



Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:

- 1.- Dades bàsiques i resums
- 2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.

Avaluació de vitamines i antioxidant en aliments vegetals mitjançant tècniques HPLC-DAD i UPLC-MS/MS.

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom	Cognoms
Albert	Ribas Agustí
Correu electrònic	
albertribasagusti@gmail.com	

Dades del director del projecte

Nom	Cognoms
Massimo	Castellari
Correu electrònic	
massimo.castellari@irta.cat	

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

Universitat de Girona

Número d'expedient

2009FI_B100028

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.

Compostos fenòlics; Vitamina C; HPLC; tomàquet, enciam

Data de presentació de la justificació

12/10/2011





Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

El programa experimental s'ha portat a terme dins el marc de les activitats del projecte TRUEFOOD, finançat per la UE per als anys 2007-2010.

L'objectiu principal d'aquesta activitat ha estat l'avaluació dels continguts en àcid ascòrbic (vitamina C), polifenols totals, àcids fenòlics i flavonoides en mostres de tomàquet i enciam, produïts sota diferents condicions de camp (producció ecològica i convencional).

Per aconseguir els resultats s'han utilitzat mètodes analítics basats en tècniques de cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) i d'ultra-alta eficàcia (UHPLC) acoblades a sistemes de detecció de diode array (DAD) i espectrometria de masses (MSn).

Per a l'àcid ascòrbic, s'ha desenvolupat un mètode ràpid que ha permès la determinació d'aquest compost en diferents matrícies vegetals amb el mínim pretractament de les mostres, utilitzant una fase estacionària HILIC (Fluorinated Stationary Phase).

Els mètodes desenvolupats d'anàlisi de compostos fenòlics han permès realitzar les analisis de forma ràpida, a fi de processar el màxim nombre de mostres per a obtenir resultats representatius. S'ha realitzat una completa caracterització dels extractes de tomàquet i enciam, ampliant el coneixement descrit en la bibliografia sobre la seva composició fenòlica. En el cas de l'enciam, s'ha identificat quatre compostos fenòlics que mai abans han estat descrits i quantificats en aquesta hortalissa.

La definició, amb precisió, dels continguts en vitamina C i compostos fenòlics en les mostres analitzades ha permès comparar els efectes de diferents tècniques de cultiu sobre les característiques nutricionals dels vegetals objecte de l'estudi.

Els mètodes d'anàlisi desenvolupats i els resultats derivats del projecte seran publicats properament en revistes científiques de reconegut prestigi.





Resum en anglès(màxim 300 paraules)

The experimental program was carried out within the TRUEEFOOD framework, financed by the EU from 2007 to 2010.

The main objective of this activity was to evaluate the contents of ascorbic acid (vitamin C), total polyphenols, phenolic acids and flavonoids in tomato and lettuce samples, produced under different agronomic conditions (conventional and biologic productions).

Results were achieved by employing analytical methods based on high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), with diode array detection (DAD) and mass spectrometry (MSn).

A fast method for analysing ascorbic acid was developed, which allowed the determination of this compound in several vegetable matrices with minimal sample pretreatment, using fluorinated stationary phase (HILIC).

The analytical methods developed for phenolic compounds allowed a fast analysis of these compounds, with the aim to analyse the maximum number of samples in order to obtain representative results. Knowledge described in bibliography was increased with the complete characterization of the tomato and lettuce extracts. Four phenolic compounds were described and quantified for the first time in lettuce.

The accurate description of the vitamin C and phenolic content in samples allowed the comparison between the effects of different agronomic techniques on the nutritional composition of the studied vegetables.

Developed analytical methods and the results of the project will be published soon in several prestigious scientific publications.





2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.



Anàlisi de Vitamina C i Compostos Fenòlics en Tomàquet i Enciam

Albert Ribas i Agustí

Agraïments

Agraeixo a l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) la concessió de l'ajut per a la contractació de personal investigador novell (FI), i a l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) per permetre'm realitzar el llarg camí de la tesi doctoral integrant-me en el seu organigrama de treball.

Agraeixo especialment al doctor Massimo Castellari la direcció d'aquest treball, així com la seva dedicació, suport i assessorament que m'ha donat, i per tot el que he après dia rere dia. Agraeixo també al doctor Jose Antonio Garcia la seva dedicació a aquest treball i la seva valuosa ajuda.

Vull agrair càlidament l'ajuda i companyonia de la doctora Carmen Sárraga, sense la qual, aquest treball no hagués estat possible, així com de la doctora Marta Gratacós i de Mariano Bellelli, amb qui he passat bons moments al laboratori. També vull agrair l'ajuda dels companys Carmen Rabaneda, Narcís Sais, Maria Clariana, Elena Viñas, Eugeni Anselmet, Eva Roldós, Ángel Valero, Dolors Roca, Amanda Núñez, Imma Sanguino, Susana Dominguez i de les doctores Isabel Díaz i María Hortós.

Als meus amics i companys de fatigues Jose Moreno, Francesc Ortega, Miquel Ribot, Ferran Prados i Pere Tubert. A en Pere, vull agrair molt especialment l'elaboració de la portada d'aquest treball. Als meus pares Enric i Dolors, i germans Eva i Jordi, pel suport que m'han estat donant durant tants i tants anys.

Aquest treball 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.

Índex

Paraules Clau	iv
Abreviacions	iv
1. Introducció	1
1.1- Consum d'aliments vegetals i influència sobre la salut	1
1.2- Vitamina C	1
1.2.1- Generalitats	1
1.2.2- Activitat biològica	2
1.2.3- Presència en els aliments vegetals	3
1.2.4- Mètodes analítics	4
1.3- Àcids fenòlics i flavonoides	6
1.3.1- Generalitats	6
1.3.2- Activitat biològica	9
1.3.3- Presència en els aliments vegetals	10
1.3.4- Mètodes analítics	12
1.4- Influència de les pràctiques agrònòmiques en el contingut de vitamina C i compostos fenòlics en els aliments vegetals	17
2. Objectius	19
3. Materials i Mètodes	21
3.1- Mostres	21
3.2- Reactius i patrons	23
3.3- Anàlisi de vitamina C en tomàquet i enciam	23
3.3.1- Extracció i conversió	23
3.3.2- Anàlisi HPLC-DAD	24
3.4- Extracció de compostos fenòlics en tomàquet	26
3.4.1- Mètodes d'extracció	26
3.4.2- Anàlisi de polifenols totals	26
3.5- Anàlisi de compostos fenòlics hidrolitzats en extractes de tomàquet	27
3.5.1- Mètodes d'hidròlisi dels extractes	27
3.5.2- Anàlisi HPLC-DAD	28
3.6- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extractes de tomàquet	28
3.6.1- Anàlisi UPLC-DAD-ESI-MS/MS	28
3.6.2- Anàlisi HPLC-DAD	29
3.7- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extractes d'enciam	30
3.7.1- Extracció	30
3.7.2- Anàlisi UPLC-DAD-ESI-MS/MS	31
3.7.3- Anàlisi HPLC-DAD	31

