



Universitat de Girona

# AVALUACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN ALIMENTS MITJANÇANT TÈCNIQUES HPLC-DAD I UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

**Albert RIBAS AGUSTÍ**

**Dipòsit legal: Gi. 955-2013**

<http://hdl.handle.net/10803/116771>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

# Avaluació de Compostos Fenòlics en Aliments Mitjançant Tècniques HPLC-DAD i UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

Albert Ribas i Agustí

2013

Programa de doctorat de Tecnologia

Tesi dirigida pel Dr. **Massimo Castellari**  
i tutelada a la UdG per la Dra. **Elena Saguer i Hom**

*Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Girona*

El director  
**Dr. Massimo Castellari**

La tutora  
**Dra. Elena Saguer i Hom**

---

Aquest treball ha estat possible gràcies als projectes finançats per la Unió Europea TRUEFOOD –FOOD-CT-2006-016264– i Q-Pork Chains –FOOD-CT-2007-036245–, ambdós dins el Sisè Programa Marc, i ha comptat amb el suport del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.

---

*“Però hem viscut per salvar-vos els mots,  
per retornar-vos el nom de cada cosa,  
perquè seguíssiu el recte camí  
d'accés al ple domini de la terra”*

— SALVADOR ESPRIU, Inici de càntic en el temple

Als meus pares Enric i Dolors,  
als meus germans Eva i Jordi,  
i a la Montse.

## Agraïments

Tot va començar l'any 2007, quan en Massimo em va proposar que demanés una beca a l'AGAUR i comencés així la carrera de doctorat a la Unitat de Química Alimentària –que més endavant va passar a dir-se Funcionalitat i Nutrició– a l'IRTA de Monells. Tot just estava acabant la llicenciatura de Ciència i Tecnologia dels Aliments, fent una estada al celler Mas Oller de Torrent. Llavors, immers en el món del vi, vaig pensar que treballar en polifenols havia de ser prou interessant. A més a l'IRTA, prop de casa –avui per mi això té més valor que mai–, un centre que ja coneixia prou bé d'ençà d'una estada durant la carrera de biologia. Ja estava avisat que el camí no seria flors i violes, tinc uns quants amics que llavors ja havien iniciat el llarg i sovint penós camí del doctorat. Però tot i així em vaig decidir a començar. Què coi, en tenia ganes.

A aquests amics, en Ferran Prados, en Pere Tubert, en Paco Ortega, en José Moreno i en Miquel Ribot, avui la majoria d'ells ja doctors –Miquel! t'esperem!–, gràcies. Amb vosaltres he compartit penes i alegries. Els vostres consells i experiències m'han estat de gran ajuda! Ho anirem a celebrar com cal, no? Per cert, la portada d'aquesta tesi ha estat concebuda i realitzada per en Pere Tubert, gràcies Pere! –espero que no hi hagi cap “cosa” camuflada...–.

Agraeixo el suport del cap de la Unitat, el Dr. José Antonio García. També als meus companys i amics de Monells, en Mariano Bellelli, l'Elena Viñas, la Dra. Carmen Sárraga, l'Eugeni Anselmet, l'Eva Roldós, la Dra. Marta Gratacós, la Dra. Maria Clariana, la Dra. Maria Hortós, la Dra. Isabel Díaz i als altres que indubtablement em deixo, la vostra aportació, científica o no, ha permès formar-me com a investigador i com a persona, us estic molt agraït!

M'agrada la ciència, m'agrada l'esperit científic i provar coses noves, a vegades estranyes, encara que moltes d'elles acabin en no res. Però si almenys una d'aquestes proves serveix per descobrir alguna cosa, val la pena provar-ho, no? He tingut la sort d'haver estat supervisat per una persona a qui vull agrair sincerament, ja que he pogut fer els experiments amb molta llibertat, però sempre comptant amb el seu assessorament i experiència, més que valuosos per a mi. Dr. Massimo Castellari, grazie per aver creduto in me e per avermi sostenuto in questi anni!

También quiero agradecer al doctor Juan Valverde la oportunidad de hacer una estancia en el centro Teagasc de Ashtown en Dublín. Con él compartí interesantes y muy estimulantes charlas científicas y no tan científicas. Aprendí mucho en Dublín, ¡muchas gracias Juan!

In science, you always feel as if you do not know it all. In my case, today I know much more than in 2011, thanks to Dr. Sandy Van Buggenhout, Professor Ann Van Loey and Professor Marc Hendrickx; however, I am also aware that there is still a lot to learn. Thanks also to all my colleagues and friends of the Laboratory of Food Technology of the faculty of Bioscience Engineering at KU Leuven, this year has been awesome with all of you, dank u wel!

Sense el recolzament dels meus pares Dolors i Enric, i els meus germans, Eva i Jordi, aquesta tesi que teniu entre mans no hagués estat possible. Sentir-se a prop de la família, encara que sovint sigui a través de l'Skype, ajuda a continuar endavant. Moltes gràcies, us dec molt!

Això que escric ara pot semblar una mica estrany, però he d'agrair molt sincerament a la meva carrera de doctorat. Treballant a l'IRTA vaig conèixer a la Montse. Era l'estiu de 2008, jo estava immers i capficat en els meus tomàquets –no us podeu imaginar com en són de durs, els tomàquets a  $-80^{\circ}\text{C}$ –, i ella feia una estada curta a l'IRTA, aïllada en una sala que anomenen la nevera, no en va. Qui ens hauria dit llavors que al cap d'un temps estaríem tant units, oi? Gràcies tesi per haver permès que conegui la Montse, i gràcies Montse per aguantar-me! Desitjo que sigui per mooolts anys!

A tots vosaltres, moltes gràcies!

## Presentació dels treballs publicats

Aquesta tesi està conformada per un compendi de quatre articles científics, els quals, han estat escrits pel doctorand i el mateix hi figura com a autor principal:

- *Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce –Lactuca sativa L.– by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection.*

Autors: Albert Ribas Agustí, Marta Gratacós Cubarsí, Carmen Sárraga, José Antonio García Regueiro i Massimo Castellari.

Article original publicat a la revista *Phytochemical Analysis*, número 22 (2011), pàgs. 555-563. Aquest treball dona lloc al capítol 2 d'aquesta tesi. *Phytochemical analysis* (Wiley-Blackwell) té un factor d'impacte de 2,633 (primera meitat de la categoria "Química Analítica"), segons publica *Journal Citation Reports* (Thomson Reuters, 2013).

- *A validated HPLC-DAD method for routine determination of ten phenolic compounds in tomato fruits.*

Autors: Albert Ribas Agustí, Rafaela Cáceres, Marta Gratacós Cubarsí, Carmen Sárraga i Massimo Castellari.

Article original publicat a la revista *Food Analytical Methods*, número 5 (2012), pàgs. 1137-1144. Aquest treball conforma el capítol 3 d'aquesta tesi. *Food Analytical Methods* (Springer) té un factor d'impacte de 1,943 (primera meitat de la categoria "Ciència i Tecnologia dels Aliments"), segons publica *Journal Citation Reports* (Thomson Reuters, 2013).

- *Effects of different organic anti-fungal treatments on tomato plant productivity and selected nutritional components of tomato fruit.*

Autors: Albert Ribas Agustí, Pavlos Bouchagier, Efstathia Skotti, Daniela Erba, Cristina Casiraghi, Carmen Sárraga i Massimo Castellari.

Article original publicat a la revista *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, número 88 (2013), pàgs. 67-72. El capítol 4 d'aquesta tesi es basa en aquest treball. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* (Headley

---

Brothers) té un factor d'impacte de 0,637 (segona meitat de la categoria "Horticultura"), segons publica *Journal Citation Reports* (Thomson Reuters, 2013).

- *Characterization and stability of phenolic compounds in dry-cured sausages added with cocoa and grape seed extracts.*

Autors: Albert Ribas Agustí, Marta Gratacós Cubarsí, Carmen Sárraga, Jacint Arnau, José Antonio García Regueiro i Massimo Castellari.

Article en revisió per a la revista *LWT-Food Science and Technology*. Aquest treball origina el capítol 5 d'aquesta tesi. *LWT-Food Science and Technology* té un factor d'impacte de 2,545 (primera meitat de la categoria "Ciència i Tecnologia dels Aliments"), segons publica *Journal Citation Reports* (Thomson Reuters, 2013).



# Índex general

Índex de figures .....	xii
Índex de taules.....	xiv
Llista d'abreviatures .....	xvi
Glossari català-anglès .....	xviii
Resum .....	xx
Summary.....	xxii
1. Introducció .....	1
1.1 Els compostos fenòlics .....	2
1.2 Biologia dels compostos fenòlics en els vegetals.....	7
1.3 Presència en els aliments.....	16
1.4 Biodisponibilitat i activitat biològica en humans .....	20
1.5 Usos en la indústria alimentària i noves aplicacions.....	26
1.6 Anàlisi de compostos fenòlics en aliments .....	32
1.7 Objectius de la recerca i metodologia emprada.....	48
2. Analysis of eleven phenolic compounds including novel <i>p</i> -coumaroyl derivatives in lettuce – <i>Lactuca sativa</i> L.– by UHPLC-PAD-MS .....	51
2.1 Abstract.....	52
2.2 Introduction .....	53
2.3 Materials and methods.....	54
2.4 Results and discussion .....	57
3. A validated HPLC-DAD method for routine determination of ten phenolic compounds in tomato fruits.....	67
3.1 Abstract.....	68
3.2 Introduction .....	69
3.3 Materials and methods.....	70
3.4 Results and discussion .....	74

3.5 Conclusions .....	80
4. Effects of different organic anti-fungal treatments on tomato plant productivity and selected nutritional components of tomato fruit.....	83
4.1 Abstract.....	84
4.2 Introduction .....	85
4.3 Materials and methods.....	86
4.4 Results.....	91
4.5 Discussion.....	94
5. Characterization and stability of phenolic compounds in dry-cured sausages added with cocoa and grape seed extracts .....	97
5.1 Abstract.....	98
5.2 Introduction .....	99
5.3 Materials and methods.....	100
5.4 Results and discussion .....	104
5.5 Conclusions .....	113
6. Resultats i discussió generals .....	115
6.1 Desenvolupament de mètodes d'anàlisi HPLC de compostos fenòlics en matrius vegetals.....	116
6.2 Aplicació dels mètodes HPLC-DAD d'anàlisi de compostos fenòlics en estudis de l'efecte de condicions agronòmiques.....	122
6.3 Anàlisi UHPLC-DAD-MS de compostos fenòlics exògens en matrius càrnies.....	123
6.4 Discussió general.....	126
7. Conclusions.....	129
8. Bibliografia.....	133

# Índex de figures

<b>1.1</b>	Estructura molecular bàsica de les principals classes de compostos fenòlics .....	2
<b>1.2</b>	Estructura general dels flavonoides i de les principals classes presents en aliments .....	3
<b>1.3</b>	Flavonols més abundants en els aliments .....	4
<b>1.4</b>	Principals flavan-3-ols i esquema general de les procianidines amb enllaç C4→C8 .....	5
<b>1.5</b>	Esquema de la ruta de biosíntesi de les principals classes de compostos fenòlics .....	8
<b>1.6</b>	Perfils d'absorció UV solapats dels principals compostos fenòlics del tomàquet, corresponents a quatre classes diferents .....	11
<b>1.7</b>	Reaccions d'oxidació de compostos fenòlics catalitzades per polifenol oxidases i peroxidases .....	15
<b>1.8</b>	Exemple d'activitat antioxidant de la catequina en presència d'un radical superòxid .....	24
<b>1.9</b>	Exemples de compostos fenòlics amb propietats gustatives .....	26
<b>1.10</b>	Exemple esquemàtic del funcionament d'un electroesprai .....	39
<b>1.11</b>	Exemple esquemàtic de la detecció en un triple quadrupol .....	41
<b>2.1</b>	Cromatograma UHPLC-DAD característic d'un extracte d'enciam, enregistrat a 330 nm .....	57
<b>2.2</b>	Espectres DAD dels derivats d'àcid cumàric "àcid cumaroilcafeoil tartàric" –pic 7– i àcid "dicumaroil tartàric" –pic 8– .....	58
<b>2.3</b>	Estructures moleculars proposades pels compostos quantificats en extractes d'enciam .....	60
<b>2.4</b>	Patró de fragmentació MS <sup>2</sup> de l'àcid cumaroilcafeoil tartàric –pic 7– amb l'estructura molecular proposada per aquest compost .....	62

<b>2.5</b>	Proposta de fragmentació MS <sup>3</sup> dels ions MS <sup>2</sup> fills de l'àcid cumaroilcafeoil tartàric –pic 7– amb m/z 311 –àcid cafeoil tartàric– i m/z 295 –àcid <i>p</i> -cumaroil tartàric– .....	63
<b>2.6</b>	Proposta de fragmentació MS <sup>2</sup> de l'àcid dicumaroil tartàric –pic 8– i de fragmentació MS <sup>3</sup> dels ions MS <sup>2</sup> fills amb m/z 295 –àcid <i>p</i> -cumaroil tartàric– .....	64
<b>3.1</b>	Estructura dels deu compostos fenòlics avaluats en tomàquet .....	76
<b>3.2</b>	Perfil HPLC característic d'extracte de tomàquet <i>Caramba</i> , enregistrat a 353 i 288 nm .....	77
<b>5.1</b>	Perfil <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM) de fuet amb extracte de cacau .....	106
<b>5.2</b>	Perfil <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM) de fuet amb extracte de llavor de raïm GSE2 .....	107
<b>5.3</b>	Nivells de catequina, epicatequina i flavan-3-ols oligomèrics en embotits secs curats amb extractes vegetals .....	110
<b>5.4</b>	Nivells d'àcid gal·lic, flavan-3-ols esterificats amb àcid gal·lic i flavonols glicosilats en embotits secs curats amb extractes vegetals .....	111
<b>6.1</b>	Composició percentual dels compostos fenòlics presents en els enciams <i>romà</i> analitzats .....	118
<b>6.2</b>	Composició percentual dels compostos fenòlics presents en els tomàquets de les varietats <i>Montserrat</i> , <i>Pera de Girona</i> i <i>Caramba</i> .....	120
<b>6.3</b>	Composició percentual dels compostos fenòlics presents en els embotits secs curats enriquits amb extractes de llavor de raïm GSE1 i GSE2 i de cacau, un mes després de l'elaboració .....	125

# Índex de taules

1.1	Estructura dels àcids fenòlics més comuns en els vegetals .....	6
1.2	Contingut de compostos fenòlics en enciam, tomàquet, llavor de raïm i cacau en pols .....	18
1.3	Extractes rics en compostos fenòlics utilitzats com a antioxidants en aliments carnis .....	28
1.4	Exemples típics de bandes d'absorció màximes per a les diferents classes de compostos fenòlics .....	37
2.1	Paràmetres d'identificació cromatogràfics, espectroscòpics i espectromètrics dels pics principals obtinguts amb extractes d'enciam .....	58
2.2	Ions de fragmentació recurrents obtinguts en experiments MS <sup>n</sup> en enciam.....	60
2.3	Paràmetres de les corbes de calibratge del mètode d'anàlisi HPLC-DAD de compostos fenòlics en enciam .....	65
2.4	Límits de quantificació i exactitud del mètode d'anàlisi UHPLC-DAD en enciam .....	66
2.5	Contingut en compostos fenòlics intactes en enciam <i>romà</i> –llarg– .....	66
3.1	Paràmetres experimentals UHPLC-DAD-MS d'identificació de compostos fenòlics en tomàquet .....	75
3.2	Paràmetres de validació, corbes de calibratge i número de plats teòrics del mètode d'anàlisi HPLC-DAD de compostos fenòlics en tomàquet .....	78
3.3	Contingut promig de compostos fenòlics intactes en les varietats de tomàquet <i>Montserrat</i> , <i>Pera de Girona</i> i <i>Caramba</i> .....	80
4.1	Productivitat de les tomaqueres sota els tractaments “control”, “sofre”, Milsana® i Chitoplant® a BPI –Atenes–, on no s’hi observà oïdi, i a TEI –Cefalònia–, on s’hi va desenvolupar oïdi .....	91
4.2	Perfils composicionals dels tomàquets crescuts a BPI –Atenes– sota quatre tractaments foliaris antifúngics .....	92

<b>4.3</b>	Perfils composicionals dels tomàquets crescuts a TEI –Cefalònia– sota quatre tractaments foliars antifúngics .....	93
<b>5.1</b>	Paràmetres de validació del mètode UHPLC d’anàlisi de compostos fenòlics en llonganissa i fuet amb extractes vegetals .....	104
<b>5.2</b>	Paràmetres cromatogràfics, espectroscòpics i espectromètrics utilitzats per identificar i quantificar els compostos fenòlics en mostres de fuet i llonganissa amb extractes de cacau i llavor de raïm .....	105
<b>5.3</b>	Resultats ANOVA amb els efectes principals de les variables independents i les interaccions en l’estudi de l’estabilitat dels compostos fenòlics en embotit sec curat .....	108
<b>5.4</b>	Concentració de compostos fenòlics en fuet i llonganissa amb extractes vegetals al final del procés de maduració .....	112

# Llista d'abreviatures

<b>4CL</b>	<i>p</i> -cumarat-CoA lligasa <i>p-coumarate-CoA ligase</i>	<b>ESI</b>	Ionització per electroesprai <i>Electrospray ionization</i>	<b>ISO</b>	Organització Internacional per l'Estandardització <i>International Organization for Standardization</i>
<b>a.</b>	Àcid <i>Acid</i>	<b>F3'H</b>	Flavonoid 3'-hidroxilasa <i>Flavonoid 3'-hydroxylase</i>	<b>IUPAC</b>	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>ANR</b>	Antocianidina reductasa <i>Anthocyanidin reductase</i>	<b>F3H</b>	Flavanona 3-hidroxilasa <i>Flavanone 3-hydroxylase</i>	<b>LAR</b>	Leucoantocianidina 4-reductasa <i>Leucoanthocyanidin 4-reductase</i>
<b>ANS</b>	Antocianidina sintasa <i>Anthocyanidin synthase</i>	<b>FDA</b>	Administració dels Estats Units per l'alimentació i els medicaments <i>United States Food and Drug Administration</i>	<b>LOD</b>	Límit de detecció <i>Limit of detection</i>
<b>APCI</b>	Ionització química a pressió atmosfèrica <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	<b>FLS</b>	Flavonol sintasa <i>Flavonol synthase</i>	<b>LOQ</b>	Límit de quantificació <i>Limit of quantification</i>
<b>C4H</b>	Cinamat 4-hidroxilasa <i>Cinnamate 4-hydroxylase</i>	<b>FNS</b>	Flavona sintasa <i>Flavone synthase</i>	<b>MALDI</b>	Desorció-ionització amb làser assistit per matriu <i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
<b>CE</b>	Electroforesi capil·lar <i>Capillary electrophoresis</i>	<b>GC</b>	Cromatografia de gasos <i>Gas chromatography</i>	<b>MAP</b>	Proteïna activada per mitògen
<b>CHI</b>	Calcona isomerasa <i>Chalcone isomerase</i>	<b>GST</b>	Glutatió <i>S</i> -transferasa <i>Glutathione S-transferase</i>	<b>MS</b>	Espectrometria de massa <i>Mass spectrometry</i>
<b>CHS</b>	Calcona sintasa <i>Chalcone synthase</i>	<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida a molt alta resolució <i>High performance liquid chromatography</i>	<b>MRM</b>	Múltiple reacció de monitoratge <i>Multiple reaction monitoring</i>
<b>DAD</b>	Detecció de barra de díodes <i>Diode array detection</i>	<b>ICH</b>	Conferència Internacional sobre l'Harmonització <i>International Conference on Harmonization</i>	<b><i>m/z</i></b>	Relació massa/càrrega <i>Mass-to-charge ratio</i>
<b>DFR</b>	Dihidroflavonol 4-reductasa <i>Dihydroflavonol 4-reductase</i>	<b>IFS</b>	Isoflavona sintasa <i>Isoflavone synthase</i>	<b>NMR</b>	Ressonància magnètica nuclear <i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>DW</b>	Càlcul en pes sec <i>On dry weight basis</i>	<b><i>i.s.</i></b>	Patró intern <i>Internal standard</i>	<b>PAD</b>	Detecció de barra de fotodíodes (=DAD) <i>Photodiode array detection</i>
<b>CE</b>	Electroforesi capil·lar <i>Capillary electrophoresis</i>				<i>Mass spectrometry</i>
<b>EFSA</b>	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària <i>European Food Safety Authority</i>				

<b>PAL</b>	Fenilalanina amoni liasa <i>Phenylalanine ammonia lyase</i>	<b>RP</b>	Fase reversa <i>Reverse-phase</i>	<b>UHPLC</b>	Cromatografia líquida de molt alta ressolució <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
<b>p.ex.</b>	Per exemple	<b>SDS</b>	Dodecilsulfat de sodi <i>Sodium dodecyl sulfate</i>	<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<b>p.i.</b>	Patró intern <i>Internal standard</i>	<b>SPE</b>	Extracció en fase sòlida <i>Solid-phase extraction</i>	<b>UV-VIS</b>	Espectroscòpia ultraviolat-visible <i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>
<b>PF</b>	Càlcul en pes fresc	<b>SS</b>	Estilbè sintasa <i>Stilbene synthase</i>		
<b>PPO</b>	Polifenol oxidases <i>Polyphenol oxidases</i>	<b>TLC</b>	Cromatografia de capa fina <i>Thin layer chromatography</i>		
<b>PUFA</b>	Àcids grassos poliinsaturats <i>Polyunsaturated fatty acids</i>	<b>TOF</b>	Temps de vol <i>Time of flight</i>		
<b>ROS</b>	Espècies d'oxigen reactiu <i>Reactive Oxygen Species</i>	<b>UE</b>	Unió Europea <i>European Union</i>		



# Glossari català-anglès

**Àcid 5-cafeoilquínic**

*5-Caffeoylquinic acid*

**Àcid cafeic**

*Caffeic acid*

**Àcid cafeoil·màlic**

*Caffeoylmalic acid*

**Àcid cafeoilquínic**

*Caffeoylquinic acid*  
(*Chlorogenic acid*)

**Àcid cafeoil·tartàric**

*Caffeoyltartaric acid*  
(*Caftaric acid*)

**Àcid cinàmic\***

*Cinnamic acid*

**Àcid clorogènic\***

*Chlorogenic acid*

**Àcid cumàric**

*Coumaric acid*

**À. cumaroil·cafeoil·tartàric**

*Coumaroylcaffeoyl-tartaric a.*

**Àcid cumaroilquínic**

*Coumaroylquinic acid*

**Àcid cumaroil·tartàric**

*Coumaroyltartaric a.*  
(*Coutaric acid*)

**Àcid 3,5-dicafeoilquínic**

*3,5-Dicaffeoylquinic acid*

**Àcid dicafeoil·tartàric**

*Dicaffeoyltartaric a.*  
(*Chicoric acid*)

**Àcid dicumaroil·tartàric**

*Dicoumaroyltartaric acid*

**Àcid el·làgic\***

*Ellagic acid*

**Àcid fenòlic\***

*Phenolic acid*

**Àcid ferúl·lic**

*Ferulic acid*

**Àcid gàl·lic**

*Gallic acid*

**Àcid hidroxibenzoic**

*Hydroxybenzoic acid*

**Àcid hidroxicinàmic**

*Hydroxycinnamic acid*

**Àcid sinàpic\***

*Sinapic acid*

**Al·lelopatia\***

*Allelopathy*

**Antocianidina\***

*Anthocyanidin*

**Antocianina\***

*Anthocyanin*

**Apigenina\***

*Apigenin*

**Campferol**

*Kaempferol*

**Capsaicina**

*Capsaicin*

**Catequina\***

*Catechin*

**Calcona**

*Chalcone*

**Caps blancs**

*Sweet alyssum*

**Catecol\***

*Catechol*

**Catequina\***

*Catechin*

**Cianidina**

*Cyanidin*

**Cinamat\***

*Cinnamate*

**Cumarina\***

*Coumarin*

**Daidzeïna**

*Daidzein*

**Dihidrocampferol**

*Dihydrokaempferol*

**Dihidroquercetina**

*Dihydroquercetin*

**Electroesprai\***

*Electrospray*

**Elícitor**

*Elicitor*

**El·lagitaní**

*Ellagitannin*

**Epicatequina**

*Epicatechin*

**Epicatequina gal·lat**

*Epicatechin gallate*

**Epigal·locatequina**

*Epigallocatechin*

**Epigal·locatequina gal·lat**

*Epigallocatechin gallate*

**Estilbè**

*Estilbene*

**Fenilalanina\***

*Phenylalanine*

**Fitoalexina\***

*Phytoalexin*

**Fitoquímic\***

*Phytochemical*

**Flavan-3-ol<sup>s</sup>****Flavanona**

*Flavanone*

**Flavona\***

*Flavone*

**Flavonoide\***

*Flavonoid*

**Flavonol<sup>s</sup>****Floretina**

*Phloretin*

**Floridzin**

*Phloridzin*

**Gal·locatequina**

*Gallocatechin*

**Gal·lotaní**

*Gallotannin*

**Genisteïna**

*Genistein*

**Hesperetina**

*Hesperetin*

**Hesperidina**

*Hesperidin*

**Hidrolasa\****Hydrolase***Hidroxilasa***Hydroxylase***Isoflavona\****Isoflavone***Isoflavonoide***Isoflavonoid***Isomerasa\****Isomerase***Isoramnetina***Isorhamnetin***Isoxantumol***Isoxanthohumol***Lacasa***Laccase***Leucocianidina***Leucocyanidin***Liasa\****Lyase***Lligasa\* (Ligasa\*)***Ligase***Lignà***Lignan***Lignina\****Lignin***Luteolina***Luteolin***Miricetina***Myricetin***Morina***Morin***Naringenina\****Naringenin***Naringenina calcona***Naringenin chalcone**(Chalconaringenin)***Neohesperidòsid***Neohesperidise***Oïdi\****Powdery mildew***Oxidasa\****Oxidase***Oleuropeïna\****Oleuropein***p-Cumaroil CoA***p-Coumaroyl CoA***Peroxidasa\****Peroxidase***Polifenol***Polyphenol***Proantocianidina***Proanthocyanidin***Procianidina***Procyanidin***Prodelfinidina***Prodelfinidin***Propelargonidina***Propelargonidin***Quercetina\****Quercetin***Quercetina-3-O-arabinòsid***Quercetin-3-O-arabinoside***Quercetina-3-O-galactòsid***Quercetin-3-O-galactoside***Quercetina-3-O-glucòsid***Quercetin-3-O-glucoside***Quercetina-3-O-glucurònid***Quercetin-3-O-glucuronide***Quercetina-3-O-malonilglucòsid***Quercetin-3-O-malonylglucoside***Quercetina-3-O-rutinòsid***Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)***Ramnosa\****Rhamnose***Reductasa\****Reductase***Resveratrol<sup>§</sup>****Sanguïina***Sanguin***Sintasa\****Synthase***Tanins condensats\****Condensed tannins***Tanins hidrolitzables\****Hydrolysable tannins***Xantumol***Xanthohumol***Xiquimat\****Shikimate*

\* La majoria de termes no estan normalitzats en llengua catalana. Els mots amb asterisc “ \* ” tenen entrada en el Diccionari de la Llengua Catalana <sup>(1)</sup> i/o en el Diccionari de l'Enciclopèdia Catalana <sup>(2)</sup>; per a la resta de termes, es proposen mots coherents amb la normes ortogràfiques de la llengua catalana.

<sup>§</sup> La traducció anglesa no difereix del mot en català.

# Resum

Els compostos fenòlics són metabòlits secundaris dels organismes vegetals que es troben presents en molts aliments de la nostra dieta. Nombrosos estudis relacionen el consum regular d'aliments que contenen aquests compostos i certs efectes beneficiosos per a la salut, principalment pels seus efectes antioxidants, però també per les seves interaccions en el metabolisme que estan relacionades amb una menor incidència de diverses malalties cròniques. A part dels aliments d'origen vegetal, l'ús d'extractes vegetals rics en compostos fenòlics en alguns aliments carnis és una estratègia a considerar per a la indústria alimentària per motius tecnològics i funcionals.

En aquest sentit, l'objectiu global d'aquesta tesi és dotar d'eines per a la millora del coneixement que tenim sobre la presència de compostos fenòlics en els nostres aliments. L'execució d'aquest objectiu es materialitza en dues vessants, la primera en el desenvolupament de mètodes analítics per a l'anàlisi de compostos fenòlics en matrius diferents i de l'altra, en aprofundir el coneixement sobre el contingut fenòlic d'aliments habitualment presents a la nostra dieta. Els aliments escollits són tomàquet i enciam, representants de dues matrius vegetals diferents, i embotit sec curat –fuet i llonganissa– amb extractes vegetals, representant d'una matriu càrnia amb compostos fenòlics afegits de tres orígens diferents, dos d'ells de llavor de raïm i un de cacau.

La tesi ha permès desenvolupar mètodes d'anàlisi HPLC-DAD i UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup> per a l'anàlisi sistemàtic dels compostos fenòlics presents en els aliments descrits, els quals compten amb una metodologia simplificada, es troben validats i permeten la valoració d'un perfil ampli i representatiu dels compostos presents a les mostres.

La informació UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup> d'extractes d'enciam *romà* permeté identificar provisionalment quatre àcids hidroxicinàmics –derivats d'àcid cumàric– mai descrits anteriorment en aquest vegetal. A més a més, dos d'aquests compostos –designats àcid *p*-cumaroilcafeoil tartàric i àcid di-*p*-cumaroil tartàric– són inèdits a la literatura.

Per primer cop es descriu el contingut de compostos fenòlics a tres varietats de tomàquet, una de comercial –*Caramba*– i dues de regionals –*Montserrat* i *Pera de Girona*–. Les anàlisis en tomàquets *Belladonna* revelaren que l'aplicació d'elícitor –tractament antifúngic ecològic– en absència de plaga produí un lleuger increment en el contingut de flavonoides, mentre que en presència d'oïdi –*Leveillula taurica*–, les mostres no tractades amb elícitor en contingueren més.

L'anàlisi de compostos fenòlics a fuets i llonganisses amb extractes de llavor de raïm i de cacau al llarg del seu procés de curació i de la vida útil permeté comprovar que la seva estabilitat és suficient per mantenir nivells importants al producte final. Aquests resultats donen suport a l'ús d'extractes vegetals rics en compostos fenòlics en embotits secs curats amb finalitats funcionals.

# Summary

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants which are found in a large number of foods. Many studies have related the regular consumption of foods containing these compounds to certain health benefits, mainly thanks to their antioxidant effects but also due to their metabolic interactions, which are related to a lower incidence of certain chronic diseases. Apart from vegetable-based foods, the use of vegetable extracts rich in phenolic compounds in some meat foods is also a strategy to be considered by the food industry, with either technological or functional purposes.

In this regard, the overall objective of this thesis is to provide tools to improve the knowledge about the presence of phenolic compounds in our foods. This objective is twofold; on one hand it is to develop analytical methods for the analysis of phenolic compounds in different matrices and, on the other hand, to provide data about the phenolic composition in common foods. The selected foods are tomato and lettuce, representatives of two different vegetable matrices, and dry-cured sausage –*fuet* and *llonganissa*– with vegetable extracts, representative of a meat matrix with exogenous phenolic compounds from three different origins, two from grape seed and one from cocoa.

This thesis has made possible the development of HPLC-DAD and UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analytical methods for the systematic analysis of the phenolic composition in the selected foods. These methods have a simplified methodology, are validated and let obtain a wide and representative range of the phenolic compounds in samples.

The UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup> information from romaine lettuce extracts provided the tentative identification of four hydroxycinnamic acids –coumaric acid derivatives– never described before in this vegetable. Furthermore, two of these compounds, assigned as *p*-coumaroylcaffeoyltartaric acid and di-*p*-coumaroyltartaric acid, are novel in literature.

For the first time, the phenolic compositions of three tomato varieties, *Caramba* –with wide commercial use–, *Montserrat* and *Pera de Girona* –both regionally important–, are described. The analysis of *Belladonna* tomatoes showed that the use of elicitor –pest control used in organic farming– in absence of pests induced a slight increase in flavonoids, whereas in presence of powdery mildew infestation –*Leveillula taurica*–, samples without elicitor treatment contained more flavonoids.

The analysis of phenolic compounds in dry-cured sausages with grape seed and cocoa extracts during ripening and shelf life showed that the compounds are enough stable to retain important levels at the final product. These results support the use of vegetable extracts rich in phenolic compounds with functional purposes in dry-cured sausages.



---

**1.**

# **Introducció**





# 1.1 Els compostos fenòlics

## Descripció general

El tret comú dels compostos fenòlics és la presència d'un o més anells aromàtics en la seva estructura molecular, que a més, inclou com a mínim un grup hidroxil –fenol–<sup>(3)</sup>. La presència, en molts casos, de més d'un fenol en la seva estructura fa que també siguin coneguts com a polifenols. Constitueixen un enorme grup de metabòlits secundaris amb més de 8000 estructures identificades<sup>(3)</sup>. Són compostos característics de les plantes, tot i que també poden ser sintetitzats per fongs i procarïotes. No participen en el metabolisme primari, és a dir, no intervenen directament en la fotosíntesi, respiració, creixement ni en el desenvolupament de l'organisme que l'ha sintetitzat. Les seves possibles funcions a les plantes es troben descrites a la secció 1.2.

La seva diversitat estructural va des d'un simple anell fenòlic de poc pes molecular fins a complexes estructures polimèriques. Es poden classificar segons el nombre d'anells fenòlics presents en la seva estructura i com aquests es troben units. Els flavonoides i els àcids fenòlics són els dos grups més significatius en termes d'abundància i impacte en l'alimentació; els estilbens —amb el resveratrol com a màxim exponent—, els lignans i les cumarines són altres classes de compostos fenòlics d'importància més específica

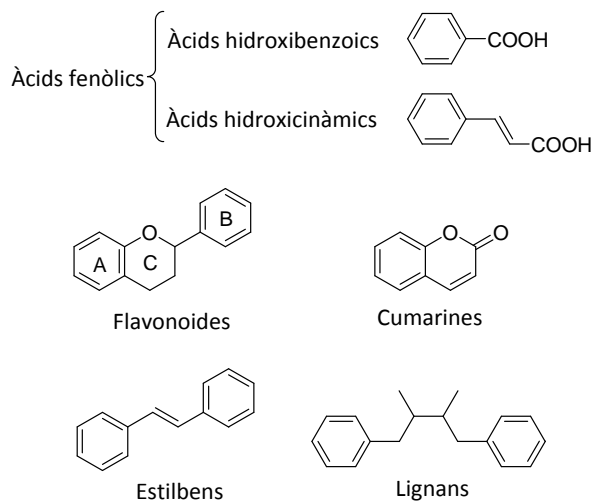


Fig. 1.1 Estructura molecular bàsica de les principals classes de compostos fenòlics.

en certs aliments (Fig. 1.1). A part de la seva diversitat estructural, en la naturalesa els compostos fenòlics solen trobar-se conjugats amb altres compostos fenòlics, àcids orgànics o glúcids, originant així un enorme ventall de compostos diferents.

### Flavonoides

L'estructura molecular bàsica compartida dels flavonoides consisteix en un fenilbenzopirà  $-C_6-C_3-C_6-$  <sup>(4)</sup>. Contenen dos anells, A i B, amb propietats aromàtiques –compleixen la regla de Hückel– que presenten 6 electrons deslocalitzats que confereixen una estabilitat superior a la molècula <sup>(5)</sup>. A i B estan units per un heterocicle, C, de tres àtoms de carboni i un d'oxigen (Fig. 1.2). La majoria de flavonoides presents en la naturalesa presenten l'anell B unit a la posició 2 de l'heterocicle, tot i que aquesta unió també pot situar-se en la posició 3 –isoflavonoides– o 4 –neoflavonoides– <sup>(4)</sup>.

Les diferents classes de flavonoides es distingeixen segons l'estructura de l'heterocicle; els flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, antocianidines i flavan-3-ols es troben entre les classes més comunes presents en els aliments <sup>(6)</sup> (Fig. 1.2).

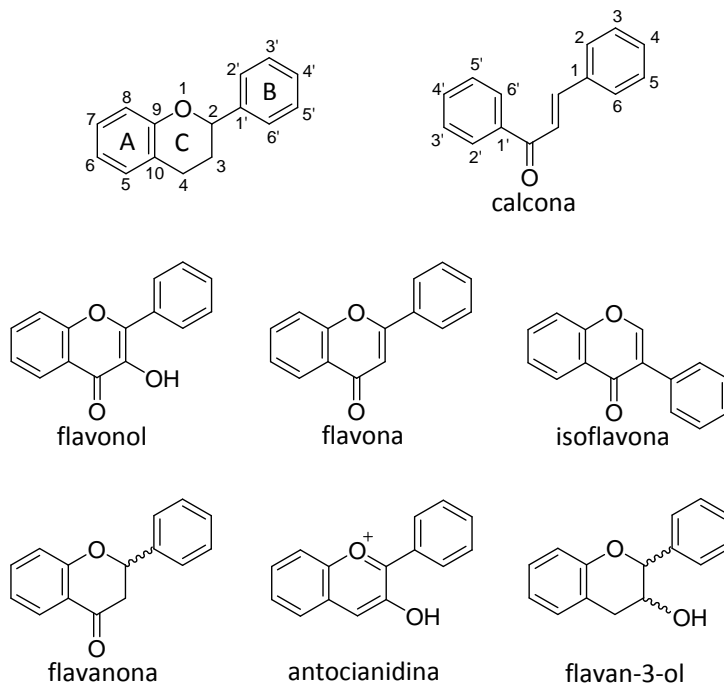


Fig. 1.2 Estructura general dels flavonoides i de les principals classes presents en aliments.

Els flavonoides constitueixen el grup de compostos fenòlics més abundant en els aliments. D'aquests, els **flavonols** en són els més destacats. Els *O*-glicòsids en la posició 3 de l'anell C són els més freqüents, especialment de quercetina, campferol, isoramnetina i miricetina <sup>(6, 7)</sup> (Fig. 1.3). La glicosilació és molt freqüent en els compostos fenòlics; la presència d'un glicòsid incrementa la polaritat i per tant, la seva solubilitat en aigua, necessària per a la seva acumulació en els vacúols cel·lulars <sup>(8)</sup>.

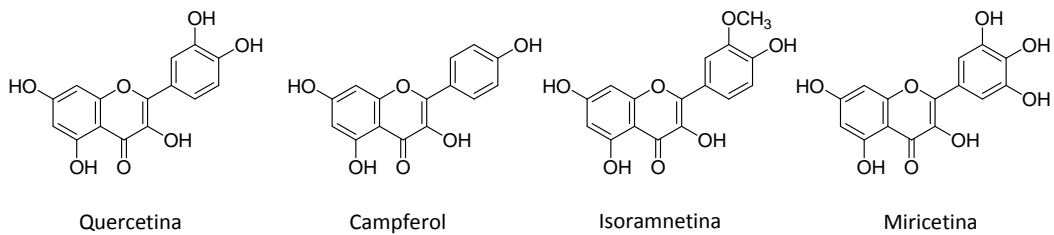


Fig. 1.3 Flavonols més abundants en els aliments.

Els **flavan-3-ols** són el grup més complex des d'un punt de vista estructural. Els carbonis 2 i 3 són centres quirals, originant quatre possibles estereoisòmers per a la mateixa estructura molecular. Catequina (*2,3-trans*) i epicatequina (*2,3-cis*) són els flavan-3-ols monomèrics més abundants en els aliments <sup>(4)</sup>. Menys abundants són els seus derivats amb hidroxilació en la posició 5' (gal·locatequina i epigal·locatequina), els derivats amb àcid gàl·lic esterificat en la posició 3 (catequina gal·lat i epicatequina gal·lat) i els derivats amb hidroxilació a 5' i esterificació amb àcid gàl·lic a 3 –gal·locatequina gal·lat i epigal·locatequina gal·lat–. Segons el pla on es situen els substituents, tots els monòmers flavan-3-ols presenten isomeria +/-, tot i que alguns d'aquests enantiòmers són rars en la naturalesa –és el cas de (-)-catequina i (+)-epicatequina– (Fig. 1.4).

A més a més, les formes bàsiques monomèriques dels flavan-3-ols poden combinar-se per formar oligòmers i polímers –coneguts com a **proantocianidines** o tanins condensats–, els quals es poden trobar en quantitats importants en determinats aliments <sup>(9)</sup>. Les proantocianidines formades per unitats de (+)-catequina i/o (-)-epicatequina s'anomenen **procianidines**, i són les més abundants. Les procianidines tipus B presenten enllaços carboni-carboni 4→6 o 4→8 (Fig. 1.4), i les tipus A presenten simultàniament els enllaços 4→8 i 2→7. Contràriament a altres classes de flavonoides, els flavan-3-ols no es troben conjugats amb sucres.

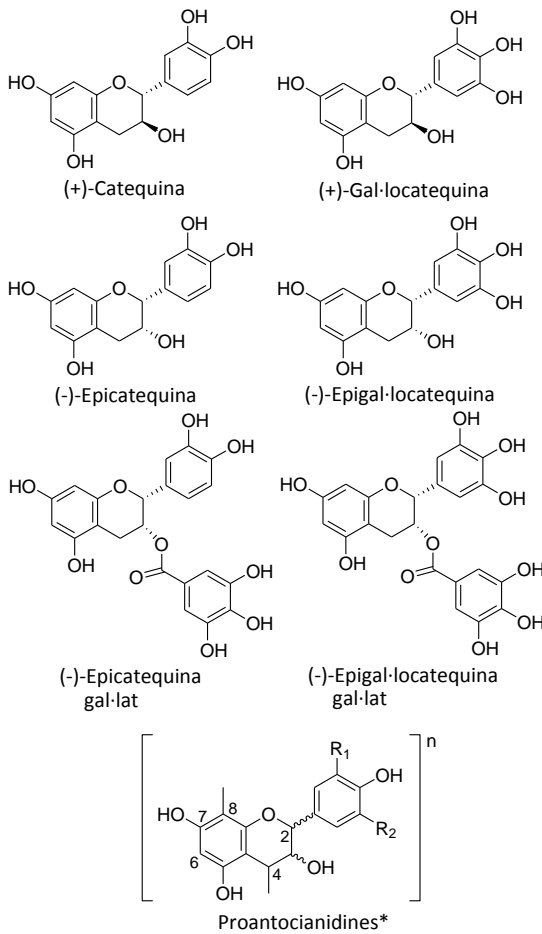


Fig. 1.4 Principals flavan-3-ols i estructura bàsica de les proantocianidines.

\*Propelargonidines,  $R_1$ ,  $R_2=H$ ;  
 procianidines,  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ;  
 prodelfinidines,  $R_1$ ,  $R_2=OH$ .

Les **calcones**, grup precursor de la resta de flavonoides, presenten l'heterocicle obert per la manca de l'àtom d'oxigen. Són molt properes biosintèticament a les flavanones, podent-se convertir en aquestes –i viceversa– per isomerització a determinades condicions de pH <sup>(10)</sup>. Les **flavanones** tenen un centre quiral en la posició 2 –existeixen estereoisòmers *R/S*–, tot i que les formes 2*S* són les més comunes en els vegetals <sup>(10)</sup>. Solen ser glicòsids de rutinosa –6-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucòsids– o neohesperidosa –2-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucòsids–, units a la posició 7 <sup>(10)</sup>.

En teixits vegetals, les **antocianidines** es troben exclusivament glicosilades, anomenant-se antocianines, ja que la forma aglicò és inestable. L'heterocicle C conté dos dobles enllaços, tot i que no presenta aromaticitat. La *O*-glicosilació, principalment en la posició 3, confereix una elevada estabilitat enfront a condicions de llum, pH i oxidació que provocarien la degradació d'altres flavonoides. Algunes formes es troben estabilitzades mitjançant la unió a àcids orgànics –àcid màlic i cítric– i àcids fenòlics <sup>(11)</sup>. Les **flavones**

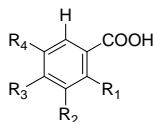
més abundants són 7-*O*-glicòsids, tot i que també es poden trobar hidroxilades, metilades, o presentar grups alquil. Les principals flavones són glicòsids de luteolina i apigenina <sup>(7)</sup>. Les **isoflavones**, d'altra banda, són el grup d'isoflavonoides més important, amb hidroxilació a les posicions 5, 7 i 4' –genisteïna– o 7 i 4' –daidzeïna– <sup>(12)</sup>.

### Àcids fenòlics

Estrictament parlant, els àcids fenòlics comprenen aquelles molècules que contenen un o més fenols amb un grup funcional carboxil. No obstant, quan es parla de metabòlits vegetals, el terme àcid fenòlic sol designar a un grup concret d'àcids orgànics, i especialment als derivats de l'àcid benzoic –àcids hidroxibenzoics– i als de l'àcid cinàmic –àcids hidroxicinàmics– <sup>(13)</sup> (Taula 1.1).

