., Selvaggini, R., & Taticchi, A. (2013, Diciembre 20). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 3(1), 1-23. pubmed. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>  
Consejo Oleícola Internacional (COI). (2019, Noviembre). COI/T.15/NC No 3/Rev. 15. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Retrieved Abril 14, 2021, from [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)  
Bendini, A., Carretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., María Gómez-Caravaca, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercher, G. (2007, Agosto 6). 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* (Basel, Switzerland), 12(8), 1679-1719. Pubmed. <https://doi.org/10.3390/12081679>  
González, P. (2020, Enero). Oleocantal del Aceite de Oliva Virgen Extra y sus efectos en procesos neurodegenerativos. Investigación sobre compuestos activos de los alimentos y su efecto en la salud. Retrieved Abril 27, 2020, from [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/150979/1/TFG\\_Gonz%3A%11ez\\_Paula.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/150979/1/TFG_Gonz%3A%11ez_Paula.pdf)  
Foscolou, A., Critselis, E., & Panagiotakos, D. (2018, Diciembre 1). Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas, Volume 118*, Pages 60-66. sciencedirect. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.10.013>  
Foscolou, A., Critselis, E., & Panagiotakos, D. (2018, Diciembre 1). Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas, Volume 118*, Pages 60-66. sciencedirect. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.10.013>  
Pedan, V., Popp, M., Rohn, S., Nyfeler, M., & Bongartz, A. (2019, Mayo 28). Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil. *Molecules* (Basel, Switzerland), 11(24). <https://doi.org/10.3390/molecules11240241>  
Sepúlveda, B. A. (2015, Junio). Clasificación de Aceites de Oliva Monovarietales de origen Chileno y Español mediante Técnicas Quimiométricas. Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Química. Retrieved Mayo 15, 2021, ISP. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". In B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, M. Aguilera, & S. Sandoval (Eds.), *GUÍA TÉCNICA N° 1* (pp. 1-67). [https://www.isp.ch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia\\_tecnica\\_1\\_validacion\\_de\\_metodos.pdf](https://www.isp.ch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf)  
Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Rios, J. J., Camacho, L., Alcudia, F., & Cert, A. (2001, Mayo). Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 49(5), 2185-2192. NCBI PubMed. DOI: 10.1021/jf0013205  
Consejo Oleícola Internacional (COI). (2007, Septiembre). COI/T.20/Doc. n° 4/Rev. SENSORY ANALYSIS: GENERAL BASIC VOCABULARY. Retrieved Abril 14, 2021, from [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)  
Fuentes, E., Paucar, F., Ortiz, J., Jimenez, P., & N. R. (2018, Marzo 15). Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietales. *Food Chem.*, 243:285-294. NCBI PubMed. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.130.