4. Resultats i discussió	33
4.1- Anàlisi de vitamina C en tomàquet i enciam	33
4.1.1- Anàlisi HPLC-DAD	33
4.1.2- Extracció i conversió	35
4.2- Extracció de compostos fenòlics en tomàquet	39
4.3- Anàlisi de compostos fenòlics hidrolitzats en extractes de tomàquet	40
4.3.1- Anàlisi HPLC-DAD de patrons de compostos fenòlics	40
4.3.2- Hidròlisi àcida	44
4.3.3- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'ametlla	45
4.3.4- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d' <i>Aspergillus nigra</i>	46
4.3.5- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa d' <i>Helix pomatia</i>	47
4.4- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extracte de tomàquet	49
4.4.1- Identificació per UPLC-DAD-MS/MS	49
4.4.2- Anàlisi HPLC-DAD	65
4.5- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extracte d'enciam	77
4.5.1- Identificació per UPLC-DAD-MS/MS	77
4.5.2- Anàlisi HPLC-DAD	94
5. Conclusions	107
6. Bibliografia	109

Paraules clau

Vitamina C, antioxidants, compostos fenòlics, àcids fenòlics, flavonoides, HPLC, UPLC, espectrometria de masses, tomàquet, enciam.

Símbols i Abreviacions

- Ø – Diàmetre
AA – Àcid L-ascòrbic (*L-ascorbic acid*)
API – Ionització a pressió atmosfèrica (*atmospheric pressure ionization*)
CAE – Equivalents d'àcid cafeic (*caffeic acid equivalents*)
4-CaQA – Àcid 4-cafeoilquínic (*4-caffeoylequinic acid*), àcid criptoclorogènic (*cryptochlorogenic acid*)
5-CaQA – Àcid 5-cafeoilquínic (*5-caffeoylequinic acid*), àcid clorogènic (*chlorogenic acid*)
CaTA – Àcid cafeoiltartàric (*caffeoyltartaric acid*), àcid caftàric (*caftaric acid*)
CHI – Calcona isomerasa (*chalcone isomerase*)
CHS – Calcona sintasa (*chalcone synthase*)
CID – Dissociació induïda per col·lisió (*collision-induced dissociation*)
CoCaTA – *Coumaroylcaffeoyltartaric acid*
CoQA – Àcid cumaroilquínic (*cumaroylequinic acid*)
CoTA – Àcid cumaroiltartàric (*coumaroyltartaric acid*), àcid cutàric (*coutaric acid*)
CV – Coeficient de variació
DAD – Detector de barra de diòdes (*diode array detector*)
DHA – Àcid L-dehidroascòrbic (*dehydroascorbic acid*)
DiCaQA I – *Dicaffeoylquinic acid I*
DiCaQA II – *Dicaffeoylquinic acid II*
3,5-DiCaQA – *3,5-Dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid)*
DiCaTA – *Dicaffeoyltartaric acid (chicoric acid)*
DiCoTA – *Dicoumaroyltartaric acid*
DNA – Àcid desoxiribonucleic (*deoxyribonucleic acid*)
DTT – Ditiotreitol (*dithiothreitol*)
EC – Electroforesi capil·lar (*capillary electrophoresis*)
ED – Detecció electroquímica (*Electrochemical detection*)
EDTA – Àcid etilendiaminotetraacètic (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
ESI – Ionització per electroesprai (*Electrospray ionization*)
ETH – Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
FAO – Organització de les Nacions unides per a l’Alimentació i l’Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
fig. – Figura
FLD – Detecció per fluorescència
GAE – Equivalents d'àcid gàl·lic (*gallic acid equivalents*)
GC – Cromatografia de gasos (*gas chromatography*)
HILIC – Cromatografia líquida d’interacció hidrofílica (*hydrophilic interaction chromatography*)
HPCE – Electroforesi capil·lar d’alta resolució (*high-performance capillary electrophoresis*)
HPLC – Cromatografia líquida d’alta resolució (*high-performance liquid chromatography*)
k – Factor de capacitat (factor de retenció)
K-Rut – *Kaempferol-3-O-rutinoside*

LC – Cromatografia líquida
LDL – Lipoproteïnes de baixa densitat (*low-density lipoproteins*)
LOD – Límit de detecció (*limit of detection*)
MS – Espectrometria de masses (*mass spectroscopy*)
MSⁿ – Espectrometria de masses amb múltiples etapes
MS/MS – Espectrometria de masses en tàndem (MS^2)
MS/MS/MS – Espectrometria de masses amb tres etapes
m/z – Quocient del pes molecular per la càrrega d'un ió
n – Nombre de rèpliques
N – Nombre de plats teòrics
Nar – *Naringenin*
NarChalc – *Naringenin chalcone*
o/w – Oli en aigua (*oil in water*), coeficient de partició
p.ex. – per exemple
PF – Pes fresc
PFT – Polifenols totals (mètode)
PS – Pes sec
Q-Gluc – *Quercetin-3-O-glucuronide*
Q-MaGlu – *Quercetin-3-O-malonylglicoside*
Q-Rut – *Quercetin-3-O-rutinoside (rutin)*
Q-Tris – *Quercetin trisaccharide*
RNI – Ingesta de nutrients recomenada (*recommended nutrient intake*)
RP – Fase reversa (*reverse phase*)
TBHQ – *Tert-butilhidroquinona (tert-butylhydroquinone)*
TCA – Àcid tricloroacètic (*trichloroacetic acid*)
TriCaQA – *Tricaffeoylquinic àcid*
t_R – Temps de retenció
UV – Ultraviolat
WHO – Organització Mundial de la Salut, OMS (*World Health Organization*)

Nota

En el text, els noms en anglès d'alguns compostos figuren en cursiva. Alguns d'ells, en no tenir l'entrada corresponent en llengua catalana, apareixen només en anglès.