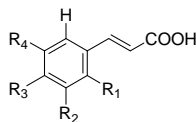
Taula 1.1

#### Estructures dels àcids fenòlics més comuns en els vegetals



Àcids hidroxibenzoics

Nom	Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Àcid benzoic	<i>Benzoic acid</i>	H	H	H	H
Àcid gàl·lic	<i>Gallic acid</i>	H	OH	OH	OH
Àcid gentísic	<i>Gentisic acid</i>	OH	H	H	OH
Àcid <i>p</i> -hidroxibenzoic	<i>p-Hydroxybenzoic acid</i>	H	H	OH	H
Àcid protocatecuic	<i>Protocatechuic acid</i>	H	OH	OH	H
Àcid salicílic	<i>Salicylic acid</i>	OH	H	H	H
Àcid siríngic	<i>Siringic acid</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Àcid vainílic	<i>Vanillic acid</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Àcid veràtric	<i>Veratric acid</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H



Àcids hidroxicinàmics

Àcid cinàmic	<i>Cinnamic acid</i>	H	H	H	H
Àcid cafeic	<i>Caffeic acid</i>	H	OH	OH	H
Àcid <i>p</i> -cumàric	<i>p-coumaric acid</i>	H	H	OH	H
Àcid <i>m</i> -cumàric	<i>m-coumaric acid</i>	H	OH	H	H
Àcid <i>o</i> -cumàric	<i>o-coumaric acid</i>	OH	H	H	H
Àcid ferúl·lic	<i>Ferulic acid</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Àcid sinàpic	<i>Sinapic acid</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Els **àcids hidroxibenzoics** es solen trobar en forma de glucòsids. L'àcid gàl·lic és el més comú, i es troba principalment esterificat formant estructures complexes d'elevat pes molecular, els gal·lotanins. Aquests èsters, comunament coneguts com a tanins hidrolitzables, també poden estar estructurats per dímers d'àcid gàl·lic –àcid el·làgic– formant els el·lagitanins <sup>(9)</sup>.

Els **àcids hidroxicinàmics** solen trobar-se en condicions naturals esterificats amb àcids orgànics, com els àcids quínic i tartàric, i també amb glucosa. El terme “àcids clorogènics” designa als èsters d'àcid cafeic amb àcid quínic, i són compostos fenòlics històricament ja coneguts en certs aliments <sup>(14)</sup>. Àcid clorogènic també s'empra per denominar-ne el més comú, l'àcid 5-cafeoilquínic, emprant la nomenclatura IUPAC <sup>(15)</sup>.

## 1.2 Biologia dels compostos fenòlics en els vegetals

### *Metabolisme secundari*

Els metabòlits secundaris són resultat d'una extensa i complicada xarxa metabòlica, dels quals els compostos fenòlics representen el grup més important en plantes, algues, fongs i bacteris, tot i que no són rellevants en el regne animal. Des del punt de vista metabòlic, els compostos fenòlics són un grup heterogeni ja que són produïts a través de diferents rutes biosintètiques. A través de la via del xiquimat –*shikimate*– es sintetitzen els àcids hidroxibenzoics –àcid gàl·lic i derivats– i l'aminoàcid aromàtic fenilalanina. L'enzim fenilalanina amoni liasa –PAL, EC 4.3.1.5– és clau en la síntesi dels compostos fenòlics, ja que catalitza la conversió de fenilalanina a àcid cinàmic (**Fig. 1.5**), mitjançant una desaminació no oxidativa <sup>(16)</sup>. Aquesta reacció és el primer pas en la biosíntesi d'un gran nombre de productes secundaris, en la denominada ruta del fenilpropanoid, que inclou els àcids hidroxicinàmics i els seus èsters, les cumarines, les lignines, els isoflavonoides i els flavonoides <sup>(3, 17, 18)</sup>.

A partir de la reacció catalitzada per PAL, es coneixen més de setze citocrom P450 monooxigenases que s'embranchen en múltiples rutes de síntesi per donar lloc als diferents compostos fenòlics <sup>(16)</sup>. De totes maneres, lluny de ser una ruta lineal, la biosíntesi dels compostos fenòlics és un bon exemple de xarxa metabòlica on molts dels compostos poden ser formats a partir d'intermediaris diferents, i un mateix intermediari

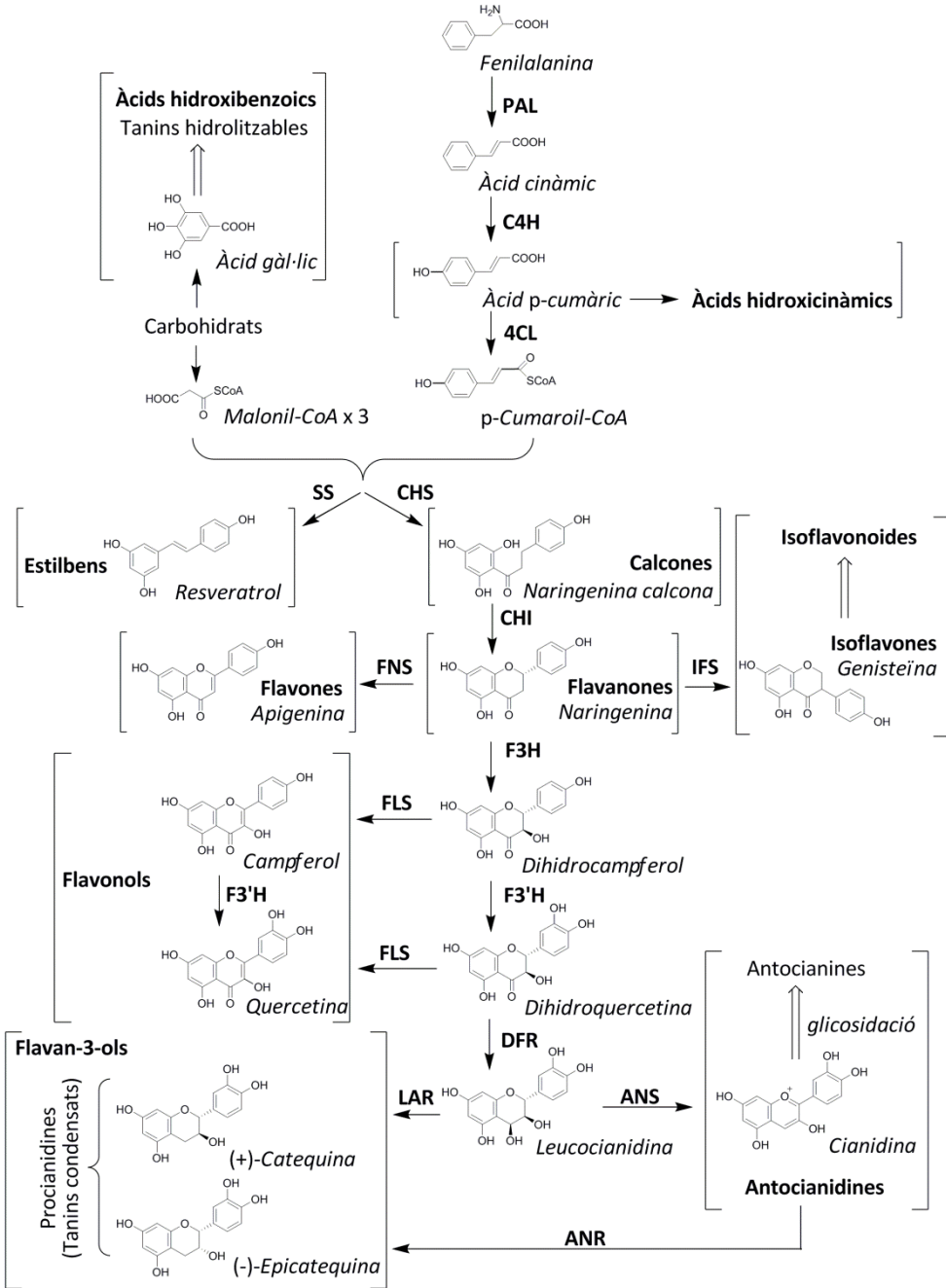


Fig. 1.5 Esquema de la ruta de biosíntesi de les principals classes de compostos fenòlics. Abreviatures dels enzims: **4CL**, *p*-cumarat-CoA lligasa; **ANR**, antocianidina reductasa; **ANS**, antocianidina sintasa; **C4H**, cinamat 4-hidroxilasa; **CHI**, calcona isomerasa; **CHS**, calcona sintasa; **DFR**, dihidroflavonol 4-reductasa; **F3'H**, flavonoid 3'-hidroxilasa; **F3H**, flavanona 3-hidroxilasa; **FLS**, flavonol sintasa; **FNS**, flavona sintasa; **IFS**, isoflavona sintasa; **LAR**, leucoantocianidina 4-reductasa; **PAL**, fenilalanina amoni liasa; **SS**, estilbè sintasa.

pot ser transformat en productes diferents en funció del complex enzimàtic que hi actua (19).

### **Regulació de la biosíntesi**

Un ampli rang de paràmetres relacionats amb l'estrès i les condicions ambientals poden modular les rutes de biosíntesi (20). L'atac de patògens, la presència de ferides, la depredació, les baixes temperatures, l'exposició a la llum UV i el dèficit de ferro, fòsfor i nitrogen són factors que indueixen l'expressió de PAL (20). Es coneix que davant la presència d'estímuls inductors es potencia la transcripció de gens que participen en la síntesi de compostos fenòlics (21). Es creu que els gens que catalitzen les reaccions més importants per a la síntesi de compostos fenòlics es troben agrupats en famílies multigèniques, i que cada un dels gens d'una família pot tenir una resposta individual als estímuls (16). Aquests gens poden transcriure isoenzims amb propietats cinètiques lleugerament diferents en funció dels factors de transcripció presents, la transcripció dels quals també depèn del tipus de teixit. Així doncs, durant el desenvolupament de les plantes existeix una regulació molt fina del metabolisme fenòlic, subjecte a l'edat i a la localització de la planta (16).

El control de l'activitat dels factors de transcripció és la base de la regulació de la biosíntesi de compostos fenòlics, ja que activen –o desactiven– l'expressió dels gens que transcriuen els enzims que hi participen (19). A més a més, la biosíntesi també es regula a través de la inactivació enzimàtica (22). La regulació pot tenir lloc a diversos nivells de la ruta de biosíntesi; el control de la transcripció i de l'activitat de PAL determina en bona mesura la quantitat total de compostos fenòlics sintetitzats, ja que és el pas decisiu per dirigir el flux de carboni cap a la síntesi d'aquests compostos (23). Més enllà de PAL, el control es multiplica en les nombroses ramificacions de les rutes de biosíntesi, on hi intervien les famílies de factors de transcripció R2R3-MYB, bHLH i WDR (19).

### **Transport**

Per evitar l'efecte tòxic d'alguns dels metabòlits intermediaris que són altament reactius, es postula que la biosíntesi té lloc en complexes multienzimàtics situats al citosol i propers al reticle endoplasmàtic; d'aquesta manera s'evitaria el contacte directe entre els metabòlits i els orgànuls de la cèl·lula (24). Els flavonoides s'acumulen en vacúols; en el cas de les antocianines aquestes són acolorides i s'anomenen antocianoplasts –abunden en pètals i altres òrgans pigmentats–. Per a la compartimentació dels compostos fenòlics en vacúols es creu que és necessari augmentar la seva solubilitat mitjançant la



glicosilació. A més, se sap que calen sistemes de transport on hi intervenen proteïnes específiques com les glutatió S-transferasa –GST– i un transportador *en cassette* unit a ATP –anomenat ABC–<sup>(24)</sup>.

### **Activitat biològica en les plantes**

Les primeres plantes terrestres van haver de desenvolupar estructures que les sostinguessin i sistemes de defensa que les protegissin de les noves inclemències a què es van veure sotmeses en el seu camí de colonització dels ambients no aquàtics. La irrupció de PAL va ser clau per a la supervivència i evolució de les primeres plantes terrestres, podent formar estructures aèries sustentades per lignina, un polímer compost per unitats de hidroxicinamoil alcohol. Provablement, mutacions i modificacions de les primeres rutes biosintètiques van anar originant una sèrie de compostos fitoquímics que, tot i no tenir un paper directe en el metabolisme primari de les plantes, van significar un avantatge evolutiu; la presència ubiqua de compostos fenòlics en plantes terrestres així ho sembla indicar<sup>(16)</sup>.

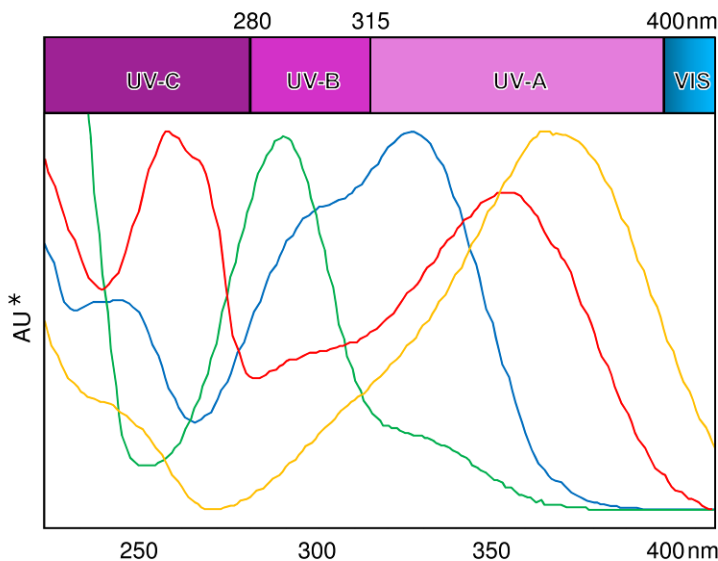
En general, les funcions dels compostos fenòlics a la planta són d'interacció amb el seu entorn ambiental. La seva síntesi pot ser constitutiva –durant el desenvolupament normal de la planta– o induïda –en presència d'un dany, senyal o factor inductor–. L'emplaçament dels compostos fenòlics sintetitzats constitutivament sol ser en compartiments estratègics per a la supervivència de la planta, on hi poden actuar com a agents defensius. En el cas dels compostos induïts –també anomenats *fitoalexines*–, la seva acumulació es dona en els punts on s'ha produït el factor d'inducció<sup>(25)</sup>.

Una de les propietats més reconegudes dels compostos fenòlics és la capacitat d'absorció de la radiació ultraviolada –UV–<sup>(25, 26)</sup>. En funció de la seva classe, posseeixen espectres d'absorció UV-Vis amb màxims variables dins el rang ultraviolat<sup>(27)</sup>, que combinats, poden abastar eficaçment tot l'espectre UV, i en particular el rang UV-B (280-315 nm), que és el més nociu per a la integritat del DNA de les plantes<sup>(28)</sup> (Fig. 1.6). Els compostos fenòlics acumulats en vacúols de cèl·lules epidèrmiques actuen de pantalla protectora i eviten el dany a teixits interns<sup>(23)</sup>. Les plantes responen als nivells de radiació UV rebuts, augmentant la concentració de compostos fenòlics en teixits sensibles com fulles i flors. En aquest sentit, s'ha observat que la llum UV-B estimula la síntesi dels enzims CHS i CHI<sup>(28)</sup>.

La capacitat que tenen algunes plantes de produir compostos químics que dificulten o perjudiquen a competidors o a enemics naturals s'anomena *al·lelopatia*<sup>(29)</sup>. Una de les funcions destacades dels compostos fenòlics és precisament la protecció contra insectes

fitòfags. En determinats casos, poden esdevenir toxines o limitar la digestibilitat de la planta en depredadors <sup>(23)</sup>. L'efecte tòxic podria ser degut a l'activitat prooxidant que es pot donar dins el sistema digestiu dels insectes, produint l'oxidació i peroxidació de proteïnes i lípids <sup>(30)</sup>. Es creu que l'activitat antiinsectívora dels compostos fenòlics és molt específica; aquest fet podria explicar per què les fulles joves de bedoll, les més sensibles a la depredació, acumulen fins a 40 compostos diferents <sup>(30)</sup>. *Cistus ladanifer* produeix un exsudat ric en 3,7-di-*O*-metilcampferol, flavonoide que té la capacitat de dificultar la disponibilitat de  $\text{Ca}^{2+}$  a les cèl·lules musculars esquelètiques i impeding així la relaxació dels músculs que intervenen en la masticació; aquesta activitat li permetria dissuadir a depredadors incloent insectes i conills <sup>(31)</sup>. En alguns casos però, els insectes depredadors han aconseguit utilitzar els flavonoides de les plantes que consumeixen per al seu propi benefici; és el cas d'algunes espècies de lepidòpters que acumulen flavonoides per evitar la depredació i també per atracció sexual <sup>(30)</sup>.

Algunes plantes tenen la capacitat de formar comunitats fitosociològiques pobres en altres espècies vegetals, emprant substàncies al·lopàtiques que dificulten el naixement o la supervivència de les espècies competidores. Per exemple, l'exsudat ric en compostos fenòlics de *Cistus ladanifer* inhibeix la germinació de les llavors d'almenys vint espècies diferents <sup>(29)</sup>.



**Fig. 1.6** Perfils d'absorció UV solapats dels principals compostos fenòlics del tomàquet, corresponents a quatre classes diferents.

**Blau:** àcid 5-cafeoilquínic (àcid hidroxicinàmic).

**Vermell:** quercetina-3-*O*-rutinòsid (flavonol);

**Verd:** naringenina (flavona);

**Taronja:** naringenina calcona (calcona).

Els espectres han estat obtinguts amb patrons purs dissolts en aigua-metanol (70:30 v/v) injectats en un sistema HPLC-DAD utilitzant gradient d'aigua-metanol (33,5 – 57,25% MeOH) com a fase mòbil.

\*Les unitats d'absorbància –AU– depenen del factor de resposta del compost i de la seva concentració a la mostra

Alguns compostos fenòlics també actuen com a transmissors de senyals <sup>(32)</sup>. Quan es produeix una agressió en un teixit de la planta, se sintetitzen compostos a la zona danyada que posteriorment són transportats per via floemàtica a altres zones de la planta, on hi indueixen la síntesi de compostos de defensa. Un dels transmissors més coneguts és l'àcid salicílic, però també s'ha descrit la participació d'altres compostos fenòlics en la transmissió de senyals, com per exemple alguns derivats dels àcids gàl·lic i cumàric, implicats en el moviment de les fulles <sup>(23)</sup>. L'activitat dels compostos de senyalització també pot ser externa, com és el cas de les plantes que estan en simbiosi amb microorganismes del sòl. Certs bacteris fixadors de nitrogen poden fixar-se a les arrels de les lleguminoses, en un tipus d'*infecció* beneficiosa per a la planta, ja que les hi permet absorbir nitrogen procedent de l'atmosfera en sòls pobres en aquest mineral. Les arrels de les plantes que estableixen aquesta simbiosi produeixen exsudats de flavonoides que provoquen que els bacteris implicats produeixin les proteïnes que són necessàries per a la colonització de les arrels <sup>(25)</sup>. També s'ha descrit la intervenció de compostos fenòlics en la senyalització d'altres processos fisiològics, com en la germinació del pol·len o en la comunicació entre plantes mitjançant èsters volàtils <sup>(23)</sup>.

### ***Influència de les pràctiques agronòmiques***

La síntesi de compostos fenòlics i altres fitoquímics respon a un complex entramat d'estímuls i variables mediambientals, genètiques i fisiològiques <sup>(33)</sup>. No obstant això, el coneixement dels mecanismes que influeixen a la síntesi de compostos fenòlics va en augment, i permet intervenir deliberadament per mirar d'obtenir cultius amb nivells més alts d'aquests compostos. L'obtenció de plantes i productes vegetals amb continguts elevats de compostos fenòlics interessa des del punt de vista de la qualitat alimentària, aspecte i efectes sobre la salut humana, però també per a la resistència de les plantes a factors d'estrès biòtic i abiòtic <sup>(34, 35)</sup>.

Probablement, la via més directa d'obtenir vegetals amb nivells elevats de compostos fenòlics és mitjançant l'enginyeria genètica i la creació d'organismes modificats genèticament. S'han realitzat nombrosos treballs en aquest sentit, ja sigui silenciant gens per potenciar vies metabòliques que desemboquen en el metabolisme secundari o bé mitjançant la clonació de gens heteròlegs que intervenen en la síntesi de metabòlits secundaris <sup>(16, 36-38)</sup>. De totes maneres, l'ús d'organismes modificats genèticament és controvertit <sup>(39)</sup> i a la Unió Europea no s'accepta en la gran majoria de casos <sup>(40, 41)</sup>. Això fa que el control del contingut en compostos fenòlics mitjançant les tècniques de cultiu i el maneig de l'entorn adquireixi especial rellevància <sup>(35)</sup>.

Alguns estudis han pogut relacionar positivament determinades tècniques de cultiu amb nivells més alts de compostos fenòlics <sup>(34)</sup>. En general, els factors agronòmics que provoquen una tendència a l'acumulació de compostos fenòlics són aquelles pràctiques que suposen un estrès biòtic o abiòtic suplementari per a la planta; alguns d'aquests factors es poden deduir de l'activitat protectora que exerceixen els compostos fenòlics per a la planta.

Alguns estudis han relacionat una major exposició a la llum solar amb un increment de la concentració de compostos fenòlics <sup>(35)</sup>. Un exemple clar el trobem en les varietats de poma vermella; l'exposició solar estimula la biosíntesi d'antocianines que confereixen el color vermell a la pell de les pomes <sup>(35)</sup>. Molt probablement, la llum UV té un paper important en l'estimulació de la síntesi de compostos fenòlics <sup>(42)</sup>. Per exemple, en un estudi fet en enciam de fulla vermella, es va observar un increment en l'acumulació dels flavonoides principals i de polifenols totals en augmentar la radiació UV incident <sup>(43)</sup>. No obstant, la relació entre la radiació UV-B incident i l'acumulació de compostos fenòlics a les plantes pot ser no lineal, tal i com fou observat en fulles de raigràs perenne (*Lolium perenne*), on la síntesi de compostos que absorbeixen llum UV-B seguí una tendència positiva amb la radiació incident, excepte a dosis altes, on possiblement es superà un llindar màxim per a la producció d'aquests compostos <sup>(44)</sup>.

En alguns casos també s'ha observat una relació amb la temperatura ambiental. La síntesi d'antocianines en algunes varietats de poma i raïm es veu estimulada a temperatures nocturnes baixes <sup>(45, 46)</sup>, mentre que en maduixa la síntesi d'antocianines s'incrementa a temperatures més elevades <sup>(47)</sup>. Donat que les antocianines són sintetitzades majoritàriament en fruits madurs, un llindar específic de temperatura podria exercir com a senyal indicador de que la climatologia adequada per a la maduració s'acosta: la primavera –temperatura alta– en el cas de les maduixes o finals d'estiu/tardor –temperatura baixa–, en el cas de les pomes i el raïm <sup>(35)</sup>.

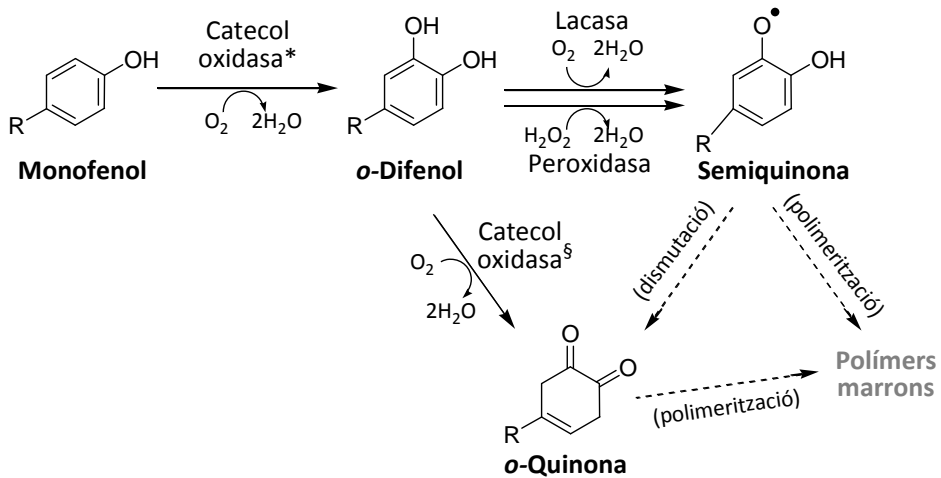
Mitjançant la tècnica de fertilització també és possible potenciar els compostos fenòlics del cultiu. En alguns casos s'ha observat que aportacions elevades de nitrogen comporten un detriment en el contingut de compostos fenòlics, degut a que el metabolisme es canalitza cap a la síntesi de compostos estructurals –augment de la biomassa–, en detriment del metabòlits secundaris no nitrogenats <sup>(35)</sup>. En un estudi realitzat per Mitchell i col·laboradors <sup>(48)</sup> en cultiu de tomàquet, la utilització de pràctiques ecològiques –incloent-hi la fertilització i el tractament de plagues– va significar un increment del contingut de compostos fenòlics respecte a cultius convencionals. En aquest mateix estudi, es postula que la menor aportació de nitrogen al sòl explicaria l'augment de compostos fenòlics en els tomàquets de cultiu ecològic.

Els mecanismes naturals de defensa de què disposen les plantes poden ser induïts sense necessitat de cap patologia. S'ha observat que, en contacte amb certs productes d'origen natural, algunes plantes intensifiquen la biosíntesi de compostos fenòlics o desenvolupen estructures que les fa més resistents a l'atac de patògens i plagues<sup>(49)</sup>. Els productes que tenen aquesta capacitat s'anomenen elícitors, i tenen cada cop més acceptació per part dels agricultors degut a la seva eficàcia contra les plagues i que en general tenen un impacte menys negatiu per al medi ambient o per a la salut humana que els pesticides químics convencionals<sup>(50)</sup>. Les causes de la inducció de la resistència natural són incertes i poden ser diverses; en molts casos els elícitors indiquen o simulen la presència d'un organisme paràsit i produeixen l'activació del metabolisme secundari i la síntesi d'estructures de defensa<sup>(49)</sup>. S'ha comprovat que els àcids araquidònic, jasmònic i salicílic, així com diversos polisacàrids, glicoproteïnes, pèptids i fosfolípids posseeixen activitat elícitor<sup>(49)</sup>. No obstant, davant la dificultat d'identificar i aïllar els compostos actius, és habitual utilitzar extractes naturals d'orígens molt diversos que contenen compostos amb activitat elícitor. L'eficàcia per evitar la proliferació de fongs i estimular la síntesi de compostos fenòlics en plantes de cultiu ha estat comprovada en l'aplicació d'extractes d'algues marines<sup>(51, 52)</sup>, de la planta asiàtica *Fallopia sachalinensis* F.Schmidt –amb el nom comercial Milsana®–<sup>(53-55)</sup> i de chitosan, una mescla de polisacàrids catiònics d'elevat pes molecular obtinguts normalment de l'exosquelet de crustacis<sup>(56-58)</sup>.

La selecció de varietats naturalment riques en compostos fenòlics, la gestió del dèficit hídric, l'empelta i la regulació del CO<sub>2</sub> ambiental són d'altres pràctiques agronòmiques que s'han mostrat útils en alguns casos per a incrementar el contingut de compostos fenòlics<sup>(34, 35)</sup>. Certes pràctiques de l'agricultura ecològica afecten a la selecció d'espècies, varietats i adobs, paràmetres que alguns estudis han determinat que tenen un efecte positiu sobre el contingut de compostos fenòlics<sup>(59, 60)</sup>. Cal destacar les pràctiques que permeten limitar o evitar l'ús de fertilitzants i productes fitosanitaris químics que poden ser nocius pels que els manipulen i també pel medi ambient. No obstant, les evidències científiques per concloure que els productes ecològics són més saludables que els convencionals són sovint contradictòries, i és subjecte de controvèrsia<sup>(61, 62)</sup>.

### **Estabilitat**

S'ha observat que en alguns fruits hi ha canvis ràpids i importants del perfil de compostos fenòlics a mesura que van madurant. Això implica probablement que els compostos preexistents es reciclen per crear nous conjugats, però també es creu que en altres casos hi ha una degradació completa dels compostos fenòlics presents al mateix temps que es sintetitzen nous compostos que els reemplaçaran<sup>(23)</sup>.



**Fig. 1.7** Reaccions d'oxidació de compostos fenòlics catalitzades per polifenol oxidases –catecol oxidasa, lacasa– i peroxidases –adaptat de Pourcel i col·laboradors<sup>(63)</sup>–. \*Activitat monofenolasa; §activitat difenolasa.

D'altra banda, es coneixen diversos enzims que en condicions naturals oxiden els compostos fenòlics, els més importants dels quals són la lacasa –EC 1.10.2.2–, la catecol oxidasa –EC 1.10.3.1– i la peroxidasa –EC 1.11.1.7–. Les dues primeres són conegudes com a polifenol oxidases –PPO–<sup>(63)</sup>. Aquests enzims tenen un important efecte econòmic en la indústria alimentària, ja que són els principals responsables de l'*enfosquiment enzimàtic*. Aquest procés suposa un detriment de la qualitat visual, gustativa i nutricional dels aliments vegetals frescos<sup>(22)</sup>. Les PPO, en presència d'oxigen, catalitzen la hidroxilació de monofenols a o-difenols, i posteriorment l'oxidació dels o-difenols a o-quinones (Fig. 1.7). Les o-quinones, per la seva banda, polimeritzen i formen una mescla complexa de pigments foscos marrons en una reacció sense intervenció enzimàtica. En teixits intactes, PPO i compostos fenòlics es troben compartimentats en espais diferents: la PPO dins de cloroplasts, mitocondris, microsomes, peroxisomes i també al citoplasma, mentre que els compostos fenòlics dins de vacúols. Així doncs, talls o ruptures del teixit vegetal permeten el contacte entre enzims i substrats, iniciant així la cadena de reaccions que desembocarà en la formació de polímers marrons<sup>(63)</sup>. Les PPO, com la majoria d'enzims, són termolàbils, per tant, l'escaldat pot ser una estratègia per mantenir els nivells de compostos fenòlics alts en certs aliments vegetals<sup>(64)</sup>.

## 1.3 Presència en els aliments

### *Àcids fenòlics a la dieta*

Els gal·lotanins, tot i ser la forma més abundant d'àcid gàl·lic en la naturalesa, són poc presents en aliments. En canvi, alguns aliments són particularment rics en èsters no glucídics d'àcid gàl·lic, com el te, el raïm i derivats. També es troben el·lagitanins en la móra, la maduixa, la magrana i en alguns fruits secs <sup>(3)</sup>.

Els àcids hidroxicinàmics es troben àmpliament representats en aliments d'origen vegetal, principalment els èsters. El més important és l'àcid 5-cafeoilquínic –àcid clorogènic– <sup>(6)</sup>, però també abunden altres derivats amb una o més unitats d'àcid cafeic conjugats amb àcid quínic, àcid tartàric o àcid màlic. El cafè, el nabiu, la poma i la cidra són fonts significatives d'èsters d'àcid cafeic i àcid quínic; l'espinaç, l'enciam, el raïm i el vi són fonts importants d'àcid cafeic esterificat amb àcid tartàric; i l'enciam i els espinaços contenen èsters d'àcid cafeic amb àcid màlic. El cafè també conté èsters d'àcid ferúlic amb àcid quínic, mentre que les cireres contenen èsters d'àcid *p*-cumàric amb àcid quínic <sup>(14)</sup>.

### *Flavonoides a la dieta*

Els flavonols es troben presents a gairebé tot el regne vegetal, exceptuant les algues i els fongs <sup>(3)</sup>. Els principals flavonols ingerits en la dieta són els *O*-glicòsids de quercetina, campferol, isoramnetina i miricetina, i se'n poden trobar quantitats significatives a la ceba, la col, el bròquil, la mongeta, la poma, la grosella i el te <sup>(7)</sup>.

Els flavan-3-ols (+)-catequina, (-)-epicatequina i els seus oligòmers –procianidines– constitueixen un dels grups de compostos fenòlics més abundant en els aliments, particularment en el te, el cacau, el raïm i els seus derivats <sup>(9)</sup>. L'afinitat que tenen les procianidines per unir-se a proteïnes salivals provoca l'astringència característica dels aliments rics en aquests compostos <sup>(23)</sup>. Els flavan-3-ols del raïm s'acumulen especialment a les llavors i a la pell. El vi negre, el most del qual es manté en contacte amb les pells i les llavors durant el procés de fermentació, és altament ric en procianidines <sup>(65)</sup>. Els processos de secat, fermentació i torrefacció ocorreguts en el te i la xocolata indueixen canvis importants en el contingut i perfil de compostos fenòlics respecte a les seves matèries primeres <sup>(65)</sup>.

Les flavanones són característiques dels cítrics, però també es poden trobar en petites quantitats en tomàquet i menta. El gust amarg dels cítrics es deu a les flavanones glicosilades en posició 7 amb un disacàrid o un neohesperidòsid. Curiosament, les flavanones glicosilades amb un rutinòsid no tenen gust. Es concentren especialment en el teixit blanc i esponjós anomenat *albedo*; una taronja sencera pot contenir fins a cinc vegades més flavanones que un suc de taronja a qui s'ha extret l'albedo <sup>(6, 10)</sup>. Les calcones, per la seva banda, tenen una distribució limitada en els aliments, i la naringenina calcona del tomàquet és un dels pocs exemples significatius <sup>(10)</sup>. El llúpol conté derivats prenilats de flavanones i calcones –éssent prenil-naringenina i xantumol les majoritàries–, que són transferits a la cervesa i li confereixen el gust amarg característic <sup>(10)</sup>.

Les formes estables de les antocianidines, les antocianines, es troben en els vacúols dels teixits epidèrmics de flors i fruits, a qui aporten els colors vermells, blaus, rosats i morats <sup>(66)</sup>. Les fruites vermelles són les principals fonts d'antocianines; la quantitat present en un fruit està normalment correlacionada amb la intensitat del color d'aquest. Altres fonts importants d'antocianines són algunes hortalisses, com l'albergínia, el rave i les varietats de ceba vermella, així com el vi negre <sup>(6, 67)</sup>. Les antocianines presents al vi, a qui li donen color, poden esdevenir altament estables mitjançant fenòmens de copigmentació. La copigmentació és la formació d'un complex estable entre una antocianina i un altre compost fenòlic –copigmentació intermolecular– o bé un residu acil de la mateixa molècula –copigmentació intramolecular. Aquesta darrera, només possible en antocianines acilades, és la més estable gràcies a les interaccions covalents que s'hi donen lloc <sup>(68, 69)</sup>.

Les flavones són poc importants en la dieta, tot i que en el julivert, l'api, en plantes aromàtiques i en cereals poden ser relativament importants. Les més comunes són l'apigenina i la luteolina <sup>(7)</sup>. Les isoflavones són l'únic grup d'isoflavonoides amb certa importància en els aliments. Es troben de forma exclusiva en plantes lleguminoses com la soja <sup>(3, 70)</sup>.

### ***Rellevància dels compostos fenòlics en aliments vegetals***

Els compostos fenòlics són omnipresents en el regne vegetal. Cada taxó vegetal té el seu propi perfil fenòlic, que sovint és distintiu de l'espècie, subespècie o cultivar. Alguns compostos fenòlics es troben restringits en determinades espècies o grups vegetals, i la seva presència pot ser indicadora de l'origen d'un aliment en particular <sup>(71)</sup>. Tot i així, els nivells de compostos fenòlics en aliments documentats en la bibliografia poden variar de



forma important, degut principalment a variacions genètiques, estacionals, de processat, etc., però també degut a la tècnica d'anàlisi <sup>(3)</sup>. La **Taula 1.2** mostra a tall d'exemple el contingut de compostos fenòlics en enciam, tomàquet, raïm i cacau.

Els indicis que es tenen avui dia sobre els efectes positius derivats de l'aportació de compostos fenòlics en la dieta són notables (vegeu secció 1.4). Un exemple d'això és l'anomenada *paradoxa francesa*, referint-se al baix índex de mortalitat per malalties cardiovasculars registrat a França malgrat el consum elevat de greix saturat –p.ex. formatge–, que es relaciona amb el consum moderat de vi <sup>(72)</sup>. Tot i així, es considera que el consum d'aliments amb compostos fenòlics en els països industrialitzats és insuficient <sup>(73)</sup>. Organismes oficials i també no governamentals han establert diverses iniciatives per mirar de corregir aquesta tendència, començant per millorar els hàbits alimentaris –p.ex. Fundació Alcía <sup>(74)</sup>–. A banda de mantenir una dieta rica en aliments vegetals, també és important disposar de vegetals amb bona qualitat nutricional, potenciant aquelles varietats naturalment riques en compostos fenòlics i també aquelles pràctiques agronòmiques i de postcollita que en preserven el seu contingut.

En general, el consum estimat de compostos fenòlics varia entre 20 i 1000 mg al dia, depenent de la metodologia emprada per a la seva determinació <sup>(75-78)</sup>. En individus consumidors habituals de vi, cafè i te, s'estima que aquestes begudes són la seva principal font de compostos fenòlics. L'impacte d'aquests compostos sobre el metabolisme de qui els pren està fortament lligat a la seva absorció i biodisponibilitat a l'organisme.

**Taula 1.2**

**Contingut en compostos fenòlics en productes escollits, segons bases de dades**

Base de dades	Compostos	mg/kg PF
<b>Enciam cru –<i>Lactuca sativa</i> L.–</b>		
USDA flavonoid <sup>(79)*</sup>	Quercetina	30,6 ± 4,3
	Luteolina	6,5 ± 1,3
	Campferol	3,1 ± 0,8
	Apigenina	0,1 ± 0,0
Phenol-Explorer <sup>(80)§</sup>	Àcid 5-cafeoilquínic	37,8 ± 0,0
	Quercetina-3-O-(6''-malonil-glucòsid)	18,5 ± 27,9
	Quercetina-3-O-glucurònid	13,4 ± 14,4
	Luteolina-7-O-glucurònid	4,0 ± 5,7
	Quercetina-3-O-glucòsid	3,7 ± 6,0
	Quercetina-3-O-ramnòsid	1,3 ± 2,2
	Quercetina-3-O-galactòsid	1,0 ± 1,1
Quercetina-3-O-(6''-malonil-glucòsid)-7-O-glucòsid	0,6 ± 1,3	
Quercetina-3-O-rutinòsid	0,4 ± 0,1	

Taula 1.2

–continuació–

**Tomàquet cru –*Solanum lycopersicum* L.–**

USDA flavonoid <sup>(79)*</sup>	Naringenina	6,8 ± 1,6
	Quercetina	5,8 ± 0,1
Phenol-Explorer <sup>(80)§</sup>	Miricetina	1,3 ± 0,3
	Campferol	0,9 ± 0,2
	Àcid 5-cafeoilquínic	18,4 ± 10,9
	Àcid 4-cafeoilquínic	11,7 ± 0,0
	Àcid cafeic	4,5 ± 5,1
	Àcid ferúlic	2,7 ± 1,2
	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinòsid	1,4 ± 0,6
	Naringenina-7- <i>O</i> -glucòsid	1,4 ± 0,1
	Àcid cumàric	1,3 ± 2,0
	Campferol	0,1 ± 0,1
Quercetina	0,04 ± 0,07	

**Llavor de raïm –*Vitis vinifera* L.–**

USDA flavonoid <sup>(79)*</sup>	(-)-Epicatequina	933,1 ± 84,2
	(+)-Catequina	746,3 ± 57,8
USDA proanthocyanidin <sup>(81)†</sup>	Monòmers	1712,9 ± 805,6
	Dímers	1698,9 ± 1105,1
	Trímers	322,2 ± 306,3

**Cacau en pols –*Theobroma cacao* L.–**

USDA flavonoid <sup>(79)*</sup>	(-)-Epicatequina	1964,3 ± 453,8
	(+)-Catequina	648,2 ± 145,3
	Quercetina	100,0 ± 23,6
USDA proanthocyanidin <sup>(81)†</sup>	Monòmers	3168,3 ± 4669,8
	Dímers	1834,9 ± 3471,2
	Trímers	1595,4 ± 2564,6
	Tetràmers a hexàmers	5245,3 ± 7279,8
	Heptàmers a decàmers	1889,3 ± 2850,2
Phenol-Explorer <sup>(80)§</sup>	(-)-Epicatequina	1583,30 ± 863,4
	Procianidina B1	1120,0 ± 0,0
	(+)-Catequina	1077,5 ± 639,5
	Procianidina B2	715,7 ± 851,4
	Tetràmer cinamtaní A2	331,7 ± 185,1
	Procianidina C1	238,3 ± 105,7
	Galactòsid de dímer d'epicatequina	50,0 ± 16,7

\*Contingut en aglicons.

§ Contingut en compostos intactes.

† Contingut en proantocianidines segons el grau de polimerització.

## 1.4 Biodisponibilitat i activitat biològica en humans

### *Biodisponibilitat*

El percentatge de compostos fenòlics que un cop ingerits en la dieta són incorporats al sistema circulatori, és a dir, la seva biodisponibilitat, és un factor clau en l'eficàcia biològica dels compostos fenòlics. En el transcurs de la digestió dels compostos fenòlics es poden produir diversos escenaris: *i)* absorció directa a l'intestí prim; *ii)* degradació per enzims endògens i absorció a l'intestí prim; *iii)* degradació per enzims de la microbiota intestinal i absorció al còlon; *iv)* no absorció i eliminació amb la femta. L'estructura química dels compostos fenòlics és decisiva en aquests escenaris, afectant així al seu metabolisme i absorció <sup>(77)</sup>.

La majoria de flavonoides ingerits en la dieta, excepte els flavan-3-ols, es troben glicosilats. La presència d'un sucre a la molècula li confereix polaritat i en dificulta la difusió passiva a través de les cèl·lules en raspall de l'intestí prim. Alguns teixits vegetals poden contenir  $\beta$ -glucosidases, iniciant-se així la degradació dels compostos glicosilats durant la masticació <sup>(82)</sup>. Les condicions àcides de l'estómac en humans no són suficients per a la desglicosilació, així doncs, en molts casos és necessària la hidròlisi del glicòsid mitjançant glicosidases de la mucosa intestinal o de la microbiota del còlon <sup>(3, 77)</sup>. Les  $\beta$ -glucosidases endògenes humanes, com la lactasa floridzin hidrolasa –LPH–, permeten la hidròlisi extracel·lular de la glucosa i probablement d'arabinosa i xilosa; en canvi, els glicòsids de ramnosa només poden ser hidrolitzats per ramnosidases de la microbiota del còlon <sup>(77)</sup>. També es té coneixement d'altres sistemes de transport actiu en mamífers que permeten absorbir directament els compostos glicosilats. S'han trobat sistemes de transport de cinamat i glicòsids de flavonol <sup>(23)</sup> i s'ha detectat quercetina-3-*O*-rutinòsid en sang en humans després del consum de tomàquet <sup>(83)</sup>. També es coneix la presència d'una  $\beta$ -glucosidasa citosòlica –CBG– <sup>(3)</sup>. S'ha observat que la presència de glucosa en l'estructura augmenta significativament la biodisponibilitat dels flavonoides <sup>(7)</sup>. Per exemple, en un estudi de Rüfer i col·laboradors <sup>(84)</sup>, la isoflavona daidzeïna-7-*O*-glucòsid va ser absorbida de tres a sis vegades més que el seu aglicó daidzeïna.

Es coneixen pocs detalls sobre l'absorció dels àcids hidroxicinàmics; sembla que hi podria intervenir un cotransportador sodi-dicarboxilat –SDCT1– situat a l'epiteli en raspall de l'intestí prim. Aquest cotransportador és capaç d'incorporar molècules amb almenys dos

grups carboxil, com és el cas dels èsters d'àcid hidroxicinàmic <sup>(85)</sup>. La majoria d'àcids hidroxicinàmics es troben esterificats amb àcids orgànics o sucres. Aquests només poden ser absorbits després de l'activitat de les esterases de la microbiota del còlon <sup>(77)</sup>. El 8 % dels derivats d'àcid cafeoilquínic ingerits en la dieta són absorbits a través de l'intestí prim, mentre que el 21 % ho fa a través de l'intestí gruixut <sup>(86)</sup>.

L'absorció de glicòsids de quercetina varia en humans entre un 20 i un 50 % <sup>(7)</sup> i es dona principalment a la part proximal de l'intestí prim, tot i que en el cas de quercetina-3-O-rutinòsid de tomàquet, s'ha observat que es dona al còlon, probablement per la presència de ramnosa en la seva estructura <sup>(86)</sup>. La biodisponibilitat dels glicòsids de quercetina presents a la ceba, principalment  $\beta$ -glucòsids, va resultar ser superior a la dels glicòsids de quercetina de poma, que conté majoritàriament  $\beta$ -xilòsids <sup>(7)</sup>. Aquestes dades suggereixen que el tipus de sucre contingut en l'estructura dels flavonols també influeix a la seva biodisponibilitat, malgrat que no es pot descartar l'efecte de la matriu <sup>(7)</sup>.

La biodisponibilitat dels flavan-3-ols depèn del grau de polimerització <sup>(87)</sup> però no del de gal·loització <sup>(77)</sup>. Crozier i col·laboradors <sup>(86)</sup> han estimat recentment que l'absorció de flavan-3-ols representa aproximadament el 83 % de la quantitat ingerida. Aquest valor correspon a la suma dels metabòlits en sang originats a partir del metabolisme dels flavan-3-ols, i és significativament superior als valors estimats en estudis anteriors <sup>(6)</sup>, on s'indicava que l'absorció dels flavan-3-ols era molt baixa o nul·la perquè només es consideraven els compostos intactes. La majoria de procianidines són degradades a monòmers o dímers abans de la seva absorció <sup>(65)</sup>. Així doncs, els flavan-3-ols pateixen transformacions profundes al llarg del procés de digestió i els seus efectes biològics es deuen principalment als metabòlits formats i absorbits en el còlon <sup>(86, 87)</sup>.

Estudis recents han posat de relleu la importància del metabolisme dels compostos fenòlics a l'intestí gruixut, on hi intervé la microbiota intestinal. Els compostos fenòlics i els seus metabòlits afecten l'estat de la flora intestinal i també del mateix còlon. Molts dels catabòlits formats en el còlon són absorbits i transportats a través de la vena porta al fetge, on són metabolitzats i posteriorment incorporats al sistema circulatori, on hi mantenen una activitat antiinflamatòria important fins a la seva excreció <sup>(86, 88)</sup>. La presència de compostos fenòlics en el fetge estimula la secreció d'enzims de la fase II, que s'encarreguen d'eliminar potencials carcinògens. Justament, l'activació d'aquests enzims de la fase II pot ser una de les causes de l'activitat anticarcinogènica atribuïda a alguns compostos fenòlics <sup>(3)</sup> i a altres fitoquímics <sup>(89, 90)</sup>.