1. Introducció

1.1- Consum d'aliments vegetals i influència sobre la salut

La dieta i la nutrició són factors importants per a la promoció i manteniment d'una bona salut. Obesitat, diabetis, malalties cardiovasculars i càncer són malalties cròniques amb una prevalença cada cop major en els països desenvolupats. Totes elles, estan relacionades amb l'alimentació, i regulant la dieta es pot prevenir en bona part la seva aparició. Per a una dieta nutritiva i diversificada, el consum de fruita i verdures ha de representar-ne una part important. No obstant, el seu consum no arriba als nivells desitjables en la majoria de casos (WHO/FAO, 2003).

S'han trobat evidències convinents que el consum de fruita i verdura redueix el risc de patir obesitat i malalties cardiovasculars, mentre que, a falta d'estudis més detallats, es considera probable que el seu consum redueix el risc de patir diabetis tipus 2 i determinats tipus de càncer. Aquestes propietats s'associen principalment als diferents tipus de components bioactius presents en els vegetals, tals com les vitaminas o els compostos fenòlics (Bravo, 1998; Le Marchand, 2002; Proteggente *et al.*, 2002; WHO/FAO, 2003; Andersen i Markham, 2006; Erdman *et al.*, 2007).

La regió mediterrània ha disposat sempre d'una generosa aportació de fruites i verdures en la seva dieta. L'enciam i el tomàquet, entre d'altres, han format part tradicionalment de la cultura culinària d'aquesta regió (el tomàquet des del segle XVI). En un estudi realitzat en una cohort espanyola, s'estima que el consum diari de fruita fresca és d'uns 276 g i el de verdura d'uns 224 g, dels quals, 53 g són d'hortalisses foliàcies (majoritàriament enciam) i 89 g són d'hortalisses en fruit (tomàquet, entre d'altres) (Agudo *et al.*, 2007).

D'altra banda, la producció d'hortalisses conforma un important sector econòmic a Catalunya. L'any 1999 hi havia censades més de 10.000 hectàrees dedicades al cultiu d'hortalisses, de les quals, el 39,2 % situades a la província de Barcelona, el 36,2 % a Tarragona, el 14,6 % a Lleida i el 9,9 % a Girona. L'any 2007 es produïren a Catalunya 37.000 tones d'enciam i 69.000 tones de tomàquet (11 i 20 % respectivament del total d'hortalisses produïdes) (Idescat, 2009).

1.2- Vitamina C

1.2.1 - Generalitats

Vitamina C és el nom genèric per denominar els compostos amb l'activitat biològica de l'àcid L-ascòrbic (AA) (fig.1.1a). (Odriozola-Serrano, 2007). L'AA és la forma principal biològicament activa, però també s'ha de considerar la seva forma oxidada, l'àcid L-dehidroascòrbic (DHA) (fig. 1.1b), que també presenta

1. Introducció

certa activitat biològica. En canvi, l'àcid D-ascòrbic (àcid eritòrbic o àcid isoascòrbic, fig. 1.1c) només té el 5 % de l'efecte antiescorbútic de l'AA (Fontannaz *et al.*, 2006).

L'AA és estable en sec, però molt làbil en solució. Dissolt, s'oxida fàcilment amb la presència de temperatures altes, pH bàsic, llum, oxigen, metalls i també per acció enzimàtica. L'oxidació d'AA produeix DHA, en una reacció reversible (Benzie, 1999). En solució aquosa, el DHA és inestable i s'oxida irreversiblement a àcid 2,3-dicetogulònic, el qual, ja no presenta les propietats de la vitamina C (Davey *et al.*, 2000; Nováková *et al.*, 2008). Habitualment s'utilitza la suma d'AA i DHA en un aliment per expressar el seu contingut en vitamina C (Odriozola-Serrano, 2007; Nováková *et al.*, 2008).

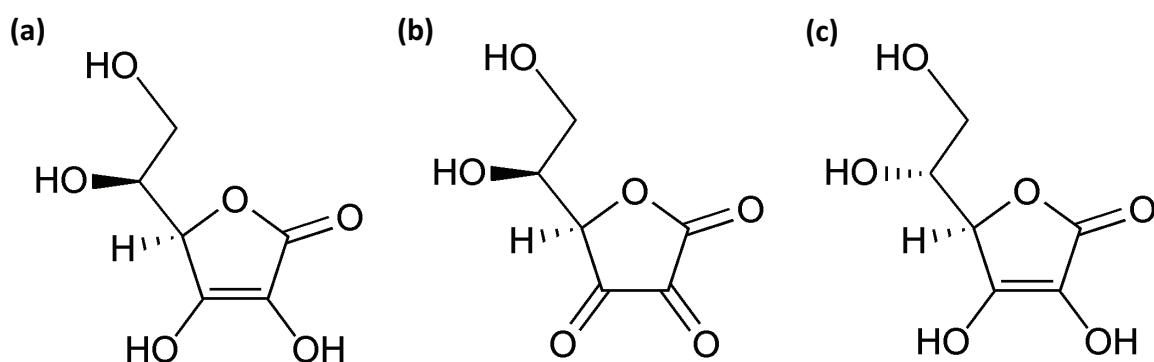


Figura 1.1. Vitamina C. (a): àcid L-ascòrbic (AA); (b): àcid L-dehidroascòrbic (DHA); (c): àcid D-ascòrbic.

1.2.2- Activitat biològica

L'AA és una vitamina present en vegetals molt important per a la nutrició humana. Els efectes del seu dèficit, l'escorbut, varen ser descrits fa segles especialment en mariners que mantenien dietes sense fruita i verdures fresques durant un període prolongat de temps.

Els primats, a diferència de la majoria de vertebrats, són deficientes en l'enzim L-gulono-1,4-lactona oxidasa, que participa en l'últim pas de la síntesi d'AA (Davey *et al.*, 2000), fet que condiciona que en humans l'AA ha de ser subministrat per la dieta (és un nutrient essencial). L'estrés, l'embaràs i el tabac són factors que fan augmentar els requeriments de vitamina C. L'AA intervé especialment donant electrons en reaccions d'hidroxilació, incloent la síntesi de col·lagen i el metabolisme del colesterol, entre d'altres (De Leenheer *et al.*, 1992). Baixes aportacions d'AA C s'associen a un increment del risc a patir d'alguna malaltia crònica, com malalties cardiovasculars o càncer; mentre que dosis elevades d'AA estan associades a una reducció de la pressió sanguínia i dels triglicèrids, a una millora del metabolisme de la glucosa i de la funció endotelial i a un increment de la resistència dels lípids i el DNA a l'estrés oxidatiu (Davey *et al.*, 2000; WHO/FAO, 2002). Malgrat que nombrosos estudis han observat aquestes tendències, la dificultat d'associar una millora en la salut amb el consum d'AA (descartant l'efecte d'altres factors) no permet arribar a resultats concluents (Benzie, 1999; Willcox *et al.*, 2003).

L'AA és un constituent universal de totes les plantes verdes (excepte les llavors en latència), i no és difícil d'obtenir una aportació adequada en la dieta. La taula 1.1 mostra les quantitats recomanades d'ingesta diària, les quals corresponen a la meitat de la quantitat necessària per arribar a la saturació tissular en un

97,5% de la població (WHO/FAO, 2002). Malgrat aquests valors, es poden necessitar quantitats més elevades per a què la ingesta de vitamina C comporti una disminució del risc a sofrir alguna malaltia crònica (Davey *et al.*, 2000).

Grup	RNI (mg/dia)
Nadons i nens	
0-6 mesos	25
7-12 mesos	30
1-3 anys	30
4-6 anys	30
7-9 anys	35
Adolescents, 10-18 anys	40
Adults	
19-65 anys	45
>65 anys	45
Gestació	55
Lactància	70

Taula 1.1. Ingesta de nutrients recomanada (RNI) de vitamina C.
(Font: WHO/FAO, 2002).

1.2.3- Presència en els aliments vegetals

Més del 90% de l'AA de la dieta humana és aportat per aliments vegetals (Lee i Kader, 2000). Els que presenten concentracions més altes de vitamina C són alguns fruits, com l'*acerola* (*Malpighia glabra* L.) (13.000 mg/kg), la grosella negra (*Ribes nigrum* L.) (2.000-2.100 mg/kg) o la guaiaba (*Psidium guajava* L.) (2.300-3.000 mg/kg) (Davey *et al.*, 2000). Altres fruits contenen nivells inferiors (les taronges 500 mg/kg i les pomes 20 mg/kg), però el fet de consumir-los crus i el seu baix pH, que estabilitza l'AA durant l'emmagatzematge, fan que siguin importants fonts de vitamina C. L'AA és molt sensible a l'oxidació, i els seus nivells disminueixen durant l'emmagatzematge, el processat i sobretot, durant la cocció (Davey *et al.*, 2000). Així doncs, el consum de fruites i hortalisses fresques en quantitats adequades permet una aportació important d'AA en la dieta. Malgrat que normalment les verdures pateixen pèrdues per cocció abans de ser consumides, són també fonts d'AA. La taula 1.2 reflecteix la concentració de vitamina C en tomàquet i enciam, segons diferents autors.

Font bibliogràfica	Vitamina C total	
	Enciam (mg/kg PF)	Tomàquet (mg/kg PF)
AFSSA	177	167
Bahorun <i>et al.</i> , 2004	25	86
Davey <i>et al.</i> , 2000	150	200-250
ETH-SwissFIR	40	180
Lee i Kader, 2000	-	136
Proteggente <i>et al.</i> , 2001	<20	180
USDA	240	127

Taula 1.2. Concentració de vitamina C total (AA + DHA) en tomàquet i enciam, segons bibliografia. Abreviatures: **PF**, expressat en pes fresc.

1. Introducció

1.2.4- Mètodes analítics

L'interès generat per l'AA durant anys ha impulsat el desenvolupament d'una gran quantitat de metodologies per a la seva quantificació. Molts d'aquests mètodes són específics per a una determinada matriu; la seva transferència a altres matrius s'ha de fer amb cautela, ja que en plantes existeix un gran nombre de potencials interferents. A la literatura s'hi poden trobar mètodes d'anàlisi espectrofotomètrics, de cromatografia líquida (LC) i d'electroforesi capilar.

Extracció i conversió

L'AA és molt inestable en condicions alcalines i amb presència d'alguns metalls. L'extracció de la mostra es realitza utilitzant un solvent d'extracció àcid, i sovint, amb presència d'un quelant de metalls com l'EDTA. Les condicions àcides també permeten la precipitació de proteïnes i el trencament de les membranes cel·lulars. Els millors resultats de recuperació s'obtenen amb l'àcid metafosfòric (3-6%), per sobre de l'àcid tricloroacètic (TCA) i l'àcid oxàlic. L'àcid perclòric dóna recuperacions similars a l'àcid metafosfòric, però és menys eficient com a precipitant de proteïnes (Davey *et al.*, 2000).

S'assumeix que el contingut de vitamina C total d'un aliment és la suma d'AA i DHA (Odriozola-Serrano *et al.* 2007). L'anàlisi directe de DHA presenta certs inconvenients, ja que és difícil de separar cromatogràficament de l'AA, és molt inestable i absorbeix poc la llum UV (poca sensibilitat en la detecció). Per aquests motius, en la majoria de mètodes el DHA es redueix a AA utilitzant un agent reductor (conversió). El ditiotreitol (DTT) és un dels agents reductors que dóna recuperacions més altes. La determinació de DHA pot fer-se amb una doble anàlisi, la primera amb conversió (AA+DHA) i la segona sense agent reductor (AA) (Odriozola-Serrano *et al.* 2007; Nováková *et al.*, 2008).