Un cop absorbits, els compostos fenòlics són metabolitzats. Per exemple, els aglicons de flavonol són sulfatats, metilats i/o glucuronidats abans de passar al torrent sanguini. La sulfatació es dona exclusivament en els compostos absorbits a l'intestí prim <sup>(86)</sup>. En un estudi amb humans, després del consum de cacau amb epicatequina com a compost fenòlic majoritari, els metabòlits més abundants detectats en sang foren els isòmers de 4'-*O*-metil-epicatequina-*O*- $\beta$ -D-glucurònid, amb glucuronidació en les posicions 3', 5 i 7 –essent les dues últimes les més comunes– <sup>(91)</sup>.

En un àpat amb aliments que contenen compostos fenòlics, aquests i els seus metabòlits comencen a ser presents a la sang mitja hora després de la seva ingestió, i s'assoleix la concentració màxima entre una i dues hores, segons estudis realitzats en humans <sup>(77, 86)</sup>. Per exemple, en un estudi de Bugianesi i col·laboradors <sup>(92)</sup>, la concentració màxima de naringenina en sang després del consum de tomàquet va ser al cap de dues hores. En un altre estudi, el consum de 250 g d'enciam fresc va comportar un increment significatiu a les 3 hores de la concentració d'àcid cafeic en plasma (63  $\mu\text{g/L}$ ), àcid *p*-cumàric (85  $\mu\text{g/L}$ ) i quercetina (66  $\mu\text{g/L}$ ), mentre que a les 6 hores els nivells tornaven a ser els basals <sup>(93)</sup>. Curiosament, aquest mateix estudi no va trobar increments significatius de cap compost fenòlic després del consum d'enciam conservat a atmosfera modificada. La concentració màxima de flavan-3-ols i els seus metabòlits en plasma després del consum de te verd va ser assolida entre 1,6 i 2,3 hores, i es van deixar de detectar a les 24 hores <sup>(94)</sup>. Després del consum de ceba, la concentració màxima de flavonols i els seus metabòlits va ser entre 0,6 i 2,5 hores després de la ingesta i es va deixar de detectar la seva presència també al cap de 24 hores <sup>(95)</sup>.

La metabolòmica ha posat de relleu la gran diversitat de compostos formats a partir de l'absorció i metabolisme dels compostos fenòlics. Els estudis metabolòmics permeten establir el perfil de metabòlits creat a partir de la ingesta de compostos fenòlics i fer un seguiment en el temps de la seva presència en el torrent circulatori o en orina <sup>(96, 97)</sup>. Alguns estudis metabolòmics han permès conèixer que, en alguns casos, l'evolució dels metabòlits formats coincideix clarament amb l'activació o la potenciació de determinades activitats biològiques, podent relacionar així el consum de compostos fenòlics amb respostes biològiques beneficioses per a la salut <sup>(91, 98)</sup>.

### **Efectes sobre la salut**

Alguns estudis epidemiològics han posat de relleu que les dietes riques en verdures, hortalisses i fruites redueixen el risc de patir determinades malalties, especialment malalties cardiovasculars i càncer <sup>(99-101)</sup>. Vitamines, minerals, fibra, compostos fenòlics i

altres compostos fitoquímics presents en els aliments vegetals han estat assenyalats des de fa temps com a responsables dels efectes beneficiosos per a la salut. Donada la mescla heterogènia de compostos que es troben habitualment en els aliments vegetals, és difícil establir mitjançant estudis epidemiològics quina és la contribució d'un compost o família de compostos a l'activitat biològica mostrada pel consum d'un aliment en concret <sup>(98)</sup>.

Ja a l'any 1936 es va observar que una mescla de dues flavanones disminuïa la fragilitat i la permeabilitat dels capil·lars sanguinis en humans, i se li va proposar el nom de *vitamina P* <sup>(102)</sup>. Més endavant, els flavonoides van deixar de ser considerats vitamines pel fet que no es cenyien a la seva definició. Però no es fins als anys noranta del segle passat que l'interès de la comunitat científica pels compostos fenòlics va començar a créixer exponencialment, a mesura que s'anaven publicant estudis sobre les nombroses activitats biològiques exhibides pels compostos fenòlics.

Nombrosos estudis realitzats *in vitro*, *ex vivo*, en humans i en animals han mostrat que els compostos fenòlics presenten activitat que els relaciona directament amb els beneficis observats pel consum d'aliments vegetals <sup>(3, 91, 103-105)</sup>. Els compostos fenòlics són **antioxidants**, donadors d'hidrogen, segrestadors de radicals lliures i inhibidors de la generació d'aquests; tenen **activitat anticarcinogènica**, actuant com a agents bloquejadors de la proliferació i d'agents supressors de tumors; són **inhibidors enzimàtics** i tenen capacitat per **unir-se específicament** amb receptors cel·lulars <sup>(23, 106)</sup>.

Les propietats redox dels compostos fenòlics els permet actuar com a donadors d'hidrogen, agents reductors i segrestadors de radicals lliures <sup>(107)</sup>. Els radicals lliures, i especialment les espècies d'oxigen reactiu –ROS–, provoquen estrès oxidatiu que pot desembocar en danys a les membranes cel·lulars, als teixits i al DNA. Aquests danys fisiològics promouen processos patològics relacionats amb l'edat i amb determinades malalties degeneratives, com són les malalties cardiovasculars, neurodegeneratives i diferents tipus de càncer. L'organisme humà disposa de mecanismes endògens de defensa per anul·lar l'activitat de les ROS, tot i que en molts casos hi intervenen factors externs que contribueixen a aportar i generar ROS en excés –tabaquisme, dieta rica en greixos poliinsaturats, pol·lució, radiació UV, processos inflamatoris, etc.–. Per aquest motiu, pot ser necessària l'aportació d'antioxidants de la dieta per complementar els mecanismes endògens de defensa enfront als radicals lliures. Les vitamines A, C, i E i els carotenoides són components procedents de la dieta amb activitat antioxidant contrastada en nombrosos estudis, que es suma a la dels compostos fenòlics.

Els flavonoides són compostos antioxidants reconeguts. La seva activitat antioxidant es deu a la seva estructura i es veu especialment potenciada per la presència d'un doble enllaç entre els carbonis 2 i 3 –flavonols i flavones–, per la presència de dos grups hidroxil a l'anell B –és a dir, un grup catecol– i per la presència d'un grup hidroxil en la posició 3 <sup>(107)</sup>. Seyoum i col·laboradors <sup>(108)</sup> van determinar que el primer electró en ser perdut per la morina –flavonol amb grups hidroxils en les posicions 2' i 4'– en ser oxidada provenia del grup hidroxil en posició 3. La presència de grups hidroxil en altres posicions també potencia, en menor mesura, la capacitat antioxidant dels flavonoides <sup>(107)</sup>. L'activitat antioxidant dels àcids fenòlics també ve determinada pel nombre de grups hidroxil presents en l'estructura; els que en presenten dos o més són els antioxidants més potents. Per exemple, un flavonoide amb dos grups hidroxil en el seu anell B pot suprimir almenys dos radicals lliures, amb un primer pas d'oxidació a radical aroxil –*aroxyl*– i un segon d'oxidació a quinona, una estructura estable <sup>(107)</sup> (Fig. 1.8).

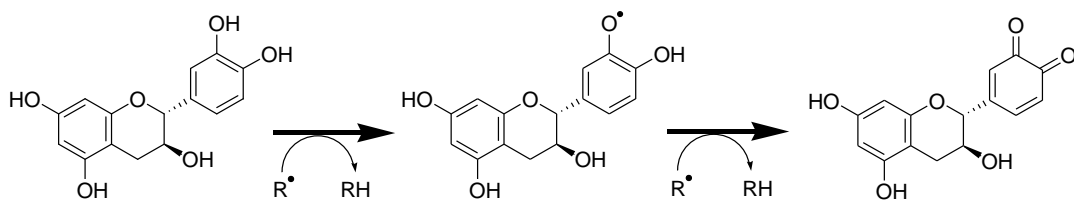


Fig. 1.8 Exemple del segrest de radicals lliures per part de la catequina, amb potencial redox  $-E_7-0,57$  –adaptat de Pietta i col·laboradors <sup>(107)</sup>–.  $R^\bullet$ , radical lliure.

En l'estudi de Proteggente i col·laboradors <sup>(109)</sup>, els fruits rics en antocianines van resultar ser els que presentaren més capacitat antioxidant, seguit dels aliments rics en flavanones, flavonols i àcids hidroxicinàmics. De totes maneres, els valors de capacitat antioxidant *in vitro* estan fortament lligats al tipus de mètode utilitzat per a la seva mesura i no reproduïxen fidelment les condicions reals *in vivo* <sup>(110)</sup>.

Els compostos fenòlics protegeixen l'organisme de les ROS a diferents nivells: inhibeixen alguns enzims responsables de la seva formació –xantina oxidasa i proteïna cinasa C, entre d'altres–, actuen com a agents quelants de metalls necessaris per a la seva formació i també anul·len ROS ja formades <sup>(107)</sup>. S'ha proposat l'ús de suplementes dietètics rics en un o més compostos fenòlics o d'altres antioxidants naturals per aprofitar les seves propietats antioxidants. No obstant, la utilització d'aquests suplementes ha resultat ser contraproduent, donat que alguns antioxidants poden

presentar activitat prooxidant i ser potencialment cancerígens quan són subministrats a dosis altes i sota determinades condicions <sup>(111)</sup>. Avui dia es té la certesa que els efectes beneficiosos dels compostos fenòlics estan condicionats a una dieta rica en diferents antioxidants, lluny de ser atribuïbles a un compost en concret. Per a que els beneficis exhibits a la salut siguin efectius, és necessària la presència d'una mescla rica i variada de compostos fenòlics i altres antioxidants –com vitamines i carotenoides– en la dieta, que exerceixin entre ells un efecte sinèrgic <sup>(16, 112)</sup>.

Malgrat tot, l'activitat antioxidant com a mecanisme directe per a l'efecte saludable dels compostos fenòlics i altres fitoquímics és actualment motiu de controvèrsia. Malgrat que les ROS són considerades oncogèniques, també són necessàries per produir danys i induir apoptosi a cèl·lules cancerígenes <sup>(113)</sup>. En aquest sentit, el codescobridor de l'estructura en doble hèlix del DNA i premi nobel James D. Watson ha apuntat recentment que els antioxidants poden interferir en aquesta "vessant" anticancerígena de les ROS, resultant així contraproductius en la prevenció o en la cura de certs tipus de càncer <sup>(114)</sup>.

Més enllà de l'activitat antioxidant, estudis recents destaquen cada cop més la importància de les interaccions entre compostos fenòlics i els seus metabòlits amb proteïnes involucrades en processos de senyalització i resposta cel·lulars. Per exemple, l'epigal·locatequina gal·lat inhibeix la ruta de senyalització del factor nuclear  $\kappa$ B –NF- $\kappa$ B–, un factor de transcripció que està involucrat en la gènesi de diverses patologies <sup>(115)</sup>. La quercetina i els flavan-3-ols de te supprimeixen l'activació d'AP-1, un altre factor de transcripció que intervé en la regulació del cicle cel·lular i que podria estar implicat en la proliferació d'alguns tumors <sup>(116)</sup>. Feng i col·laboradors <sup>(117)</sup> van trobar que l'àcid 5-cafeoilquínic inhibeix els factors de transcripció NF- $\kappa$ B i AP-1, quan aquests estan induïts químicament o per radiació UV, i també que activa els enzims GST i NADPH quinona oxidoreductasa; ambdós són eliminadors de toxines de la fase II i poden prevenir la proliferació de tumors. També s'ha observat que diversos compostos fenòlics –entre ells la catequina, l'epigal·locatequina gal·lat, la quercetina i l'àcid 5-cafeoilquínic– activen algunes MAP cinases, factors de transcripció que intervenen i regulen nombrosos processos i que poden evitar l'aparició d'alguns processos patològics cancerosos i coronaris <sup>(117-119)</sup>. D'altra banda, l'estructura molecular d'algunes isoflavones els fa ser anàlegs d'hormones estrogèniques –fitoestrògens–. Poden bloquejar l'ovulació en animals herbívors i en humans pot reduir la incidència de càncer de pròstata i de mama degut a la seva activitat estradiol <sup>(70, 120)</sup>, tot i que, alguns estudis conclouen que poden produir efectes adversos per interferir en la regulació hormonal –bloquejar els receptors  $\beta$  d'estrògen– <sup>(120, 121)</sup>



## 1.5 Usos en la indústria alimentària i noves aplicacions

### Propietats organolèptiques

Molts aliments deuen el seu gust amarg, picant o astringent a la presència de compostos fenòlics. Les capsaicines del bitxo –*chili*– són picants i els neohesperidòsids de flavanona confereixen amargor als cítrics, així com l'oleuropeïna a les olives no processades i el xantumol –flavonoide prenilat– al llúpul –i el seu derivat isoxantumol a la cervesa– <sup>(22)</sup> (Fig. 1.9).

El gust astringent de moltes fruites és conseqüència dels tanins hidrolitzables –derivats d'àcid gàl·lic– i/o dels tanins condensats –proantocianidines–. Per exemple, els el·lagitanins aporten astringència a les maduixes, a les móres i a les magranes, mentre que les proantocianidines als caquis, als préssecs, a les pomes i al raïm <sup>(22)</sup>.

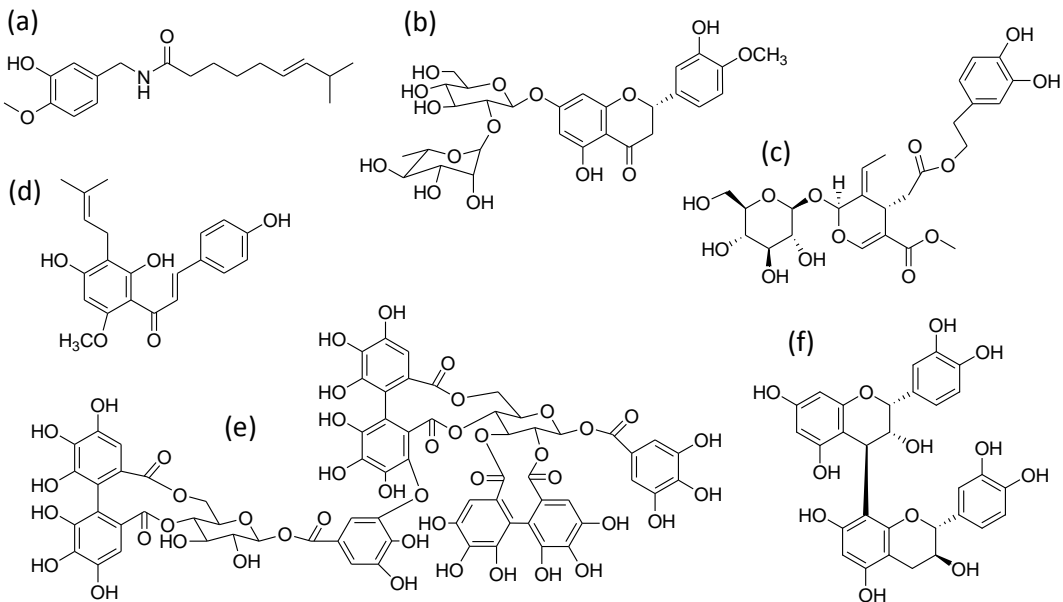


Fig. 1.9 Exemples de compostos fenòlics amb propietats gustatives: **(a)** capsaicina; **(b)** hesperetina-7-*O*-neohesperidòsids –flavanona–; **(c)** oleuropeïna; **(d)** xantumol –flavonoide prenilat–; **(e)** sangüïna H-10 –el·lagitanní–; **(f)** procianidina B1 –flavan-3-ol–.

Les procianidines tenen un efecte marcadament astringent, degut a la seva capacitat d'interaccionar amb les proteïnes salivars i precipitar-les <sup>(122)</sup>. Aquest fenomen és especialment important durant la degustació del vi <sup>(123)</sup>. Els graus de polimerització i la presència d'àcid gàl·lic a l'estructura de les procianidines influeixen en la percepció de l'astringència, tot i que no hi ha un consens en la seva determinació <sup>(122-124)</sup>. Segons Sun i col·laboradors <sup>(123)</sup>, l'amargor i l'astringència que produeixen les procianidines del vi són directament proporcionals a la seva concentració i al pes molecular –per tant, al grau de polimerització–.

### **Propietats colorants**

El color és un paràmetre que influeix en gran mesura a la percepció i acceptabilitat d'un aliment. Les antocianines són les responsables dels tons blaus, vermells i violacis de molts fruits, i poden ser utilitzades com a colorants –E-163– <sup>(125)</sup>. Al llarg de l'envelliment del vi, les procianidines formen complexos estables amb les antocianines, generant així nous colors i reduint l'astringència deguda a les procianidines lliures <sup>(67)</sup>.

### **Propietats antioxidants**

No hi ha dubte que les propietats antioxidants dels compostos fenòlics són tecnològicament útils per a l'elaboració d'aliments <sup>(126-128)</sup>. El seu ús pot ser especialment interessant tenint en compte la visió cada cop més negativa dels consumidors envers als antioxidants sintètics <sup>(129)</sup>. En aquest sentit, s'han realitzat nombrosos treballs per avaluar l'efecte de l'addició d'extractes rics en compostos fenòlics cap a la qualitat i vida útil de productes carnis (**Taula 1.3**).

Llum, temperatura, pH i la concentració d'oxigen, ions metàl·lics, enzims i sucres són els factors més rellevants que afecten l'estabilitat dels compostos fenòlics d'un aliment i la seva capacitat antioxidant <sup>(130, 131)</sup>. També pot influir l'estat físic de la matriu, ja que les reaccions enzimàtiques i d'oxidació estan afavorides en solució. Així doncs, es pot preveure que en aliments amb baixa activitat d'aigua – $a_w$ – la degradació dels compostos fenòlics és més lenta i la capacitat antioxidant més estable al llarg del temps <sup>(132)</sup>. Hurst i col·laboradors <sup>(133)</sup>, van observar que els nivells de flavan-3-ols i l'activitat antioxidant de la xocolata es manté estable almenys 2 anys en condicions ambientals, i que llavors de cacau de més d'un segle d'antiguitat encara preserven nivells alts de flavan-3-ols i d'activitat antioxidant.

L'aplicació de temperatures altes pot alterar significativament l'estabilitat dels compostos fenòlics i, per tant, la seva capacitat antioxidant. Per exemple, segons Davidov-Pardo i col·laboradors <sup>(134)</sup>, els tractaments tèrmics utilitzats habitualment en la indústria alimentària afecten el perfil de compostos fenòlics i l'activitat antioxidant dels extractes de llavor de raïm, rics en procianidines. Les procianidines amb àcid gàl·lic esterificat resultaren ser els compostos més sensibles a la temperatura. No obstant, aquests autors també conclouen que aquests canvis no es poden relacionar directament

Taula 1.3

**Extractes rics en compostos fenòlics utilitzats com a antioxidants en aliments carnis**

Origen extractes	Productes carnis	Refs.
<i>Beta vulgaris</i> –remolatxa–	Hamburguesa de porc	(135)
<i>Borago officinalis</i> –borratja–	Embotit sec curat*	(136)
<i>Camellia sinensis</i> –flavan-3-ols de te–	Carns i peixos crus refrigerats	(137)
	Salsitxa de porc*	(138)
<i>Citrus sp.</i> –subproductes de cítrics–	Salsitxa de Bolonya	(139, 140)
	Carn de cabra	(141)
<i>Citrus x limon</i> –albedo cru de llimona–	Hamburguesa de vedella	(142)
<i>Coffea sp.</i> –flavan-3-ols de cafè–	Salsitxa de porc*	(138)
<i>Epilobium angustifolium</i> –epilobi–	Hamburguesa de porc	(135)
<i>Malus domestica</i> –poma–	Salsitxa de porc	(143)
<i>Melissa officinalis</i> –tarongina–	Salsitxa de Bolonya*	(144)
<i>Olea europaea</i> –fulla d'olivera–	Salsitxa de porc	(145)
<i>Origanum vulgare</i> –orenga–	Salsitxa de Bolonya	(140)
	Hamburgueses de vedella i porc	(146)
<i>Punica granatum</i> –llavor i pela de magrana–	Carn de cabra	(141)
<i>Rosmarinus officinalis</i> –romaní–	Salsitxa de Bolonya	(140)
	Hamburgueses de vedella i porc	(146)
<i>Rubus chamaemorus</i> –móra vermella–	Hamburguesa de porc	(135)
<i>Solanum tuberosum</i> –pela de patata–	Carn de xai irradiada	(147)
<i>Theobroma cacao</i> –fulles de cacau–	Carn de pollastre	(148)
<i>Thymus vulgaris</i> –farigola–	Salsitxa de Bolonya	(139)
<i>Vitis vinifera</i> –llavor de raïm–	Carns crues/cuïtes a 4°C/-18°C	(149)
	Hamburgueses de vedella i porc	(146)

\*Productes carnis enriquits amb PUFA o amb el greix saturat substituït parcialment.

amb la intensitat del tractament tèrmic. En canvi, en un estudi similar de Chamorro i col·laboradors <sup>(150)</sup>, el contingut total de polifenols i tanins, el perfil de compostos fenòlics i l'activitat antioxidant d'extractes de llavor de raïm no es van veure afectats en tractarlos en un forn a 100 °C durant una hora. A més a més, en tractar els extractes a la mateixa temperatura i durant el mateix temps en un autoclau es va produir una degradació intensa dels compostos fenòlics, però l'activitat antioxidant es va mantenir.

### ***Funcionalitat en productes carnis***

Un altre motiu per afegir extractes rics en compostos fenòlics als aliments, a banda dels motius tecnològics, és l'aprofitament de les seves propietats beneficioses per a la salut. Com s'ha comentat anteriorment, alguns dels beneficis derivats d'una dieta elevada en compostos fenòlics han estat contrastats amb estudis epidemiològics i se n'atribueixen un bon nombre més. Els aliments –o ingredients– funcionals es defineixen com a aquells aliments que a part de posseir propietats nutricionals també s'utilitzen per prevenir o tractar algunes disfuncions o malalties <sup>(151)</sup>.

La carn i els productes carnis són una bona font nutricional de vitamines i aminoàcids essencials i no essencials, entre d'altres. No obstant, també contenen elements que en determinades circumstàncies i en proporcions inapropiades tenen un efecte negatiu per a la salut humana. La indústria alimentària ha d'oferir productes carnis el més saludables possibles. En aquest sentit, les estratègies I+D de les empreses càrnies cada cop estan més enfocades a desenvolupar productes amb menys greix, colesterol i sal, al mateix temps que s'evita l'addició i l'aparició de substàncies potencialment tòxiques durant el processat i emmagatzematge <sup>(151)</sup>.

La modificació del perfil nutricional de la carcassa i la reformulació dels ingredients són dues opcions per millorar el perfil nutricional dels productes carnis. En el primer cas, és possible disposar de carn amb el perfil de greix menys saturat que el convencional a través de canvis en l'alimentació del bestiar o de la selecció genètica, principalment. Pel que fa a la reformulació, es poden seguir diferents estratègies per disminuir l'aportació de greix saturat, colesterol, sal, nitrats i nitrats. Per exemple, es pot substituir part del greix animal per greix més insaturat i sense colesterol d'origen vegetal o animal –principalment de peix–, o bé per fibres d'origen vegetal amb propietats organolèptiques similars al greix <sup>(151, 152)</sup>.

Dins la reformulació dels productes carnis, una estratègia cada cop més emprada és la utilització d'ingredients funcionals. S'han descrit ingredients d'òrgens molt diversos amb activitat funcional, des de bacteris de l'àcid làctic fins a sucres i pèptids. Òbviament,

també es té en consideració l'ús d'extractes rics en compostos fenòlics com a ingredients funcionals <sup>(151)</sup>.

Les interaccions flavonoid-proteïna poden ser un repte per a l'ús de compostos fenòlics en productes carnis. Es sap que els compostos fenòlics s'uneixen mitjançant interaccions no covalents a certs dominis proteics, principalment aquells que contenen prolina, tot i que els productes de l'oxidació dels compostos fenòlics també poden unir-se covalentment a residus d'aminoàcids nucleofílics o oxidables <sup>(153)</sup>. Les interaccions poden afectar a les propietats gustatives del producte –potenciar l'astringència degut a la precipitació dels complexos formats– o fins i tot a l'absorció i biodisponibilitat dels compostos fenòlics. Els estudis realitzats no coincideixen a confirmar o descartar aquest últim extrem, ja que els seus resultats són contradictoris <sup>(154, 155)</sup>. Per exemple, un estudi realitzat en llet amb cacau conclogué que la presència de la llet, altament rica en proteïnes, no influí en la biodisponibilitat de l'epicatequina del cacau <sup>(156)</sup>.

Qualsevol menció sobre la funcionalitat d'un producte alimentari en el seu etiquetatge es troba estrictament regulada per la llei. Les exigències varien segons els estats, però tenen en comú que cal una autorització oficial prèvia per a la seva menció i que l'evidència científica sobre les propietats funcionals de l'aliment ha d'estar fortament contrastada <sup>(157-159)</sup>. A la Unió Europea, les mencions o al·legacions poden ser de dos tipus, les que fan referència a les propietats nutricionals d'un aliment –*nutrition claims*– i les que es refereixen a l'efecte sobre la salut –*health claims*–.

A la Unió Europea, la legislació ve marcada per la regulació 1924/2006 <sup>(157)</sup>. Aquesta regulació exigeix que els productes amb al·legacions funcionals no han de superar la quantitat recomanada –segons l'EFSA– de tots els nutrients potencialment perjudicials, principalment alcohol, greix, sal i sucre. Si l'aliment supera la quantitat recomanada d'un d'aquests nutrients, no es pot fer cap al·legació funcional sobre la salut, i les mencions sobre la nutrició es poden fer només si també s'explicita que l'aliment té el contingut elevat del nutrient en excés. Si l'aliment supera els límits en més d'un dels nutrients especificats, només els aliments que continguin la quantitat reduïda en un d'aquests nutrients –respecte a aliments equivalents– podran al·legar únicament que tenen el contingut baix en aquest nutrient. Per exemple, l'etiqueta d'un fuet baix en greix només podrà contenir l'al·legació “baix en greix” malgrat contingui altres funcionalitats nutricionals o sobre la salut, ja que es considera que s'excedeix en greix i sal.

L'aplicació de la regulació 1924/2006 comporta que els productes alimentaris que pretenen al·legar beneficis funcionals, ja siguin nutricionals o sobre la salut, necessiten una base científica sòlida que recolzi les al·legacions. L'article 5 de la regulació especifica

que una porció normal del producte ha de ser suficient per proveir la quantitat de nutrient necessària per tenir l'efecte fisiològic o nutricional al·legat. D'aquest article se'n desprenen dues dificultats:

- i) Cal tenir una caracterització completa dels compostos fenòlics presents en el producte alimentari que es vol al·legar, la seva estabilitat i quins són els seus nivells en una porció llesta per al consum.
- ii) Cal identificar els efectes nutricionals o fisiològics derivats del consum d'aquests compostos fenòlics i quines són les dosis necessàries per obtenir el benefici.

Avui per avui hi ha una manca evident d'estudis realitzats entorn els dos punts. Convé aplicar les metodologies més precises i modernes per a la caracterització dels compostos fenòlics presents en els aliments <sup>(160)</sup>. És necessari actualitzar les bases de dades de compostos fenòlics en aliments –p. ex. Phenol-Explorer, USDA database– <sup>(79, 80, 161)</sup>, les quals sovint es basen en treballs que han emprat metodologies analítiques que no han tingut en compte la diversitat real de compostos fenòlics presents a les mostres –p.ex. hidròlisi prèvia a l'anàlisi–. En el cas de productes carnis amb extractes vegetals, gairebé la totalitat dels estudis realitzats no determinen l'estabilitat dels compostos fenòlics ni els seus continguts en el producte final, i es limiten a caracteritzar la seva activitat antioxidant <sup>(162)</sup>. D'altra banda, pel que fa al segon punt, hi ha pocs estudis epidemiològics que aconseguixin identificar clarament els compostos o grup de compostos responsables dels efectes fisiològics beneficiosos derivats del consum d'aliments vegetals <sup>(3)</sup>.

A la Unió Europea, un producte alimentari amb compostos fenòlics –si reuneix els requisits comentats més amunt– pot contenir dos tipus d'al·legacions nutricionals <sup>(157, 163)</sup>:

- i) Conté + nom(s) dels compostos fenòlics –en anglès: *Contains*–.
- ii) Contingut augmentat de + nom(s) dels compostos fenòlics –en anglès: *Increased*–. En aquest cas, l'augment de contingut respecte a productes similars ha de ser almenys del 30 %.

Pel que fa a les al·legacions sobre la salut <sup>(164)</sup>, la gran majoria de les que són proposades a l'EFSA no tenen prou evidència científica per complir amb les condicions exigides. Entre les que sí s'han acceptat, hi ha l'efecte antioxidant dels compostos fenòlics de l'oli d'oliva sobre el colesterol LDL <sup>(165)</sup>, l'efecte beneficiós dels flavan-3-ols del cacau sobre el flux sanguini –manteniment de la vasodilatació endoteli-depenent– <sup>(166)</sup>, el benefici del consum de nous per a la millora del funcionament dels vasos sanguinis <sup>(167)</sup> i el benefici del consum de concentrat de tomàquet soluble en aigua –comercialitzat amb el nom

Fruitflow® – sobre la circulació sanguínia <sup>(168)</sup>. Els dos últims casos no especifica quins són els compostos responsables. Actualment, l'EFSA encara està avaluant un gran nombre d'al·legacions sobre la salut, pas previ per ser autoritzades o rebutjades per la Comissió Europea. És d'esperar que en un futur pròxim, noves investigacions permetin l'acceptació de més al·legacions sobre la salut referents a l'efecte beneficiós del consum de compostos fenòlics.

## 1.6 Anàlisi de compostos fenòlics en aliments

### *Diversitat de mètodes*

L'elecció de la tècnica analítica depèn bàsicament del tipus esperat de compostos fenòlics presents en la mostra, del tipus i especificitat dels resultats desitjats i, inevitablement, de la disponibilitat d'equips. Les tècniques de separació són particularment interessants per caracteritzar la diversitat de compostos presents en les mostres, tot i que, les tècniques espectrofotomètriques també han estat tradicionalment molt populars per a la quantificació de compostos fenòlics <sup>(160)</sup>.

Els mètodes espectrofotomètrics es basen en la formació de complexos acolorits entre famílies de compostos fenòlics i certs reactius. El reactiu Folin-Ciocalteu –fosfomolibdat-fosfotungstat– forma un complex de color blau en solució alcalina, detectable a 760 nm, en combinació amb els compostos fenòlics. S'utilitza per a la quantificació dels *fenols totals*, tot i que la presència d'àcid ascòrbic i altres agents reductors interfereixen en els resultats <sup>(150)</sup>. Alguns treballs quantifiquen els *flavonoides totals* emprant alumini, el qual s'uneix als grups carbonil i hidroxil dels flavonoides formant un complex rosat quantificable a 510 nm <sup>(169)</sup>. Les múltiples variants del mètode de la vainil·lina –*vanillin*– són més específiques, emprant-se per a la quantificació de flavan-3-ols <sup>(130)</sup> i antocianines <sup>(96)</sup>. Els principals inconvenients de les tècniques espectrofotomètriques són la manca de validació, els possibles interferents, la molt baixa especificitat i que no ofereixen dades sobre compostos individuals. No obstant, la seva simplicitat, baix cost i el fet de generar resultats fàcilment comparables amb estudis previs mantenen el seu ús ben vigent <sup>(160)</sup>.

De totes maneres, la necessitat d'una caracterització més específica ha comportat el desenvolupament d'un gran nombre de mètodes analítics basats en tècniques de separació. La millora de les tècniques de separació està permetent cada cop més la

caracterització de compostos més complexes, de més pes molecular, menys estables i més minoritaris <sup>(16)</sup>. L'electroforesi capil·lar –CE– i la cromatografia en són les més remarcables. Les anàlisis CE de compostos fenòlics solen utilitzar tampons fosfat o borat, capil·lars de 50-100 µm ID i voltatges de 10-30 kV. La detecció UV-VIS és la més habitual en CE, tot i que l'acoblament amb espectrometria de masses també és possible <sup>(160)</sup>. Els avantatges de la CE són la seva rapidesa, el baixíssim ús de solvents, l'elevada resolució i els baixos límits de detecció <sup>(87)</sup>.

Les primeres tècniques cromatogràfiques emprades per a l'anàlisi de compostos fenòlics foren la cromatografia en paper i la cromatografia de capa fina –*thin-layer chromatography*, TLC– <sup>(105)</sup>. S'han descrit múltiples mètodes TLC i TLC a alta resolució –HPTLC– per a l'anàlisi de compostos fenòlics en vegetals, la majoria d'ells utilitzant sílice com a fase estacionària <sup>(160)</sup>. Els principals avantatges de la TLC són el requeriment de poc volum de solvents orgànics, la senzillesa per a la preparació de mostres i la capacitat de processar moltes mostres en una sola seqüència, el que fa aquesta tècnica molt apta per a *screening* <sup>(97)</sup>.

La cromatografia de gasos –GC– és una important tècnica cromatogràfica també utilitzada per a l'anàlisi de compostos fenòlics. Ofereix una gran resolució, sensibilitat i selectivitat, especialment quan és acoblada amb espectrometria de masses <sup>(160)</sup>. No obstant, els compostos fenòlics han de ser modificats químicament per a ser analitzables per GC –derivatització–, donat que la gran majoria no són volàtils en la seva conformació natural. Això fa les anàlisis més llargues, costoses i amb patrons de fragmentació difícils d'interpretar <sup>(170, 171)</sup>. Els primers treballs en GC utilitzaven detecció amb ionització de flama, tot i que actualment la més utilitzada és l'espectrometria de masses. La derivatització consisteix en convertir els grups hidroxil en èters o èsters, mitjançant metilació o trimetilsilació. Les anàlisis GC solen emprar columnes no polars, separant els analits amb programes de 30-90 minuts amb temperatures de fins a 300 °C <sup>(160)</sup>.

La versatilitat de la HPLC per a l'anàlisi de compostos fenòlics en matrius vegetals, pel que fa a selectivitat, sensibilitat i fiabilitat, i la seva disponibilitat instrumental, fan que esdevingui una tècnica idònia i la més utilitzada actualment per a la separació i caracterització d'aquests compostos <sup>(13, 98, 160, 172)</sup>. Donada la rellevància de la HPLC en aquesta tesi, aquest capítol de la introducció descriu preferentment els procediments més utilitzats per a la preparació de mostres, anàlisi, detecció i quantificació de compostos fenòlics en mètodes d'anàlisi HPLC.



### **Preparació de les mostres**

Els mètodes d'anàlisi de compostos fenòlics solen requerir múltiples passos, tals com assecat, homogeneïtzació, filtració, extracció, purificació i concentració. D'un bon pretractament de les mostres en depenen la selectivitat, el límit de detecció, la repetibilitat, la reproductibilitat i la precisió del mètode analític <sup>(13)</sup>. Sigui com sigui, la preparació de les mostres ha de complir amb els següents objectius bàsics <sup>(160)</sup>:

- i) Aïllament dels analits de la matriu primària i dels compostos interferents que es trobin presents a la mostra.
- ii) Transferència dels analits a una fase adequada per a la tècnica analítica escollida.
- iii) Concentració suficient dels analits per permetre'n la seva determinació.

La deshidratació és un possible primer pas en el pretractament de les mostres. En alguns casos, la deshidratació o la liofilització de la mostra ha comportat una pèrdua dels compostos inicialment presents a la mostra <sup>(13)</sup>. Si s'opta per no deshidratar-les, convé evitar l'acció enzimàtica que degrada els compostos fenòlics. És necessari preservar les mostres a temperatura baixa i evitar en la mesura del possible el contacte amb la llum i l'oxigen. L'ús de solvents orgànics com a extractant –p.ex. metanol– o l'addició d'antioxidants –p.ex. àcid ascòrbic– també ajuden a minimitzar la degradació dels compostos <sup>(13)</sup>.

La diversitat estructural dels compostos fenòlics presents a la naturalesa es veu reflectida en l'ampli ventall de propietats físico-químiques que aquests posseeixen. Per exemple, la polaritat dels compostos fenòlics es veu molt afectada pels substituents presents en la seva estructura. Els grups hidroxil i glicòsid són altament hidròfils, mentre que els grups metil i isopentil els hi confereixen hidrofobicitat <sup>(3)</sup>. Això, sumant-hi l'enorme varietat de matrius que contenen compostos fenòlics, fa que una sola tècnica d'extracció no pugui ser bona per a tot tipus de mostres. Els mètodes d'extracció s'han d'adaptar al tipus de matriu i al tipus de compostos que s'hi troben presents, i en general, s'ha d'arribar a un compromís de condicions que extragui el màxim possible els compostos majoritaris o els més rellevants de la mostra <sup>(13)</sup>. El coeficient de partició oli en aigua –o/w– dels compostos fenòlics varia de  $6 \times 10^{-4}$  a 1,5. Per aquest motiu, s'utilitzen solvents relativament polars per a la seva extracció, principalment metanol, etanol, acetona, dietil èter i etil acetat. Per als àcids fenòlics més polars, com els àcids hidroxicinàmics, cal una mescla de solvent orgànic amb aigua per a la seva màxima extracció. Altres factors que poden influir en l'eficàcia de l'extracció són el pH, la temperatura, la relació de volums entre mostra i solvent, i el temps d'extracció <sup>(13)</sup>.

A banda de la clàssica maceració, s'han aplicat nombroses tècniques per millorar l'extracció. S'ha observat que la sonicació amb ultrasons augmenta la penetració del solvent dins la matriu i per tant millora l'extracció <sup>(173, 174)</sup>. Altres tècniques emprades, que requereixen equipament especialitzat, són l'extracció a alta pressió, l'extracció amb fluid supercrític, l'extracció amb solvent accelerada –que combina altes pressions i temperatures– i l'extracció assistida per microones, entre d'altres <sup>(173)</sup>.

Els extractes fets amb mostres vegetals solen contenir una mescla complexa de compostos que poden interferir a l'anàlisi. Si és així, es poden eliminar mitjançant l'extracció en fase sòlida –SPE– o per fraccionament. Finalment, els extractes diluïts en excés es poden evaporar parcial o totalment, sota flux de nitrogen per evitar l'oxidació, per concentrar els analits i millorar-ne la seva detecció.

L'enllaç glicosídic dels compostos fenòlics és fàcilment hidrolitzable en condicions àcides. Tradicionalment, la hidròlisi dels extractes s'ha utilitzat sistemàticament per diversos motius <sup>(175)</sup>:

- i) Reduir el nombre d'analits i fer la separació cromatogràfica més fàcil.
- ii) Permetre la quantificació mitjançant un patró, ja que no hi ha patró comercial disponible per a molts glicòsids.
- iii) Comparació del contingut en els aliments i la seva biodisponibilitat, considerant que anteriorment es creia que els flavonoides s'absorbien a l'intestí només en forma d'aglicó.
- iv) Obtenció de resultats comparables amb els estudis realitzats prèviament amb hidròlisi.

S'han publicat molts treballs amb dades quantitatives on la metodologia s'ha basat en la hidròlisi àcida dels extractes <sup>(48, 175-178)</sup>. Alguns treballs també han emprat enzims <sup>(179)</sup> o condicions bàsiques <sup>(180)</sup> per a la hidròlisi. No obstant, la hidròlisi provoca en bona mesura la degradació dels compostos fenòlics, l'aparició d'artefactes i no permet conèixer la diversitat real de compostos presents en una mostra <sup>(170)</sup>.

### **Anàlisi HPLC**

El caràcter semi apolar dels compostos fenòlics els fa adequats per a la separació en columnes de fase reversa –RP–. Generalment s'utilitzen columnes C18 de 100 a 250 mm de longitud i amb diàmetre intern de 2,1 a 4,6 mm. El sistema de fase mòbil sol consistir en un gradient que comenci per una fase predominantment aquosa i incrementant gradualment la proporció de solvent orgànic, habitualment metanol o acetonitril. La

retenció dels compostos en RP es basa en interaccions hidrofòbiques i els compostos més polars s'elueixen primer. Acidificant lleugerament la fase mòbil s'aconsegueix neutralitzar la càrrega de molts compostos fenòlics, que són àcids febles, i per tant augmentar la seva retenció en RP <sup>(13, 105)</sup>. Segons Harnly i col·laboradors <sup>(170)</sup>, l'ordre d'elució dels compostos fenòlics en RP segueix certes generalitzacions:

- i) Primer elueixen els àcids fenòlics, els més polars.
- ii) L'ordre d'elució segons l'estructura de l'aglicó és flavanona < flavonol < flavona.
- iii) El temps de retenció és inferior com més grups hidroxil té la molècula, i superior com més grups metoxi.
- iv) El temps de retenció és inversament proporcional al grau de glicosilació.
- v) L'ordre d'elució segons el tipus de sucre és glucòsids < pentòsids (xilòsids i arabinòsids) < ramnòsids < glucurònids.
- vi) L'ordre d'elució segons la posició del sucre és: 7-O-glicòsids < 3-O-glicòsids < 4'-O-glicòsids.

No obstant, existeixen nombroses excepcions i l'ordre d'elució de les diverses famílies de compostos es solapen en bona mesura. Per poder separar correctament les mescles heterogènies de compostos fenòlics presents en mostres vegetals convé utilitzar gradients de fase mòbil. L'elució sol consistir en un sistema binari, amb una fase aquosa polar acidificada amb àcid acètic, fòrmic o fosfòric i un solvent orgànic menys polar, principalment metanol o acetonitril, que també poden estar acidificats <sup>(181)</sup>.

La mida de partícula de les fases estacionàries utilitzades en HPLC es troba típicament compresa entre els 3 i els 10  $\mu\text{m}$  <sup>(13)</sup>. Amb la reducció de la mida de partícula s'aconsegueix uniformitzar el flux de la fase mòbil, reduir la distància de difusió i per tant augmentar la cinètica de transferència de massa dins de la columna <sup>(182)</sup>. Això té com a resultat una millora en l'eficiència de la columna però també requereix un augment de la pressió. L'any 2004 van sortir els primers equips comercials que permetien aplicar una pressió superior als 500 bar, permetent l'ús de columnes amb la mida de partícula inferior als 2  $\mu\text{m}$ . Aquesta nova tecnologia, denominada UHPLC –cromatografia líquida de molt alta resolució– ha permès des de llavors anàlisis amb millor resolució i més ràpides que amb les columnes convencionals. Els límits de detecció i quantificació en UHPLC són més baixos que en HPLC, ja que els pics generats amb resolució més alta són més estrets i alts, fet que permet detectar i quantificar compostos que a menys resolució serien indetectables. Amb UHPLC s'assoleixen valors de plats teòrics superiors a 100.000, mentre que en HPLC els valors es troben habitualment per sota <sup>(183)</sup>.

La identificació dels compostos fenòlics presents en mostres vegetals pot arribar a ser molt complexa, degut a la gran diversitat de compostos i formes isomèriques existents. L'espectroscòpia ultraviolat-visible –UV-VIS– i l'espectrometria de masses –MS– són els mètodes predilectes per a la seva detecció i quantificació en anàlisis HPLC <sup>(170)</sup>. La informació estructural que ofereixen, juntament amb el temps de retenció, permeten la identificació i la quantificació dels compostos comparant la informació obtinguda amb patrons. No obstant, els patrons comercials de la majoria de compostos fenòlics presents a la naturalesa no existeixen; en aquests casos, la identificació per HPLC-UV-VIS i HPLC-MS no pot ser inequívoca i es considera provisional. La ressonància magnètica nuclear –NMR–, per la seva banda, permet la caracterització inequívoca dels compostos sense necessitar de disposar dels patrons <sup>(171)</sup>.

### Detecció UV-VIS

La naturalesa fenòlica amb dobles enllaços confereix als compostos fenòlics la propietat d'absorbir la radiació electromagnètica a longituds d'ona de l'espectre ultraviolat (UV, 15-400 nm) i del visible (VIS, 400-700 nm). Aquests compostos presenten espectres d'absorció UV-VIS característics, amb la presència de dues bandes d'absorció (**Taula 1.4, Fig. 1.6**). En flavonoides, es creu que la denominada banda II (240-300 nm) prové de l'anell A, mentre que la banda I (300-550 nm) de l'anell B <sup>(181)</sup>.

**Taula 1.4**

**Exemples típics de bandes d'absorció màximes –nm– per a les diferents classes de compostos fenòlics** <sup>(27, 172)</sup>

Classe	Banda II	Banda I
Àcids hidroxibenzoics	235-305	
Àcids hidroxicinàmics	227-245; 310-332	
Flavonols	250-280	350-385
Flavan-3-ols	275-279	
Calcones	240-260	365-390
Flavanones	275-295	310-330
Antocianines	265-275	465-560
Flavones	250-280	310-350
Isoflavones	245-275	310-330

La radiació UV-VIS electromagnètica absorbida provoca transicions electròniques que poden ser quantificades pels detectors UV-VIS. Els detectors de barra de díodes –DAD, PAD– acoblats a sistemes HPLC enregistren *on-line* i simultàniament l'absorció produïda a tot el rang de l'espectre, permetent així l'obtenció dels espectres d'absorció dels pics i dels cromatogrames a qualsevol longitud d'ona, p. ex., al màxim específic per a cada analit. Els espectres d'absorció dels pics també permeten fer una anàlisi de la puresa d'aquests.