Mètodes espectrofotomètrics

La majoria d'assajos d'AA anteriors al 1980 foren realitzats amb determinacions espectrofotomètriques. Moltes de les metodologies emprades es basen en la reducció del colorant blau 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) per l'AA, donant lloc a una forma reduïda sense color. D'altres, utilitzen el poder reductor de l'AA per formar complexos cromogènics. Totes aquestes metodologies es basen en reaccions poc específiques i gens adequades per a matrius vegetals, ja que altres compostos antioxidants, especialment abundants en les plantes, interfereixen en els resultats. Una tècnica més específica és la oxidació d'AA a DHA mitjançant l'enzim ascorbat oxidasa, mesurant la pèrdua d'absorbància a 260 nm, però aquest procediment no permet mesurar directament la quantitat de DHA (Arya *et al.*, 1998; Davey *et al.*, 2000).

Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

Els mètodes d'anàlisi per chromatografia líquida permeten millorar la selectivitat i la sensibilitat, ja que es poden reduir les interferències no-específiques de la matriu. Un desavantatge dels mètodes per LC són els temps relativament llargs d'anàlisi. En la majoria de casos s'utilitzen columnes chromatogràfiques C₁₈ de fase reversa (RP). L'AA i el DHA són molècules molt petites i polars, caràcters que els fan especialment

difícils de retenir en una columna d'aquest tipus. Per separar l'AA del front d'injecció és necessari utilitzar fases mòbils amb un molt elevat percentatge d'aigua (100% o proper), juntament amb pH baix (inferior al pK_a de l'AA, 4,17) per mantenir l'AA en la forma no ionitzada i millorar la retenció. Amb aquest objectiu, s'utilitzen normalment àcid trifluoroacètic, àcid sulfúric o àcid fosfòric, a valors de pH entorn a 2 (*ion-suppression reversed-phase chromatography*). Una alternativa a la RP-HPLC és l'ús de columnes HILIC (cromatografia líquida d'interacció hidrofílica), molt convenient per a l'anàlisi de petites molècules polars. La fase estacionària és polar i la fase mòbil és, en un alt percentatge, un solvent orgànic (Odriozola-Serrano *et al.*, 2007; Nováková *et al.*, 2008).

Electroforesi capil·lar d'alta resolució (HPCE)

Comparant amb les separacions HPLC, les analisis per electroforesi capil·lar poden ser més ràpides, requerir menys quantitat de mostra i tenen bona resolució. No obstant, els límits de detecció són generalment més alts que en l'HPLC (Davey *et al.*, 2000).

Detecció

La tècnica de detecció d'AA en HPLC més freqüent és l'espectrofotometria d'absorció en ultraviolat (UV), a longitud d'ona fixa (HPLC-UV) o amb barra de diòdes (HPLC-DAD). L'AA té el seu màxim d'absorció a longitud d'ona entre 244 i 265 nm, dependent de la composició de la fase mòbil; la longitud d'ona que més s'utilitza és 254 nm. Una altra tècnica de detecció utilitzada és l'electroquímica (ED), ja que l'AA és relativament reactiu i es detecta fàcilment en sistemes coulomètrics i amperomètrics. La determinació d'AA per ED ofereix la sensibilitat i especificitat més alta, i redueix la interferència d'altres substàncies. També s'ha utilitzat la detecció per fluorescència (FLD). Aquesta tècnica requereix la conversió de l'AA a DHA i la posterior derivatització del DHA (per emetre fluorescència). La detecció per espectrometria de masses (MS) ofereix una elevada selectivitat, però també requereix una instrumentació més complexa (Odriozola-Serrano *et al.*, 2007; Nováková *et al.*, 2008).

1.3- Àcids fenòlics i Flavonoides

1.3.1 – Generalitats

Els compostos fenòlics (també coneguts com a polifenols) són un grup de metabòlits secundaris sintetitzats gairebé exclusivament per les plantes, els quals no intervenen directament en la fotosíntesi, en la respiració, en el creixement ni en el desenvolupament dels vegetals (Crozier *et al.*, 2009). Malgrat això, s'estima que aproximadament un 2 % del total de carboni fixat per fotosíntesi és convertit a flavonoides i compostos relacionats, i es troben a tots els tipus de teixits vegetals (Cuyckens i Claeys, 2004). Comprenden els àcids fenòlics (àcids hidroxibenzoics i àcids hidroxicinnàmics, fig. 1.2a), els flavonoides (flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, flavanonols, calcones, dihidrocalcones, antocianidines, antocianines, flavanols i proantocianidines, fig. 1.2b), els estilbens, els lignans i les cumarines, entre d'altres. Tots tenen en comú que posseeixen un o més anell fenòlic. A més a més d'aquesta diversitat, els compostos fenòlics en els teixits vegetals es troben sovint combinats amb glúcids, àcids orgànics o en forma d'oligòmers i polímers (Manach *et al.*, 2004).