### **Detecció MS**

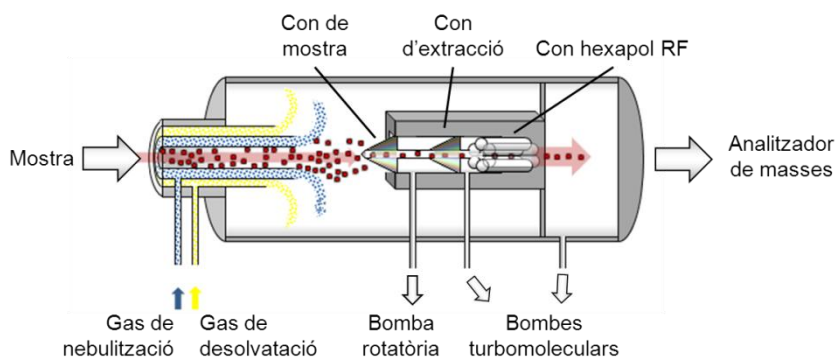
L'espectrometria de masses ha esdevingut una eina molt útil per a la detecció de compostos fenòlics en mostres complexes <sup>(13)</sup>. Es mesura el valor massa/càrrega  $-m/z-$  dels compostos ionitzats i dels seus fragments, donant una informació valuosa sobre el pes molecular i l'estructura molecular dels compostos <sup>(184)</sup>. Tots els tipus d'espectròmetres de masses es basen en la dinàmica de les partícules carregades en camps elèctrics i magnètics en condicions de buit <sup>(185)</sup>. A grans trets, dins un espectròmetre de masses, les mostres passen per quatre processos diferenciats:

- i) Introducció de la mostra. Els espectròmetres de masses poden funcionar *off-line*, mitjançant la introducció directa de la mostra –*infusió*–, o bé acoblats *on-line* a un sistema cromatogràfic –GC o HPLC– on els analits de la mostra han estat prèviament separats <sup>(185)</sup>.
- ii) Transferència de fase líquida a gasosa mitjançant la font de ionització. En sistemes acoblats a HPLC –HPLC-MS–, els analits passen d'estar en solució en una mostral líquida i a pressió atmosfèrica a estar ionitzats i en estat gasós en condicions de buit. També denominades *interfase*, les fonts de ionització més recomanades per a l'anàlisi de compostos fenòlics són les que produeixen una ionització suau dels analits, permetent així la seva anàlisi sense alterar-ne l'estructura <sup>(185)</sup>.

La font de ionització més utilitzada és la ionització per electroesprai –ESI–<sup>1</sup> (Fig. 1.10), on la mostra en solució es fa passar per un capil·lar –elèctrode– que està sotmès a una diferència de potencial d'1 a 5 KV respecte un segon capil·lar

---

<sup>1</sup> John Bennett Fenn va rebre el Premi Nobel de Química l'any 2002 per el desenvolupament de l'ESI i les seves aplicacions per a la identificació i l'anàlisi estructural de macromolècules biològiques.



**Fig. 1.10** Esquema d'una font d'ionització electroesprai –ESI–. *Adaptat de Allwood i Goodacre, 2010*<sup>(186)</sup>.

–elèctrode auxiliar, *counter electrode*–. Els ions de la mostra són conduïts per efecte del camp elèctric fins a l'extrem del capil·lar, on la mostra líquida forma l'anomenat “con de Taylor”. Els ions, tots carregats amb la mateixa polaritat, s'acumulen a la superfície de la mostra líquida fins que la força de repulsió és més gran que la tensió superficial del líquid, moment en què multitud de petites gotetes –aprox. 1  $\mu\text{m}$ – altament carregades amb ions surten emeses en forma d'aerosol o esprai. Molts aparells comercials utilitzen un flux coaxial de nitrogen per millorar la formació de l'esprai –gas de nebulització– quan es treballa amb fluxos alts de mostra líquida. L'esprai és conduït mitjançant el camp elèctric cap al segon capil·lar que està al buit. Una cortina de gas que escombra les molècules neutres i l'angle en què estan disposats els elèctrodes permeten que només entrin les molècules carregades que estan sent arrossegades pel camp elèctric. Un cop dins el segon elèctrode o capil·lar, les gotetes perden volum per desintegració i desolvatació, fins que finalment els analits queden ionitzats en fase gasosa. El segon capil·lar es pot escalfar eventualment per facilitar l'evaporació del solvent<sup>(187)</sup>.

Una altra interfase molt comuna en sistemes HPLC-MS és la ionització química a pressió atmosfèrica –APCI–. En aquest cas, la transferència a fase gasosa es fa a través d'un tub de vidre a alta temperatura (350-500  $^{\circ}\text{C}$ ) amb flux elevat de nitrogen, on es produeix una vaporització explosiva. Una agulla amb alt voltatge –corona de descàrrega– provoca la ionització de les molècules de solvent vaporitzades i dels analits. L'alta temperatura aplicada a l'APCI és un inconvenient per preservar intacta l'estructura dels compostos fenòlics<sup>(185)</sup>.

La desorció-ionització amb làser assistit per matriu –MALDI– és una tècnica de ionització suau per a espectròmetres de masses no acoblats a HPLC –*off-line*–. Les mostres, que poden haver estat fraccionades prèviament per HPLC, es munten en una matriu cristal·lina i són irradiades amb làser per vaporitzar i ionitzar els analits. La matriu cristal·lina afavoreix la vaporització i la ionització al mateix temps que protegeix els analits de l'acció directa del làser. El làser s'aplica a ràfegues individuals, per tant, no és apte per a una entrada continua de mostra <sup>(185)</sup>.

Les fonts de ionització poden treballar en mode positiu o negatiu, segons la polaritat del voltatge aplicat. Els compostos fenòlics es desprotonen fàcilment en mode negatiu, obtenint així el ió pseudomolecular  $[M-H]^-$ . Amb els modes de ionització positius els compostos fenòlics formen fàcilment adductes amb els cations presents a la mostra o a la fase mòbil, per exemple, amb sodi  $-[M+Na+H]^+$ . En general, es prefereix el mode de ionització negativa, ja que el senyal obtingut sol ser millor degut a l'acidesa dels protons fenòlics <sup>(188)</sup>.

En sistemes HPLC-MS convé utilitzar fases mòbils amb components volàtils, per tal de no interferir en la ionització dels analits. Per exemple, l'ús d'àcid fòrmic per acidificar la fase mòbil és adequat degut a la seva elevada volatilitat, mentre que l'ús de tampons afecta severament la intensitat de la senyal <sup>(13)</sup>.

- iii) Recorregut pels analitzadors de masses. Els analits, després de ser transferits a fase gasosa i ionitzats, són determinats segons la seva relació massa-càrrega  $-m/z-$  en els analitzadors de masses. Els tipus d'analitzadors més freqüents en l'anàlisi de compostos fenòlics són els quadrupols –Q–, les trampes iòniques –IT– i els temps de vol –TOF– <sup>(171)</sup>.

Els quadrupols funcionen com a “filtres de massa”. Utilitzen combinacions de corrent continu –DC, *direct current*– i corrent altern –AC, *alternating current*– aplicats en quatre barres d'elèctrodes paral·leles per barrar el pas dels ions –filtrar-los– o escanejar-los en funció de la seva  $m/z$ . Segons el tipus de corrent aplicat, els ions dins un cert rang de  $m/z$  passen a través del quadrupol descrivint una trajectòria oscil·latòria. Els ions que estan fora del rang col·lideixen amb les barres i són eliminats de la trajectòria. Els instruments amb quadrupols més habituals són els que en tenen un –quadrupol senzill, SQ– i els que en tenen tres –triple quadrupols, TQ o QQQ–. Els SQ permeten obtenir espectres de masses amb baixa resolució però són els instruments MS més barats del mercat <sup>(185)</sup>.

Els TQ (Fig. 1.11) ofereixen informació estructural en funció de com estan configurats els tres quadrupols. El primer –Q1– i el tercer –Q3– quadrupols funcionen com a filtres de masses mentre que el segon quadrupol –Q2– funciona com a cel·la de col·lisió. En el mode *Scan MS*– (Fig. 1.11a), el TQ funciona com a SQ, és a dir, un quadrupol –Q1 o Q3– escaneja per obtenir l'espectre de masses dins del rang  $m/z$  especificat, mentre que la cel·la de col·lisió –Q2– està inactiva. En un sistema HPLC-MS configurat en mode *Scan* s'obté informació sobre el pes molecular –valor  $m/z$ – dels analits eluïts al llarg d'un cromatograma. En el mode *Product Ion Scan* (Fig. 1.11b) –també anomenat *Daughter Ion Scan*–, Q1 i Q3 actuen com a filtres de masses, treballant així en “tàndem” –MS<sup>2</sup> o MS/MS–. En aquest cas, Q1 selecciona els ions d'una determinada  $m/z$  –*parent ion*– que passen a Q2, on són fragmentats per col·lisió amb un gas inert, normalment un

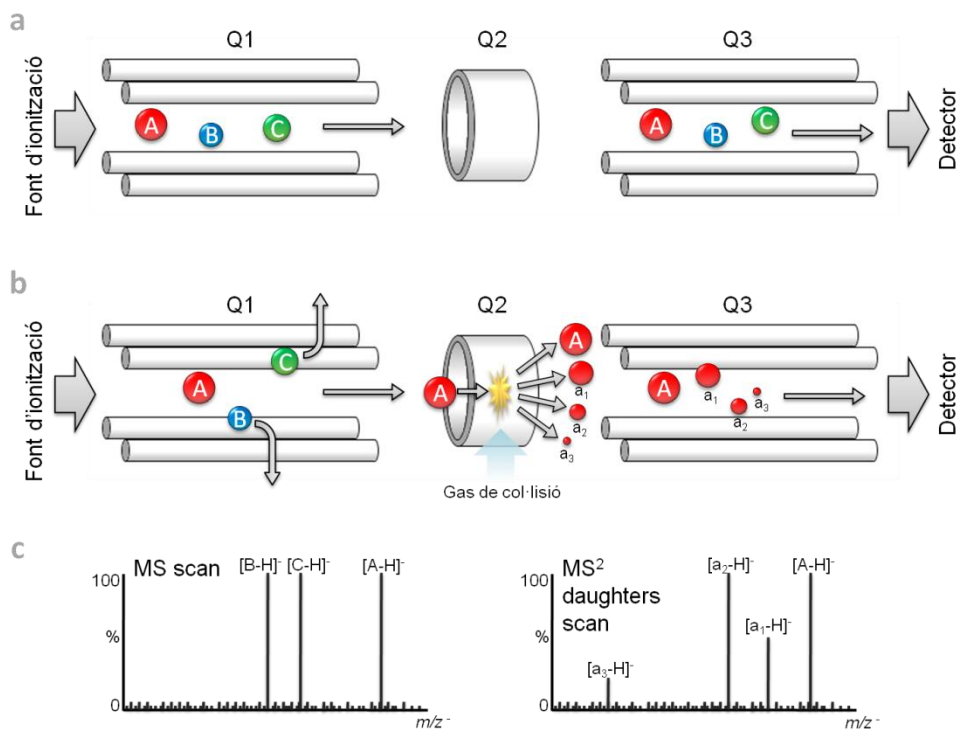


Fig. 1.11 Exemple esquemàtic de la detecció de tres compostos que coelueixen –A, B, C– en un triple quadrupol: (a) anàlisi MS en mode *scan*, amb el rang de  $m/z$  que permet el pas de A, B i C; (b) anàlisi MS<sup>2</sup> en mode *Product ion scan* –*daughter ions scan*– específic per a la  $m/z$  de A; (c) exemples d'espectres de masses obtinguts amb els dos modes anteriors.



gas noble. Els productes de la fragmentació –*daughter ions*– passen a Q3 que escaneja per obtenir l'espectre de fragmentació. En un sistema HPLC-MS<sup>2</sup> configurat en mode *Product Ion Scan* s'obté la informació estructural –valor  $m/z$  dels fragments produïts– dels compostos definits prèviament <sup>(162)</sup>.

La selectivitat de l'espectròmetre de masses TQ és especialment útil per quantificar compostos en mostres vegetals complexes, de diferent pes molecular i que coelueixen. En la configuració *Multiple Reaction Monitoring* –MRM–, Q1 selecciona el valor  $m/z$  del compost a quantificar, Q2 fragmenta el compost i Q3 filtra els fragments seleccionant els d'un valor  $m/z$  característic del compost. La senyal originada en mode MRM és una transició "ió pare → ió fill" altament selectiva per al compost determinat, permetent així la seva quantificació evitant en bona mesura possibles interferents <sup>(162)</sup>.

La trampa iònica –IT– és un quadrupol modificat que permet retenir els ions de  $m/z$  seleccionada dins una trajectòria estable. Aleshores els ions es fragmenten i s'analitzen dins el mateix analitzador de masses, és a dir, el primer i el segon experiments MS estan separats pel temps, i no per l'espai com en un TQ, i només cal un analitzador de masses per fer múltiples experiments MS –MS<sup>n</sup>–, permetent així successives fragmentacions i anàlisi dels fragments produïts <sup>(162)</sup>.

Els analitzadors de masses tipus TOF estan acoblats habitualment a fonts de ionització MALDI –MALDI-TOF–, ja que els dos permeten l'anàlisi de rangs amplis de massa i treballen en discontinu. Els TOF acceleren els ions presents a la mostra mitjançant un voltatge i els separen en funció del temps que necessiten per passar –“volar”– per un tub sense camp elèctric. La precisió dels valors  $m/z$  dels TOF és d'uns 0,01 Da, superior a la dels espectròmetres convencionals –entorn 1 Da–. Així doncs, el TOF-MS és una eina atractiva per a la identificació de compostos fenòlics en mostres vegetals complexes, tot i que requereix una instrumentació més complexa i cara <sup>(185)</sup>.

- iv) Detecció. Els ions analitzats pels analitzadors de masses, en passar o col·lidir per la superfície del detector, creen una senyal que és transmesa elèctricament per crear els espectres de massa. Els detectors dels espectròmetres de masses típicament han consistit en un multiplicador d'electrons, tot i que els equips moderns solen contenir un detector tipus plat microcanal –*microchannel plate*, MCP– unit a un convertidor temps-digital –*time to digital converter*, TDC– <sup>(186)</sup>.

### Altres mètodes de detecció

Els detectors de fluorescència –FL– i electroquímics –ED– aprofiten les propietats fluorescents o electroquímiques, respectivament, de certs compostos fenòlics per detectar-los amb elevada selectivitat i sensibilitat. No obstant, el fet que només determinats compostos fenòlics presenten aquestes propietats, fa que les deteccions per FL o ED es considerin alternatives i estiguin habitualment acompanyades per detecció UV-VIS o MS. Exemples de compostos amb propietats fluorescents i electroquímiques són el resveratrol, l'àcid gàl·lic, la catequina i la quercetina <sup>(13)</sup>.

Les millores recents en la ressonància magnètica nuclear –NMR– han permès acoblar òptimament *on-line* aquesta tècnica a sistemes HPLC, sobretot després de solucionar la baixa sensibilitat tradicional de la NMR que impedia la detecció de compostos sortint d'una columna cromatogràfica, i la supressió del solvent de la fase mòbil. La NMR 1H i 13C ofereixen informació estructural que permet acotar amb gran precisió la identificació dels compostos, tot i que actualment la seva sensibilitat continua per sota d'altres sistemes de detecció com UV-VIS i MS <sup>(63)</sup>.

### Quantificació

La intensitat de senyal mesurada pels detectors al llarg d'una anàlisi HPLC dibuixa un perfil denominat cromatograma, on els compostos eluïts i detectats queden registrats en forma de *pic*. La intensitat de senyal produïda per un analit està relacionada amb la quantitat d'analit injectada, mitjançant l'expressió

$$S_{analit} = KC$$

on **C** és la concentració d'analit injectada, **S** és la intensitat de senyal –àrea del pic– i **K** és el coeficient de resposta. No obstant, la intensitat total de senyal **S** depèn de la quantitat d'analit present a la mostra –**S<sub>analit</sub>**– però també de l'instrumental –**S<sub>0</sub>**–, és a dir, la senyal basal produïda en absència de l'analit. Per tant, les rectes de calibratge s'expressen

$$S = S_0 + S_{analit} = S_0 + KC$$

El valor de **K** s'estima mitjançant el calibratge, és a dir, construint una recta de regressió amb una sèrie de valors **S** obtinguts amb quantitats conegudes de compost patró <sup>(134)</sup>.

Per al calibratge convé utilitzar patrons purs i completament dissolts en un solvent que en garanteixi la seva estabilitat. Es distingeixen diferents tipus de calibratge, en funció del procediment per crear-los:

- i) Calibratge extern. La recta de calibratge s'obté mitjançant una sèrie d'injeccions, en condicions cromatogràfiques idèntiques, de solucions de compostos patró en concentració creixent. Aquest mètode de calibratge no té en compte un possible efecte matriu, és a dir, les desviacions produïdes a la intensitat de senyal degudes a la presència d'interferents a la matriu i no degudes pròpiament a la concentració d'analit. L'efecte matriu és particularment important en detecció per MS, ja que la ionització dels analits es veu fàcilment alterada per la presència de certs components a la mostra <sup>(134, 189)</sup>.
- ii) Calibratge en matriu –matrix-matched–. És un tipus de calibratge extern on les solucions de compostos patró també contenen matriu, és a dir, els patrons a concentració coneguda s'han afegit a mostres que no contenen analit. Aquest tipus de calibratge implica disposar de mostres –matriu– que no continguin l'analit a quantificar, per tant, no és adequat per a la quantificació de compostos que es troben de forma natural a les mostres. En anàlisi d'aliments s'utilitza típicament per a la quantificació de drogues i pesticides. Aquest tipus de calibratge té en compte un possible efecte matriu <sup>(134, 189)</sup>.
- iii) Addició de patró –standard additions–. És útil per tenir en compte l'efecte matriu en mostres que contenen els analits de forma natural. Es fortifica una mostra a diferents nivells, és a dir, a una mostra que conté una concentració desconeguda d'analit se li afegeix patró de l'analit a diferents concentracions conegudes. S'obté l'expressió  $S = S_0 + KC$ , on  $S_0$  és el valor de senyal degut a l'efecte matriu i a la concentració endògena de la mostra i  $C$  és la concentració de patró afegida. El valor absolut de  $C$  quan  $S = 0$  correspon a la concentració d'analit endògena a la mostra <sup>(134, 189)</sup>.
- iv) Calibratge intern. Requereix l'ús d'un patró intern –*p.i.*–, que ha de ser un compost amb un comportament analític similar als analits a quantificar i no ha d'estar present a la mostra. Per a cada analit s'obté un factor de resposta, que permet relacionar els valors senyal/concentració obtinguts amb l'analit i amb el patró intern. Així, injectant les mostres amb una concentració coneguda de patró intern, es calcula la concentració d'analit tenint en compte l'àrea obtinguda de l'analit, l'àrea del patró intern, la concentració injectada de patró intern i el factor de resposta.

El patró intern també es pot utilitzar per compensar les pèrdues produïdes durant el procés d'extracció i anàlisi, afegint el patró intern a la mostra just abans

de l'extracció. Aquest ús del patró intern és especialment indicat en anàlisis on la preparació de mostres sigui complexa o variable <sup>(134, 189)</sup>.

### **Validació**

És important que les anàlisis quantitatives estiguin validades, és a dir, assegurar numèricament que els resultats quantitius siguin fiables. Convé validar tot el mètode d'anàlisi, incloent la preparació de les mostres, per a tot el rang de concentracions present a les mostres i per a tots els tipus de matriu utilitzats. Diverses organitzacions internacionals –ICH, IUPAC, ISO, FDA, etc.– han establert una sèrie de paràmetres que són emprats com a criteris de validació, amb la finalitat d'homogeneïtzar el seu ús. No obstant, les definicions dels paràmetres o la manera de calcular-los pot variar d'una organització a l'altra. A continuació es descriuen els paràmetres que són més utilitzats en la validació dels mètodes cromatogràfics en l'anàlisi alimentària <sup>(134, 190)</sup>:

- i) Recta de calibratge. Es mesura la linearitat del calibratge mitjançant el coeficient de correlació  $-R^2-$ . Una bona linearitat assegura una bona relació entre la concentració d'analit present a la mostra i la senyal obtinguda.
- ii) Límit de detecció –LOD–. És la concentració mínima d'un analit que pot ser detectada amb fiabilitat. En HPLC, la manera més corrent de mesurar-la és multiplicant per tres el soroll de fons d'un cromatograma –intensitat de senyal en absència de pic–. Es considera LOD la concentració d'analit corresponent a un pic tres vegades més alt que el soroll de fons extret d'un cromatograma –senyal/soroll =3–.
- iii) Límit de quantificació –LOQ–. Similar a l'anterior, però en aquest cas és la concentració mínima que pot ser quantificada amb fiabilitat. Per al seu càlcul s'utilitza  $s/n = 10$ . El LOD i el LOQ són paràmetres de validació instrumentals, ja que depenen de les aptituds dels equips instrumentals utilitzats.
- iv) Exactitud –accuracy–. És el grau d'aproximació del valor mesurat respecte al resultat real. Per al seu càlcul s'utilitzen materials de referència, mostres fortificades o comparacions interlaboratorials.

Sovint s'utilitza la recuperació –recovery– com a mesura de l'exactitud. S'analitzen dues mostres, una fortificada i una sense fortificar. La recuperació és el percentatge d'analit afegit a la mostra fortificada que ha estat efectivament quantificat amb el mètode. La recuperació també permet calcular quines

pèrdues d'analit s'han produït durant el procés d'extracció i anàlisi –si la fortificació es realitza abans de l'extracció–. En mètodes d'anàlisi amb calibratge extern, convé aplicar un factor de recuperació per tenir en compte aquestes pèrdues en els resultats.

- v) Precisió. És el grau d'aproximació entre diferents mesures efectuades a la mateixa mostra. És una mesura de les desviacions aleatòries degudes al procés analític, sense tenir en compte si els valors s'aproximen o no als valors reals. La precisió normalment s'expressa amb la desviació estàndard –SD– o el coeficient de variació –%RSD– d'una sèrie de repeticions analítiques. Per estimar la precisió s'utilitzen habitualment dos paràmetres, la repetibilitat –*repeatability*–, mesurada amb anàlisis realitzades per un mateix operador, utilitzant el mateix instrumental i al llarg d'un mateix dia –intradia– o en dies diferents –interdia–, i la reproductibilitat –*reproducibility*–, amb mesures realitzades en diferents laboratoris per diferents operadors –validació interlaboratorial–.
- vi) Robustesa –*robustness*–. És la capacitat d'un mètode per reproduir els mateixos resultats en condicions analítiques diferents. Es calcula realitzant anàlisis diferents modificant deliberadament alguns paràmetres, per tal d'identificar aquells paràmetres que més poden influenciar els resultats obtinguts.

D'altra banda, convé controlar regularment que certs paràmetres instrumentals funcionen correctament, especialment si s'observa que algun dels paràmetres de validació es desvia de la normalitat. En HPLC, les possibles fonts d'error instrumentals són <sup>(134)</sup>:

- i) Injector. Desviacions en el volum d'injecció, que comporten una disminució en la precisió dels resultats.
- ii) Fase mòbil. Desviacions en la composició afecten el temps de retenció dels analits. La fase mòbil també és una possible font de contaminació.
- iii) Flux de fase mòbil. Poca estabilitat i variacions en la pressió afecten l'exactitud i la precisió dels resultats.
- iv) Temperatura de la columna. La precisió pot veure's afectada per la mala estabilitat de la temperatura.
- v) Columna. Un mal funcionament de la columna pot afectar dràsticament l'exactitud i la precisió dels resultats. L'eficàcia separadora d'una columna pot

mesurar-se mitjançant el valor de plats teòrics – $N$ –, que pren un valor concret per a cada analit. Una manera habitual de calcular  $N$  és mitjançant l'expressió

$$N = a \left( \frac{RT}{W_{1/2}} \right)^2$$

on  $a$  és la constant 5,54,  $RT$  el temps de retenció –min– i  $W_{1/2}$  l'amplada del pic a mitja altura. Desviacions de  $N$ , dels temps de retenció i/o de la simetria dels pics poden ser indicadors del mal funcionament de la columna.

- vi) Detector. Un mal funcionament del detector produeix problemes de sensibilitat i soroll de fons, a part de problemes de precisió i exactitud en els resultats.

La injecció d'una mostra consistent en només fase mòbil –blanc– permet detectar alguns dels problemes esmentats. El cromatograma resultant reflecteix la línia base, és a dir, la intensitat de senyal produïda pel pas de fase mòbil pel detector i pel soroll instrumental. L'únic pic hauria de ser degut a la injecció; la presència de més pics significa la presència de contaminants a la fase mòbil o a la columna o bé la retenció excessiva d'un compost en una analítica anterior. Els sistemes HPLC permeten controlar la línia base abans d'injectar les mostres. En iniciar el flux, la línia base sol presentar una deriva que tarda uns minuts en estabilitzar-se. Si la deriva de la línia base persisteix, reflecteix un problema de pressió degut a un flux de fase mòbil excessiu o a l'obturació de la fase estacionària de la columna.

## 1.7 Objectius de la recerca i metodologia emprada

Els objectius principals de la tesi són els següents:

- i) Identificació dels compostos fenòlics més rellevants, des d'un punt de vista quantitatiu, en dues matrius vegetals distintes i incloent varietats de distribució limitada. Desenvolupament de nous mètodes d'anàlisi quantitatius per als compostos fenòlics identificats a cada una de les matrius, ràpids, senzills i adients per a estudis que requereixin un gran nombre de mostres.*
- ii) Aplicació d'un nou mètode de quantificació de compostos fenòlics en un estudi global sobre l'efecte de les tècniques agronòmiques en la composició nutricional d'una aliment vegetal.*
- iii) Identificació dels compostos fenòlics més rellevants en productes carnis elaborats amb l'addició d'extractes vegetals rics en compostos fenòlics, i desenvolupament d'un nou mètode per a quantificar-los. Aplicació del mètode en un estudi sobre l'impacte del procés d'elaboració en la seva estabilitat.*

Per a la consecució de l'objectiu *i)* es van identificar dos aliments vegetals de reconegut pes dins la dieta dels països mediterranis, com són l'enciam i el tomàquet. Els dos aliments representen dues matrius ben diferenciades, el primer com a hortalissa foliar i el segon com a fruit carnós. Per a la identificació dels compostos es van utilitzar les dades cromatogràfiques obtingudes mitjançant sistemes HPLC-DAD i UHPLC-DAD-MS.

És habitual que es requereixin grans quantitats de mostra per determinar l'efecte de determinades condicions de cultiu, processat, etc. sobre la composició nutricional d'aliments vegetals. Així doncs, el mètode d'anàlisi ideal per a estudis d'aquest tipus hauria de contemplar el màxim possible els següents punts:

- Identificació i quantificació d'un nombre de compostos significatiu i representatiu del perfil real present en les mostres.
- Ràpid, senzill i eficaç, capaç d'absorbir un nombre elevat de mostres en un temps limitat.

- Estar adequadament validat.

Els nombrosos mètodes d'anàlisi de compostos fenòlics disponibles en la literatura manquen en almenys un d'aquests punts. Crozier i col·laboradors <sup>(3)</sup>, alerten de la falta de dades exhaustives i fiables sobre el contingut fitoquímic d'aliments vegetals, que limiten les conclusions que es poden extreure dels estudis epidemiològics. Així doncs, per a l'assoliment del segon objectiu, els tres punts esmentats es prengueren com a eix troncal durant el desenvolupament dels nous mètodes d'anàlisi, i suplementar així el buit existent en la metodologia disponible. S'utilitzaren sistemes HPLC-DAD, una tecnologia d'abast comú en laboratoris d'anàlisi d'aliments. Per a l'extracció i anàlisi es va donar prioritat a tècniques ràpides i d'ús corrent en laboratoris d'anàlisi d'aliments. En aquesta línia, es va descartar la deshidratació i la liofilització de les mostres, i es va incorporar l'ús d'ultrasons per accelerar l'extracció. Finalment, es va requerir una validació dels mètodes per a confirmar-ne la fiabilitat del seu ús en estudis de composició nutricional.

La consecució de l'objectiu **i)** es detalla en els capítols segon i tercer de la present tesi, en enciam i tomàquet respectivament. Les varietats utilitzades inclouen dues de cultiu generalitzat –enciam *Romaine* i tomàquet *Caramba*– i dues d'àmbit regional català –tomàquets *Montserrat* i *Pera de Girona*–. Les varietats de tomàquet s'escolliren amb la finalitat d'aportar dades nutricionals inèdites de tres varietats sobre les quals no es disposava de coneixement previ pel que fa al perfil de compostos fenòlics.

L'objectiu **ii)** s'engloba dins el projecte TRUEFOOD del sisè programa marc de la Comissió Europea –6<sup>th</sup> Framework Programme– <sup>(74)</sup>. En aquest context, es va aplicar un nou mètode d'anàlisi HPLC-DAD de compostos fenòlics en un estudi sobre l'impacte de tècniques fungicides ecològiques sobre la qualitat nutricional del tomàquet *Belladonna*. En aquest estudi, la composició nutricional de les mostres estigué representada pel seu contingut de flavonoides, carotenoides, àcid ascòrbic i oligoelements. La consecució del segon objectiu es descriu en el capítol quart.

L'addició d'extractes vegetals rics en compostos fenòlics en productes carnis obre un ampli ventall de possibilitats i d'aplicacions, d'interès tecnològic i/o nutricional. L'ús de compostos fenòlics com a additius alimentaris comporta necessàriament el coneixement de l'estabilitat d'aquests compostos dins de l'aliment. La pràctica totalitat dels estudis realitzats en aquest sentit es limiten a la determinació de l'activitat antioxidant de les mostres, i hi ha per tant una manca d'informació pel que fa a l'estabilitat dels compostos fenòlics dins de matrius càrnies. En aquest sentit, per a l'acompliment de l'objectiu **iii)**, s'utilitzaren dos embotits secs curats de consum generalitzat en l'àmbit català i espanyol: el fuet i la llonganissa. D'altra banda, es van identificar tres extractes vegetals comercials




diferents amb molt elevat contingut fenòlic i disponibles per al seu ús en la indústria alimentària, dos d'ells de llavor de raïm i un de cacau. La manufactura dels fuets i les llonganisses utilitzats en l'estudi seguí el procediment tradicional propi per a l'elaboració d'aquests dos embotits, llevat de l'ús dels extractes en la seva formulació. La identificació dels compostos fenòlics presents en les mostres, així com el mètode d'anàlisi i quantificació desenvolupat, es basà en les dades obtingudes mitjançant anàlisis UHPLC-DAD-MS. Per a l'estimació de l'estabilitat dels compostos, es consideraren tres moments representatius de l'elaboració i la vida útil dels productes embotits curats: el moment d'embotit –inici–, el final del procés de curació –aproximadament un mes després de l'embotit– i el final de la vida útil –tres mesos després de l'embotit–. L'objectiu *iii)* es troba detallat en el capítol cinquè d'aquesta tesi.

---

**2.**

**Analysis of eleven phenolic compounds including novel *p*-coumaroyl derivatives in lettuce –*Lactuca sativa* L.– by UHPLC-PAD-MS**



*Transcripció de l'article original publicat a la revista **Phytochemical Analysis**, número 22 (2011), pàgs. 555-563.*

## 2.1 Abstract

Lettuce is a widely consumed vegetable and a good source of phenolic compounds. Several factors –genetic, agronomical and environmental– can influence the lettuce composition; their effects are not completely defined and more studies are needed on this topic.

The objective of this study is to develop an improved ultra-high-performance liquid chromatography –UHPLC– method to quantify the main target intact phenolic compounds in lettuce.

UHPLC identification of the compounds was supported by PAD spectra and MS<sup>n</sup> analyses. Quantification was carried out by PAD, by creating standard addition calibration curves at the specific wavelength for each compound.

Sample pretreatment was simplified, with neither purification nor hydrolysis steps. Chromatographic conditions were chosen to minimise matrix interferences and to give a suitable separation of the major phenolic compounds within 27 min. The method allowed the quantification of 11 intact phenolic compounds in Romaine lettuces, including phenolic acids –caffeoyl and *p*-coumaroyl esters– and flavonoids –quercetin glycosides–. Four *p*-coumaroyl esters were tentatively identified and quantified for the first time in lettuce.

The main intact phenolic compounds, including four novel *p*-coumaroyl esters, were simultaneously quantified in lettuce with optimal performances and a reduced total time of analysis. These findings make headway in the understanding of the lettuce phytochemicals with potential nutritional relevance.

## 2.2 Introduction

Diet is an important factor to promote a good health status and it is widely accepted that the consumption of vegetables reduces the risk of some chronic diseases, especially those that cause an important burden in industrialised countries <sup>(73)</sup>. Vegetable food products provide a significant source of phenolic compounds, secondary plant metabolites that have been shown to have beneficial effects on human health <sup>(3, 72)</sup>. Lettuce –*Lactuca sativa* L.– is a commonly consumed vegetable all over the world and a good source of different classes of phenolic compounds, mainly belonging to the groups of phenolic acids and flavonoids <sup>(191, 192)</sup>.

Several studies have shown that abundance of phenolic compounds in lettuce tissues can be affected by genetic –variety–, agronomical –fertilisation, crop protection strategies, etc.– and environmental factors <sup>(6, 193)</sup>. In order to evaluate the impact of these factors on the nutritional quality of lettuce, suitable methods for routine analyses of the phenolic profile are needed, paying special attention to their time and cost.

Extraction of phenolic compounds in lettuce samples has principally been performed using methanol, often mixed with water, acetone and/or an organic acidifier <sup>(194, 195)</sup>. Sonication during extraction has been proved to be a good deal for its simplicity, low cost and positive effects on extraction in vegetable samples <sup>(196)</sup>. Several HPLC protocols include an SPE purification of the crude extracts in order to reduce sample interferences <sup>(193, 197)</sup>.

Acid hydrolysis of glycosilated flavonoids and phenolic acid esters –naturally occurring in vegetables– has been proposed to allow the evaluation of the phenolic composition in lettuce samples, especially when simple UV detectors are used. After hydrolysis, caffeic acid, cyanidin, quercetin, luteolin, myricetin, kaempferol and apigenin have been found in lettuce sample extracts <sup>(43, 198)</sup>. Acid hydrolysis entails longer sample treatment and the risk of artefact formation. Since the purpose of many studies is the characterisation of the naturally occurring phenolic compounds –including glycosilated flavonoids and phenolic acid esters–, analysis of intact phenolic compounds is considered adequate, even if it requires the use of more sophisticated instrumentation, such as MS or NMR <sup>(196, 199)</sup>.

Recent studies, focused on the quantification of intact compounds, have shown that dicaffeoyltartaric acid –DiCaTA– and 5-caffeoylquinic acid –5-CaQA– are the main phenolic compounds in lettuce. Other caffeic acid derivatives and glycosilated flavonoids have also been found –caffeoyltartaric acid, CaTA; 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-DiCaQA;

caffeoylmalic acid, CaMA; quercetin, kaempferol, luteolin and cyanidin derivatives–, although some of them seem to be related to specific varieties<sup>(192, 194, 200)</sup>. Even though *p*-coumaric acid derivatives are common in vegetables<sup>(3, 14)</sup> only the non-conjugated form has been characterised in lettuce samples<sup>(93, 201)</sup>.

Currently, the introduction of ultra-high-performance liquid chromatography –UHPLC– columns with porous particles smaller than 2 µm provides reduced retention times and/or improves dramatically the theoretical plate numbers –greater than 100000–, compared with conventional HPLC<sup>(183)</sup>. UHPLC has been successfully applied to characterise the phytochemical profiles in several vegetable extracts<sup>(202, 203)</sup>. The aim of this work was to develop an improved UHPLC-PAD method to quantify the main intact phenolic compounds of lettuce. A minimal processing pretreatment of sample was applied to reduce the total time of analysis, while compounds identification was supported by MS<sup>n</sup>.

## 2.3 Materials and methods

### *Reagents, solvents and standards*

Ultra-pure water was obtained with a Milli-Q Advantage system of Millipore Iberica –Madrid, Spain–. Methanol was HPLC-grade from J.T. Baker –Deventer, The Netherlands–. Formic acid was purchased from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–.

Standards of 5-CaQA [CAS no. 327-97-9], *p*-coumaric acid [CAS no. 501-98-4] and quercetin-3-*O*-rutinoside –Q-Rut– [CAS no. 207671-50-9] were obtained from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–; 1,3-dicaffeoylquinic acid –1,3-DiCaQA– [CAS no. 1182-34-9], CaTA [CAS no. 67879-58-7] and CaMA [CAS no. 39015-77-5] were obtained from ChromaDex –Santa Ana, CA, USA–; quercetin-3-*O*-glucuronide –Q-Gluc– [CAS no. 22688-79-5] was obtained from TransMIT –Gießen, Germany–; and DiCaTA [CAS no. 6537-80-0] was obtained from PhytoLab –Vestenbergsgreuth, Germany–. All standards were diluted in methanol HPLC-grade –J.T. Baker, Deventer, The Netherlands– (1000 µg/mL), and stored at –40°C in darkness.

### **Samples**

Ten lettuce samples of Romaine variety –*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*– were obtained from an experimental field in Cabrils –Barcelona, Spain– in 2007. On the day of harvest, outer leaves were discarded and samples were packed in aluminium bags under vacuum, and stored at –80°C. Three additional commercial lettuces –Romaine variety– were purchased in a grocery store and kept at –80°C. Samples were analysed within 6 months.

### **Extraction**

Whole frozen lettuces were minced in a blender-mixer Blixer 3 –Robot Coupe, Isleworth, UK– in the presence of carbon dioxide ice. Five grams of frozen sample were placed in a centrifuge tube with 20 g of cold (4°C) methanol. Tubes were sonicated for 15 min at 0°C in an ultrasonic bath –J.P. Selecta, Abrera, Spain– and centrifuged at 17400g for 10 min at 4°C in a J2-MC centrifuge –Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA–. Aliquots of 4 g of methanolic extract were evaporated to dryness with nitrogen, reconstituted with 1 mL of mobile phase A –water 94.9%–methanol 5.0%–formic acid 0.1%, v/v/v– and filtered through PTFE 0.2 µm porosity filters –Teknokroma, Sant Cugat, Spain–.

### **UHPLC analysis**

The UHPLC chromatographic system consisted of an Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, USA), equipped with a photodiode array detector –PAD–, an electrospray –ESI– as a source of ionisation and a triple quadrupole mass spectrometer. The system was controlled by MassLynx 4.1 software –Waters, Milford, MA, USA–. The chromatographic separation was carried out with an HSS T3 100 × 2.1 mm i.d. column with 1.8 µm particle size –Waters, Milford, MA, USA–, kept at 35°C. A linear gradient elution was carried out by varying the composition of mobile phase from initial 100% A –water 94.9%: methanol 5.0%:formic acid 0.1%, v/v/v– to 50% B –methanol 60.0%: water 39.9%:formic acid 0.1%, v/v/v– at 30 min, with a flow-rate of 0.50 mL/min. Sample vials on the injector were maintained at 4°C; the injected volume was 10 µL.

Electrospray was operated in the negative mode (ESI–); the source temperature was fixed at 140°C, the capillary voltage was set at 2.5 kV and the desolvation temperature was set at 350°C. The cone gas –nitrogen– flow-rate was 350 L/h. MS experiments were carried out in “scan” mode, in order to obtain m/z values of molecular ions. MS<sup>2</sup> experiments were performed in “daughter ions” mode, in order to obtain the fragmentation patterns of pseudomolecular ions. MS<sup>2</sup> parameters for each target

compound were optimised by standards infusion, using the AutoTune software tool for testing the optimal values of cone voltage and collision energy. The collision gas used was argon, at 0.1 mL/min flow-rate. MS<sup>3</sup> experiments were carried out by increasing the cone voltage up to 45 V, to induce a first fragmentation in the cone. Selected daughter ions were further fragmented, and their product ions –granddaughter ions– were evaluated in the “daughter ions” mode.

### **Identification**

Peaks obtained in UHPLC system were identified by comparing their retention times, UV spectra, MS and MS<sup>n</sup> data with data obtained from pure commercial standards. When peak data did not agree with available standards, bibliographic data was used for their tentative identification.

### **Quantification**

Calibration curves were created by spiking lettuce samples with different amounts of standard compounds, in order to obtain a concentration range in agreement with the levels observed in lettuce samples. Tentatively identified compounds –with no standard available– were quantified as equivalents of the most similar compound, taking into account their molecular weight. Peak areas were registered at 310 nm –*p*-coumaric acid derivatives–, 330 nm –caffeic acid derivatives– and 350 nm –flavonols–.

### **Method validation**

The number of theoretical plates –*N*– was calculated by injecting 100 ng of *p*-coumaric acid, 5-CaQA, 1,3-DiCaQA, CaMA, CaTA, DiCaTA, Q-Gluc and Q-Rut. Limits of detection –LOD– were calculated as the concentration corresponding to S/N of 3 on the basis of the response of natural and spiked samples. Absolute recoveries were estimated by comparing spiked sample and the response of external standard at the same concentration. Accuracy was evaluated by analysing three spiked samples at two different concentration levels and comparing the observed concentration with the corresponding expected concentrations. Interday repeatability of the method was estimated by analysing standards solution per triplicate in two different days.

## 2.4 Results and discussion

### UHPLC-PAD-MS<sup>n</sup> identification

Fig. 2.1 shows a typical chromatogram of a Romaine lettuce extract. Chromatographic conditions were chosen to separate the main peaks within twenty-seven minutes. A satisfactory resolution between the target phenolic compounds was observed, with a number of theoretical plates ranging from 19000 –caffeoyltartaric acid– to 194000 –quercetin-3-*O*-rutinoside–. These results are better than those obtained with other HPLC methods focused on phenolic compounds<sup>(192, 194, 200, 204)</sup>. Interferences of other matrix components were minimised, even using a simplified extraction procedure. Retention times, UV–vis spectra, MS<sup>n</sup> conditions and yielded ionic fragments of target peaks are shown in Table 2.1.

UV–vis spectra of the target compounds showed three spectrum typologies, corresponding to three phenolic groups<sup>(27, 205)</sup>: (i) flavonols, with two maximum bands at  $\lambda$  254–256 and 352–354 nm –peaks 9 and 11–; (ii) caffeic acid derivatives, with a

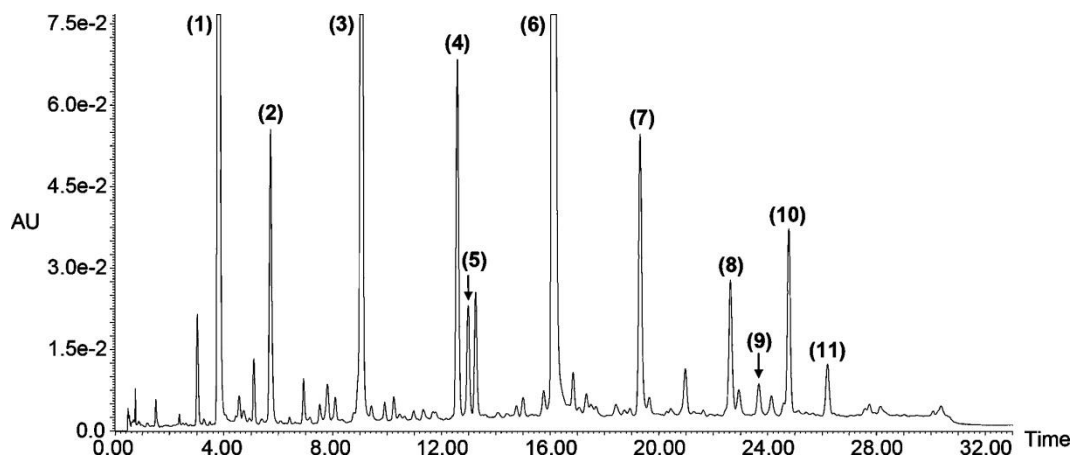


Fig. 2.1 Typical UHPLC-DAD chromatogram of lettuce extract recorded at  $\lambda = 330$  nm.



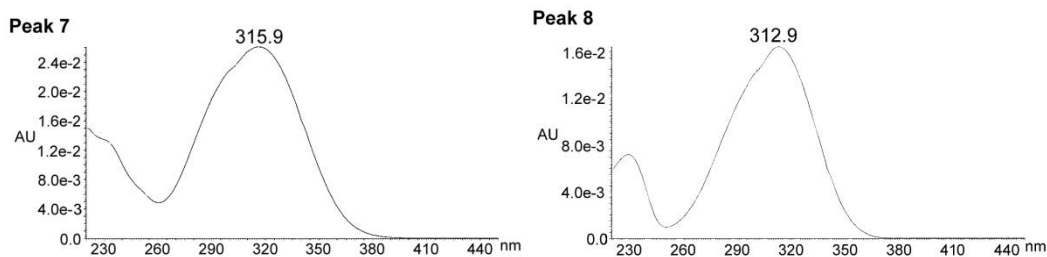


Fig. 2.2 PAD spectra of peaks 7 and 8 –*p*-coumaroyl derivatives–.

maximum band at  $\lambda$  325–328 nm –peaks **1**, **3**, **5**, **6** and **10**–; and (iii) *p*-coumaric acid derivatives, with a maximum at  $\lambda$  311–313 nm –peaks **2**, **4** and **8**–. Peak **7** showed a merged spectrum between caffeic and *p*-coumaric acid derivatives, with a maximum at  $\lambda$  316 nm (Fig. 2.2).

On the basis of the identification parameters, peaks **1**–**11** were identified as shown in Table 2.1. Molecular structures of the compounds are proposed in Fig. 2.3. Several recurrent daughter ions produced in MS<sup>2</sup> experiments were useful to allocate the candidate in a phenolic group and to define the structure of the parent ion (Table 2.2). For instance, the daughter ion at  $m/z$  191 T2 ([quinic acid – H]<sup>–</sup>), typical of esters with quinic acid<sup>(206)</sup>, was found in peaks **3**, **4** and **10**.

Peaks **1**, **3**, **5**, **6** and **9** were identified as CaTA, 5-CaQA, CaMA, DiCaTA and Q-gluc –respectively–, on the basis of their concordance with retention time, UV–vis spectra and MS<sup>2</sup> fragmentation of the pure standards.

Table 2.1

Chromatographic, spectroscopic and spectrometric identification parameters of the main peaks in crude extracts

Peak	Compound	$t_R \pm SD$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	MS [M–H] <sup>–</sup> ( $m/z$ )	MS <sup>2</sup> daughters* ( $m/z$ )
1	CaTA <sup>§</sup>	3,75 ± 0,03	327	-25	15	311	179 (100 %) 149 (100 %)
2	CoTA	5,72 ± 0,01	313	-30	15	295	163 (100 %) 149 (20 %)
3	5-CaQA <sup>§</sup>	9,11 ± 0,02	325	-30	15	353	191 (100 %)

Table 2.1

*Continued*

4	5-CoQA	12,64 ± 0,03	311	-25	17	337	191 (100 %) 173 (15 %) 163 (10 %)
5	CaMA <sup>§</sup>	13,04 ± 0,03	328	-30	12	295	179 (20 %), 133 (100 %)
6	DiCaTA <sup>§</sup>	16,13 ± 0,03	328	-30	12	473	311 (100 %) 293 (30 %) 179 (15 %) 149 (20 %)
7	CoCaTA	19,29 ± 0,02	316	-30	15	457	311 (70 %) 295 (65 %) 277 (75 %) 179 (100 %) 163 (25 %) 149 (20 %)
8	DiCoTA	22,60 ± 0,02	313	-30	12	441	295 (30 %) 277 (100 %) 203 (20 %) 163 (20 %)
9	Q-Gluc <sup>§</sup>	23,69 ± 0,03	256, 353	-30	20	477	301 (100 %) 273 (30 %) 245 (20 %)
10	3,5-DiCaQA	24,83 ± 0,03	328	-30	17	515	353 (100 %) 335 (10 %) 191 (20 %) 179 (15 %) 173 (10 %)
11	Q-MaGlu	26,21 ± 0,03	255, 354	-30	25	549	505 (50 %) 463 (15 %) 415 (20 %) 317 (20 %) 301 (100 %)

\* Relative ion intensities within parentheses.

<sup>§</sup> Identification supported by commercial standard.

Compounds: **1**, caffeoyltartaric acid, caftaric acid; **2**, p-coumaroyltartaric acid, coutaric acid; **3**, 5-caffeoylquinic acid –nomenclature according to IUPAC<sup>(15)</sup> –, chlorogenic acid; **4**, 5-p-coumaroylquinic acid; **5**, caffeoylmalic acid; **6**, dicaffeoyltartaric acid, chicoric acid; **7**, p-coumaroylcaffeoyltartaric acid; **8**, di-p-coumaroyltartaric acid; **9**, quercetin-3-O-glucuronide; **10**, 3,5-dicaffeoylquinic acid; **11**, quercetin malonylglucoside.

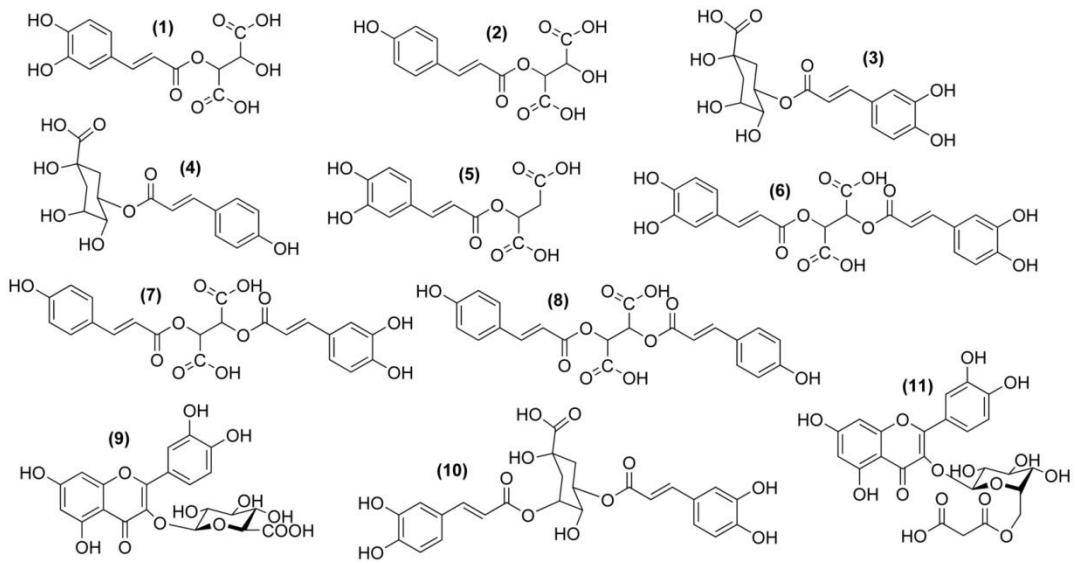


Fig. 2.3 Proposed molecular structures of the quantified compounds in lettuce extracts. Peaks identification as in Table 2.1.

Table 2.2

Recurrent fragment ions yielded in MS<sup>n</sup> experiments

<i>m/z</i>	Fragment ions	Compounds containing the fragment
119	[Coumaric acid – COOH] <sup>-</sup>	CoCaTA <sup>*</sup> , DiCoTA <sup>*</sup>
133	[Malic acid – H] <sup>-</sup>	CaMA <sup>§</sup>
135	[Caffeic acid – COOH] <sup>-</sup>	CoCaTA <sup>*</sup> , 3,5-DiCaQA <sup>*</sup>
149	[Tartaric acid – H] <sup>-</sup>	CaTA <sup>§</sup> , CoTA <sup>§</sup> , DiCaTA <sup>§</sup> , CoCaTA <sup>*§</sup> , DiCoTA <sup>*</sup>
163	[Coumaric acid – H] <sup>-</sup>	CoTA <sup>§</sup> , 5-CoQA <sup>§</sup> , CoCaTA <sup>*§</sup> , DiCoTA <sup>*§</sup>
173	[Quinic acid – H <sub>2</sub> O – H] <sup>-</sup>	5-CoQA <sup>§</sup> , DiCaQA <sup>§</sup>
179	[Caffeic acid – H] <sup>-</sup>	CaTA <sup>§</sup> , CaMA <sup>§</sup> , DiCaTA <sup>§</sup> , 3,5-DiCaQA <sup>§</sup> , CoCaTA <sup>*§</sup>
191	[Quinic acid – H] <sup>-</sup>	5-CaQA <sup>§</sup> , 5-CoQA <sup>§</sup> , 3,5-DiCaQA <sup>*§</sup>
277	[Coumaroyltartaric – H <sub>2</sub> O – H] <sup>-</sup>	CoCaTA <sup>§</sup> , DiCoTA <sup>§</sup>
293	[Caffeoyltartaric – H <sub>2</sub> O – H] <sup>-</sup>	DiCaTA <sup>§</sup>
295	[Coumaroyltartaric – H] <sup>-</sup>	CoCaTA <sup>§</sup> , DiCoTA <sup>§</sup>
301	[Quercetin – H] <sup>-</sup>	Q-Gluc <sup>§</sup> , Q-MaGlu <sup>§</sup>
311	[Caffeoyltartaric – H] <sup>-</sup>	DiCaTA <sup>§</sup> , CoCaTA <sup>§</sup>
353	[Caffeoylquinic acid – H] <sup>-</sup>	3,5-DiCaQA <sup>§</sup>
463	[Quercetin glucoside – H] <sup>-</sup>	Q-MaGlu <sup>§</sup>
505	[Quercetin malonylglucoside – COOH] <sup>-</sup>	Q-MaGlu <sup>§</sup>

\* Obtained in MS<sup>3</sup> experiments.

§ In MS<sup>2</sup> experiments.

UV, MS, MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> data obtained for peak **10** allowed this peak to be tentatively identified as 3,5-dicaffeoylquinic acid –3,5-DiCaQA–<sup>(207)</sup>, with a MS<sup>3</sup> base peak at m/z 191 for the MS<sup>2</sup> fragment yielded at m/z 353. Peak **11** was tentatively identified as quercetin malonylglucoside –Q-MaGlu– by comparing obtained data with information found in lettuce<sup>(195)</sup> and other plant samples<sup>(196, 208)</sup>. Peaks **2** and **4** were tentatively identified as *p*-coumaroyltartaric acid –CoTA– and 5-*p*-coumaroylquinic acid –5-CoQA, respectively–, by comparison with bibliographic data<sup>(196, 209-211)</sup>.

No bibliographic information fit with the identification parameters of peaks **7** and **8**. Therefore a tentative identification was suggested on the basis of their UV–vis spectra, molecular weight of parent ions and MS<sup>n</sup> fragmentation patterns. Peak **7** yielded MS<sup>2</sup> fragment ions at m/z 179 ([caffeic acid – H]<sup>–</sup>), m/z 163 ([*p*-coumaric acid – H]<sup>–</sup>) and m/z 149 ([tartaric acid – H]<sup>–</sup>), indicating the simultaneous presence of *p*-coumaric, caffeic and tartaric acids in its molecule. Other MS<sup>2</sup> fragments seemed to confirm a “*p*-coumaric-caffeic-tartaric” structure: ions at m/z 311 ([caffeoyltartaric – H]<sup>–</sup>), m/z 295 ([*p*-coumaroyltartaric acid – H]<sup>–</sup>) and m/z 277 ([*p*-coumaroyltartaric – H<sub>2</sub>O – H]<sup>–</sup>) (Fig. 2.4). In order to clarify the structure, an MS<sup>3</sup> analysis of the fragments at m/z 311 and m/z 295 was carried out. The MS<sup>3</sup> fragmentation of the daughter ion at m/z 311 ([caffeoyltartaric – H]<sup>–</sup>) produced ions at m/z 179 ([caffeic acid – H]<sup>–</sup>), m/z 149 ([tartaric acid – H]<sup>–</sup>) and m/z 135 ([caffeic acid – COOH]<sup>–</sup>) (Fig. 2.5a). On the other hand, the MS<sup>3</sup> fragmentation of the daughter ion at m/z 295 ([*p*-coumaroyltartaric – H]<sup>–</sup>) produced ions at m/z 163 ([*p*-coumaric acid – H]<sup>–</sup>), m/z 149 ([tartaric acid – H]<sup>–</sup>) and m/z 119 ([*p*-coumaric acid – COOH]<sup>–</sup>) (Fig. 2.5b). Therefore, peak **7** was tentatively identified as *p*-coumaroylcaffeoyltartaric acid –CoCaTA–.

In a similar way, peak **8** produced MS<sup>2</sup> daughter ions at m/z 295 ([*p*-coumaroyltartaric acid – H]<sup>–</sup>), m/z 277 ([*p*-coumaroyltartaric – H<sub>2</sub>O– H]<sup>–</sup>) and m/z 163 ([*p*-coumaric acid – H]<sup>–</sup>) (Fig. 2.6a). As described for CoCaTA, the MS<sup>3</sup> fragmentation of the daughter ion at m/z 295 ([*p*-coumaroyltartaric – H]<sup>–</sup>) yielded fragment ions at m/z 163 ([*p*-coumaric acid – H]<sup>–</sup>), m/z 149 ([tartaric acid – H]<sup>–</sup>) and m/z 119 ([*p*-coumaric acid – COOH]<sup>–</sup>) (Fig. 2.6b). This information supported the putative identification of peak **8** as di-*p*-coumaroyltartaric acid –DiCoTA–.

The order of elution of cinnamic acid derivatives reflected the highest polarity of the caffeic acid moiety in comparison with *p*-coumaric –i.e. 5-CaQA < 5-CoQA; CaTA < CoTA; DiCaTA < CoCaTA < DiCoTA–.

All the identified flavonoids were quercetin derivatives (Table 2.1); other flavonoids previously reported in lettuce, such as kaempferol, luteolin and cyanidin glycosides<sup>(193, 195)</sup> were not detected under our conditions.

Even though the presence of free *p*-coumaric acid in lettuce has been reported before<sup>(93, 201)</sup>, to the best of our knowledge this is the first time that *p*-coumaroyl derivatives have been found in lettuce. Furthermore, the presence of CoCaTA and DiCoTA has not been previously reported in vegetable tissues. Their occurrence in lettuce seems to indicate that both *p*-coumaric and caffeic acids esters may play a role in the defense mechanisms of this Compositae plant.

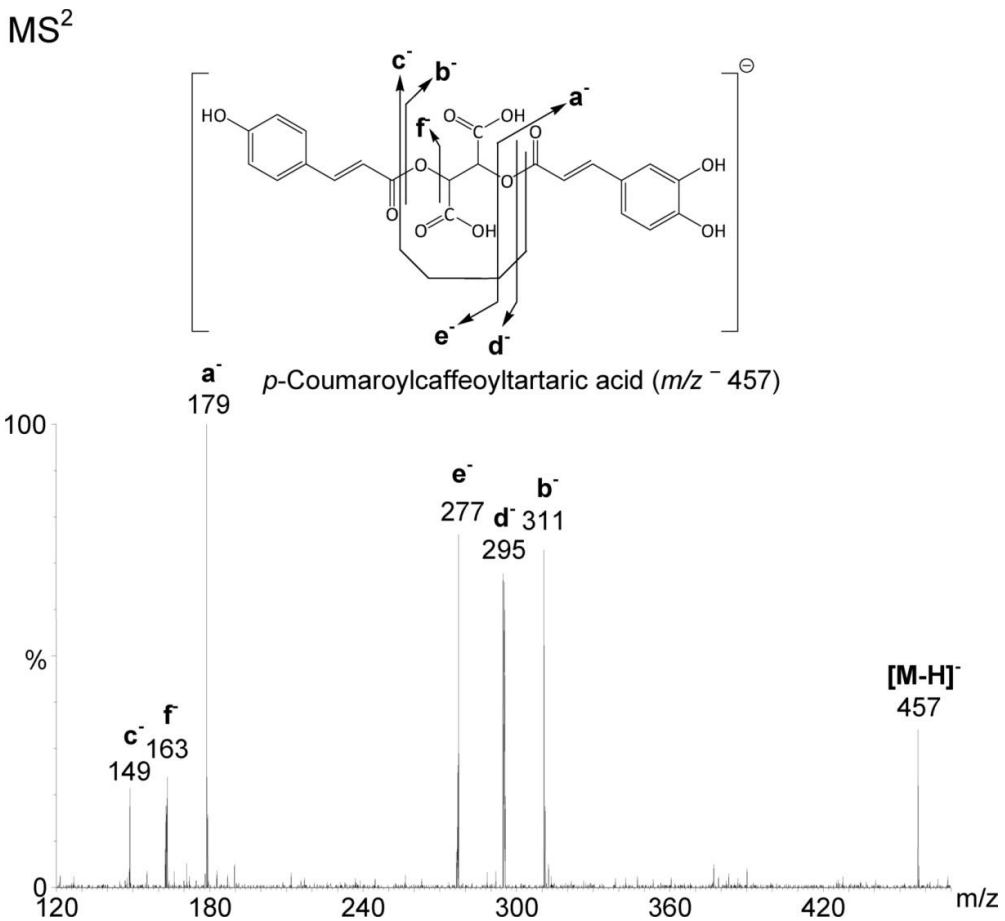


Fig. 2.4 MS<sup>2</sup> fragmentation pattern of peak 7 -CoCaTA- with the proposed molecular structure for this compound.

MS<sup>3</sup>

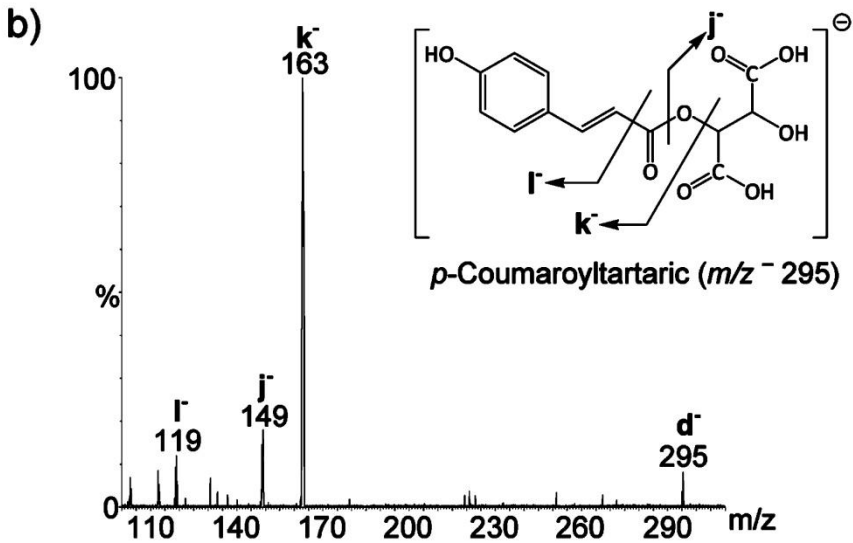
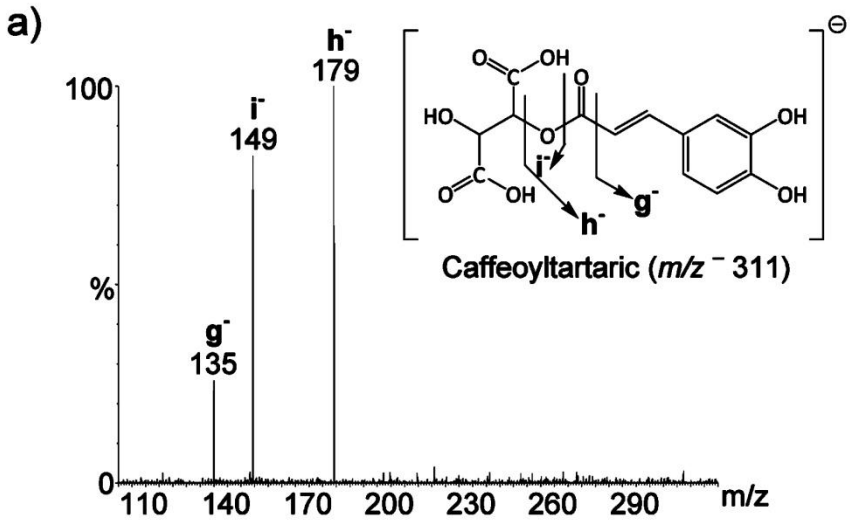
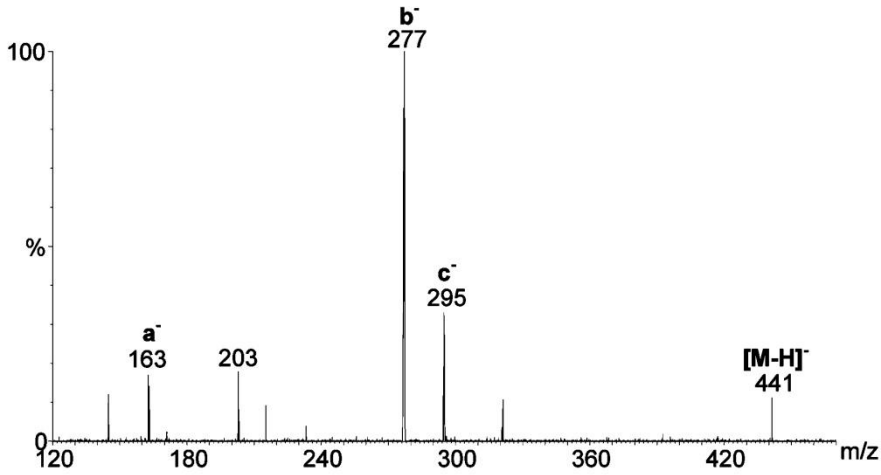
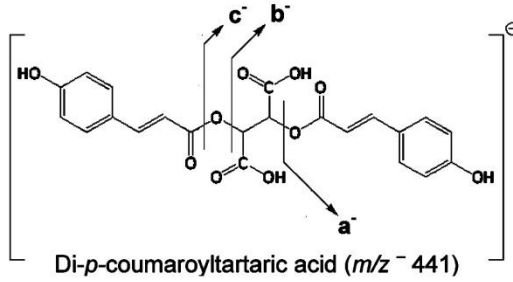


Fig. 2.5 Suggested MS<sup>3</sup> fragmentation patterns of MS<sup>2</sup> daughter ions from peak 7 –CoCaTA– at  $m/z$  311 –caffeoyltartaric– (a) and  $m/z$  295 –*p*-coumaroyltartaric– (b).

a) MS<sup>2</sup>



b) MS<sup>3</sup>

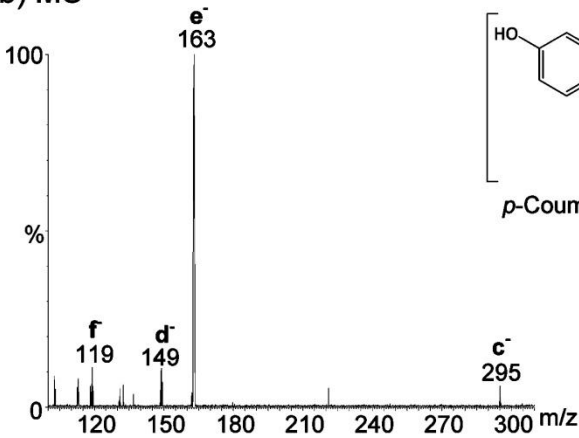
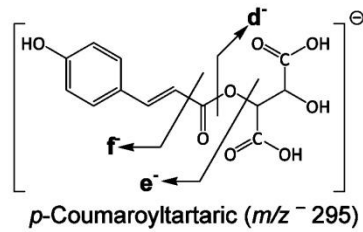


Fig. 2.6 Suggested MS<sup>2</sup> fragmentation pattern of peak 8 –DiCoTA– (a) and MS<sup>3</sup> fragmentation of the MS<sup>2</sup> daughter ion at  $m/z$  295 –*p*-coumaroyltartaric– (b).

### Method validation

Standard addition calibration equations (Table 2.3) were optimised for each compound and calibration was linear in the range of concentration considered –correlation coefficients higher than 0.99 in all cases–. Mean accuracy values were comprised between 89 and 111 %, whereas the limits of detection ranged from 100 to 800 µg/kg fresh weight (Table 2.4). Interday repeatability was lower than 7 %, while absolute recoveries ranged from 77 to 90 %.

### Sample analysis

Table 2.5 shows the results of the analyses of 13 romaine lettuces. Caffeoyl derivatives were the largest phenolic group (90 %), principally as esters with tartaric acid. *p*-Coumaroyl derivatives were about 8 % of the phenolic content of the analysed samples, mainly as esters with tartaric acid –CoCaTA has been considered both caffeoyl and *p*-coumaroyl derivative–. Quercetin derivatives were found in lesser extent (5 %). Previous works have also found that mono- and dicaffeoyl esters with tartaric and quinic acids are the main group of phenolic compounds in green varieties of lettuce<sup>(194, 195)</sup>. In several samples, *p*-coumaric acid derivatives were below the level of detection. The

**Table 2.3**  
Parameters of the matrix calibration curves

Standard	Regression*			λ of quantification (nm)
	b	a	r <sup>2</sup>	
Caffeoyltartaric acid	5.65·10 <sup>-3</sup>	0.417	0.999	330
5-Caffeoylquinic acid	1.49·10 <sup>-3</sup>	0.999	0.996	330
<i>p</i> -Coumaric acid <sup>§</sup>	2.82·10 <sup>-4</sup>	-0.047	0.999	310
Caffeoylmalic acid	6.00·10 <sup>-3</sup>	-0.164	0.996	330
Dicaffeoyltartaric acid	1.55·10 <sup>-3</sup>	1.400	0.999	330
1,3-Dicaffeoylquinic acid <sup>†</sup>	1.51·10 <sup>-3</sup>	-0.377	0.991	330
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	1.76·10 <sup>-3</sup>	-0.204	0.993	350
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside <sup>‡</sup>	2.38·10 <sup>-3</sup>	0.338	0.999	350

\* Regression equation:  $y = bx + a$ , where  $y$  is the concentration in mg/kg fresh weight and  $x$  is the peak area.

<sup>§</sup> For quantification of *p*-coumaroyltartaric acid, 5-*p*-coumaroylquinic acid, di-*p*-coumaroyltartaric acid and *p*-coumaroylcaffeoyltartaric acid.

<sup>†</sup> For quantification of 3,5-dicaffeoylquinic acid.

<sup>‡</sup> For quantification of quercetin malonylglucoside.



variability in *p*-coumaric acid derivatives content may stimulate further studies to elucidate their metabolic pathway, the agronomic factors which could affect their content and their nutritional relevance.

**Table 2.4**  
**Limits of quantification and accuracy for the UHPLC-DAD analysis**

Phenolic compound	LOD (µg/kg FW)	% Accuracy ± SD
Caffeoyltartaric acid	800	96.6 ± 11.9
<i>p</i> -Coumaroyltartaric acid	100	-
5-Caffeoylquinic acid	140	96.1 ± 11.7
5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	100	-
Caffeoylmalic acid	500	102.7 ± 6.7
Dicaffeoyltartaric acid	180	89.1 ± 6.6
<i>p</i> -Coumaroylcaffeoyltartaric acid	110	-
Di- <i>p</i> -coumaroyltartaric acid	120	-
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	140	111.0 ± 9.0
3,5-Dicaffeoylquinic acid	150	-
Quercetin malonylglucoside	220	-

FW, fresh weight.

**Table 2.5**  
**Contents (mg/kg fresh weight) of intact phenolic compounds in Romaine lettuce (n=13)**

	Median	Max	Min
Caffeoyltartaric acid	44.5	128.4	3.8
Coumaroyltartaric acid*	2.8	4.3	n.d.
5-Caffeoylquinic acid	20.9	47.3	2.9
Coumaroylquinic acid*	2.7	4.4	n.d.
Caffeoylmalic acid	4.8	13.0	1.1
Dicaffeoyltartaric acid	35.0	138.8	2.3
Coumaroylcaffeoyltartaric acid*	3.6	7.5	n.d.
Dicoumaroyltartaric acid*	3.9	7.0	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	2.1	3.7	0.2
Dicaffeoylquinic acid <sup>§</sup>	2.8	9.8	0.3
Quercetin malonylglucoside <sup>†</sup>	4.8	8.8	1.1

\*Expressed as *p*-coumaric acid equivalents.

<sup>§</sup> Expressed as 1,3-dicaffeoylquinic acid equivalents.


<sup>†</sup> Expressed as quercetin-3-*O*-rutinoside equivalents.

n.d., not detected (< LOD)

---

**3.**

**A validated HPLC-DAD method  
for routine determination of  
ten phenolic compounds in  
tomato fruits**



*Transcripció de l'article original publicat  
a la revista **Food Analytical Methods**,  
número 5 (2012), pàgs. 1137-1144.*

## 3.1 Abstract

Awareness of consumers about phenolic compounds and their positive role in human nutrition is increasing nowadays. Therefore, studies with large number of samples for determination of the effect of agronomic or processing conditions on phenolic composition of foods are arising on importance

This work describes a validated HPLC-DAD method for simultaneous quantification of ten intact phenolic compounds, including phenolic acids and flavonoids (4-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, dicaffeoylquinic acids I and II, tricaffeoylquinic acid, quercetin trisaccharide, quercetin-3-*O*-rutinoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, naringenin, and naringenin chalcone), in tomato fruit extracts.

Extraction treatment and chromatographic system were chosen with the aim of minimizing time, equipment, and disposable costs in laboratory. Method was applied for characterization, for the first time, of three Spanish tomato cultivars (“Caramba”, “Montserrat”, and “Pera de Girona”) which showed significant differences in their phenolic content.

Validation parameters for the compounds with commercially available standards (91–105% accuracy; 68–97% recovery; 5–90 µg/kg LOQ; <10% RSD repeatability; >0.99  $r^2$  for calibration curves; 5,500–115,000 M) can be considered suitable for practical purposes in high-throughput analysis.

## 3.2 Introduction

Growing evidences indicate that a vegetable based diet, rich in phenolic compounds, vitamins and fiber, can be beneficial for human health <sup>(73)</sup>. These effects have been directly correlated with the antioxidant properties of the phenolic compounds <sup>(107)</sup>, but according to recent studies, can also be associated with complex interactions between these compounds and other molecular targets involved in human metabolism <sup>(3, 72)</sup>. Tomato is the second most important vegetable crop in the world in terms of production <sup>(212)</sup>, and it is a main ingredient in worldwide diets. Its consumption is a source of several classes of phenolic compounds, mainly phenolic acids and flavonoids <sup>(198, 213)</sup>. Several studies have shown that genotype and agronomic practices such as fertilization and crop protection strategies can significantly affect the tomato phenolic profile, and consequently, its nutritional value <sup>(48, 214, 215)</sup>. Many of the published methods which evaluated single phenolic compounds in tomato were based on the hydrolysis of crude extracts. In this case, free flavonoids and phenolic acids are quantified once released from their conjugated forms, usually glycosides and esters <sup>(48, 176, 179, 215)</sup>. After acidic, alkaline or enzymatic hydrolysis, the main phenolic compounds detected in tomato extracts were chlorogenic acid, also described as 5-caffeoylquinic acid <sup>(15)</sup>, caffeic acid, quercetin, kaempferol, and naringenin <sup>(198, 216)</sup>.

Anyway, hydrolysis is a time-consuming step that can also produce the partial degradation of the native compounds and the formation of artifacts <sup>(170)</sup>. Therefore, the evaluation of the intact molecules, which are the endogenous or non-hydrolyzed compounds, seems more appealing to define their levels in vegetal tissues and to evaluate their nutritional properties and bioavailability <sup>(199)</sup>.

In the recent years, many intact phenolics have been identified in tomato fruits by HPLC-MS <sup>(199, 217-221)</sup> and HPLC-MS-NMR <sup>(36, 222)</sup>. Several HPLC methods have been proposed to quantify the main intact phenolic compounds in tomato. Anyway, if we think about a cost-effective and reliable method, the suggested methodologies could be improved in at least one of the following aspects:

- i) Long extraction and pre-treatment steps, including freeze drying <sup>(36, 214, 217, 220, 223-225)</sup>, 15-24 h maceration <sup>(220, 222, 226-228)</sup>, SPE clean-up <sup>(36, 227, 229)</sup>, or multiple extraction cycles <sup>(83, 214, 224, 225)</sup>.
- ii) Quantification of a few molecules, i.e., five compounds or less <sup>(83, 214, 228)</sup>.

- iii) Use of sophisticated instrumentation such as time-of-flight and ion-trap mass spectrometers <sup>(217)</sup>.
- iv) Lack of complete validation procedures <sup>(36, 220, 222, 224-226, 228)</sup>.

For these reasons, there is still a need for validated and cost-effective methods to carry out the complete characterization of tomato intact phenolic compounds in large experiments, involving several genetic or agronomic factors.

Consequently, the aim of this work was to obtain a reliable and simplified methodology for the quantification of a significant number of flavonoids and phenolic acids naturally occurring in tomato. Extraction procedure was simplified to improve the sample throughput. Quantification was performed with an HPLC-DAD system giving priority to its minor costs of operation, while compounds identification was confirmed by UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup>. Finally, the method was applied to define the phenolic profile of three tomato cultivars grown in Spain for the first time in literature.

## 3.3 Materials and methods

### *Chemicals*

Ultrapure water was obtained with a Milli-Q Advantage system –Millipore Ibérica, Madrid, Spain–. Methanol HPLC grade was from J.T. Baker –Deventer, The Netherlands–. Acetonitrile LC-MS grade was from Merck –Darmstadt, Germany–. Phosphoric acid and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–. Standards of caffeic acid (CAS num. 331-39-5), 5-caffeoylquinic acid (CAS num. 327-97-9), quercetin-3-*O*-rutinoside (CAS num. 207671-50-9) and naringenin (CAS num. 67604-48-2) were obtained from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–. 3-Caffeoylquinic acid (CAS num. 906-33-2) was obtained from TransMIT –Gießen, Germany–. Kaempferol-3-*O*-rutinoside (CAS num. 17650-84-9) was purchased from Extrasynthèse –Genay, France–. Naringenin chalcone (CAS num. 73692-50-9) was obtained from Apin Chemicals –Abingdon, UK–. 2 N Folin–Ciocalteu reagent was obtained from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–.

## **Samples**

Tomato –*Lycopersicon esculentum* Mill.– seedlings of the cultivars “Pera de Girona”, “Montserrat”, and “Caramba” were obtained from Gel-Bo-Plant commercial nursery –Malgrat de Mar, Spain–. “Pera de Girona” and “Montserrat” cultivars have regional importance in Catalonia and normally are consumed raw in salads. “Caramba” is one of the most produced cultivars in Spain in summer and is exported all over the world; it is a suitable for a wide range of uses, such as raw consumption in salads or processed to obtain tomato derived foods.

Twenty four plants –eight plants per variety– grew up in perlite B-12 type substrate –medium particle size 0.5 mm–, in a greenhouse at IRTA Cabrils Center –Cabrils, Spain–. Fertilization was carried out by controlled nutrient solution via drip irrigation system. One fruit per plant (n=24) were sampled at maturity stage 10 –commercial ripeness–<sup>(230)</sup>, then immediately washed with de-ionized water, packed in individual aluminum bags sealed under vacuum, stored at –80°C and analyzed within 6 months per duplicate.

## **Extraction of phenolic compounds**

Extraction was adapted and simplified from the method described by Gómez-Romero *et al.*<sup>(217)</sup>, discarding the use of a freeze-drying step. Each sample –i.e., a whole frozen fruit– was minced in a blender-mixer Blixer 3 –Robot Coupe, Isleworth, UK– in presence of CO<sub>2</sub> ice. Five grams of sample were placed in a centrifuge tube with 20 g of cold (4°C) methanol. Samples and methanol in tubes were weighed in a laboratory balance with a precision of 0.02 g. Tubes were sonicated for 15 min at 0°C in an ultrasonic bath –J.P. Selecta, Abrera, Spain– and then centrifuged at 17,400×g for 10 min at 4°C in a J2-MC centrifuge –Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA–.

Three different tomato samples were extracted twice in order to evaluate the yield of a second extraction. Total polyphenol content of extracts –as caffeic acid equivalents– was evaluated according to the method described by Asami *et al.*<sup>(231)</sup>, using Folin–Ciocalteu reagent. Absorbances were measured at 725 nm with an UV-240 Graphicord spectrophotometer –Shimadzu, Kyoto, Japan–.

For identification, aliquots of 7 g of the methanolic extract were evaporated to dryness with nitrogen, reconstituted with 1 mL of water–acetonitrile–formic acid (94.9:5.0:0.1 v/v/v) and filtered through PTFE (0.2 µm porosity) filters –Teknokroma, Sant Cugat, Spain–. For quantification, aliquots of 7 g of the methanolic extract were evaporated to dryness with nitrogen, reconstituted with 1 mL of water–methanol–phosphoric acid

(94.6:5.0:0.4 v/v/v, pH 2.5) and filtered through PTFE (0.2 µm porosity) filters –Teknokroma, Sant Cugat, Spain–.

#### ***UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup> identification***

Main phenolic compounds of methanolic extracts were characterized in a first stage by using an Acquity UPLC<sup>®</sup>-DAD-MS<sup>2</sup> chromatographic system –Waters, Milford, MA, USA– equipped with a Diode Array Detector and a Triple Quadrupole Mass Spectrometer –TQD–. Chromatographic separation was carried out in a BEH Shield RP18 (150×1.0 mm i.d., 1.7 µm particle size) column –Waters, Milford, MA, USA– at 35°C. Samples were maintained at 4°C and volume of injection was 5 µL. A linear gradient elution was carried out by varying the composition of mobile phase from initial 100% mobile phase A –water–acetonitrile–formic acid 94.9:5.0:0.1 v/v/v– to 28% mobile phase B –water–acetonitrile–formic acid 39.9:60.0:0.1 v/v/v– at 25 min, with a flow rate of 0.130 mL/min. TQD operated on negative electrospray ionization mode (ESI–); the source temperature was fixed at 140°C, the capillary voltage was set at 2.5 kV, the cone voltage was set at –30 V, and the desolvation temperature was set at 350°C. The cone gas –nitrogen– flow rate was 350 L/h. Argon was used as collision gas at 0.1 mL/min flow rate.

UHPLC peaks were identified on the basis of their retention times, UV–vis spectra, MS, and MS<sup>2</sup> information, by comparing these data with those obtained from pure standards. When no commercial standard was available, bibliographic data were used for a tentative identification.

#### ***HPLC-DAD quantification***

Identification of peaks obtained in the UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup> system was transferred to HPLC-DAD chromatograms, comparing their retention times, relative intensities, and DAD spectra of the same extracts injected in both systems. Even if samples could be analyzed for quantification in the UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup> as well, the system transference allowed the analysis of tomatoes in a more simple and universal equipment which required less disposable costs and less-trained operators.

HPLC-DAD analyses were carried out in a Breeze system –Waters, Milford, MA, USA–, equipped with a 1525 Binary HPLC Pump, a 2996 Photodiode Array Detector and a XBridge Shield RP<sub>18</sub> BEH column (150×4.6 mm i.d., 3.5 µm particle size) –Waters, Milford, MA, USA–. Column was maintained at 35°C and elution was carried out with a linear gradient between mobile phase A –water–methanol–phosphoric acid 94.98:5.00:0.02

v/v/v, pH 2.5– and mobile phase B –methanol–phosphoric acid 99.98:0.02 v/v, pH 2.5– from 30% B to 55% B in 45 min at 1.1 mL/min flow rate. Sample extracts were kept at 4°C in the auto-sampler, and the injected volume was 80 µL. UV–vis spectra were acquired in the range 210–450 nm with the Empower 2 Pro® software –Waters, Milford, MA, USA–. Purity of all quantified peaks in sample extracts was checked by calculating the peak purity with the Empower® software –Waters, Milford, MA, USA–.

HPLC-DAD quantification was made by creating external calibration curves for those compounds with commercial standard available. Absolute recoveries and sample dilution were taken into account. A suitable range of standard concentrations was considered (n=8 for each compound) to cover the concentration ranges observed in real samples. When no commercial standard was available, compound quantification was made as equivalents of the most similar standard, taking into account the corresponding molecular weights.

Number of theoretical plates –*N*– was calculated by injecting 10 µL of 5-caffeoylquinic acid standard solution at 90 mg/L (900 ng), 10 µL of quercetin-3-*O*-rutinoside standard solution at 90 mg/L (900 ng), 10 µL of kaempferol-3-*O*-rutinoside standard solution at 45 mg/L (450 ng), 10 µL of naringenin standard solution at 250 mg/L (2500 ng), and 10 µL of naringenin chalcone standard solution at 105 mg/kg (1050 ng). Limits of quantification –LOQ– were calculated on the basis of the calibration curves as the concentration corresponding to a signal to noise ratio –*s/n*– of 10. Absolute recoveries were estimated by spiking frozen ground tomato samples before extraction (n=7) with pure standards at two concentrations (50 and 100 mg/kg for 5-caffeoylquinic acid; 1.25 and 2.50 mg/kg for quercetin-3-*O*-rutinoside; 0.50 and 1.25 mg/kg for kaempferol-3-*O*-rutinoside; 3.50 and 7.00 mg/kg for naringenin, and 1.50 and 3.00 mg/kg for naringenin chalcone). Response of spiked samples was compared with those of the standard solutions with the same concentration. Accuracy was evaluated by analyzing ten spiked samples at different concentration levels (1.20, 50.00, 100.00, and 150.00 mg/kg of 5-caffeoylquinic acid; 1.25 and 2.50 of quercetin-3-*O*-rutinoside; 0.50 and 1.25 mg/kg of kaempferol-3-*O*-rutinoside; 3.50 and 7.00 mg/kg of naringenin and 1.50 and 3.00 mg/kg of naringenin chalcone), and comparing the calculated values with the corresponding expected concentrations. Repeatability for each compound was estimated by analyzing duplicates of 12 samples in a week time frame.



### Statistical Analysis

Quantification results were analyzed by a one-way ANOVA test to assess differences between cultivars, employing the JMP 8 software –SAS Institute Inc., Cary, NC, USA–. Significance was set at  $\alpha=0.05$ .

## 3.4 Results and discussion

### UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup> Identification

Peaks **2**, **5**, **7**, **8**, and **10** were identified on the basis of the response of pure standard solutions as 5-caffeoylquinic acid, quercetin-3-*O*-rutinoside (quercetin-3-*O*-rhamnosylglucoside), kaempferol-3-*O*-rutinoside (kaempferol-3-*O*-rhamnosylglucoside), naringenin, and naringenin chalcone, respectively (Table 3.1). MS<sup>2</sup> fragmentation of both flavonol glycosides –peaks **5** and **7**– yielded daughter ions profiles containing the corresponding deprotonated aglycones: quercetin ( $m/z^-$  301 in peak **5**) and kaempferol ( $m/z^-$  285 in peak **7**).

Peaks **1**, **3**, **4**, **6**, and **9** (Table 3.1) did not match with any commercial standard, so a tentative identification was suggested by comparing their UV–vis spectra and MS<sup>2</sup> fragmentation patterns with those reported in related bibliographic references. The DAD analysis of peaks **1**, **4**, **6**, and **9** showed typical UV–vis spectra of hydroxycinnamic acid derivatives, with maximum absorbance at  $\lambda$  325–330 nm<sup>(27)</sup>. Pseudomolecular ion [M–H]<sup>–</sup> of peak **1** obtained in ESI negative mode ( $m/z^-$  353) was characteristic of monocaffeoylquinic acids. MS<sup>2</sup> fragmentation of peak **1** was in agreement with the structure of 4-caffeoylquinic acid –cryptochlorogenic acid–, with a base peak at  $m/z^-$  173 [M–caffeic–H<sub>2</sub>O–H]<sup>–</sup> (210, 221). The analysis of the commercial standard of its isomeric form, 3-caffeoylquinic acid, showed that this compound was under the level of detection in tomato extracts under our conditions.

Both peaks **4** and **6** had pseudomolecular ions at  $m/z^-$  515 and MS<sup>2</sup> fragments in concordance with those reported in literature for dicaffeoylquinic acids<sup>(196, 199, 210)</sup>, with daughter ions at  $m/z^-$  353 [M–caffeic–H]<sup>–</sup>,  $m/z^-$  179 [M–caffeic–quinic–H]<sup>–</sup> and  $m/z^-$  173 [M–caffeic–caffeic–H<sub>2</sub>O–H]<sup>–</sup>. It was not possible to clarify the structure of the possible isomers by ESI–MS<sup>2</sup>, so they were tentatively identified as dicaffeoylquinic acids I and II.

The pseudomolecular ion at  $m/z^-$  677 and  $MS^2$  fragmentation pattern of peak 9 agreed with previously observed data for tricaffeoylquinic acid <sup>(199, 232)</sup>. This peak yielded  $MS^2$  daughter ions at  $m/z^-$  515 [M-caffeic-H]<sup>-</sup>,  $m/z^-$  353 (M-caffeic-caffeic-H)<sup>-</sup> and  $m/z^-$  173 [M-caffeic-caffeic-caffeic-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>.

**Table 3.1**  
**UHPLC-DAD-MS experimental identification parameters**

Peak	Compound identity	DAD	MS			Identification source
		$\lambda$ max (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Collision energy (eV)	Daughter ions (m/z)	
1	4-Caffeoylquinic acid*	326	353	-15	191 (40%) 179 (90%) 173 (100%)	<sup>(210, 221)</sup>
2	5-Caffeoylquinic acid	326	353	-15	191 (100%)	Standard
3	Quercetin trisaccharide*	255, 351	741	-25	609 (50%) 301 (100%)	<sup>(220, 222, 233)</sup>
4	Dicaffeoylquinic acid I*	326	515	-30	353 (100%)	<sup>(196, 199, 210)</sup>
5	Quercetin-3-O-rutinoside	256, 357	609	-25	301 (100%)	Standard
6	Dicaffeoylquinic acid II*	326	515	-30	353 (40%) 179 (100%) 173 (60%)	<sup>(170, 199, 210)</sup>
7	Kaempferol-3-O-rutinoside	266, 340	593	-25	285 (100%)	Standard
8	Naringenin	288	271	-20	177 (20%) 151 (100%) 119 (40%)	Standard
9	Tricaffeoylquinic acid*	329	677	-30	515 (100%) 353 (50%) 173 (100%)	<sup>(199, 232)</sup>
10	Naringenin chalcone	365	271	-20	151 (100%) 119 (15%) 107 (15%)	Standard

\*Tentative identification –no commercial standard available–.

UV-vis spectrum of peak 3 was typical of flavonols, with two maximum absorbance bands at 255 and 351 nm<sup>(27)</sup>. This peak yielded a pseudomolecular ion at  $m/z^-$  741 and MS<sup>2</sup> daughter ions at  $m/z^-$  609 [M-pentose-H]<sup>-</sup> and  $m/z^-$  301 [M-hexose-deoxyhexose-pentose-H]<sup>-</sup>, which was in agreement with a quercetin trisaccharide structure –quercetin-hexose-deoxyhexose-pentose, that is, a quercetin-rutinoside structure linked to a pentosyl residue–<sup>(220, 233)</sup>. Slimestad et al.<sup>(222)</sup> previously found a quercetin trisaccharide with similar characteristics in tomato extracts and identified it by NMR as quercetin-3-(2''-β-apiofuranosyl-6''-α-rhamnopyranosyl-β-glucopyranoside). Molecular structures of the compounds identified in tomato extracts are shown in Fig. 3.1.