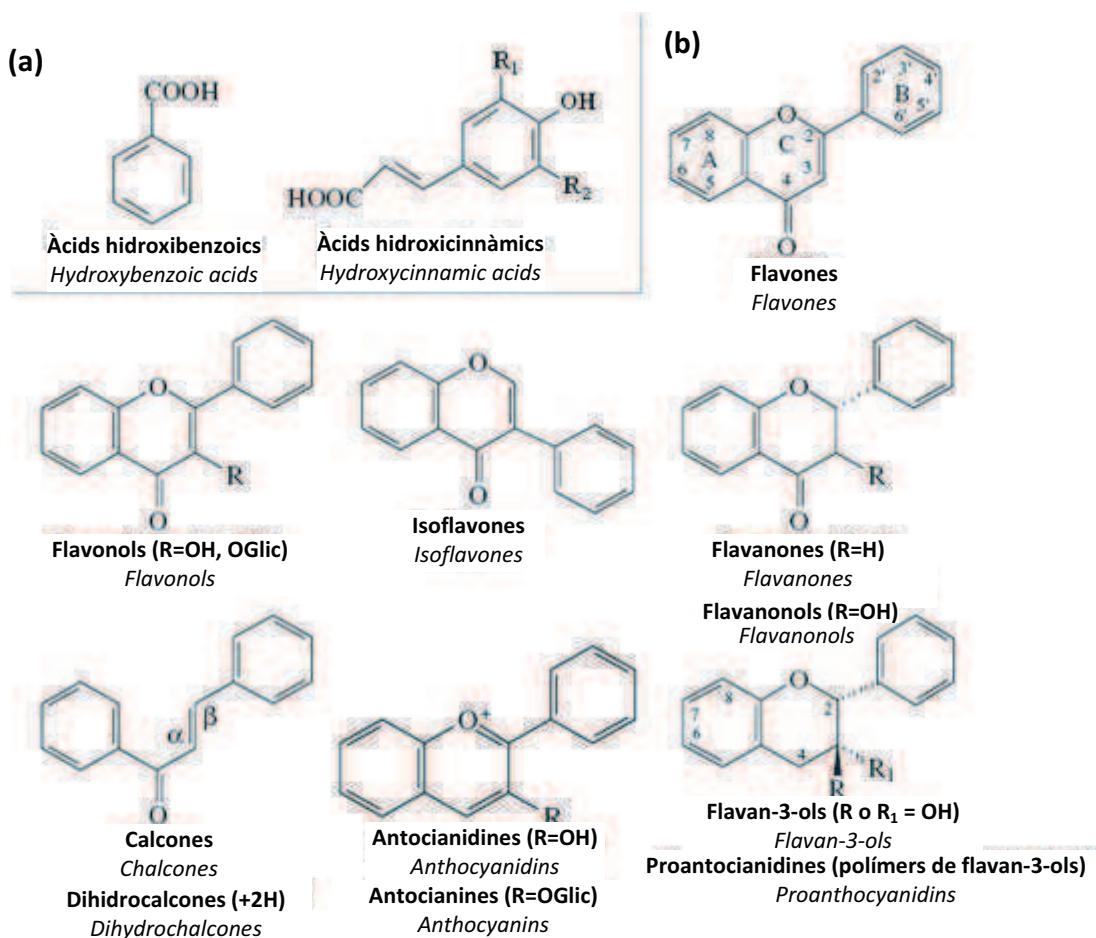


Figura 1.2. Estructura fonamental de diferents grups de compostos fenòlics*. **(a)**, Àcids fenòlics; **(b)**, flavonoides. (Adaptat de Harnly *et al.*, 2007).

La ruta del fenilpropanoid (*phenylpropanoid pathway*) és la via biosintètica dels àcids fenòlics, els flavonoides i altres metabòlits secundaris. Els precursors clau de la ruta són la fenilalanina i el malonil-CoA; d'aquests en deriven els àcids fenòlics i el 4-coumaroyl-CoA, el precursor de totes les classes de flavonoides. La primera classe de flavonoides en formar-se són les calcones (p.ex. *naringenin chalcone*), amb l'acció de l'enzim calcona sintasa (CHS). La calcona isomerasa catalitza la formació de les flavanones (p.ex. *naringenin*) a partir de les calcones, i de les flavanones se'n deriven diverses rutes metabòliques que donen lloc a la resta de classes de flavonoides: flavones, isoflavones, flavonols (amb dihidroflavonols com a intermediaris), les antocianines (amb leucoantocianidines i antocianidines com a intermediaris) i els flavonols (Andersen i Markham, 2006; Slimestad i Verheul, 2009). La figura 1.3 mostra un esquema simplificat de les rutes metabòliques que originen els flavonoides del tomàquet.