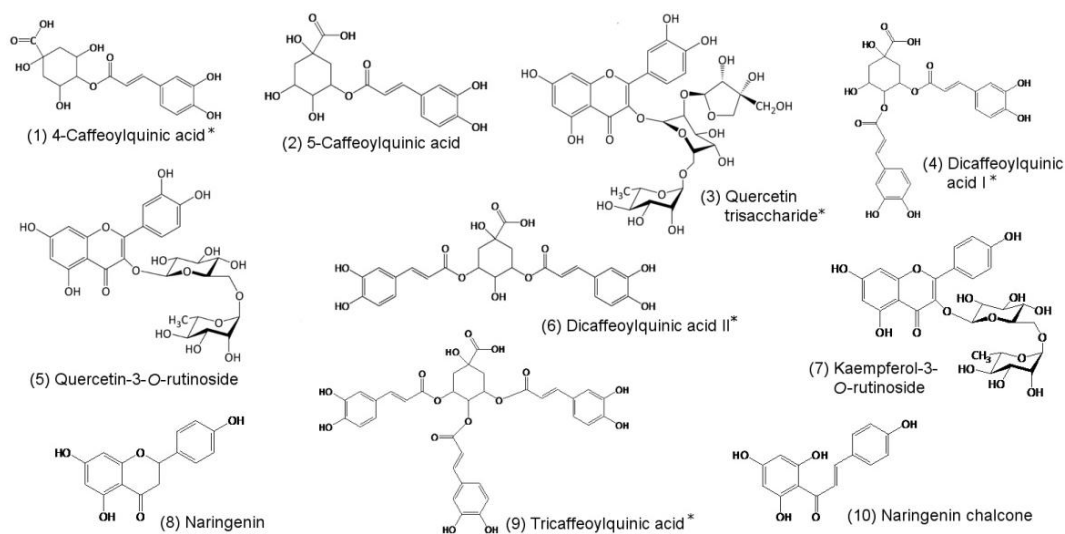


Fig. 3.1 Structure of the ten intact compounds evaluated in this study.

\*Tentative structure suggested on the basis of LC-MS<sup>2</sup> fragmentation.

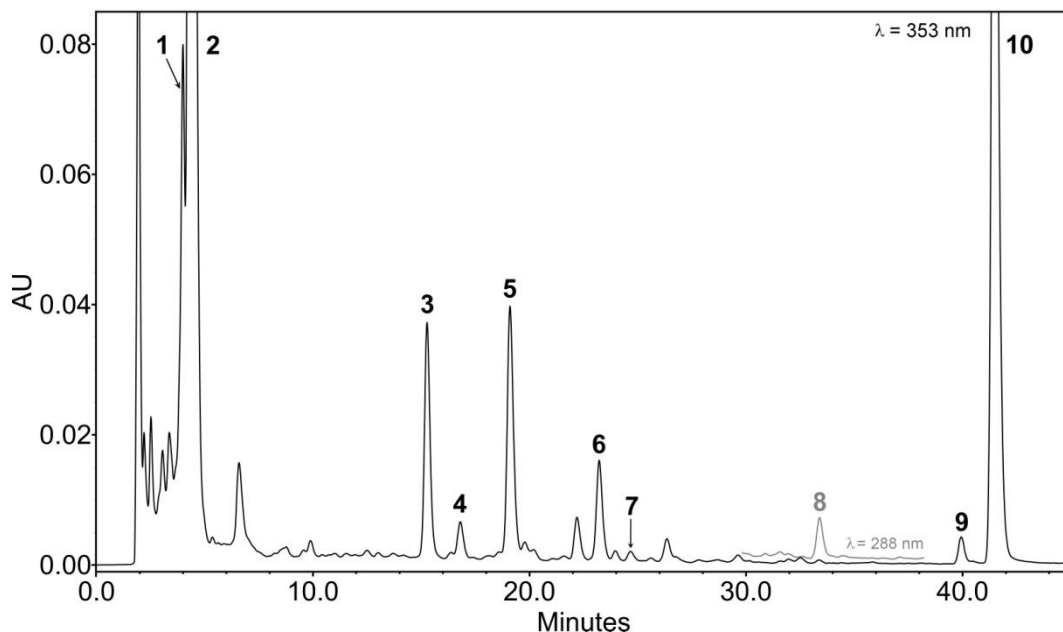
### HPLC-DAD Analysis

Results of the multiple extraction assays showed that the second extraction only increased  $2.4\% \pm 0.9\%$  the total phenolic content of the first extraction. With the aim of developing a high-throughput analysis, the use of a second extraction step was discarded in view of its low yield. This results could be partially explained by the use of ultrasonic waves, which can facilitate the penetration of the solvent into the tissues<sup>(173, 174)</sup> and

enhance the extraction of phenolic compounds without the need of multiple extraction steps.

Chromatographic conditions were chosen to provide the separation of the main intact phenolic compounds within 45 min (Fig. 3.2). Although no extract purification was carried out, it was possible to separate and quantify ten endogenous phenolic compounds with a good selectivity from matrix interferences. Previous works, which were focused on the quantification of phenolic compounds by mass spectrometry, did not achieve a suitable baseline separation for DAD quantification<sup>(217)</sup>.

Under our conditions, chromatographic performances show an improvement of the existing methods with DAD quantification in terms of HPLC run time<sup>(224)</sup> or number of compounds separated from the matrix interferences<sup>(83, 222, 223, 225, 226)</sup>. Furthermore, under these conditions, samples can be injected in the HPLC without large sample pre-treatment steps as freeze-drying, maceration, multiple extractions steps or SPE purification. Working with the proposed protocol, an expert technician pre-processed about 24 samples per day.



**Fig. 3.2** Typical HPLC profile of a tomato extract – “Caramba” – registered at 353 and 288 nm –overlaid gray pattern at 30–38 min–. Peaks identification as in Table 3.1

Mean recoveries with a one-time extraction were better than 90% for 5-caffeoylquinic acid, kaempferol-3-*O*-rutinoside, and quercetin-3-*O*-rutinoside (Table 3.2). Lower but still acceptable recoveries (68–80%) were obtained for naringenin chalcone and naringenin, respectively. Similar recovery values were observed previously for other flavanones such as eriodictyol-7-*O*-rutinoside (82%), naringenin-7-*O*-rutinoside (78%), and hesperetin-7-*O*-rutinoside (26%) in citrus juice <sup>(27)</sup>.

**Table 3.2**  
Validation parameters, calibration curves and number of theoretical plates –*N*– for the HPLC-DAD analysis

Compound	Accuracy* (%) Mean (± SD)	Recovery* (%) Mean (± SD)	LOQ (mg/kg)	Repeatability (RSD %)	<i>N</i>	Calibration curves* <sup>§</sup>			
						Linear range (mg/kg)	Slope ( <i>b</i> )	Origin ordinate ( <i>a</i> )	<i>r</i> <sup>2</sup>
1	-	-	0.005 <sup>†</sup>	3.0	-	-	-	-	-
2	104.7 (± 6.8)	96.9 (± 9.1)	0.005	5.1	5571	0.8-125	3.0·10 <sup>5</sup>	6.0·10 <sup>5</sup>	0.997
3	-	-	0.076 <sup>‡</sup>	2.1	-	-	-	-	-
4	-	-	0.007 <sup>†</sup>	3.5	-	-	-	-	-
5	98.8 (± 6.4)	90.9 (± 7.4)	0.065	4.7	26197	0.08-12	1.6·10 <sup>5</sup>	-7.1·10 <sup>2</sup>	0.999
6	-	-	0.007 <sup>†</sup>	6.0	-	-	-	-	-
7	104.8 (± 7.7)	95.9 (± 6.6)	0.055	9.5	35609	0.06-0.93	2.1·10 <sup>5</sup>	-1.2·10 <sup>3</sup>	0.998
8	98.8 (± 3.7)	80.2 (± 3.5)	0.025	7.9	59055	0.04-12	3.0·10 <sup>5</sup>	-1.8·10 <sup>3</sup>	0.999
9	-	-	0.009 <sup>†</sup>	6.4	-	-	-	-	-
10	90.7 (± 10.2)	67.7 (± 5.3)	0.090	8.3	115414	0.10-10	4.6·10 <sup>5</sup>	-2.4·10 <sup>3</sup>	1.000

\* Calculated only for compounds with standard available.

<sup>§</sup>  $Y = bX + a$ , where *Y* is chromatographic area (μV·s) and *X* is mg/kg fresh weight.

<sup>†</sup> Expressed as 5-caffeoylquinic acid equivalents.

<sup>‡</sup> Expressed as quercetin-3-*O*-rutinoside equivalents.

Compounds: **1**, 4-caffeoylquinic acid; **2**, 5-caffeoylquinic acid; **3**, quercetin trisaccharide; **4**, dicaffeoylquinic acid I; **5**, quercetin-3-*O*-rutinoside; **6**, dicaffeoylquinic acid II; **7**, kaempferol-3-*O*-rutinoside; **8**, naringenin; **9**, tricaffeoylquinic acid; **10**, naringenin chalcone.

Complete results of method validation are summarized in **Table 3.2**. Mean accuracy ranged from 91% to 105%. Limits of quantification were comprised between 5 and 90 µg/kg, while inter-day repeatability –RSD– was always lower than 10%. Inter-day repeatability values were similar to other values found in other works dealing with phenolic compounds in food matrices, which usually range between 5% and 10% <sup>(27, 203)</sup>. Calibration curves showed a good linearity in the calibration range ( $r^2$  higher than 0.99). Plate number –*N*– was comprised between 5,500 –5-caffeoylquinic acid– and 115,000 –naringenin chalcone–. Validation parameters, even though the simplification of the extraction, were comparable to those obtained by other authors, in terms of limits of quantification, repeatability, and recovery <sup>(83, 217, 223)</sup>.

### ***Phenolic Profile in Samples***

The proposed analytical conditions have been used to study the phenolic profile of three tomato cultivars grown in Spain (**Table 3.3**). Phenolic profile of tomato samples was significantly affected by cultivar, even if high variability within samples of the same variety was observed for some compounds, as for kaempferol-3-*O*-rutinoside and naringenin in “Caramba” cultivar (**Table 3.3**).

“Montserrat” samples were the richest in total caffeic acid derivatives, containing  $79.26 \pm 15.31$  mg/kgFW, while the mean content of these compounds was  $59.65 \pm 15.39$  mg/kg FW in “Pera de Girona” and  $48.99 \pm 4.41$  mg/kg FW in “Caramba” fruits.

5-Caffeoylquinic acid was found to be the main phenolic compound in the three cultivars of our study (**Table 3.3**), with mean concentrations comparable with those reported for other Spanish cultivars, 27.9, 26.1, and 23.2 mg/kg FW in “Rambo”, “Ramillete”, and “Remate” cultivars, respectively <sup>(213)</sup>.

The concentration of 4-caffeoylquinic acid in our samples was similar to those reported previously <sup>(180)</sup>, but it should be underlined that only few works <sup>(180, 217, 225)</sup> gave individual values for both the 4- and 5-caffeoylquinic acid isomeric forms.

The flavonoid profile (**Table 3.3**) showed also significant differences between cultivars. “Caramba” samples showed the highest levels of naringenin chalcone, quercetin trisaccharide, and quercetin-3-*O*-rutinoside, while naringenin and kaempferol-3-*O*-rutinoside were found at lower concentrations. On the other hand, the most important flavonoids in “Montserrat” and “Pera de Girona” cultivars were quercetin-3-*O*-rutinoside and quercetin trisaccharide –the latter only in “Pera de Girona”–, whereas the other flavonoids were not detected.

Similar differences in flavonoid composition have been previously described between other tomato cultivars <sup>(213)</sup>; however, it is the first time that a complete phenolic profile of intact compounds is showed for these three cultivars.

Table 3.3

**Mean contents ( $\pm$ SD) of intact phenolic compounds in three tomato cultivars**

Compound	Mean content (mg·kg <sup>-1</sup> FW)		
	cv. Caramba	cv. Montserrat	cv. Pera de Girona
4-Caffeoylquinic acid*	12.14 $\pm$ 1.30b	12.05 $\pm$ 1.66b	8.50 $\pm$ 1.95a
5-Caffeoylquinic acid	28.58 $\pm$ 3.41a	49.20 $\pm$ 12.78b	37.29 $\pm$ 11.89a
Quercetin trisaccharide <sup>§</sup>	10.96 $\pm$ 2.36b	n.d.	0.65 $\pm$ 0.21a
Dicaffeoylquinic acid I*	2.01 $\pm$ 0.15a	3.03 $\pm$ 0.48b	2.11 $\pm$ 0.31a
Quercetin-3-O-rutinoside	10.66 $\pm$ 3.16b	0.82 $\pm$ 0.35a	0.90 $\pm$ 0.50a
Dicaffeoylquinic acid II*	4.10 $\pm$ 0.38a	9.45 $\pm$ 2.13b	7.64 $\pm$ 2.41b
Kaempferol-3-O-rutinoside	0.22 $\pm$ 0.19	n.d.	n.d.
Naringenin	0.28 $\pm$ 0.13	n.d.	n.d.
Tricaffeoylquinic acid*	2.16 $\pm$ 0.21a	5.51 $\pm$ 1.40c	4.12 $\pm$ 0.94b
Naringenin chalcone	7.55 $\pm$ 3.24	n.d.	n.d.

\* Expressed as 5-caffeoylquinic acid equivalents.

<sup>§</sup> Expressed as quercetin-3-O-rutinoside equivalents.

n.d. = not detected.

Superscript letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between means on the same line.

### 3.5 Conclusions

The proposed HPLC-DAD method, involving a simplified sample treatment, has been shown to be suitable for the simultaneous quantification of five flavonoids and five caffeic acid derivatives in tomato fruits. Quantification of target phenolic compounds was faster if compared to other methods, which required more complex procedures –freeze-drying, maceration, hydrolysis– or quantified only few compounds. Transference of peaks identification from the UHPLC-DAD-MS<sup>2</sup> to the HPLC-DAD system allowed the

development of a quantification method on a cheaper platform, because an LC-MS2 can be five to ten times more expensive than an HPLC-DAD.

Detailed phenolic composition of tomato fruits from the “Montserrat” and “Pera de Girona” regional cultivars, as well as from the widely distributed “Caramba” cultivar, was determined for the first time. The HPLC-DAD method showed to be appropriate for putting in evidence the strong effect of the genetic background to the endogenous phenolic profile in tomato. The reduced sample manipulation and the relative low cost of the analysis protocol may stimulate further studies, requiring large number of samples, to evaluate the effects of genetic, agronomic, or environmental factors on the tomato phenolic profile.






---

**4.**

**Effects of different organic  
anti-fungal treatments on  
tomato plant productivity and  
selected nutritional  
components of tomato fruit**



*Transcripció de l'article original publicat a la revista  
Journal of Horticultural Science & Biotechnology  
número 88 (2013), pàgs. 67-72.*

A. Ribas-Agustí, P. Bouchagier, E. Skotti, D. Erba, C. Casiraghi, C. Sárraga and M. Castellari. "Effects of different organic anti-fungal treatments on tomato plant productivity and selected nutritional components of tomato fruit". *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Vol. 88, no. 1 (january 2013) : p. 67-72

[http://www.jhortscib.org/Vol88/88\\_1/8.htm](http://www.jhortscib.org/Vol88/88_1/8.htm)

### **Abstract**

Organic farming and horticulture require the use of more environmentally-friendly chemicals to reduce harmful side-effects on producer and consumer health. Sulphur is one of the most important natural fungicides used in organic farming to protect plants against attack by powdery mildew – *Leveillula taurica*–. The use of natural elicitors to induce natural resistance against fungal diseases may provide an alternative to conventional treatments. In this work, we compared the effects of wettable sulphur and two elicitors –Chitoplant® and Milsana®– on the productivity and nutritional quality of tomato –*Solanum lycopersicum* L cv. belladonna–.


Both elicitors, and a conventional sulphur treatment, resulted in a similar degree of protection against powdery mildew. One or more of these three treatments positively affected the concentrations of some phytochemicals in tomato fruit –e.g., ascorbic acid, quercetin trisaccharide, quercetin-3-O-rutinoside,  $\beta$ -carotene, or potassium– compared with untreated control plants. The minimal environmental impact, and the absence of negative side-effects on farmers and consumer health may encourage the use of these elicitors in organic farming and horticulture.



---

**5.**

**Characterization and stability  
of phenolic compounds in dry-  
cured sausages added with  
cocoa and grape seed extracts**



*Transcripció de l'article original en revisió  
a la revista **LWT-Food Science & Technology**.*

## 5.1 Abstract

This work reports for the first time the level of ten target phenolic compounds in dry-cured sausages added with vegetable extracts. Grape seed –GSE1 and GSE2– and cocoa extracts, rich in phenolic compounds, were added in the formulation of dry-cured sausages – “Salchichón” and “Fuet” –. Evolution of the major monomeric and oligomeric phenolic compounds of these extracts was evaluated along sausage shelf life by UHPLC-MS/MS.

Kind of sausage did not affect significantly overall stability of the target compounds. At the end of the ripening process, catechin and epicatechin were at 54-61%, gallic acid and galloylated flavan-3-ols at 59-91%, oligomeric flavan-3-ols at 72-95% and glycosylated flavonols at 56-88% (in cocoa treatment) and 82-94% (in GSE treatment) of their content at the beginning of production. All phenolic compounds levels did not decrease further significantly after one month of production until the end of shelf life.

The 0.5% (w/w) addition of vegetal extracts was suitable to enrich dry-cured sausages with health-beneficial polyphenols.

## 5.2 Introduction

The high dietary intake of fat in addition to a low intake of fruits and vegetables is a public health concern in the industrialized countries. An unbalanced nutritional intake has been related to some chronic diseases, such as obesity, cancer or cardiovascular disease<sup>(73)</sup>. Besides their fat content, meat products are an important source of highly bioavailable proteins, vitamins and minerals, so an improvement of their overall nutritional balance would be appealing from a nutritional point of view<sup>(151)</sup>. Cured pork sausages, generally seasoned with spices, are very typical in the Spanish gastronomy and their trade involves an important economic sector; about 212,000 tones were produced in Spain in 2010, from which 47,000 tones were exported overseas<sup>(250)</sup>. “Salchichón” is a large (35-90 mm Ø) raw-cured fermented sausage while “fuet” is a thin (20-35 mm Ø) raw-cured sausage in a pork gut case, with regional importance in Catalonia<sup>(251)</sup>.

Phenolic compounds constitute a group of plant secondary metabolites that includes flavonoids and phenolic acids<sup>(3)</sup>. Many studies underlined the antioxidant properties and the capability of phenolic compounds to interact in metabolic processes with positive effects on human wellness<sup>(3, 72, 107)</sup>. In recent years, many vegetal extracts rich in phenolic compounds have been put in the market as functional ingredients<sup>(152)</sup>. Cocoa –*Theobroma cacao* L.– extracts are particularly rich in flavan-3-ols –catechin and epicatechin– and their oligomeric forms –procyanidins–, and contain also glycosides of quercetin<sup>(64, 252)</sup>. Grape –*Vitis vinifera* L. – seeds extracts are another important source of phenolic compounds, especially monomeric flavan-3-ols, procyanidins and several galloylated derivatives<sup>(253, 254)</sup>.

These phenolic compounds found in both cocoa and grape seed extracts have been shown to have in vivo positive effects, such as anti-inflammatory activity and protection against free radicals, LDL peroxidation, carcinogenic metabolites and altered gene expression<sup>(254-258)</sup>. Several works emphasized the potential of dietary phenolic compounds to prevent undesirable effects for consumers health related to the high consumption of fatty foods, as the absorption of malondialdehyde<sup>(259)</sup> or some alterations of the lipid metabolism<sup>(107, 260)</sup>.

Phenolic compounds are components recognized for their healthy properties in functional foods<sup>(127)</sup>. Also, the use of plant extracts rich in phenolic compounds has been suggested for their technological properties in meat products, such as to extend shelf life, improve quality and prevent rancidity<sup>(129, 136, 138, 145, 261)</sup>. At the same time, health concerns about synthetic antioxidants stimulate the use of natural ingredients with

antioxidant properties <sup>(129)</sup>. Nevertheless, the use of vegetal extracts as functional ingredients in meat products should be supported by the evaluation of the phenolics content in these products and their evolution during shelf life. To the best of our knowledge, few data are available about the residual levels of phenolic compounds in dry-cured sausages added with vegetal extracts, namely hesperidin from orange fibre <sup>(262)</sup>.

Therefore, the aim of this work was to evaluate the concentration of main target phenolic compounds in typical Spanish dry-cured sausages added with three different vegetal extracts very rich in phenolic compounds, from their production to the end of commercial shelf life. Two extracts from grape seed and one from cocoa were considered, and a suitable UHPLC-MS/MS protocol of analysis was developed to assess the concentration of the main target phenolic compounds in the specific matrices.

## 5.3 Materials and methods

### *Chemicals*

Ultrapure water was obtained with a Milli-Q Advantage system –Millipore Ibérica, Madrid, Spain–. Acetone and methanol HPLC grade were from J.T. Baker –Deventer, The Netherlands–. Acetonitrile LC-MS grade, CHAPS, formic acid, ascorbic acid, gallic acid and procyanidin B2 were obtained from Sigma-Aldrich –Madrid, Spain–. Catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, procyanidin B1, quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-glucoside were purchased from Extrasynthèse –Genay, France–. Procyanidin C1 was from PhytoLab –Vestenbergsgreuth, Germany– and quercetin-3-*O*-arabinoside from ChromaDex –Santa Ana, CA, USA–.

Individual standard stock solutions at 1 g/L were prepared by dissolving the pure commercial standards in methanol. Fortified samples for calibration, accuracy and recovery assays were spiked with the appropriate amounts of a standard mix solution (50 mg/L in methanol). Standard solutions for MS infusion were prepared at 100 mg/L by diluting standard stock solutions with methanol. Chromatographic solutions of each standard were prepared by diluting stock solutions in mobile phase A.



### **Vegetal extracts**

Two commercial grape seed extracts –*Vitis vinifera* L. –, “Grape Seed Dry Extract” –Exxentia, Madrid, Spain– and “Leucocyanidins Grape Seed Extract” –Euromed, Barcelona, Spain–, and a commercial cocoa extract –*Theobroma cacao* L. – “Cocoanox Extract” –Natraceuticals, Valencia, Spain– were employed for the experiments. Appearance and available information from suppliers was as follows: brown powder, < 5.0 % moisture and  $\geq 45$  % total polyphenols for “Cocoanox Extract”; reddish powder, 0.5 % moisture,  $\geq 95$  % total polyphenols and 99.6 % < 200  $\mu\text{m}$  particle size for “Grape Seed Dry extract”; pink-reddish powder, 2.4 % moisture,  $\geq 85$  % total polyphenols, 11.6 % monomers and 99.7 % < 200  $\mu\text{m}$  particle size for “Leucocyanidins Grape Seed Extract”.

### **Dry-cured sausages**

Pork meat from shoulders and bellies was frozen at -20 °C for 3 days, thawed at 4 °C for 2 days and minced at -1 °C in a grinder –Tecmaq, Barcelona, Spain– with an adjustable plate set at diameter of 6 mm. For each kg of ground meat, the formulation of the ingredients for the production of “fuet” –fresh weight basis– was as follows: 600 g pork shoulder meat, 400 g pork belly meat, 20 g sodium chloride, 0.15 g sodium nitrite, 0.15 g potassium nitrate, 0.5 sodium ascorbate, 2 g dextrose, 2.5 g black pepper, 15 g sodium lactate and 5 g of vegetal extracts –except control samples–. For each kg of ground meat, the ingredients dosage in “salchichón” production –fresh weight basis– was as follows: 600 g pork shoulder meat, 400 g pork belly meat, 24 g sodium chloride, 0.15 g sodium nitrite, 0.15 g potassium nitrate, 0.5 g sodium ascorbate, 5 g dextrose, 2.5 g black pepper, 0.25 g lactic acid bacteria –starter– and 5 g of vegetal extracts –except control samples–. About 13 kg and 40 kg of ground meat were employed for each treatment in “fuet” and “salchichón” respectively. Ground meat and other ingredients were mixed in a mixer –model 35P, Tecnotrip S.A., Terrassa, Spain–.

Four different formulations for each kind of sausage were considered: *i*) Control –without any vegetal extract–, *ii*) Cocoa –added with “Cocoanox Extract” –, *iii*) GSE1 –added with “Grape Seed Dry Extract” – and *iv*) GSE2 –added with “Leucocyanidins Grape Seed Extract”–.

“Fuet” samples were stuffed into 40 mm diameter natural casings and “salchichón” samples into 80 mm collagen casings –Fibran, Girona, Spain–. Nine replicates for each formulation and for each production were considered, giving a total of  $n=36$  “fuet” and  $n=36$  “salchichón” samples. Fresh weight was about 350 g/piece for “fuet” and 1100 g/piece for “salchichón”. “Fuet” sausages were dipped in a *Penicillium* spp. –Danisco,

Copenhagen, Denmark– suspension and ripened under controlled conditions (12 °C with a relative humidity of 75-80 %). On the other hand, “salchichón” samples fermented maintaining the temperature at 20 °C with a relative humidity of 90-95 %, until pH decreased to 5.0, and then ripened under controlled conditions (12 °C and 75-80 % RH). The whole ripening process lasted approximately one month for both products (29 days for “fuet” and 33 days for “salchichón” ). The weight loss during ripening was around 35 % for “salchichón” and 45 % for “fuet”.

Following the ripening process, both “fuet” and “salchichón” sausages were stored at 4 °C up to the end of the shelf life. Three different pieces (n=3) were sampled and analyzed in duplicate for each kind of sausage and formulation just after production –month 0–, at the end of ripening –month 1– and at the end of shelf life –month 3–. Samples were vacuum-packed and stored at -20 °C until their analysis. Fat and water content were measured by near infrared spectroscopy using FoodScan® –FOSS®, Denmark–.

### ***UHPLC-MS/MS analysis***

Different extractants were tested: *i)* 50 % methanol – 0.1 % ascorbic acid; *ii)* 50 % methanol – 1 % CHAPS – 0.1 % ascorbic acid; *iii)* 50 % methanol – 1 % SDS – 0.1 % ascorbic acid and *iv)* 70 % acetone – 0.1 % ascorbic acid.

Two grams of samples, added with 25 mg/kg of epigallocatechin from standard stock solution as internal standard, were homogenized with 15 mL of extractant solution, and then centrifuged in a J2-MC centrifuge –Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA–. Clear phase was separated, pellet was mixed again with 5 mL of extractant solution, centrifuged as above and clear extracts reunified.

Two milliliters of supernatant were evaporated under nitrogen, redissolved in 1 mL mobile phase A, filtered through PTFE 0.2 µm porosity filters –Teknokroma, Sant Cugat, Spain– and injected to the UHPLC system. Chromatographic system consisted of an Acquity UPLC® –Waters, Milford, MA, USA–, equipped with a diode array detector –DAD–, an electrospray –ESI– as a source of ionization and a triple quadrupole mass spectrometer –TQD–. The system was controlled by MassLynx 4.1 software –Waters, Milford, MA, USA–. Chromatographic separation was carried out with a BEH C<sub>18</sub> Shield column (150 x 1.0 mm id) with 1.7 µm particle size –Waters, Milford, MA, USA–, kept at 35 °C. A linear gradient elution was carried out from 100 % mobile phase A –water-acetonitrile-formic acid, 94.9: 5.0: 0.1 v/v/v– and 0 % B –acetonitrile-water-formic acid, 60.0: 39.9: 0.1 v/v/v– to 55 % A in 15 minutes, with a flow rate of 0.130 ml/min. Sample vials on the injector were maintained at 4 °C and the injected volume was 5 µL.

Electrospray interface –ESI– was operated in the negative mode; the source temperature was fixed at 140 °C, the capillary voltage was set at -2.5 KV and the desolvation temperature was set at 350 °C. The cone gas –nitrogen– flow rate was 350 L/h and cone voltage was set at 30 V. MS experiments were carried out in “Scan” mode, in order to obtain  $m/z$  values of molecular ions. MS/MS experiments were also performed to obtain the fragmentation patterns of molecular ions, in “Daughter Ions” mode. The gas used in the collision cell was argon at a flow rate of 0.1 mL/min.

“Multiple Reaction Monitoring” –MRM– mode was used to quantify the phenolic compounds. MS/MS parameters were optimized with the AutoTune software by the infusion of standard solutions.

Target compounds were identified by comparing retention times, UV spectra, MS and MS/MS data with pure commercial standards. Standard addition calibration was created by spiking control samples with known amounts of standards, using epigallocatechin as internal standard. Quantitation was made by considering the areas obtained with a specific transition for each compound and epigallocatechin –*i.s.*– in the MRM mode. A qualification transition was also acquired to support identification. Limits of detection (LOD) were calculated on the basis of the calibration curves as the concentration corresponding to a signal to noise ratio ( $s/n$ ) of 3. Absolute recoveries were estimated by comparing the response of three control samples, spiked before extraction with known amounts of pure standards, with the response of the same samples spiked after extraction at the same concentration. Accuracy was evaluated by analyzing 3 spiked control samples at different concentration levels. Repeatability of the method was estimated by analyzing three samples –at three different aging stages– per triplicate.

### **Statistical analysis**

Statistical treatments of data were made using the JMP 8 software –SAS Institute Inc., Cary, NC, USA–. A three-way ANOVA was carried out, to put in evidence the effect of the independent variables “Formulation” –Cocoa, GSE1 and GSE2–, “Sampling time” (0, 1 and 3 months since production) and “Production set” –“fuet” and “salchichón” – on the levels of the target compounds –dependent variables–. Differences between means were evaluated by an LSD test –LSMeans Differences Student’s  $t$ –. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 5.4 Results and discussion

### UHPLC-DAD-MS/MS analysis

Preliminary trials were carried out with different extracting solutions; better absolute recoveries were obtained by using acetone: water (70:30 v/v) containing 0.1 % ascorbic acid. As a general rule, recoveries were higher than 75 % for most compounds except for some oligomeric compounds, whose values were lower (Table 5.1). The higher molecular size of procyanidins and the well known interaction between such compounds and proteins <sup>(6)</sup> could explain why procyanidin recoveries from a meat-based matrix were relatively lower.

**Table 5.1**  
**UHPLC method validation parameters**

Compound	Calibration parameters*			Recovery (%) (mean ± SD)	% RSD	Accuracy (%) (mean ± SD)	N	LOD <sup>§</sup> (µg·kg <sup>-1</sup> )
	b	a	r <sup>2</sup>					
Gallic acid	2.567	4.5·10 <sup>-2</sup>	0.998	96 ± 12	5.4	104 ± 13	1569	580
Catechin	0.852	0.9·10 <sup>-2</sup>	0.998	89 ± 11	4.2	98 ± 13	31408	470
Procyanidin B1	0.667	-0.6·10 <sup>-2</sup>	0.999	62 ± 4	4.5	108 ± 3	33856	300
Epicatechin	0.839	0.5·10 <sup>-2</sup>	0.997	75 ± 5	6.8	94 ± 10	54262	510
Procyanidin B2	0.682	-0.5·10 <sup>-2</sup>	0.999	61 ± 5	7.1	97 ± 8	43531	200
Epigallocatechin gallate	1.897	-0.7·10 <sup>-2</sup>	0.997	69 ± 5	3.3	102 ± 13	57712	100
Procyanidin C1	0.273	-0.3·10 <sup>-2</sup>	0.999	56 ± 9	2.2	105 ± 11	67981	290
Epicatechin gallate	1.229	-0.6·10 <sup>-2</sup>	0.999	85 ± 7	2.3	110 ± 9	69156	110
Quercetin-3-O-galactoside	3.270	1.0·10 <sup>-2</sup>	0.993	88 ± 8	5.0	95 ± 12	112929	15
Quercetin-3-O-glucoside	3.473	0.4·10 <sup>-2</sup>	0.996	89 ± 6	5.1	90 ± 4	115936	20
Quercetin-3-O-arabinoside	1.335	0.5·10 <sup>-2</sup>	0.997	95 ± 9	3.1	89 ± 3	124872	20

N: Theoretical plates

\*Regression equation:  $Y = (b \cdot X) + a$ , where Y is (Area compound / Area i.s.) and X is (mg·kg<sup>-1</sup> compound / mg·kg<sup>-1</sup> i.s.) obtained in MRM mode.

§ LOD: limit of detection.

The UHPLC conditions were chosen to obtain the chromatographic separation within 14 minutes. Under our conditions, the number of theoretical plates ranged from 1570 to 124870, while LODs were comprised in the range between 10 and 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Table 5.1), being relatively high for flavan-3-ols and gallic acid, but still suitable for our scopes, taking into account the content of the target compounds in samples.

Table 5.2 shows the identification parameters for the analysis of the different compounds on the basis of chromatographic, spectroscopic and spectrometric properties of the pure standard solutions. Two specific MS/MS transitions and the DAD spectra were used to confirm the identity of the molecule.

Table 5.2

**Chromatographic, spectroscopic and spectrometric parameters used to identify and quantify the target phenolic compounds in samples added with cocoa and grape extracts.**

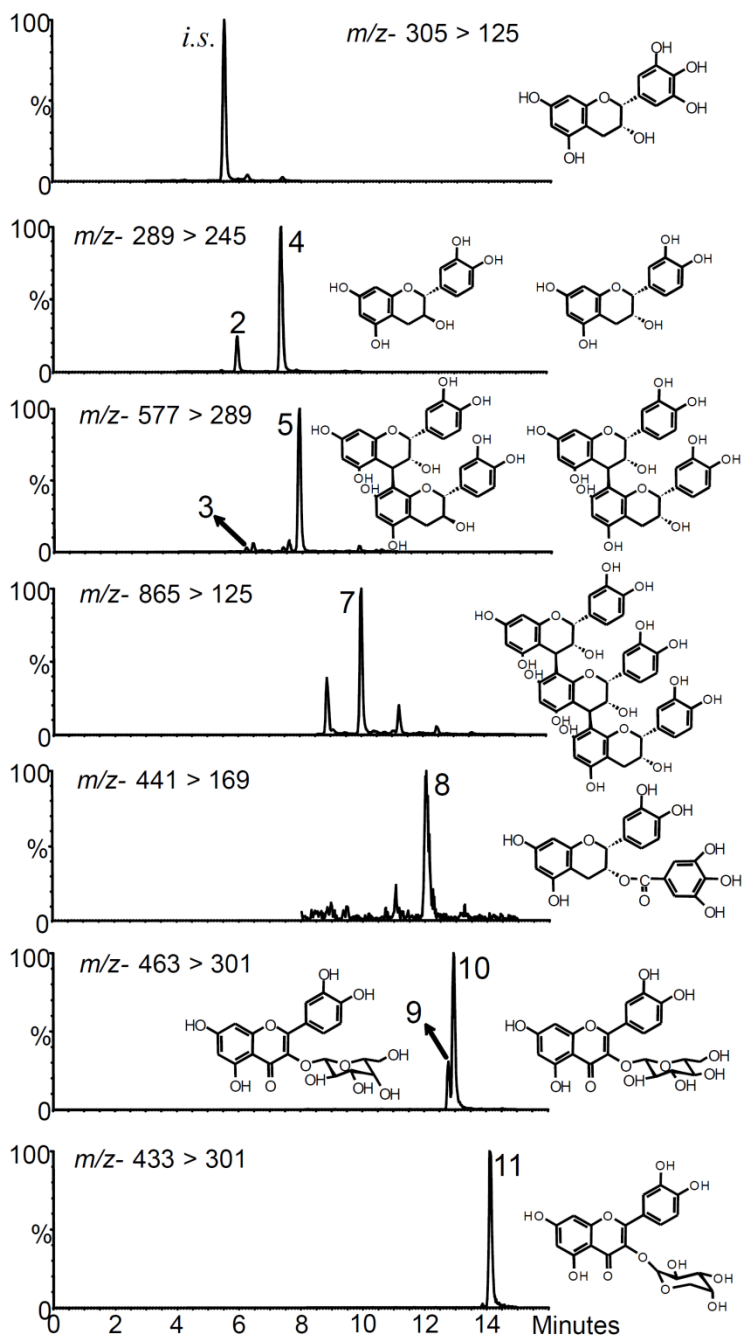
Compound	$t_R$ (mean $\pm$ SD) (min)	DAD signal	MS/MS parameters		
		$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$[\text{M}-\text{H}]^-$ ( $m/z$ -)	$\text{MRM}_{\text{quantification}}$ ( $m/z$ -)	$\text{MRM}_{\text{qualification}}$ ( $m/z$ -)
1 Gallic acid*	1.95 $\pm$ 0.01	271	169	169 > 125	169 > 79
Epigallocatechin ( <i>i.s.</i> )	5.51 $\pm$ 0.01	273	305	305 > 125	305 > 167
2 Catechin	5.95 $\pm$ 0.02	279	289	289 > 245	289 > 109
3 Procyanidin B1	6.19 $\pm$ 0.01	279	577	577 > 289	577 > 407
4 Epicatechin	7.39 $\pm$ 0.01	279	289	289 > 245	289 > 109
5 Procyanidin B2	7.90 $\pm$ 0.01	279	577	577 > 289	577 > 407
6 Epigallocatechin gallate*	9.59 $\pm$ 0.01	274	457	457 > 169	457 > 125
7 Procyanidin C1	10.00 $\pm$ 0.01	280	865	865 > 125	865 > 287
8 Epicatechin gallate	12.03 $\pm$ 0.02	278	441	441 > 169	441 > 125
9 Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside <sup>§</sup>	12.78 $\pm$ 0.01	255, 355	463	463 > 301	463 > 271
10 Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	12.96 $\pm$ 0.01	256, 353	463	463 > 301	463 > 271
11 Quercetin-3- <i>O</i> -arabinoside <sup>§</sup>	14.09 $\pm$ 0.03	255, 353	433	433 > 301	609 > 271

*i.s.*: Internal standard

$t_R$ : Retention time

\* Only in samples added with grape seed extracts.

<sup>§</sup> Only in samples added with cocoa extract.



**Fig. 5.1** Multiple Reaction Monitoring –MRM– profile of “fuet” with Cocoa extract. Peaks: i.s., epigallocatechin (internal standard); 2, catechin; 3, procyanidin B1; 4, epicatechin; 5, procyanidin B2; 7, procyanidin C1; 8, epicatechin gallate; 9, quercetin-3-O-galactoside; 10, quercetin-3-O-glucoside; 11, quercetin-3-O-arabinside.

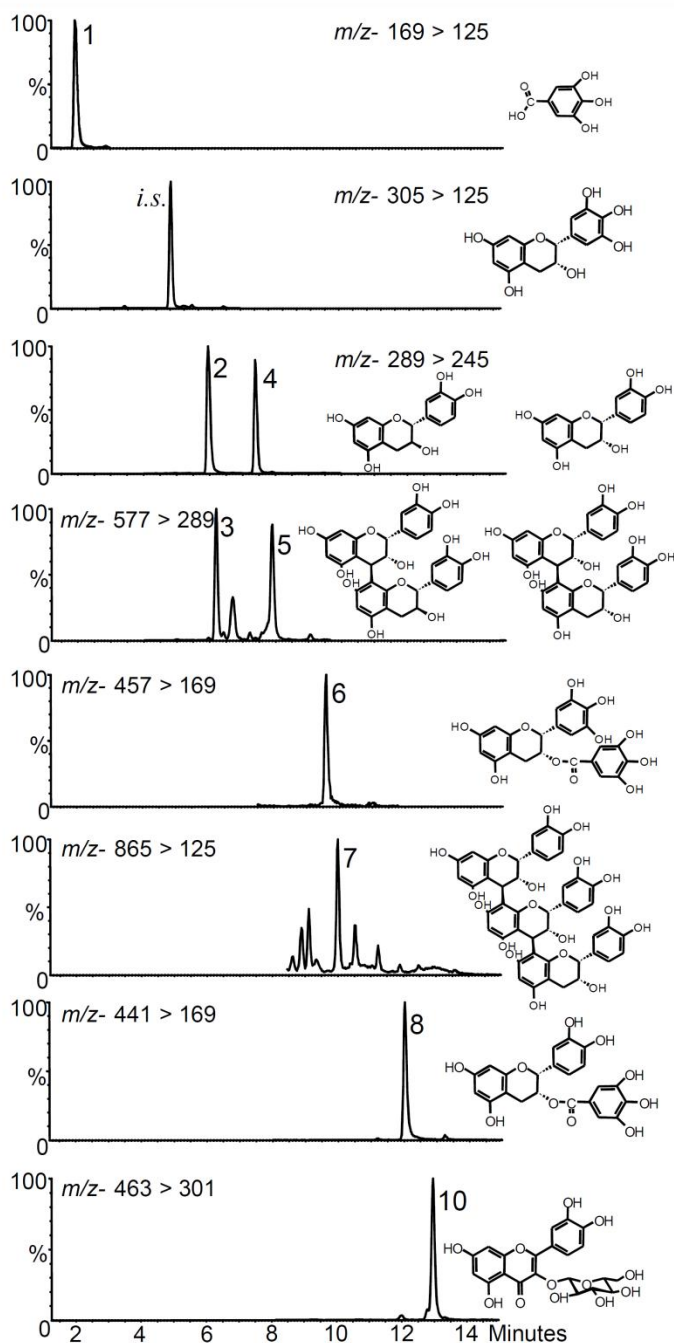


Fig. 5.2 Multiple Reaction Monitoring –MRM– profile of “fuet” with grape seed extract –GSE2–. Peaks: 1, gallic acid; i.s., epigallocatechin –internal standard–; 2, catechin; 3, procyanidin B1; 4, epicatechin; 5, procyanidin B2; 6, epigallocatechin gallate; 7, procyanidin C1; 8, epicatechin gallate; 10, quercetin-3-O-glucoside.

Epigallocatechin was not detected in any treatment, pointing out the suitability of using it as internal standard. Fig. 5.1 shows a typical MRM profile of a “fuet” added with Cocoa extract, where nine phenolic compounds were identified. The profile of glycosylated flavonols, monomeric flavan-3-ols and their oligomers is in agreement with those reported for cocoa samples in other works <sup>(64, 252)</sup>. In addition, a galloylated flavan-3-ol –epicatechin gallate– was quantified in samples added with Cocoa extract.

Fig. 5.2 shows the MRM profile of a “fuet” added with GSE2 extract. Detection of gallic acid, quercetin glucoside, monomeric, dimeric and trimeric flavan-3-ols and their galloylated derivatives as major compounds in grape seed ingredients is in accordance with previously reported data for this kind of extracts <sup>(253)</sup>.

Table 5.3

**Three-way ANOVA results, with main effects of independent variables and their interactions.**

Dependent variables	Independent variables			Interactions			
	Type of sausage (a)	Formulation (b)	Sampling time (c)	a x b	a x c	b x c	a x b x c
Gallic acid	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Catechin	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.05$	<i>n.s.</i>
Procyanidin B1	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.01$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.01$	<i>n.s.</i>
Epicatechin	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Procyanidin B2	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.05$	<i>n.s.</i>
Epigallocatechin gallate	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>
Procyanidin C1	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Epicatechin gallate	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>
Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>
Quercetin-3- <i>O</i> -arabinoside	<i>n.s.</i>	$p \leq 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

*n.s.* : not significant ( $p > 0.05$ ).



### ***Phenolic compounds behavior in cured sausages***

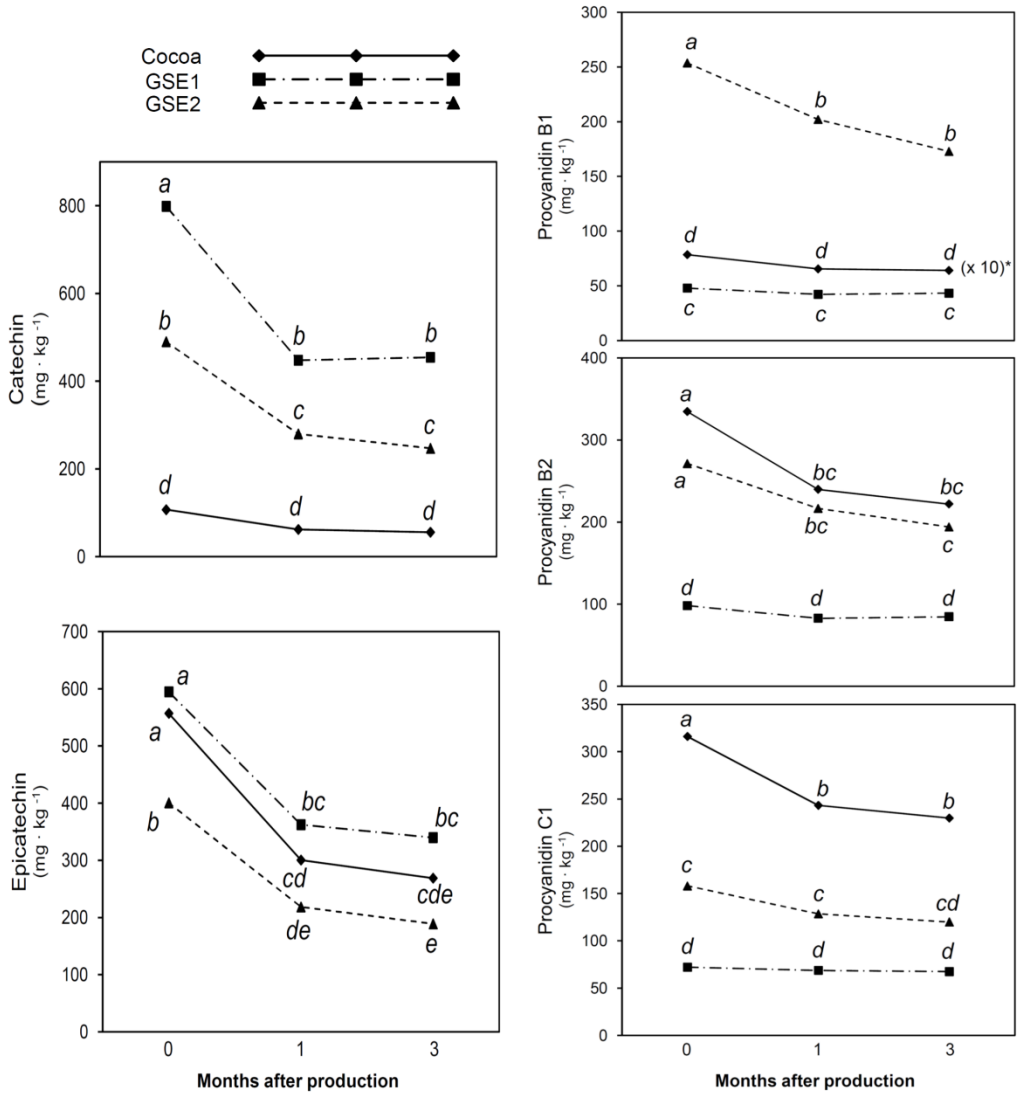
ANOVA results showed that kind of sausage –“fuet” or “salchichón”– did not affect significantly the dependent variables. On the contrary, the different source of the vegetable extracts significantly influenced, as expected, the phenolic profile of the samples. Significant effects on several target compounds were also found for the factor “sampling time” and the interaction “formulation x sampling time” (Table 5.3).

Fig. 5.3 and Fig. 5.4 show the mean values of the target compounds for the combinations of factors “formulation” and “sampling time” to highlight the level and the behavior of the phenolic compounds in dry-cured sausages during their production and storage. Phenolic profile of cocoa samples was characterized by high levels of epicatechin, procyanidins B2 and C1, and glycosylated flavonols. Samples added with the two grape seed extracts showed distinct phenolic profiles, being GSE1 samples more rich in catechin and epicatechin –GSE1–, while GSE2 samples had higher content of procyanidins, gallic acid and galloylated flavan-3-ols.

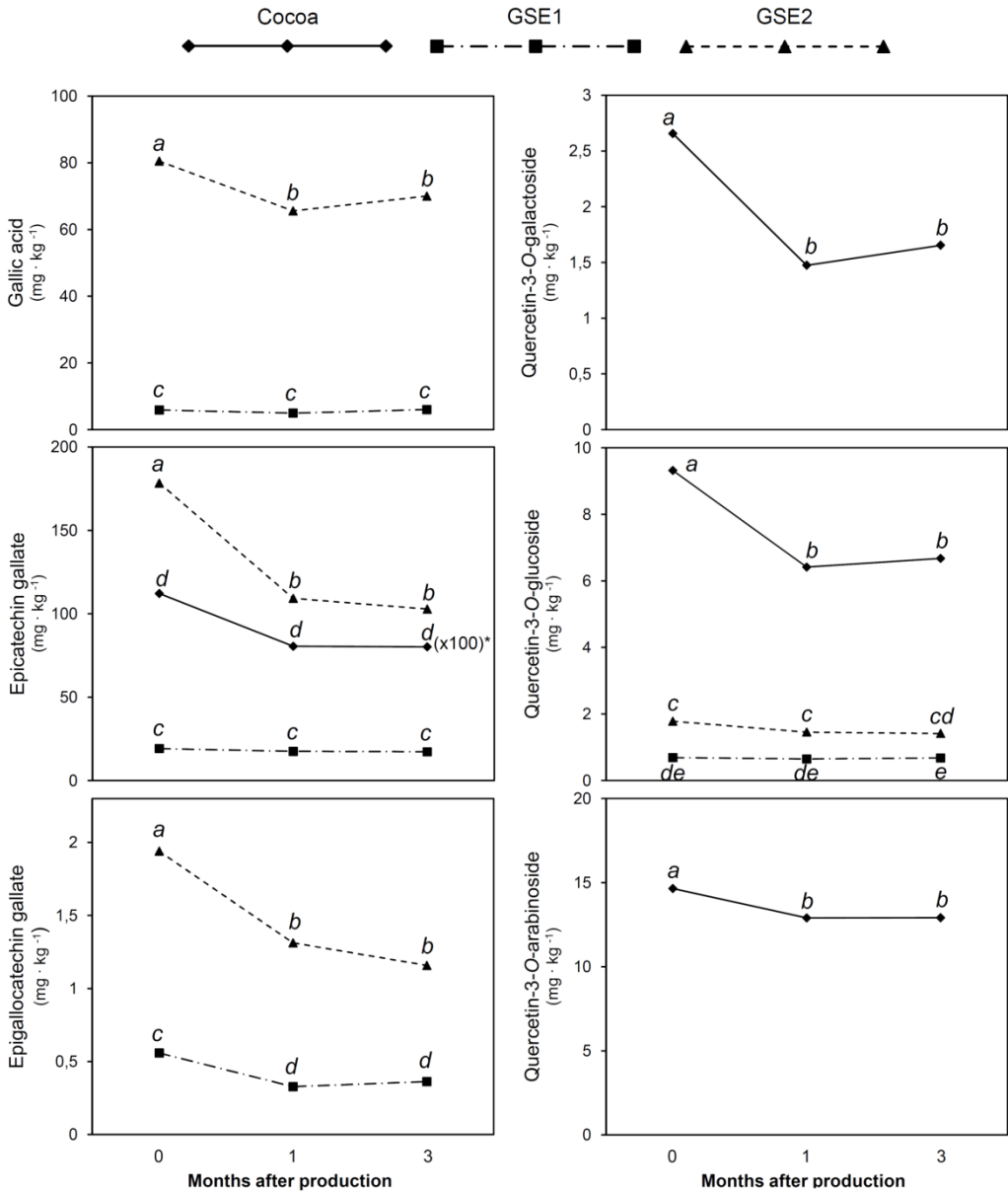
As a general rule, phenolic compounds showed an initial reduction at the end of the ripening process –i.e. the first month after production, when product is ready to be consumed– (Fig. 5.3, Fig. 5.4). Anyway, levels of bioactive polyphenols did not significantly decrease further, at least until the end of commercial shelf life (3 months).

At the end of ripening, catechin and epicatechin were at 54-61 % of their content at the beginning of production (Fig. 5.3). Oligomeric flavan-3-ols –procyanidins– generally showed higher residual levels than their corresponding monomeric compounds (72-95 % residual). During this study no significant changes of the procyanidins concentration was observed in the samples added with grape seed extract GSE1; in a similar way, catechin and procyanidin B1 in the samples added with the cocoa extract, and procyanidin C1 in the samples added with grape seed extract GSE2 did not vary significantly over time (Fig. 5.3).

Epigallocatechin gallate and gallic acid were found only in samples added with extracts from grape seeds, and once again, the relative content of these compounds was significantly different depending on the extracts. Gallic acid showed a high residual content at the end of the ripening process in GSE2 samples (81 % of the initial content), and did not significantly decrease in samples added with GSE1 extract (Fig. 5.4). After one month from production, epigallocatechin gallate was at 59-68 % of its initial content. Epicatechin gallate showed a similar behavior in GSE2 samples (61 %), while its stability was significantly better in GSE1 and Cocoa samples (Fig. 5.4).



**Fig. 5.3** Levels of catechin, epicatechin and oligomeric flavan-3-ols –mg/kg dry weight– in dry-cured sausages added with vegetal extracts. Levels of phenolic compounds in “control” formulation were always under the limits of detection. Month 0 = just after production; month 1 = at the end of ripening; month 3 = at the end of shelf life –three months after production–. Small letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between means. \*Values expressed as mg/kg x 10.



**Fig. 5.4** Levels of gallic acid, galloylated flavan-3-ols and glycosylated flavonols –mg/kg dry weight– in dry-cured sausages added with vegetal extracts. Levels of phenolic compounds in “control” formulation were always under the limits of detection; levels of gallic acid for “Cocoa” samples and levels of quercetin-3-O-galactoside and quercetin-3-O-arabinoside for GSE1 and GSE2 samples were under the limit of quantification (LOQ=3 x LOD). Month 0 = just after production; month 1 = at the end of ripening; month 3 = at the end of shelf life –three months after production–. Small letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between means. \*Values expressed as mg/kg x 100.

Significantly higher amounts of glycosylated flavonols –quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-arabinoside– were found in samples added with cocoa extract (Fig. 5.4). At the end of ripening process, flavonols from cocoa extract were found in dry-cured sausages at a concentration comprised between 56 and 88 % of their initial content, while the concentration of quercetin-3-*O*-glucoside in GSE1 and GSE2 samples was not significantly modified over time (Fig. 5.4).

Phenolics have been pointed out to have a clear protective action against lipid oxidation in meat products, especially in sausages with high lipid content and for large storage periods <sup>(145, 261)</sup>. Under our conditions, the satisfactory stability of the phenolic compounds in dry-cured sausages was probably related with the use of a traditional formulation, including antioxidant agents –nitrites, nitrates and ascorbic acid–, as well as with a not very high fat content (18.7 % ± 0.5 and 15.4 % ± 0.1 for “fuet” and “salchichón” respectively, at the end of the ripening period) which increased protection against oxidation. Results are in concordance with the work of Fernández-López *et al.* <sup>(262)</sup>, who found that hesperidin, a phenolic compound from orange by-products, was very stable in dry-cured sausage over time.

Phenolic compounds concentrations on fresh weight basis in products at the end of the ripening process were higher in “fuet” than in “salchichón” (Table 5.4), due to the different mean water content (33.6 ± 2.1 % and 49.1 ± 1.5 % respectively).

Table 5.4

**Concentration of phenolic compounds –Means ± SD; mg·100g<sup>-1</sup>, fresh weight– in “fuet” and “salchichón” added with vegetal extracts at the end of the ripening process –one month after production–**

Compounds	"Fuet"			"Salchichón"		
	Cocoa	GSE1	GSE2	Cocoa	GSE1	GSE2
Σ Monomeric flavan-3-ols*	21.8 ± 4.3	56.7 ± 9.8	30.9 ± 7.2	20.3 ± 3.1	39.4 ± 6.1	27.1 ± 1.9
Σ Gallic acid and galloylated flavan-3-ols <sup>§</sup>	0.07 ± 0.05	1.75 ± 0.03	11.95 ± 1.87	0.05 ± 0.02	0.96 ± 0.43	8.73 ± 0.43
Σ Oligomeric flavan-3-ols <sup>†</sup>	34.6 ± 5.8	13.1 ± 3.2	33.4 ± 3.4	23.6 ± 1.4	9.7 ± 1.1	30.2 ± 3.2
Σ Glycosylated flavonols <sup>‡</sup>	1.53 ± 0.17	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.96 ± 0.16	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Total	58.0 ± 10.4	71.6 ± 13.0	76.4 ± 12.5	45.0 ± 4.6	50.1 ± 7.6	66.1 ± 5.5

\* Sum of catechin and epicatechin.

<sup>§</sup> Sum of gallic acid, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate.

<sup>†</sup> Sum of procyanidin B1, procyanidin B2 and procyanidin C1.

<sup>‡</sup> Sum of quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-arabinoside.

Available data about dietary phenolic intake vary according to the methodology used for their estimation and the number of compounds included. As a general rule, estimated phenolic intake for monomeric and oligomeric compounds ranges from 20 to 860 mg/day<sup>(75, 76, 263)</sup>, while other works based on Folin-Ciocalteu colorimetric method showed values ranging from 250 to 1000 mg/day<sup>(77, 78)</sup>.

Under our conditions, a portion of 25 g of “fuet” or “salchichón” added with vegetable extracts may provide an intake of 11-19 mg of monomeric and oligomeric phenolic compounds (**Table 5.4**), what would contribute significantly to increase the daily ingestion of these compounds.

## 5.5 Conclusions

For the first time, eleven phenolic compounds of “fuet” and “salchichón” dry-cured sausages added with cocoa and grape seed extracts was monitored from their production to the end of the shelf life. A rapid sample extraction and a suitable UHPLC-DAD-MS/MS method were employed to quantify the phenolic compounds which are characteristic of the vegetal extracts of this study, but these conditions could be easily adapted to assess the behavior of different vegetal extracts in other works on dry-cured sausages.

In both kinds of dry-cured sausages, the main phenolic compounds showed an initial reduction at the end of the ripening process, and their level did not further decrease significantly, at least until the end of the commercial shelf life (3 months). At the end of the ripening process –i.e., when product is ready to be consumed–, catechin and epicatechin were at 54-61 % of their initial concentration, while higher residual percentages were found for gallic acid, galloylated flavan-3-ols, oligomeric procyanidins and glycosylated flavonols.

Even if more studies on large scale productions and sensorial evaluation are required, our findings show that overall evolution of the monomeric and oligomeric phenolic compounds from the vegetal extracts included in this experiment is appropriate for their use as ingredients in the production of dry-cured sausages. Formulation of dry-cured sausages with 0.5 % (w/w) addition of vegetal extracts rich in phenolic compounds seems to be an interesting strategy to develop novel food products with high nutritional value.



---

**6.**

## **Resultats i discussió generals**



## 6.1 Desenvolupament de mètodes d'anàlisi HPLC de compostos fenòlics en matrius vegetals

### *Extracció en matrius vegetals fresques*

Les mostres van ser immediatament refrigerades després de la seva recol·lecció i congelades en poques hores a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins al moment de l'extracció, descartant-ne la deshidratació i la liofilització, amb el propòsit de preservar el màxim possible els compostos fenòlics intactes presents inicialment. L'ús de metanol 100% s'adequa a la recomanació de Hyötyläinen i Kivilompolo <sup>(13)</sup> pel que fa a la polaritat òptima per a l'extracció de flavonoides i àcids hidroxicinàmics, i també en termes d'inactivació enzimàtica, tenint en compte el percentatge d'aigua present en les mostres congelades i hidratades. Per a mostres liofilitzades, una mescla aigua-metanol hagués estat més adequada per a la correcta penetració als teixits deshidratats <sup>(13)</sup>.

Els resultats mostraren que l'extracció amb quinze minuts d'immersió en un bany d'ultrasons en aigua-gel augmentà lleugerament el contingut de compostos fenòlics en els extractes ( $233,13 \pm 8,87$  mg polifenols totals/kg PF), comparant amb extraccions més llargues de dues hores d'agitació mecànica a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $225,18 \pm 2,37$  mg/kg) o amb maceració de dotze hores a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $219,68 \pm 0,53$  mg/kg). En base a aquests resultats, l'extracció en mostres vegetals fresques es feu aplicant ultrasons. Segons Wang i Weller <sup>(173)</sup>, els ultrasons provoquen una vibració mecànica en medis sòlids, líquids o gasosos, amb fenòmens d'expansió i compressió al llarg del medi. Aquests fenòmens en un solvent líquid com el metanol donen lloc a la cavitació, formació de microbombolles que creixen i exploten formant fluxos ràpids de solvent que permeten la seva penetració enmig de la matriu i una extracció accelerada dels seus analits, que en el cas dels compostos fenòlics, es troben compartimentats en vacúols i per tant, aïllats per les membranes vacuolars i cel·lulars i per les parets cel·lulars. En experiments amb doble extracció en tomàquet fresc s'observà que el segon pas d'extracció només contingué el 2,4% del total de compostos fenòlics extrets –expressats com a polifenols totals–. En conseqüència, les anàlisis es realitzaren amb una sola extracció, prioritzant l'estalvi de temps i solvents davant la recuperació obtinguda amb la segona extracció. Possiblement l'ús d'ultrasons facilità l'elevat rendiment de la primera extracció, essent així una tècnica adequada per a escurçar eficaçment el procés d'extracció.



Els resultats de recuperació (77 al 90% en enciam i 68-97% en tomàquet) són satisfactoris en l'anàlisi de compostos fenòlics en mostres biològiques <sup>(27, 264)</sup>, i confirmen la idoneïtat de l'ús de metanol 100% i dels ultrasons per a l'extracció de compostos fenòlics en mostres fresques d'enciam i tomàquet.

Les resolucions cromatogràfiques obtingudes en HPLC i UHPLC permeten separar els compostos quantificats dels interferents presents de forma eficaç a les matrius estudiades. Això ha permès ometre l'ús de tècniques de purificació durant el procés d'extracció, evitant així la possible aparició d'artefactes i l'allargament del mètode d'anàlisi.

### ***Mètode d'anàlisi UHPLC-DAD en enciam i identificació provisional inèdita de compostos derivats d'àcid cumàric***

El mètode exposat en aquest treball de tesi per a l'anàlisi de compostos fenòlics en enciam permet la quantificació d'onze compostos representatius emprant separacions cromatogràfiques de vint-i-set minuts, incloent-hi àcid cafeoiltartàric –àcid caftàric–, àcid dicafeoiltartàric –àcid xicòric–, àcid cafeoilmalic, àcid 5-cafeoilquínic –àcid clorogènic–, àcid 3,5-dicafeoilquínic, àcid 5-*p*-cumaroilquínic, àcid *p*-cumaroiltartàric, àcid di-*p*-cumaroiltartàric, àcid *p*-cumaroilcafeoiltartàric, quercetina-3-*O*-glucurònid i quercetina malonilglucòsid.

Aquest treball presenta informació cromatogràfica, espectroscòpica i espectromètrica detallada que facilita la detecció d'aquests compostos en estudis similars. És destacable la descripció, per primer cop en la bibliografia, de la presència de derivats d'àcid cumàric en enciam, incloent-hi dos compostos –àcid *p*-cumaroilcafeoiltartàric i àcid di-*p*-cumaroiltartàric– que no havien estat mai descrits en la literatura. Aquest treball obre les portes a una caracterització més precisa d'aquests compostos mitjançant NMR. Aquests compostos foren identificats en mostres d'enciam romà –*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*– cultivades a l'aire lliure a Cabriels –Barcelona– en època favorable –primavera–.

L'eficàcia separadora del sistema cromatogràfic fou particularment elevada, amb valors de plats teòrics compresos entre 19000 –àcid cafeoiltartàric– i 194000 –quercetina-3-*O*-rutinòsid–. Els resultats de validació, amb una exactitud de 89-111%, límits de detecció inferiors a 0,8 mg/kg PF, repetibilitat inferior al 7% i recuperació compresa entre el 77 i el 90%, fan d'aquest mètode vàlid per al seu us rutinari en l'avaluació de compostos fenòlics en enciam.

### Caracterització del perfil fenòlic de l'enciam romà

En aquest estudi, les mostres d'enciam analitzades contingueren un contingut promig de 149,4 ( $\pm$  19,1) mg/kg PF de compostos fenòlics. Les anàlisis revelaren la preponderància dels àcids hidroxicinàmics dins el perfil fenòlic (Fig. 6.1), principalment ésters d'àcid cafeic amb àcids tartàric, quínic i màlic (90%). Els flavonoides, presents en forma de derivats de quercetina, representen un grup menor dins el perfil fenòlic (5,4%). Per la seva banda, el grup d'àcids hidroxicinàmics derivats d'àcid cumàric representaren el 10,2%\* del contingut total de compostos fenòlics en les mostres analitzades.

La presència de derivats d'àcid cumàric, tot i que molt similars estructuralment als derivats d'àcid cafeic, pot requerir la presència de vies metabòliques no considerades actualment en l'enciam, així com activitats fisiològiques diferenciades a la dels seus homòlegs cafeoil. La seva descoberta pot estimular estudis per revelar-ne el seu metabolisme, possibles activitats biològiques així com els factors que indueixen la seva síntesi en enciam.

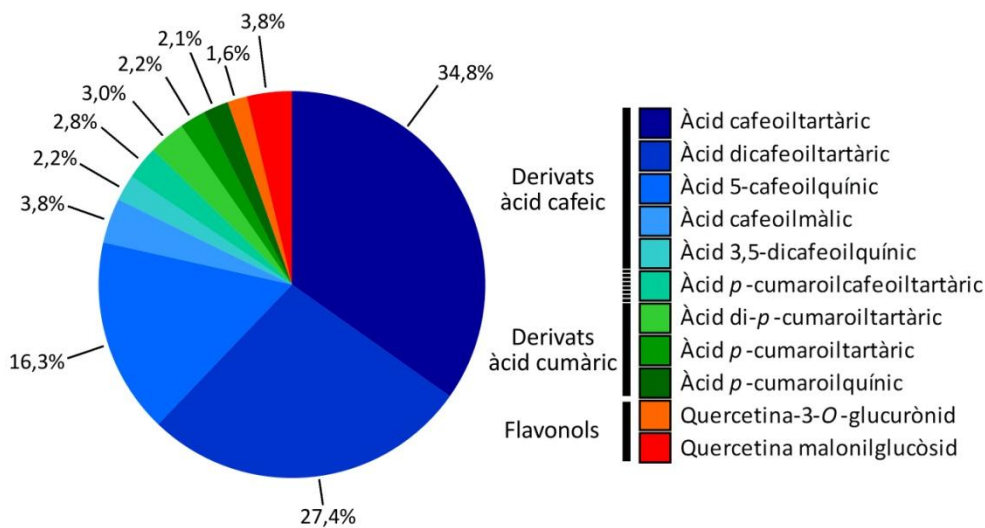


Fig. 6.1 Composició percentual dels compostos fenòlics presents en els enciams romà analitzats.

\* L'àcid *p*-cumaroilcafeoiltartàric ha estat considerat derivat d'àcids cafeic i cumàric en aquest recompte.

### **Mètode d'anàlisi HPLC-DAD en tomàquet**

Aquesta tesi detalla una metodologia ràpida, senzilla i validada per a l'anàlisi de deu compostos fenòlics majoritaris del tomàquet. Permet la quantificació de cinc àcids hidroxicinàmics i cinc flavonoides, incloent-hi àcid 4-cafeoilquínic, àcid 5-cafeoilquínic –àcid clorogènic–, àcid dicafeoilquínic I, àcid dicafeoilquínic II, àcid tricafeoilquínic, quercetina-3-*O*-rutinòsid, quercetina trisacàrid, campferol-3-*O*-rutinòsid, naringenina i naringenina calcona.

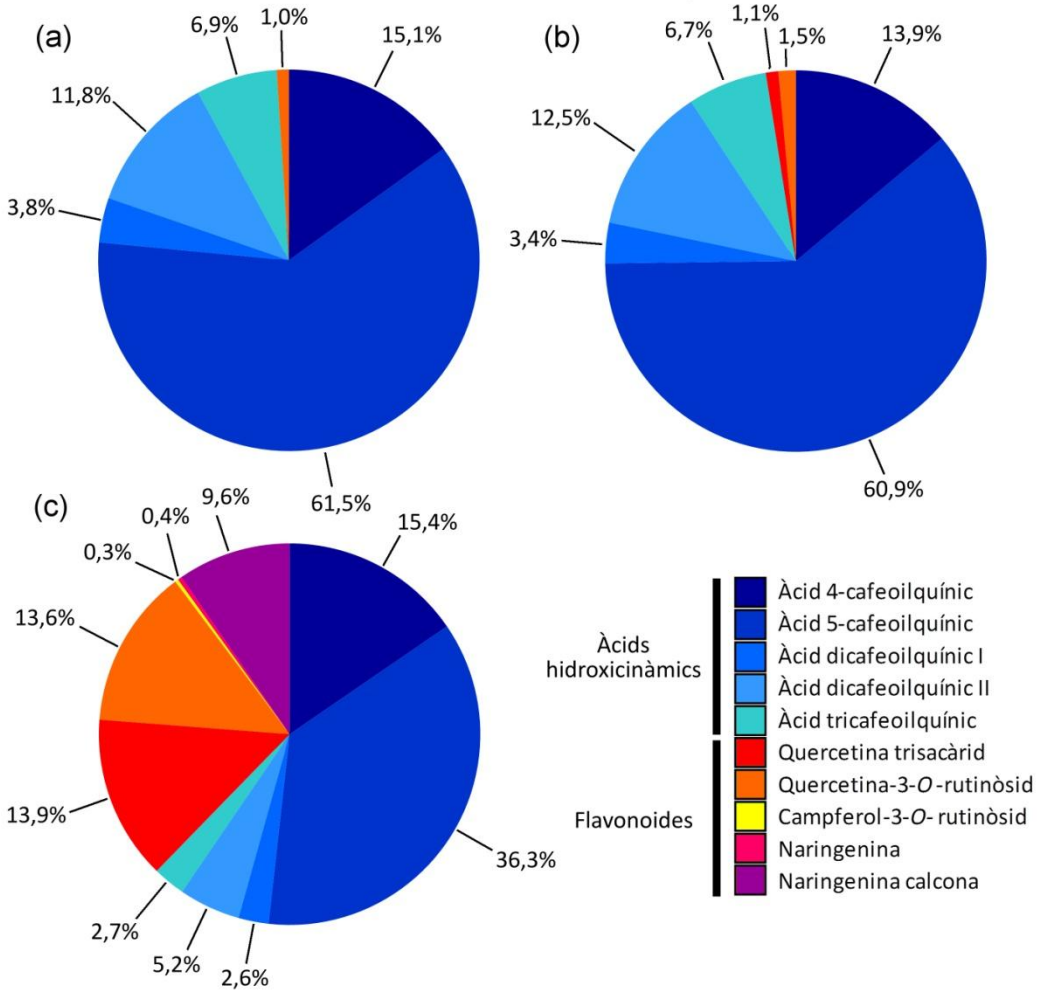
Existeixen nombrosos mètodes publicats que descriuen l'anàlisi de compostos fenòlics en fruits de tomàquet, no obstant, aquest estudi descriu per primer cop un mètode que reuneix metodologia simplificada, instrumentació convencional i validació adequada, omplint així un buit existent a la bibliografia.

L'extracció i el pretractament de mostra simplificats –no inclou liofilització, maceració, hidròlisi, purificació en fase sòlida ni cicles múltiples d'extracció– permeten assimilar un nombre important de mostres en menys temps i utilitzar menys material i reactius. La importància de l'ús d'instrumentació convencional recau en que el mètode pot ser traslladat a qualsevol laboratori amb instrumentació HPLC. L'ús de tecnologia UHPLC permet obtenir temps de retenció inferiors, així com prestacions cromatogràfiques superiors –vegeu capítol 2–, tot i que l'ús d'aquesta instrumentació requereix equips i consumibles més cars que la HPLC convencional. Un altre estudi publicat a posteriori també ha ressaltat la importància del desenvolupament de mètodes d'anàlisi de compostos fenòlics utilitzant tecnologia assequible, metodologies simplifiades i una correcta validació <sup>(265)</sup>.

L'aplicació del mètode permet obtenir dades complertes i fiables sobre el contingut fenòlic de les mostres, gràcies a l'anàlisi d'un nombre significatiu d'àcids hidroxicinàmics i flavonoides, representatius de la diversitat fenòlica real del tomàquet, així com dels resultats de validació. Aquests últims es poden considerar satisfactoris per a un mètode de compostos fenòlics en mostres naturals, tot i la simplificació del mètode i de la instrumentació. La puresa dels pics quantificats fou confirmada amb el test de puresa de pic, que es basa en l'homogeneïtat de l'espectre UV-Vis. Això significa que els interferents presents als extractes analitzats no afectaren a la integració dels pics quantificats, extrem que permet considerar que la selectivitat del mètode, és a dir, la capacitat del mètode per discernir un compost enmig dels interferents <sup>(190)</sup>, fou bona.

**Caracterització del perfil fenòlic de les varietats de tomàquet Montserrat, Pera de Girona i Caramba**

Els àcids hidroxicinàmics representen la major part del contingut fenòlic en les tres varietats estudiades, amb l'àcid 5-cafeoilquínic –àcid clorogènic– com a compost



**Fig. 6.2** Composició percentual dels compostos fenòlics presents en tomàquets de les varietats Montserrat (a), Pera de Girona (b) i Caramba (c).

principal. No obstant, la diferent contribució que tenen àcids hidroxicinàmics i flavonoides dins el perfil fenòlic de les tres varietats és remarcable (Fig. 6.2). Les mostres de la varietat *Caramba* contingueren  $48,99 (\pm 4,41)$  mg/kg (PF) d'àcids hidroxicinàmics, per sota dels  $59,65 (\pm 15,39)$  mg/kg (PF) de la *Pera de Girona* i dels  $79,26 (\pm 15,31)$  mg/kg (PF) de la *Montserrat*. La família de flavonoides és minoritària en aquestes dues últimes varietats ( $1,55 \pm 0,58$  i  $0,82 \pm 0,35$  mg/kg PF respectivament), mentre que a *Caramba* la seva presència és significativament superior ( $29,67 \pm 7,02$  mg/kg PF), principalment derivats de quercetina i naringenina calcona.

Les diferències observades en el perfil de les tres varietats estan en consonància amb les dades presentades pel complet *review* de Sliestad i col·laboradors <sup>(213)</sup>, on també s'observa que la concentració dels diferents compostos fenòlics depèn fortament de la varietat. Els resultats posen de manifest que convé aplicar mètodes d'anàlisi que tinguin en compte un ampli ventall de compostos, per no perdre informació important sobre el contingut fenòlic real de les mostres. Per exemple, els mètodes d'anàlisi que es restringeixen a certes famílies de flavonoides obtindrien resultats molt poc representatius si s'apliquessin a mostres de *Montserrat* i *Pera de Girona*.

Aquesta tesi presenta per primer cop una anàlisi detallada del contingut fenòlic en dues varietats importants però de distribució limitada a Catalunya –*Montserrat* i *Pera de Girona*– i d'una varietat de distribució àmplia i amb important valor comercial –*Caramba*–. A l'originalitat dels resultats s'hi ha de sumar la importància de la caracterització de varietats hortícoles de distribució limitada. No hi ha dubte que la globalització en el terreny agrícola empeny certes varietats a la desaparició, en benefici de varietats amb més rendiment econòmic. El coneixement del valor nutricional de les varietats de distribució limitada, sovint superior a les varietats més rendibles econòmicament, pot permetre donar més arguments per a la seva conservació a part dels motius patrimonials. Aprofundir en el coneixement de les varietats locals és precisament un dels objectius del projecte Truefood finançat per la Unió Europea <sup>(266)</sup>.

## 6.2 Aplicació dels mètodes HPLC-DAD d'anàlisi de compostos fenòlics en estudis de l'efecte de condicions agronòmiques

Com s'ha discutit en el capítol 6.1, els mètodes d'anàlisi HPLC descrits en aquesta tesi s'han desenvolupat amb la finalitat de ser aplicats en estudis que requereixen un nombre considerable de mostres, podent processar així les mostres necessàries en un temps òptim i utilitzant la instrumentació HPLC convencional disponible en el laboratori.

En aquest sentit, els mètodes desenvolupats varen ser emprats per a diversos estudis realitzats en el marc del projecte Truefood<sup>(266)</sup>. Els estudis tingueren en comú la recerca de la influència de diversos factors agronòmics sobre el valor nutricional d'enciams i tomàquets. En el cas de l'enciam, es buscà l'impacte que tingué la presència de caps blancs –*Lobularia maritima* L.– en un cultiu a l'aire lliure, dins una estratègia ecològica d'atracció d'insectes depredadors de plagues per substituir l'ús de pesticides. L'ús del mètode HPLC per a l'anàlisi de compostos fenòlics en enciam permeté detectar que la substitució de pesticides per la presència de caps blancs influencià positivament la concentració d'àcids hidroxicinàmics en els enciams<sup>(267)</sup>.

El mètode d'anàlisi de compostos fenòlics en tomàquet fou aplicat satisfactòriament en un estudi realitzat sobre les varietats *Montserrat*, *Pera de Girona* i *Caramba*. En aquest cas, els paràmetres agronòmics estudiats foren l'ús de tractaments antifúngics ecològics i l'aplicació de dosis baixes de nitrogen en la fertilització. La quantificació de compostos diferents permeté observar diferències en el perfil fenòlic segons els tractaments, diferències a més que estigueren determinades pel tipus de varietat. Els resultats seran aviat disponibles en un article publicat per Erba i col·laboradors.

El mateix mètode, malgrat que quantificant només els compostos de la família dels flavonoides, fou aplicat en una altra investigació sobre l'efecte de l'aplicació de fungicides ecològics sobre el valor nutricional del tomàquet *Belladonna*. Aquest darrer estudi es troba detallat en el capítol 4 d'aquesta tesi. En aquest estudi s'observà que el perfil fenòlic de la varietat *Belladonna* és similar al de la varietat *Caramba*, amb una presència destacada de naringenina calcona i derivats de quercetina. En aquesta varietat, l'aplicació dels elícitors Chitoplant® i Milsana® –productes naturals aplicats per potenciar la resistència natural a les plagues– en absència de plagues suposà un lleuger increment en la concentració de derivats de quercetina. No obstant, la tendència en mostres cultivades amb presència d'oïdi –*Leveillula taurica*– fou inversa, les mostres sense

tractament –i més afectades per l'oïdi– presentaren un contingut superior en compostos fenòlics, particularment naringenina. Així doncs, la presència d'oïdi possiblement pesà més que l'aplicació d'elictor en la síntesi de compostos fenòlics, tot i que en absència de plaga l'ús d'elictor suposà un augment en alguns dels paràmetres estudiats. Aquests resultats són una mostra de com es pot influenciar agronòmicament el contingut en compostos fenòlics, però també de la seva dependència de les condicions ambientals, en aquest cas, de la presència de plagues.

## 6.3 Anàlisi UHPLC-DAD-MS de compostos fenòlics exògens en matrius càrnies

### *Extracció en matriu càrnia*

Hi ha molt poca informació bibliogràfica referent a l'extracció i anàlisi de compostos fenòlics en matrius càrnies. Fernández-López i col·laboradors <sup>(262)</sup> quantificaren un sol compost fenòlic, l'hesperidina –flavanona glicosilada– en embotit sec curat amb fibra de taronja, utilitzant metanol 100%. En el treball descrit en aquesta tesi es testaren diferents extractants per optimitzar l'extracció. La recuperació de compostos fenòlics fou superior amb acetona 70% que amb metanol 50%. L'acetona 70% ja havia estat descrita prèviament per altres autors com al millor solvent per a l'extracció de procianidines en matrius vegetals <sup>(268)</sup>.

És ben coneguda l'afinitat dels flavonoides per les proteïnes i la conseqüent formació de complexos estables entre aquests compostos <sup>(153)</sup>. Es provà l'ús del detergent CHAPS i del surfactant SDS per evitar un eventual efecte negatiu en l'extracció degut a la presència de proteïnes en les mostres. Les propietats desnaturalitzants i solubilitzadores de proteïnes d'aquests dos additius no resultaren en un increment de la recuperació de compostos fenòlics –resultats no publicats–. Els resultats de recuperació amb acetona 70% foren en general satisfactoris per a tots els compostos, malgrat que les procianidines tingueren els valors més baixos, entre 56 i 62%.

La presència important de lípids a les mostres féu aconsellable l'ús d'un antioxidant, l'àcid ascòrbic, per evitar processos d'oxidació lipídica durant l'extracció que podrien provocar la degradació de compostos fenòlics presents en les mostres.

### **Anàlisi UHPLC-DAD-MS de compostos fenòlics en embotits secs curats enriquits amb extractes de cacau i de llavor de raïm**

Els compostos fenòlics presents a les mostres i separats cromatogràficament foren identificats utilitzant informació cromatogràfica –temps de retenció–, espectral –DAD– i espectromètrica –MS–. L'anàlisi UHPLC acoblat a detecció MS en mode MRM –multiple reaction monitoring– permeté quantificar un nombre considerable de compostos monomèrics i oligomèrics en només catorze minuts, concretament àcid gàl·lic, catequina, epicatequina, epicatequina gal·lat, epigal·locatequina gal·lat, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, quercetina-3-*O*-glucòsid, quercetina-3-*O*-galactòsid i quercetina-3-*O*-arabinòsid. A la rapidesa i resolució del sistema UHPLC s'hi ha de sumar la capacitat del MRM per detectar compostos amb una elevada especificitat –detecta només les substàncies que presenten una fragmentació, o transició, característica d'un compost determinat–, evitant a més l'emascament dels interferents.

Els fuets i llonganisses elaborats contingueren compostos fenòlics propis dels extractes vegetals afegits <sup>(252, 253)</sup>, mentre que les mostres control –sense extracte vegetal– no contingueren cap compost fenòlic. A diferència de les mostres d'enciam i tomàquet, la quantificació en fuets i llonganisses es realitzà mitjançant calibratge en matriu, utilitzant les mostres control com a matriu sense analits on s'hi afegiren quantitats conegudes de compostos patró.

Les mostres afegides amb els tres extractes comercials utilitzats contingueren un contingut molt important de flavan-3-ols, majoritàriament monòmers –catequina i epicatequina– i oligòmers –procianidines– (Fig. 6.3). Les diferències observades en el perfil fenòlic de les mostres amb els dos extractes de llavor de raïm demostren com el procés d'obtenció dels extractes pot influir molt la composició fenòlica final, tot i procedir de la mateixa matèria primera. Tomas-Barberán i col·laboradors <sup>(64)</sup> mostren un exemple en cacau: els autors obtingueren un extracte quatre vegades més ric en procianidines i vuit vegades més ric en epicatequina i procianidina B2 que un extracte de cacau convencional, mitjançant el control dels processos de fermentació, torrefacció i escaldat.

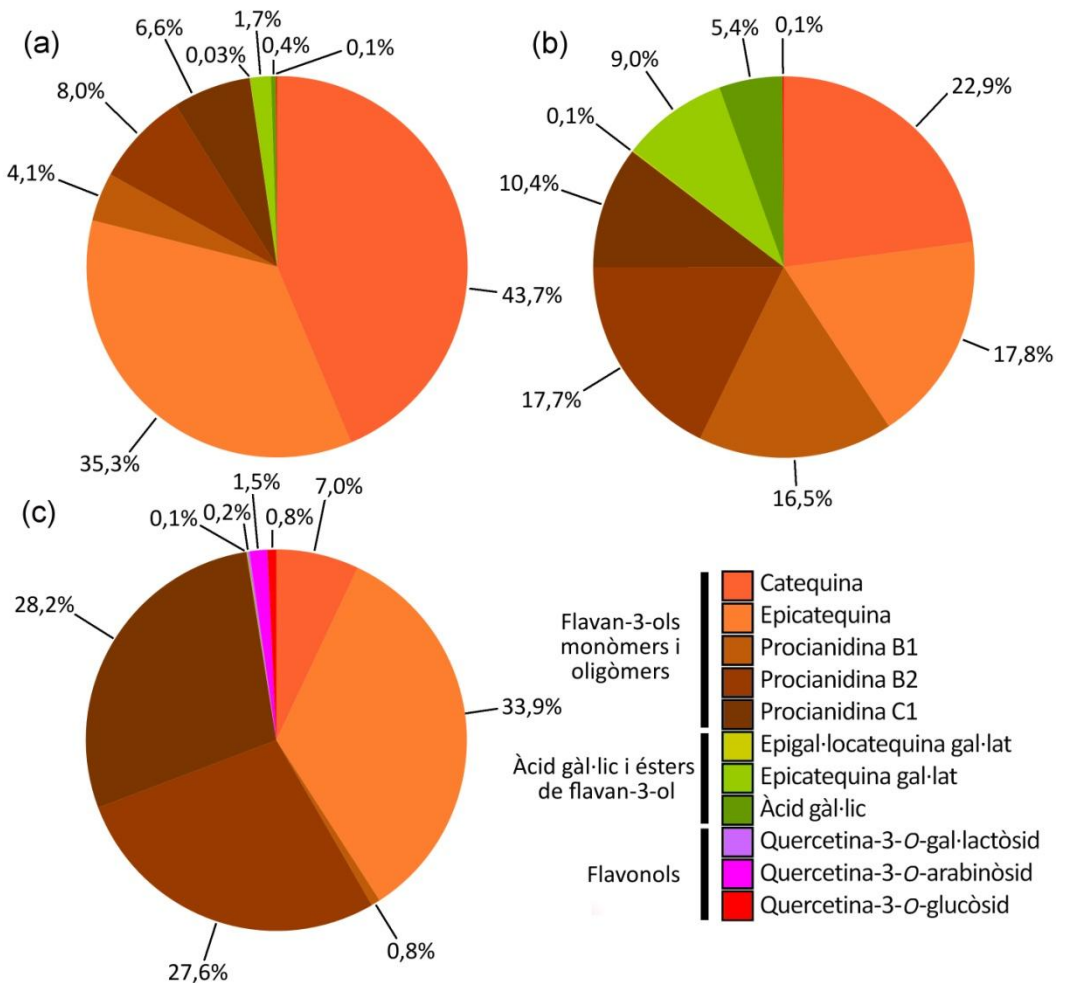
Un mes després de la seva producció, el contingut total de compostos fenòlics monomèrics i oligomèrics en fuet fou de  $716 \pm 128$ ;  $764 \pm 108$ ; i  $580 \pm 81$  mg/kg PF amb els extractes de llavor de raïm GSE1, GSE2 i de cacau, respectivament. En llonganissa, el contingut fou de  $501 \pm 77$ ;  $661 \pm 55$ ; i  $450 \pm 57$  mg/kg PF en mostres amb GSE1, GSE2 i cacau respectivament. Els continguts foren més elevats en els fuets que en les



llonganisses degut a un efecte de concentració per una major deshidratació durant el procés de curat en el cas dels fuet.

### ***Aplicació del mètode en un estudi de l'estabilitat dels compostos en fuet i llonganissa***

A diferència del que es podria pensar a priori, aquest treball demostra que els compostos fenòlics procedents de cacau i llavor de raïm són relativament estables en una matriu càrnia propensa a l'oxidació. Alguns compostos disminueixen significativament entre



**Fig. 6.3** Composició percentual de compostos fenòlics presents en els embotits secs curats enriquits amb extractes de llavor de raïm GSE1 (a), GSE2 (b) i de cacau (c), un mes després de l'elaboració.

finalitzada la manufactura dels embotits –inici del procés de curació– i un mes després de la producció. En aquest període s'hi donen els processos més intensos de curació i deshidratació en els embotits secs curats. No obstant, cap dels compostos analitzats disminuí significativament entre un i tres mesos a partir de la producció, període considerat com a vida útil comercial i on el producte es troba refrigerat. L'addició de nitrit de sodi i ascorbat de sodi en la formulació, ambdós amb activitat antioxidant, pot haver ajudat a preservar l'estabilitat dels compostos fenòlics. Els resultats obtinguts en aquesta tesi estan en concordança amb els descrits per Fernández-López i col·laboradors <sup>(262)</sup>, on es mostra que la flavanona glicosilada hesperidina, procedent de taronja, és estable al llarg de quatre setmanes d'emmagatzematge en embotit sec curat.

Tal com s'ha destacat en el capítol 1.5 d'aquesta tesi, els compostos fenòlics poden ser útils a la indústria alimentària per motius tecnològics i funcionals. La utilitat del seu ús contrasta amb la manca de coneixement sobre l'evolució i estabilitat d'aquests compostos un cop afegits als aliments. Aquesta tesi presenta per primer cop resultats sobre l'evolució del contingut de compostos fenòlics en embotits curats amb extractes vegetals, al llarg del procés de curació i vida útil. A més a més, ofereix un mètode d'anàlisi cromatogràfic UHPLC-DAD-MS que és fàcilment aplicable a altres matrius càrnies similars.

## 6.4 Discussió general

Consumidors, indústria alimentària i administracions perceben cada cop més la importància de disposar d'aliments rics en antioxidants naturals per mantenir un nivell de vida saludable. Malgrat el coneixement que tenim sobre els beneficis d'un consum regular d'aliments vegetals, encara queda molt marge per conèixer en profunditat els mecanismes que regulen la presència de compostos fenòlics en aliments. Paral·lelament, l'ús d'extractes vegetals com a ingredients amb finalitats funcionals pren importància a la indústria alimentària, però el seu ús requereix la determinació de l'estabilitat i la composició dels compostos presents en el producte final.

Les administracions, coneixedores de la importància estratègica d'aquest camp d'estudi, ha subvencional al llarg dels darrers anys una sèrie de projectes –p.ex., Truefood <sup>(74)</sup>, Flavo <sup>(269)</sup>, QLIF <sup>(270)</sup>– amb la finalitat de conèixer millor l'efecte de les variables que afecten el valor nutricional dels aliments i en particular el contingut de compostos

fenòlics. Els mètodes analítics desenvolupats en aquesta tesi s'emmarquen dins la necessitat de disposar de mètodes validats i pràctics per manipular un nombre important de mostres, per tal d'oferir resultats fiables sobre les variables estudiades en aquest tipus de projectes.

El projecte de tesi ha permès desenvolupar mètodes d'anàlisi HPLC de compostos fenòlics que permeten caracteritzar rigorosament el contingut fenòlic en tomàquet, enciam i embotit sec curat amb compostos fenòlics afegits per motius funcionals, representant tres matrius ben diferenciades, dues de vegetals –foliar i fruit– i una de càrnia. Les metodologies proposades representen una millora dels mètodes existents, establerts per a les mateixes matrius, donat que reuneixen tots els condicionants següents:

- i)* Utilitzen una instrumentació relativament senzilla i metodologia simplificada.
- ii)* Permeten obtenir resultats quantitius per un nombre de compostos representatiu de la diversitat fenòlica real present a les mostres.
- iii)* Estan validats.

Els capítols 4 i 5 d'aquesta tesi mostren l'aplicabilitat d'aquests mètodes, en el primer cas per a conèixer l'efecte d'unes condicions agronòmiques particulars en el valor nutricional dels tomàquets, i en el segon cas, per conèixer l'estabilitat dels compostos fenòlics afegits en embotits al llarg de la seva vida útil.

La instrumentació HPLC i UHPLC utilitzada en aquests treballs s'ha mostrat vàlida i eficaç per a la realització dels estudis. Les condicions cromatogràfiques descrites permeten processar nombres elevats de mostres, amb pretractament mínim i sense passos d'hidròlisi o purificació. La detecció DAD i MS ha permès identificar la diversitat de compostos fenòlics presents en les mostres alimentàries, de forma provisional per a aquells compostos sense patró disponible. Ha estat possible descriure per primer cop en enciam quatre àcids hidroxicinàmics derivats d'àcid *p*-cumàric, dos dels quals són inèdits en la literatura. Es presenta informació cromatogràfica, espectroscòpica –DAD– i espectromètrica –MS<sup>n</sup>– detallada per facilitar la seva detecció en nous treballs.