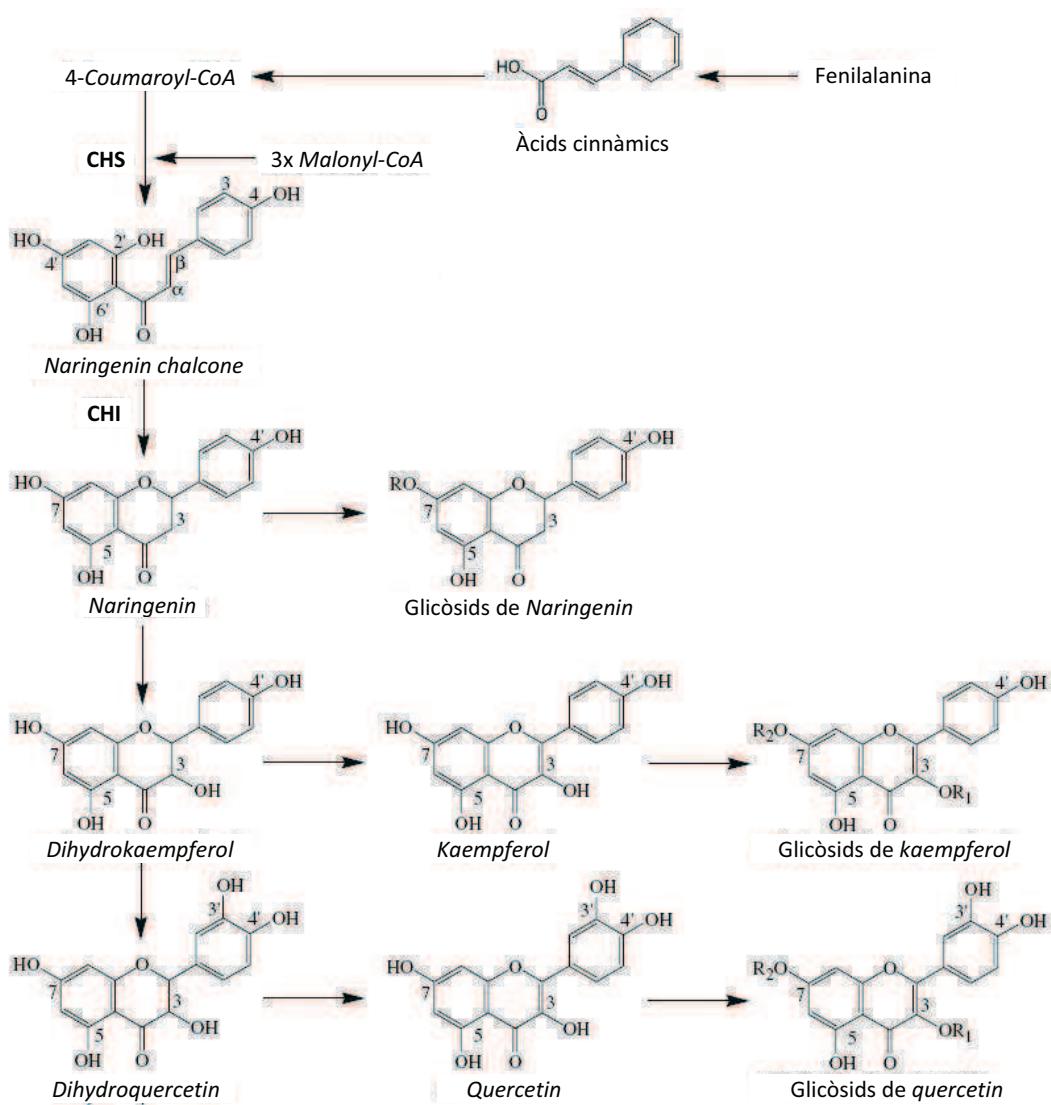


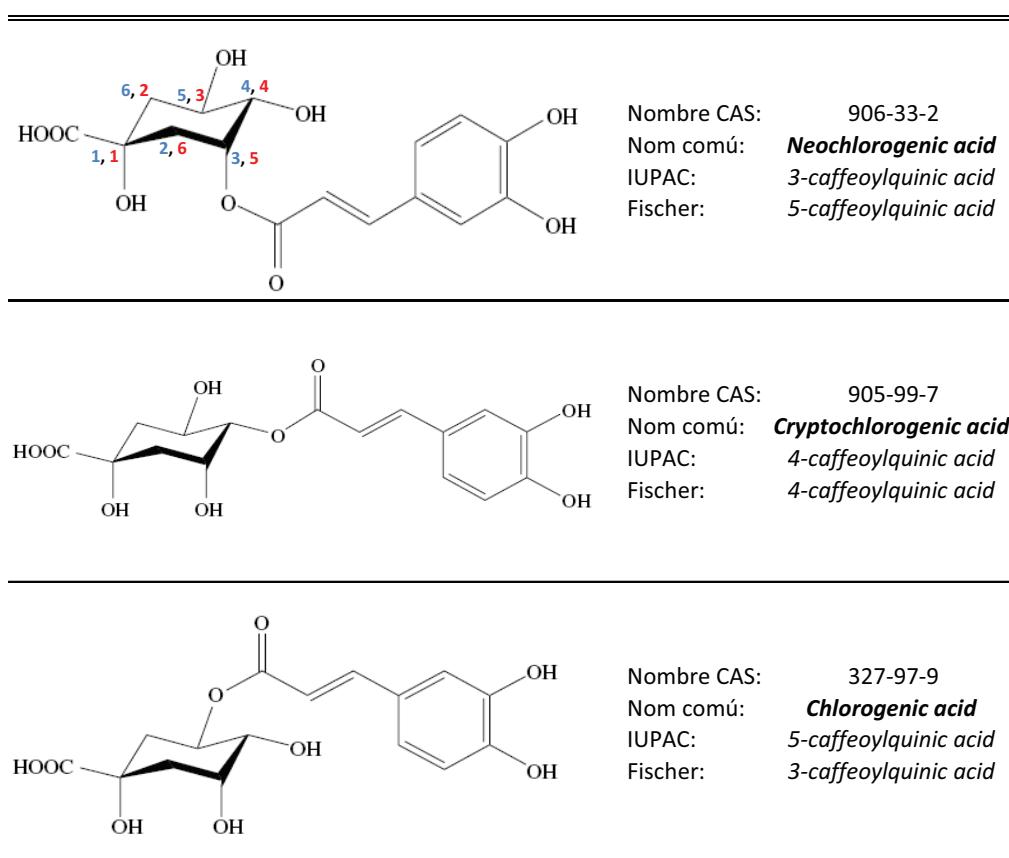
Figura 1.3. Esquema de la ruta del fenilpropanoid, mostrant la síntesi dels flavonoides en el tomàquet.

Abreviatures: **CHS**, calcona sintasa; **CHI**, calcona isomerasa; **R**, glucosa o rutinosa.
(Adaptat de Slimestad i Verheul, 2009).

1. Introducció

Els àcids fenòlics es classifiquen segons si deriven de l'àcid benzoic (àcids hidroxibenzoics) o de l'àcid cinnàmic (àcids hidroxicinnàmics). Els primers, sovint es troben acomplexats amb un glúcid, formant tanins hidrolitzables: gal·lotanins (si contenen àcid gàl·lic) o el·lagitanins (si contenen àcid el·làtic). Els diferents àcids hidroxicinnàmics es diferencien per les substitucions en l'anell fenòlic: *p-coumaric acid* (R_1 i R_2 = H), el *caffeic acid* (R_1 = OH, R_2 = H), el *ferulic acid* (R_1 = OMe, R_2 = H) i el *sinapic acid* (R_1 i R_2 = OMe). A la naturalesa aquests compostos rarament es troben lliures, normalment estan glicosilats o són èsters d'àcid quínic, màlic o tartàric (Manach *et al.*, 2004).

Un dels èsters d'àcid hidroxicinnàmic més abundants en els vegetals és l'àcid 5-cafeoilquínic (5-*caffeoylelquinic acid*), també anomenat àcid clorogènic (*chlorogenic acid*). L'àcid cafeic pot esterificar-se en la posició 5 (la més habitual) de l'àcid quínic, però també en la 4, en la 3, i més rarament en la 1. La IUPAC (IUPAC, 1976) recomana emprar aquesta nomenclatura per a aquests isòmers; no obstant, sovint s'utilitza una numeració anterior (Fischer *et al.*, 1932) per designar-los, fet que pot provocar confusió. Així com la majoria d'autors que descriuen l'àcid clorogènic utilitzen la numeració IUPAC (l'anomenen 5-*caffeoylelquinic acid*) (Ferreres *et al.*, 1997; Clifford, 1999; Hohl *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008; Slimestad i Verheul, 2009.), les empreses que comercialitzen aquest mateix compost com a patró utilitzen la numeració pre-IUPAC (l'anomenen 3-*caffeoylelquinic acid*) (Biopurify, ChromaDex, Extrasynthèse, PhytoLab, Sigma-Aldrich, TransMIT). La taula 1.3 mostra cada isòmer amb els respectius noms utilitzats i el seu nombre CAS.



Taula 1.3. Esquema dels tres isòmers existents de *caffeoylelquinic acid*, amb les respectives denominacions utilitzades. El sentit de la numeració dels àtoms de carboni de l'àcid quínic determina la nomenclatura dels dos sistemes utilitzats per a aquests compostos (IUPAC en blau i Fischer o pre-IUPAC en vermell). (Adaptat de Slimestad i Verheul, 2009).