Aquest treball també descriu detalladament per primer cop el contingut en compostos fenòlics a les varietats de tomàquet *Caramba*, *Montserrat* i *Pera de Girona*. El coneixement de contingut fenòlic de *Caramba* és remarcable pel fet que es tracta d'una varietat àmpliament utilitzada per a fins comercials i llargament consumida per la població. El coneixement de les varietats *Montserrat* i *Pera de Girona*, per la seva banda, permet aprofundir en el coneixement del valor nutricional de dues varietats de distribució geogràfica molt limitada. La variabilitat obtinguda en el perfil fenòlic de les

tres varietats subratlla la importància del factor genètic per explicar el contingut en compostos fenòlics presents en el tomàquet.

L'ús d'extractes vegetals és una estratègia molt interessant per a la indústria alimentària, ja que facilita l'obtenció de productes amb el perfil nutricional millorat i amb valor afegit, unes particularitats que haurien de ser desitjoses des del punt de vista de salut pública però també econòmic, si la millora del perfil nutricional aconsegueix incrementar l'acceptació del producte per part del consumidor. El capítol 5 d'aquesta tesi demostra que és possible elaborar embotits secs curats amb un contingut final de compostos fenòlics desitjable des del punt de vista nutricional, i conjuntament amb les corresponents avaluacions sensorials, provaria la idoneïtat de l'ús d'extractes vegetals en aquest tipus de productes.

---

# **7.**

## **Conclusions**



- i)** El mètode d'anàlisi UHPLC-DAD desenvolupat i validat per a la quantificació de compostos fenòlics en enciam *romà* permet obtenir informació àmplia i detallada de la diversitat fenòlica present de forma natural en aquesta hortalissa, representada per cinc derivats d'àcid cafeic, quatre derivats d'àcid cumàric i dos derivats de quercetina.
- ii)** S'ha identificat provisionalment quatre compostos derivats d'àcid cumàric per primer cop en enciam, designats àcid 5-*p*-cumaroilquínic, àcid *p*-cumaroiltartàric, àcid *p*-cumaroilcafeoltartàric i àcid di-*p*-cumaroiltartàric, dels quals, l'àcid *p*-cumaroilcafeoltartàric i l'àcid di-*p*-cumaroiltartàric són inèdits a la literatura. La informació cromatogràfica, espectroscòpica i espectromètrica presentada en aquesta tesi ha de facilitar la seva detecció en altres mostres vegetals, i dóna les bases per a la seva caracterització definitiva mitjançant ressonància magnètica nuclear. La descoberta de nous compostos fenòlics en enciam aporta informació nova sobre les rutes metabòliques que tenen lloc en aquest vegetal.
- iii)** El mètode d'anàlisi HPLC-DAD desenvolupat i validat en tomàquet permet quantificar deu compostos fenòlics majoritaris d'aquest fruit, obtenint així informació detallada i representativa de la diversitat fenòlica endògena en mostres de tomàquet. La simplicitat de la metodologia permet obtenir dades amb menys temps i/o costos que els mètodes d'anàlisi HPLC anteriors, particularment d'aquells que permeten quantificar un nombre significatiu de compostos intactes i es troben validats.
- iv)** El mètode d'anàlisi en tomàquet ha permès la identificació i quantificació per primer cop dels compostos fenòlics presents en les varietats de tomàquet *Caramba*, *Montserrat* i *Pera de Girona*. Les diferències observades en el perfil fenòlic de les tres varietats indica la importància del factor genètic en el metabolisme fenòlic del tomàquet i la necessitat de disposar de mètodes que descriguin un perfil ampli de compostos per obtenir resultats representatius de les diferents varietats.
- v)** El mètode d'anàlisi HPLC en mostres de tomàquet és apte per ser aplicat en estudis que requereixin un nombre important de mostres. Permet l'obtenció de dades quantitatives d'almenys vint-i-quatre mostres diàries, incloent-hi extracció i anàlisi, emprant instrumentació convencional.

- vi)** La síntesi de compostos fenòlics s'incrementà lleugerament en un cultiu de tomàquet amb aplicació dels elícitors Chitoplant® i Milsana®. No obstant, en presència d'oïdi –*Leveillula taurica*– les mostres de plantes no tractades amb elícitor presentaren nivells més alts de flavonoides, possiblement en resposta a una major afectació de la plaga.
- vii)** El mètode d'anàlisi UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup> desenvolupat i validat per a l'anàlisi de compostos fenòlics en embotits secs curats permet quantificar compostos fenòlics procedents d'extractes de llavor de raïm i de cacau, incloent-hi àcid gàl·lic, set flavan-3-ols monomèrics i oligomèrics i tres glicòsids de quercetina.
- viii)** El mètode d'anàlisi en embotit sec curat ha permès determinar l'estabilitat dels compostos fenòlics en fuet i llonganissa. Amb els nivells d'ascorbat i nitrit habituals en la formulació d'aquests embotits, els compostos fenòlics avaluats foren suficientment estables per garantir nivells al final de la vida útil amb finalitats funcionals.





---

**8.**

## **Bibliografia**



1. *Diccionari de la llengua catalana* (2a edició, 2011). Edicions 62: Barcelona.
2. *Gran diccionari de la llengua catalana* (1998). Enciclopèdia Catalana: Barcelona.
3. A. Crozier, I.B. Jaganath i M.N. Clifford (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 965-1096.
4. J.P.J. Marais, B. Deavours, R. Dixon i D. Ferreira (2006). The stereochemistry of flavonoids, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 1-46.
5. E. Hückel (1931). Quantum contributions to the benzene problem. *Zeitschrift für Physik* **72**, 310-337.
6. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy i L. Jiménez (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-747.
7. P.C.H. Hollman i I.C.W. Arts (2000). Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1081-1093.
8. U. Justesen, P. Knuthsen i T. Leth (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **799**, 101-110.
9. C. Santos-Buelga i A. Scalbert (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1094-1117.
10. F.A. Tomás-Barberán i M.N. Clifford (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1073-1080.
11. Ø.M. Andersen i M. Jordheim (2006). The anthocyanins, a *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Ø.M. Andersen i K.R. Markham (Ed.). Taylor and Francis: Boca Raton (EUA), pp. 471-552.
12. H. Wiseman (2006). Isoflavonoids and human health, a *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Ø.M. Andersen i K.R. Markham (Ed.). Taylor and Francis: Boca Raton (EUA), pp. 371-396.
13. T. Hyötyläinen i M. Kivilompolo (2011). Application of HPLC in the analysis of phenols, phenolic acids, and tannins, a *High performance liquid chromatography in*

- phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 477-512.
14. M.N. Clifford (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 362-372.
  15. IUPAC (1976). IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of cyclitols. Recommendations, 1973. *The Journal of Biochemistry* **153**, 23-31.
  16. A.-M. Boudet (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**, 2722-2735.
  17. B.S.J. Winkel (2006). The biosynthesis of flavonoids, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 71-96.
  18. K. Skalicka-Wozniak, M.L. Hanos i K. Glowniak (2011). Phytochemistry, phytopharmacology, and the biological role of plant metabolites, a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 89-106.
  19. F. Quattrocchio, A. Baudry, L. Lepiniec i E. Grotewold (2006). The regulation of flavonoid biosynthesis, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 97-122.
  20. R.A. Dixon i N.L. Paiva (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
  21. K.M. Davies i K.E. Schwinn (2006). Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis, a *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Ø.M. Andersen i K.R. Markham (Ed.). Taylor and Francis: Boca Raton (EUA), pp. 143-218.
  22. F.A. Tomás-Barberán i J.C. Espín (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 853-876.
  23. A.J. Parr i G.P. Bolwell (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 985-1012.
  24. S. Kitamura (2006). Transport of flavonoids, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 123-146.

25. D. Treutter (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* **4**, 147-157.
26. C. Clé, L.M. Hill, R. Niggeweg, C.R. Martin, Y. Guisez, E. Prinsen i M.A.K. Jansen (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* **69**, 2149-2156.
27. B. Abad-Garcia, L.A. Berrueta, D.M. Lopez-Marquez, I. Crespo-Ferrer, B. Gallo i F. Vicente (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A* **1154**, 87-96.
28. M. Brosché i Å. Strid (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* **117**, 1-10.
29. J. Herranz, P. Ferrandis, M. Copete, E. Duro i A. Zalacaín (2006). Effect of allelopathic compounds produced by *Cistus ladanifer* on germination of 20 Mediterranean taxa. *Plant Ecology* **184**, 259-272.
30. M.S.J. Simmonds (2003). Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* **64**, 21-30.
31. T. Sosa, N. Chaves, J.C. Alias, J.C. Escudero, F. Henao i C. Gutiérrez-Merino (2004). Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: A plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 1087-1101.
32. W.A. Peer i A.S. Murphy (2006). Flavonoids as signal molecules: targets of flavonoid action, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 239-268.
33. Y. Dumas, M. Dadomo, G. Di Lucca i P. Grolier (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 369-382.
34. M. Martínez-Ballesta, L. López-Pérez, M. Hernández, C. López-Berenguer, N. Fernández-García i M. Carvajal (2008). Agricultural practices for enhanced human health. *Phytochemistry Reviews* **7**, 251-260.
35. D. Treutter (2010). Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding-visions and constraints. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 807-857.

36. G. Le Gall, M.S. DuPont, F.A. Mellon, A.L. Davis, G.J. Collins, M.E. Verhoeven i I.J. Colquhoun (2003). Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2438-2446.
37. E. Butelli, L. Titta, M. Giorgio, H.P. Mock, A. Matros, S. Peterek, E. Schijlen, R.D. Hall, A.G. Bovy, J. Luo i C. Martin (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* **26**, 1301-1308.
38. D. Chagne, L.W. Kui, R.V. Espley, R.K. Volz, N.M. How, S. Rouse, C. Brendolise, C.M. Carlisle, S. Kumar, N. De Silva, D. Micheletti, T. McGhie, R.N. Crowhurst, R.D. Storey, R. Velasco, R.P. Hellens, S.E. Gardiner i A.C. Allan (2013). An Ancient Duplication of Apple MYB Transcription Factors Is Responsible for Novel Red Fruit-Flesh Phenotypes. *Plant Physiology* **161**, 225-239.
39. A. Myhr i T. Traavik (2002). The Precautionary Principle: Scientific uncertainty and omitted research in the context of GMO use and release. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **15**, 73-86.
40. European Commission: *Health and consumers. Genetically modified food and feed*. Recurs d'internet accessible a:  
[http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index_en.htm).
41. Parlament Europeu i Consell de la Unió Europea (2001). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities*, pp. L106(1-38).
42. N.D. Paul, J.P. Moore, M. McPherson, C. Lambourne, P. Croft, J.C. Heaton i J.J. Wargent (2012). Ecological responses to UV radiation: interactions between the biological effects of UV on plants and on associated organisms. *Physiologia Plantarum* **145**, 565-581.
43. P. García-Macías, M. Ordidge, E. Vysini, S. Waroonphan, N.H. Battey, M.H. Gordon, P. Hadley, P. John, J.A. Lovegrove i A. Wagstaffe (2007). Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (*Lollo Rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 10168-10172.
44. D. Comont, J.M. Abaigar, A. Albert, P. Aphalo, D.R. Causton, F.L. Figueroa, A. Gaberscik, L. Llorens, M.T. Hauser, M.A.K. Jansen, M. Kardefelt, P.D. Luque, S. Neubert, E. Nunez-Olivera, J. Olsen, M. Robson, M. Schreiner, R. Sommaruga, A. Strid, S. Torre, M. Turunen, S. Veljovic-Jovanovic, D. Verdaguer, M. Vidovic, J.

- Wagner, J.B. Winkler, G. Zipoli i D. Gwynn-Jones (2012). UV responses of *Lolium perenne* raised along a latitudinal gradient across Europe: a filtration study. *Physiologia Plantarum* **145**, 604-618.
45. B.E. Ubi, C. Honda, H. Bessho, S. Kondo, M. Wada, S. Kobayashi i T. Moriguchi (2006). Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. *Plant Science* **170**, 571-578.
46. T. Yamane, S.T. Jeong, N. Goto-Yamamoto, Y. Koshita i S. Kobayashi (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and viticulture* **57**, 54-59.
47. S.Y. Wang i W. Zheng (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4977-4982.
48. A.E. Mitchell, Y.J. Hong, E. Koh, D.M. Barrett, D.E. Bryant, R.F. Denison i S. Kaffka (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6154-6159.
49. N. Benhamou (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **1**, 233-240.
50. L.A. Terry i D.C. Joyce (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* **32**, 1-13.
51. L. Mercier, C. Lafitte, G. Borderies, X. Briand, M.T. Esquerre-Tugaye i J. Fournier (2001). The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist* **149**, 43-51.
52. J. Jayaraj, A. Wan, M. Rahman i Z.K. Punja (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection* **27**, 1360-1366.
53. S. Konstantinidou-Doltsinis, E. Markellou, A.M. Kasselaki, M.N. Fanouraki, C.M. Koumaki, A. Schmitt, A. Liopa-Tsakalidis i N.E. Malathrakis (2006). Efficacy of Milsana (R), a formulated plant extract from *Reynoutria sachalinensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). *Biocontrol* **51**, 375-392.
54. F. Daayf, M. Ongena, R. Boulanger, I. El Hadrami i R.R. Belanger (2000). Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1579-1593.
55. B. Fofana, D.J. McNally, C. Labbe, R. Boulanger, N. Benhamou, A. Seguin i R.R. Belanger (2002). Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber

- plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**, 121-132.
56. S. Bautista-Baños, A.N. Hernández-Lauzardo, M.G. Velázquez-del Valle, M. Hernández-López, E.A. Barka, E. Bosquez-Molina i C.L. Wilson (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* **25**, 108-118.
  57. J. Liu, S.P. Tian, X.H. Meng i Y. Xu (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* **44**, 300-306.
  58. D.S.O. Coqueiro, M. Maraschin i R.M.D. Piero (2011). Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. *Journal of Phytopathology* **159**, 488-494.
  59. G.E. Lester i R.A. Saftner (2011). Organically versus conventionally grown produce: common production inputs, nutritional quality, and nitrogen delivery between the two systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 10401-10406.
  60. K. Brandt, C. Leifert, R. Sanderson i C.J. Seal (2011). Agroecosystem management and nutritional quality of plant foods: The case of organic fruits and vegetables. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**, 177-197.
  61. C. Smith-Spangler, M.L. Brandeau, G.E. Hunter, J.C. Bavinger, M. Pearson, P.J. Eschbach, V. Sundaram, H. Liu, P. Schirmer i C. Stave (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? *Ann Intern Med* **157**, 348-366.
  62. Forschungsinstitut für Biologischen Landbau: *Opinion on the publication of the Stanford University Medical School study: "Are Organic Foods Safer or Healthier than Conventional Alternatives? A Systematic Review"*. Recurs d'internet accessible a: [http://www.fibl.net/fileadmin/documents/en/news/2012/stanford\\_stellungnahme\\_lindenthal\\_englisch\\_121106.pdf](http://www.fibl.net/fileadmin/documents/en/news/2012/stanford_stellungnahme_lindenthal_englisch_121106.pdf).
  63. J.-L. Wolfender (2011). LC-NMR and related techniques for the rapid identification of plant metabolites, a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 287-330.
  64. F.A. Tomás-Barberán, E. Cienfuegos-Jovellanos, A. Marín, B. Muguerza, A. Gil-Izquierdo, B. Cerdá, P. Zafrilla, J. Morillas, J. Mulero, A. Ibarra, M.A. Pasamar, D. Ramón i J.C. Espín (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3926-3935.

65. R.M. Hackman, J.A. Polagruto, Q.Y. Zhu, B. Sun, H. Fujii i C.L. Keen (2008). Flavanols: Digestion, absorption and bioactivity. *Phytochemistry Reviews* **7**, 195-208.
66. R. Brouillard (1983). The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochemistry* **22**, 1311-1323.
67. M.N. Clifford (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1063-1072.
68. R. Brouillard, S. Chassaing i A. Fougerousse (2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry* **64**, 1179-1186.
69. G. Mazza i R. Brouillard (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **29**, 1097-1102.
70. A. Cassidy, B. Hanley i R.M. Lamuela-Raventós (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1044-1062.
71. J.K.S. Møller, R.R. Catharino i M.N. Eberlin (2007). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. *Food Chemistry* **100**, 1283-1288.
72. R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren i P.A.M. van Leeuwen (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418-425.
73. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. 2003, World Health Organization: Ginebra (Suïssa).
74. SPES GEIE (Spread European Safety – European Economic Interest Grouping) *TRUEFOOD*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://www.truefood.eu/>.
75. J. Lin, S.M.M. Zhang, K.N. Wu, W.C. Willett, C.S. Fuchs i E. Giovannucci (2006). Flavonoid intake and colorectal cancer risk in men and women. *American Journal of Epidemiology* **164**, 644-651.
76. M.-L. Ovasikainen, R. Törrönen, J.M. Koponen, H. Sinkko, J. Hellström, H. Reinivuo i P. Mattila (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition* **138**, 562-566.
77. A. Scalbert i G. Williamson (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* **130**, 2073S-2085S.



78. P. Brat, S. George, A. Bellamy, L. Du Chaffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault i M.J. Amiot (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition* **136**, 2368-2373.
79. *Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>.
80. V. Neveu, J. Perez-Jiménez, F. Vos, V. Crespy, L.d. Chaffaut, L. Mennen, C.K. C, R.E. isner, J. Cruz, D. Wishart i A. Scalbert (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**,
81. U.S.D.o. Agriculture (2004). Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods.
82. G.A. Boeckler, J. Gershenzon i S.B. Unsicker (2011). Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* **72**, 1497-1509.
83. P. Simonetti, C. Gardana, P. Riso, P. Mauri, P. Pietta i M. Porrini (2005). Glycosylated flavonoids from tomato puree are bioavailable in humans. *Nutrition Research* **25**, 717-726.
84. C.E. Rüfer, A. Bub, J. Möseneder, P. Winterhalter, M. Stürtz i S.E. Kulling (2008). Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, crossover study. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**, 1314-1323.
85. M.N. Clifford (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1033-1043.
86. A. Crozier, D. Del Rio i M.N. Clifford (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* **31**, 446-467.
87. I.S.L. Lee, M.C. Boyce i M.C. Breadmore (2012). Extraction and on-line concentration of flavonoids in *Brassica oleracea* by capillary electrophoresis using large volume sample stacking. *Food Chemistry* **133**, 205-211.
88. A.-M. Aura (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews* **7**, 407-429.
89. J. Fahey i P. Talalay (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 973-979.

90. Y.-J. Surh (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* **3**, 768-780.
91. H. Schroeter, C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C.L. Keen, N.K. Hollenberg, H. Sies, C. Kwik-Urbe, H.H. Schmitz i M. Kelm (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS* **103**, 1024-1029.
92. R. Bugianesi, G. Catasta, P. Spigno, A. D'Uva i G. Maiani (2002). Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *Journal of Nutrition* **132**, 3349-3352.
93. M. Serafini, R. Bugianesi, M. Salucci, E. Azzini, A. Raguzzini i G. Maiani (2002). Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *British Journal of Nutrition* **88**, 615-623.
94. A. Stalmach, W. Mullen, H. Steiling, G. Williamson, M.E.J. Lean i A. Crozier (2010). Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Molecular Nutrition & Food Research* **54**, 323-334.
95. W. Mullen, C.A. Edwards i A. Crozier (2006). Absorption, excretion and metabolic profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* **96**, 107-116.
96. M.R. Khoshayand, T. Roohi, G. Moghaddam, F. Khoshayand, P. Shahbazikhah, M.R. Oveisi i M. Hajimahmoodi (2012). Optimization of a vanillin assay for determination of anthocyanins using D-optimal design. *Analytical Methods* **4**, 824-829.
97. M. Tomczyk, A. Bazyłko i J. Bonarewicz (2012). Method development and validation for optimized separation of quercetin derivatives in selected *Potentilla* species using high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **61**, 265-270.
98. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (2011). Overview of the field of high performance liquid chromatography in phytochemical analysis and the structure of the book, a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 3-12.
99. M.G.L. Hertog (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart-disease and cancer in the 7 countries study. *Archives of Internal Medicine* **155**, 1184-1184.
100. P. Knekt, R. Järvinen, R. Seppänen, M. Heliövaara, L. Teppo, E. Pukkala i A. Aromaa (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* **146**, 223-230.

101. F.L. Büchner, H.B. Bueno-de-Mesquita, J. Linseisen, H.C. Boshuizen, L.A.L.M. Kiemeny, M.M. Ros, K. Overvad, L. Hansen, A. Tjønneland, O. Raaschou-Nielsen, F. Clavel-Chapelon, M.C. Boutron-Ruault, M. Touillaud, R. Kaaks, S. Rohrmann, H. Boeing, U. Nöthlings, A. Trichopoulou, D. Zylis, V. Dilis, D. Palli, S. Sieri, P. Vineis, R. Tumino, S. Panico, P.H.M. Peeters, C.H. Gils, E. Lund, I.T. Gram, T. Braaten, C. Martinez, A. Agudo, L. Arriola, E. Ardanaz, C. Navarro, L. Rodríguez, J. Manjer, E. Wirfält, G. Hallmans, T. Rasmuson, T.J. Key, A.W. Roddam, S. Bingham, K.T. Khaw, N. Slimani, P. Boffetta, G. Byrnes, T. Norat, D. Michaud i E. Riboli (2010). Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes & Control* **21**, 357-371.
102. S. Ruzsnyák i A. Szent-Györgyi (1936). Vitamin P: Flavonols as vitamins (carta a l'editor). *Nature* **138**, 27-27.
103. S. de Pascual-Teresa, D.A. Moreno i C. García-Viguera (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 1679-1703.
104. L. LeMarchand (2002). Cancer preventive effects of flavonoids - A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **56**, 296-301.
105. S.J. Bloor (2001). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, a *Methods in Enzymology*. Vol. 335 (Flavonoids and other polyphenols). D.A. Hopwood (Ed.). Academic Press: Londres (Regne Unit), pp. 3-14.
106. J.-K. Lin i M.-S. Weng (2006). Flavonoids as nutraceuticals, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 213-238.
107. P.G. Pietta (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, 1035-1042.
108. A. Seyoum, K. Asres i F.K. El-Fiky (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**, 2058-2070.
109. A.R. Prottogente, A.S. Pannala, G. Paganga, L.V. Buren, E. Wagner, S. Wiseman, F.V.d. Put, C. Dacombe i C.A. Rice-Evans (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicals Research* **36**, 217-233.
110. E.A. Decker, K. Warner, M.P. Richards i F. Shahidi (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4303-4310.

111. B. Yang, F. Chen, Y. Hua, S.-S. Huang, S. Lin, L. Wen i Y. Jiang (2012). Prooxidant activities of quercetin, *p*-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure–activity relationship. *Food Chemistry* **131**, 508-512.
112. B. Fuhrman, N. Volkova, M. Rosenblat i M. Aviram (2000). Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid Redox Signal* **2**, 491-506.
113. J. Wang i J. Yi (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy* **7**, 1875-84.
114. J. Watson (2013). Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology* **3**,
115. F. Yang, H.S. Oz, S. Barve, W.J.S. de Villiers, C.J. McClain i G.W. Varilek (2001). The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Molecular Pharmacology* **60**, 528-533.
116. B.B. Aggarwal i S. Shishodia (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* **71**, 1397-1421.
117. R. Feng, Y. Lu, L.L. Bowman, Y. Qian, V. Castranova i M. Ding (2005). Inhibition of activator protein-1, NF- $\kappa$ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 27888-27895.
118. C. Chen, R. Yu, E. Owuor i A. Tony Kong (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of Pharmacal Research* **23**, 605-612.
119. C. Pasten, N.C. Olave, L. Zhou, E.M. Tabengwa, P.E. Wolkowicz i H.E. Grenett (2007). Polyphenols downregulate PAI-1 gene expression in cultured human coronary artery endothelial cells: Molecular contributor to cardiovascular protection. *Thrombosis Research* **121**, 59-65.
120. K.D. Setchell, C. Clerici, E.D. Lephart, S.J. Cole, C. Heenan, D. Castellani, B.E. Wolfe, L. Nechemias-Zimmer, N.M. Brown, T.D. Lund, R.J. Handa i J.E. Heubi (2005). S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 1072-1079.
121. R.J. Baber (2013). Phytoestrogens in health: The role of isoflavones, a *Isoflavones: chemistry, analysis, function and effects*. V.R. Preedy (Ed.). Royal Society of Chemistry, pp. 3-13.

122. H. Peleg, K. Gacon, P. Schlich i A.C. Noble (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 1123-1128.
123. B. Sun, A.C. Neves, T.A. Fernandes, A.L. Fernandes, N. Mateus, V. De Freitas, C. Leandro i M.I. Spranger (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6550-6557.
124. R. Ferrer-Gallego, M. García-Marino, J. Miguel Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo i M. Teresa Escribano-Bailón (2010). Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta* **660**, 22-28.
125. R.L. Jackman, R.Y. Yada, M.A. Tung i R.A. Speers (1987). Anthocyanins as food colorants - A review. *Journal of Food Biochemistry* **11**, 201-247.
126. F. Shahidi, Z. Yang i Z.O. Saleemi (1993). Stabilization of meat lipids with flavonoids and flavonoid-related compounds. *Journal of Food Lipids* **1**, 69-78.
127. Y. Yilmaz (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 64-71.
128. N. Balasundram, K. Sundram i S. Samman (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**, 191-203.
129. M.D. Gil, S.J. Bañón, J.M. Cayuela, J. Laencina i M.D. Garrido (2001). Utilización de extractos de plantas como antioxidantes naturales en carne y productos cárnicos: revisión. *Eurocarne* **101**, 29-41.
130. S. Weidner, A. Powalka, M. Karamac i R. Amarowicz (2012). Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 3444-3457.
131. A. Patras, N.P. Brunton, C. O'Donnell i B.K. Tiwari (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* **21**, 3-11.
132. T.P. Labuza (1980). The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology* **34**, 36-41.

133. W.J. Hurst, M.J. Payne, K.B. Miller i D.A. Stuart (2009). Stability of cocoa antioxidants and flavan-3-ols over time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 9547-9550.
134. P. Masson (2011). Quantitative analysis-method validation-quality control, a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 352-372.
135. A.I. Rey, A. Hopia, R. Kivikari i M. Kahkonen (2005). Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubus chamaemorus*), beetroot (*Beta vulgaris vulgaris*) or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *LWT - Food Science and Technology* **38**, 363-370.
136. M.G.-I.d. Ciriano, C. García-Herreros, E. Larequi, I. Valencia, D. Ansorena i I. Astiasarán (2009). Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in  $\omega$ -3 PUFA. *Meat Science* **83**, 271-277.
137. S. Tang, D. Sheehan, D.J. Buckley, P.A. Morrissey i J.P. Kerry (2001). Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science & Technology* **36**, 685-692.
138. I. Valencia, M.N. O'Grady, D. Ansorena, I. Astiasarán i J.P. Kerry (2008). Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Science* **80**, 1046-1054.
139. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López i J.A. Pérez-Álvarez (2009). Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**, 655-660.
140. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López i J.A. Pérez-Álvarez (2010). Effect of adding citrus fibre washing water and rosemary essential oil on the quality characteristics of a bologna sausage. *LWT-Food Science and Technology* **43**, 958-963.
141. S.K. Devatkal, K. Narsaiah i A. Borah (2010). Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Science* **85**, 155-159.
142. L. Aleson-Carbonell, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Alvarez i V. Kuri (2005). Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **6**, 247-255.

143. K. Osada, S. Hoshina, S. Nakamura i M. Sugano (2000). Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3823-3829.
144. I. Berasategi, S. Legarra, M. García-Íñiguez de Ciriano, S. Rehecho, M.I. Calvo, R.Y. Cavero, Í. Navarro-Blasco, D. Ansorena i I. Astiasarán (2011). "High in omega-3 fatty acids" bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. *Meat Science* **88**, 705-711.
145. J.E. Hayes, V. Stepanyan, P. Allen, M.N. O'Grady i J.P. Kerry (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 164-172.
146. M.C. Rojas i M.S. Brewer (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science* **72**, S282-S288.
147. S.R. Kanatt, R. Chander, P. Radhakrishna i A. Sharma (2005). Potato peel extract, a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1499-1504.
148. O. Hassan i L. Swet Fan (2005). The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *LWT - Food Science and Technology* **38**, 315-321.
149. R.G. Brannan i E. Mah (2007). Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxy nitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science* **77**, 540-546.
150. M.A. Rosales, L.M. Cervilla, E. Sanchez-Rodriguez, M.D. Rubio-Wilhelmi, B. Blasco, J.J. Rios, T. Soriano, N. Castilla, L. Romero i J.M. Ruiz (2011). The effect of environmental conditions on nutritional quality of cherry tomato fruits: evaluation of two experimental Mediterranean greenhouses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 152-162.
151. F. Jiménez-Colmenero, J. Carballo i S. Cofrades (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* **59**, 5-13.
152. J.M. Fernández-Ginés, J. Fernández-López, E. Sayas-Barberá i J.A. Pérez-Alvarez (2005). Meat products as functional foods: a review. *Journal of Food Science* **70**, R37-R43.

153. O. Dangles i C. Dufour (2006). Flavonoid-protein interactions, a *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Ø.M. Andersen i K.R. Markham (Ed.). Taylor and Francis: Boca Raton (EUA), pp. 443-470.
154. M. Serafini, R. Bugianesi, G. Maiani, S. Valtuena, S. De Santis i A. Crozier (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* **424**, 1013.
155. H. Schroeter, R.R. Holt, T.J. Orozco, H.H. Schmitz i C.L. Keen (2003). Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature* **426**, 787-788.
156. E. Roura, C. Andrés-Lacueva, R. Estruch, M.L. Mata-Bilbao, M. Izquierdo-Pulido, A.L. Waterhouse i R.M. Lamuela-Raventós (2007). Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Annals of Nutrition and Metabolism* **51**, 493-498.
157. Parlament Europeu i Consell de la Unió Europea (2006). Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union*, pp. (L 404) 9-25.
158. FDA: *Label claims*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims>.
159. M.R. L'Abbé, L. Dumais, E. Chao i B. Junkins (2008). Health claims on foods in Canada. *The Journal of Nutrition* **138**, 1221S-1227S.
160. C.D. Stalikas (2010). Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods, a *Free radicals and antioxidant protocols*. R.M. Uppu (Ed.). Humana Press: New York (USA), pp. 65-90.
161. J.A.T. Pennington (2002). Food Composition Databases for Bioactive Food Components. *Journal of Food Composition and Analysis* **15**, 419-434.
162. Filip Lemière: *Mass analysers for LC-MS*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/052002/8134/article.pdf>.
163. European Commission: *Nutrition claims and conditions applying to them as listed in the annex of regulation (EC) N° 1924/2006*. Recurs d'internet accessible a: [http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/community\\_register/nutrition\\_claims\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/community_register/nutrition_claims_en.htm).
164. European Comission: *EU Register of nutrition and health claims made on foods*. Recurs d'internet accessible a: <http://ec.europa.eu/nuhclaims/>.



165. EFSA: *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2033.pdf>.
166. EFSA: *Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2809.pdf>.
167. EFSA: *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to walnuts and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1156, 1158) and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1155, 1157) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2074.pdf>.
168. EFSA: *Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to water-soluble tomato concentrate and helps to maintain a healthy blood flow and benefits circulation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordance with Article 19 of the Regulation (EC) No 1924/2006*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1689.pdf>.
169. D.-O. Kim, S.W. Jeong i C.Y. Lee (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* **81**, 321-326.
170. J.M. Harnly, S. Bhagwat i L.Z. Lin (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 47-61.
171. M. Stobiecki i P. Kachlicki (2006). Isolation and identification of flavonoids, a *The science of flavonoids*. E. Grotewold (Ed.). Springer: New York (EUA), pp. 47-69.
172. K. Robards (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1000**, 657-691.
173. L. Wang i C.L. Weller (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 300-312.

174. A. Oniszczuk i A. Hawrył (2011). Sample preparation of plant material, a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (USA), pp. 107-149.
175. J.M. Harnly, R.F. Doherty, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S. Bhagwat i S. Gebhardt (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9966-9977.
176. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman i D.P. Venema (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1591-1598.
177. H.M. Merken i G.R. Beecher (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent aglycones. *Journal of Chromatography A* **897**, 177-184.
178. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida i K. Kanazawa (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 571-581.
179. C.A. Torres, N.M. Davies, J.A. Yanez i P.K. Andrews (2005). Disposition of selected flavonoids in fruit tissues of various tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9536-9543.
180. P. Mattila i J. Kumpulainen (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3660-3667.
181. H.M. Merken i G.R. Beecher (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 577-599.
182. K.M. Kalili i A. de Villiers (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science* **34**, 854-876.
183. R. Plumb, J.R. Mazzeo, E.S. Grumbach, P. Rainville, M. Jones, T. Wheat, U.D. Neue, B. Smith i K.A. Johnson (2007). The application of small porous particles, high temperatures, and high pressures to generate very high resolution LC and LC/MS separations. *Journal of Separation Science* **30**, 1158-1166.
184. F. Cuyckens i M. Claeys (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 461.
185. G. Stecher, R. Mayer, T. Ringer, M.A. Hashir, S. Kasemsook, M.N. Qureshi i G.K. Bonn (2011). LC-MS as a method of identification and quantification of plant metabolites,

- a *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. M. Waksmundzka-Hajnos i J. Sherma (Ed.). CRC Press: Boca Raton (EUA), pp. 257-286.
186. J.W. Allwood i R. Goodacre (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis* **21**, 33-47.
187. Filip Lemière: *Interfaces for LC-MS*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/052002/8134/article.pdf>.
188. N.-E. Es-Safi, S. Guyot i P.-H. Ducrot (2006). NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6969-6977.
189. L. Cuadros-Rodríguez, M.G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado i A.M. Gómez-Sáez (2007). Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A* **1158**, 33-46.
190. P. Araujo (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* **877**, 2224-2234.
191. T. Bahorun, A. Luximon-Ramma, A. Crozier i O.I. Aruoma (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**, 1553-1561.
192. R. Llorach, F.A. Tomás-Barberán i F. Ferreres (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5109-5116.
193. M.S. DuPont, Z. Mondin, G. Williamson i K.R. Price (2000). Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3957-3964.
194. A. Romani, P. Pinelli, C. Galardi, G. Sani, A. Cimato i D. Heimler (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* **79**, 337-342.
195. R. Llorach, A. Martínez-Sánchez, F.A. Tomás-Barberán, M.I. Gil i F. Ferreres (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* **108**, 1028-1038.
196. L.Z. Lin i J.M. Harnly (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1084-1096.

197. J.E. Young, X. Zhao, E.E. Carey, R. Welti, S.S. Yang i W.Q. Wang (2005). Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**, 1136-1142.
198. A. Crozier, M.E.J. Lean, M.S. McDonald i C. Black (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 590-595.
199. S. Moco, R.J. Bino, O. Vorst, H.A. Verhoeven, J. de Groot, T.A. van Beek, J. Vervoort i C.H.R. de Vos (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology* **141**, 1205-1218.
200. R. Pernice, D. Scuder, A. Napolitano, V. Fogliano i C. Leonardi (2007). Polyphenol composition and qualitative characteristics of fresh-cut lettuce in relation to cultivar, mulching, and storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**, 420-427.
201. A. Altunkaya i V. Gokmen (2009). Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). *Food Chemistry* **117**, 122-126.
202. M. Gratacós-Cubarsí, A. Ribas-Agustí, J.A. García-Regueiro i M. Castellari (2010). Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*. *Food Chemistry* **121**, 257-263.
203. L. Nováková, Z. Spáčil, M. Seifrtová, L. Opletal i P. Solich (2010). Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta* **80**, 1970-1979.
204. M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli i A. Amati (2002). Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A* **973**, 221-227.
205. K. Robards i M. Antolovich (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. *Analyst* **122**, R11-R34.
206. S. Baur, R.G. Klaiber, A. Koblo i R. Carle (2004). Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 7017-7025.
207. M.N. Clifford, S. Knight i N. Kuhnert (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3821-3832.

208. D. Heimler, L. Isolani, P. Vignolini i A. Romani (2009). Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* **114**, 765-770.
209. E. Cantos, J.C. Espín i F.A. Tomás-Barberán (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5691-5696.
210. M.N. Clifford, K.L. Johnston, S. Knight i N. Kuhnert (2003). Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2900-2911.
211. J.S. Amaral, F. Ferreres, P.B. Andrade, P. Valentao, C. Pinheiro, A. Santos i R. Seabra (2005). Phenolic profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars grown in Portugal. *Natural Product Research* **19**, 157-163.
212. FAO: FAOSTAT. Recurs d'internet accessible a:  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
213. R. Slimestad i M. Verheul (2009). Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 1255-1270.
214. H. Gautier, V. Diakou-Verdin, C. Benard, M. Reich, M. Buret, F. Bourgaud, J.L. Poessel, C. Caris-Veyrat i M. Genard (2008). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 1241-1250.
215. I. Martínez-Valverde, M.J. Periago, G. Provan i A. Chesson (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 323-330.
216. C.A. Torres, P.K. Andrews i N.M. Davies (2006). Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1933-1947.
217. M. Gómez-Romero, A. Segura-Carretero i A. Fernández-Gutiérrez (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* **71**, 1848-1864.
218. Y. Iijima, Y. Nakamura, Y. Ogata, K. Tanaka, N. Sakurai, K. Suda, T. Suzuki, H. Suzuki, K. Okazaki, M. Kitayama, S. Kanaya, K. Aoki i D. Shibata (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant Journal* **54**, 949-962.

219. S. Mintz-Oron, T. Mandel, I. Rogachev, L. Feldberg, O. Lotan, M. Yativ, Z. Wang, R. Jetter, I. Venger, A. Adato i A. Aharoni (2008). Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiology* **147**, 823-851.
220. E. Sánchez-Rodríguez, D.A. Moreno, F. Ferreres, M.d.M. Rubio-Wilhelmi i J.M. Ruiz (2011). Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry* **72**, 723-729.
221. A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, A. Medina-Remón, C. Andrés-Lacueva i R.M. Lamuela-Raventós (2010). Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 2986-2992.
222. R. Slimestad, T. Fossen i M.J. Verheul (2008). The flavonoids of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2436-2441.
223. D. Giuntini, V. Lazzeri, V. Calvenzani, C. Dall'Asta, G. Galaverna, C. Tonelli, K. Petroni i A. Ranieri (2008). Flavonoid profiling and biosynthetic gene expression in flesh and peel of two tomato genotypes grown under UV-B-depleted conditions during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 5905-5915.
224. J.P.E. Spencer, G.G.C. Kuhnle, M. Hajirezaei, H.P. Mock, U. Sonnewald i C. Rice-Evans (2005). The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. *Free Radical Research* **39**, 1005-1016.
225. B. VanderRest, S. Danoun, A.-M. Boudet i S.F. Rochange (2006). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1399-1411.
226. F. Ferreres, M. Taveira, D.M. Pereira, P. Valentao i P. B Andrade (2010). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. *J Agric Food Chem* **58**, 2854-61.
227. H. Li, Z. Deng, R. Liu, J.C. Young, H. Zhu, S. Loewen i R. Tsao (2011). Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 11803-11811.
228. R. Slimestad i M.J. Verheul (2005). Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3114-3119.
229. A. Vallverdú-Queralt, A. Medina-Remón, M. Martínez-Huélamo, O. Jáuregui, C. Andres-Lacueva i R.M. Lamuela-Raventós (2011). Phenolic profile and hydrophilic

- antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 3994-4001.
230. *Code Couleur Tomate* (2007). Centre Technique Interprofessionnel des fruits et légumes: Paris, France.
231. D.K. Asami, Y.-J. Hong, D.M. Barrett i A.E. Mitchell (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1237-1241.
232. M.N. Clifford, W.G. Wu, J. Kirkpatrick i N. Kuhnert (2007). Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 929-936.
233. P.L. Mauri, L. Iemoli, C. Gardana, P. Riso, P. Simonetti, M. Porrini i P.G. Pietta (1999). Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 924-931.
234. N.I. Krinsky i E.J. Johnson (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**, 459-516.
235. P. Riso, F. Visioli, D. Erba, G. Testolin i M. Porrini (2004). Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *European Journal of Clinical Nutrition* **58**, 1350-1358.
236. P.M. Bramley (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* **54**, 233-236.
237. P.M. Suter, C. Sierro i W. Vetter (2008). Nutritional factors in the control of blood pressure and hypertension. *Nutr Clin Care* **5**, 9-19.
238. P. Tripathi i N.K. Dubey (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* **32**, 235-245.
239. D.J. McNally, K. Wurms, C. Labbe i R.R. Belanger (2002). A standardized methodology for the study of induced glycosylated plant phenolics. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **24**, 429-436.
240. N. Benhamou, J.W. Kloepper i S. Tuzun (1998). Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* **204**, 153-168.

241. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization): *The EPPO standards for the efficacy evaluation of plant protection products*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://pp1.eppo.org>.
242. F. Khachik, M.B. Goli, G.R. Beecher, J. Holden, W.R. Lusby, M.D. Tenorio i M.R. Barrera (1992). Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 390-398.
243. C.H. Fiske i Y. Subbarow (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* **66**, 375-400.
244. A. López, A. Montaña, P. Garcia i A. Garrido (2005). Note: Quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives and in commercial presentations of table olives. *Food Science and Technology International* **11**, 199-204.
245. V.L. Singleton i J.A. Rossi (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and viticulture* **16**, 144-158.
246. M.G. Willits, C.M. Kramer, R.T.N. Prata, V. De Luca, B.G. Potter, J.C. Steffens i G. Graser (2005). Utilization of the genetic resources of wild species to create a nontransgenic high flavonoid tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1231-1236.
247. A. Dewitte, L. Lens, J. Van Huylenbroeck, E. Van Bockstaele i M. Hofte (2007). Resistance reactions in rose leaves against powdery mildew (*Podosphaera pannosa*), a *Proceedings of the IV<sup>th</sup> International Symposium on Rose Research and Cultivation*. H.B. Pemberton (Ed.). International Society of Horticultural Science: Lovaina (Bèlgica), pp. 183-188.
248. EPA (United States Environmental Protection Agency): *Regulating pesticides. Fact Sheet*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://www.epa.gov>.
249. NPIC (National Pesticide Information Center): *Recognition and management of pesticide poisonings*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://npic.orst.edu/rmpp.htm>.
250. FECIC (Catalan Federation of Meat Industries): *Nota de premsa*. Recurs d'internet accessible a:  
<http://www.fecic.es//admin/index.php?pagina=descargar&doc=1298886193-0-9.pdf>.



251. Presidencia del Gobierno Español (1980). Legislative order of February 7, 1980, passing the quality norm for raw-cured stuffed meat products in the domestic market. *Boletín Oficial del Estado (BOE)*, 70 (21/03/1980), pp. 6280-6284.
252. F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, I. Casals, C. Andrés-Lacueva, M. Izquierdo-Pulido i R.M. Lamuela-Raventós (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* **38**, 35-42.
253. M. Monagas, I. Garrido, B. Bartolomé i C. Gómez-Cordovés (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta* **563**, 401-410.
254. A.J. Shrikhande (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International* **33**, 469-474.
255. D. Bagchi, M. Bagchi, S.J. Stohs, D.K. Das, S.D. Ray, C.A. Kuszynski, S.S. Joshi i H.G. Pruess (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* **148**, 187-197.
256. R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Romero-Pérez, C. Andrés-Lacueva i A. Tornero (2005). Review: Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International* **11**, 159-176.
257. R.P. Singh, A.K. Tyagi, S. Dhanalakshmi, R. Agarwal i C. Agarwal (2004). Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *International Journal of Cancer* **108**, 733-740.
258. F.M. Steinberg, M.M. Bearden i C.L. Keen (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association* **103**, 215-223.
259. S. Gorelik, M. Ligumsky, R. Kohen i J. Kanner (2008). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB Journal* **22**, 41-46.
260. H. Quesada, J.M. del Bas, D. Pajuelo, S. Díaz, J. Fernandez-Larrea, M. Pinent, L. Arola, M.J. Salvador i C. Bladé (2009). Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *International Journal of Obesity* **33**, 1007-1012.
261. S.A. Coronado, G.R. Trout, F.R. Dunshea i N.P. Shah (2002). Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. *Meat Science* **62**, 217-224.

262. J. Fernández-López, M. Viuda-Martos, E. Sendra, E. Sayas-Barberá, C. Navarro i J. Pérez-Alvarez (2007). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology* **226**, 1-6.
263. C.C.J.M. Simons, L.A.E. Hughes, I.C.W. Arts, R.A. Goldbohm, P.A. van den Brandt i M.P. Weijnenberg (2009). Dietary flavonol, flavone and catechin intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *International Journal of Cancer* **125**, 2945-2952.
264. M. Martínez-Huélamo, S. Tulipani, X. Torrado, R. Estruch i R.M. Lamuela-Raventós (2012). Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 4542-4549.
265. M. Taveira, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, L. Oliveira, P. Valentão i P.B. Andrade (2012). Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves. *Food Chemistry* **135**, 748-755.
266. SPES GEIE (Spread European Safety – European Economic Interest Grouping) *TRUEFOOD, Work Package 4*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.truefood.eu/page.asp?ID=9>.
267. SPES GEIE (Spread European Safety – European Economic Interest Grouping) *TRUEFOOD, Project results of Work Package 4*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.truefood.eu/page.asp?ID=18>.
268. A. Marston i K. Hostettmann (2006). Separation and quantification of flavonoids, a *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Ø.M. Andersen i K.R. Markham (Ed.). Taylor and Francis: Boca Raton (EUA), pp. 1-36.
269. Group FLAVO: *FLAVO workshop 2008 : flavonoids, diet and human health*. Recurs d'internet accessible a: [https://colloque2.inra.fr/flavoworkshop2008\\_eng](https://colloque2.inra.fr/flavoworkshop2008_eng).
270. QLIF: *Quality low input food*. Recurs d'internet accessible a: <http://www.qlif.org/>.