L'estructura dels flavonoides consisteix en dos anells aromàtics (A i B) units per un heterocicle (C) de tres àtoms de carboni i un d'oxigen. L'heterocicle diferencia les classes de flavonoides, i dins de cada classe els flavonoides difereixen en les substitucions en els anells A i B. El grup més comú són els flavonols, amb *quercetin* i *kaempferol* com a més representatius. En les plantes gairebé sempre es troben glicosilats, normalment amb glucosa o ramnosa, però també amb galactosa, arabinosa, xilosa i àcid glucurònic. Els flavanols, a diferència dels altres flavonoides, no es troben mai glicosilats; a més, tenen la particularitat de formar dímers, oligòmers i polímers (proantocianidines, o tanins condensats). Les antocianines (la forma glicosilada i estable de les antocianidines) són pigments presents en els vacúols de les cèl·lules epidèrmiques de les flors i dels fruits, donant colors rosa, vermell, blau i violeta (Manach *et al.*, 2004; Andersen i Markham, 2006).

1.3.2 – Activitat biològica

Com a component de la dieta, els compostos fenòlics no són essencials per al bon funcionament de l'organisme a curt termini, a diferència del que succeeix amb les vitamines. Mentre que l'organisme té mecanismes específics per a l'acumulació i retenció de vitamines, els compostos fenòlics (i altres fitoquímics) són tractats com a xenobiòtics, i es metabolitzen per tal d'eliminar-los eficientment (Crozier *et al.*, 2009). Paradoxalment, multitud d'estudis han suggerit que els compostos fenòlics i especialment els flavonoides presenten interessants activitats biològiques dins l'organisme. La major part de l'interès s'ha centrat en les seves propietats antioxidant en l'organisme, les quals confereixen a aquests compostos la capacitat de segrestar els radicals lliures i de reduir la seva formació (Crozier *et al.*, 2009). També s'ha associat els compostos fenòlics amb activitats antial·lergèniques, antivirals, antiinflamatòries i vasodilatadores (Pietta, 1999). No obstant, molts dels estudis han utilitzat models *in vitro* i s'han basat en les propietats dels compostos fenòlics intactes. Queda molta recerca per endavant per conèixer les activitats biològiques d'aquests compostos *in vivo* i molt especialment, dels seus metabòlits un cop han estat incorporats a l'organisme (Daayf i Lattanzio, 2008; Crozier *et al.*, 2009).

Estudis epidemiològics suggereixen que dietes riques en compostos fenòlics poden reduir el risc a patir malalties cardiovasculars, protegint les LDL de l'oxidació per part dels radicals lliures (evitant així l'aparició d'aterosclerosi) i reduint l'agregació de plaquetes i els processos trombòtics (Hertog, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001; Andersen i Markham, 2006; Erdman *et al.*, 2007; Daayf i Lattanzio, 2008).

També s'ha atorgat als compostos fenòlics la capacitat d'ajudar a prevenir diversos tipus de càncer. Els mecanismes que permetrien aquesta activitat serien la intervenció en la inactivació de carcinògens, en la prevenció de danys al DNA, en la regulació del cicle cel·lular i de l'apoptosi i en els processos inflamatoris (Le Marchand, 2002; Erlejman *et al.*, 2008). Malgrat no poder presentar resultats fortament consistents, alguns estudis epidemiològics presenten evidències sobre la relació inversa entre el consum de soja i el càncer de mama, el consum de te verd i el càncer d'estòmac i el consum de poma i ceba i el càncer de pulmó (Nijveldt *et al.*, 2001; Le Marchand, 2002; Andersen i Markham, 2006).

S'ha observat l'afinitat d'alguns flavonoides per aenzims i receptors, degut a similituds estructurals amb els seus lligands i substrats. Un cas ben documentat és el de les isoflavones, que poden actuar com a anàlegs dels estrògens (per aquest motiu s'anomenen també *fitoestrògens*). També es coneix la capacitat de flavones i flavonols per a inhibir algunes proteïna-cinases i enzims fase I (citocrom P450) (Daayf i

1. Introducció

Lattanzio, 2008). L'afinitat per l'albumina, pot allargar la vida en sang d'alguns flavonoides, retardant la seva excreció (Crozier *et al.*, 2009). Les proantocianidines tenen la propietat de formar complexes amb proteïnes salivars, sent les responsables del caràcter astringent d'alguns fruits i begudes (te, vi, etc.) i del gust amarg de la xocolata (Manach *et al.*, 2004).

No obstant, la biodisponibilitat dels compostos fenòlics ingerits amb la dieta sovint no és gaire alta, degut a que l'absorció en general és baixa (especialment de les proantocianidines polimèriques) i l'eliminació dels metabòlits en plasma és ràpida (Crozier *et al.*, 2009). Això indica que és necessari que el consum d'aliments d'origen vegetal sigui una base important de la dieta diària, per poder mantenir uns nivells en sang que puguin comportar els importants i amplis beneficis detectats per a la salut (Manach *et al.*, 2004).

1.3.3- Presència en els aliments vegetals

Malgrat que no són essencials per al metabolisme respiratori o fotosintètic, es creu que la síntesi dels compostos fenòlics està relacionada amb la supervivència en el medi, i els seus nivells venen determinats per factors ambientals i genètics. El metabolisme secundari forma part del desenvolupament integral de les plantes; la capacitat de síntesi dels diferents metabòlits secundaris ha estat un caràcter seleccionat al llarg de l'evolució, donant lloc a les diferències presents en els diferents llinatges de plantes (Daayf i Lattanzio, 2008). S'han descrit nombrosos processos de les plantes en els quals hi intervenen flavonoides, especialment en la defensa contra patògens, herbívors i estrès ambiental. Poden repellir l'atac dels herbívors (presentant activitat antinutritiva o toxicitat) i evitar la infecció per fongs o bacteris (alguns d'ells es troben presents de forma inherent en teixits sensibles a infecció i d'altres s'indueixen davant l'atac d'un patògen). També protegeixen les cèl·lules a danys causats per la radiació ultraviolada o agents oxidants. Alguns indueixen la transcripció de les proteïnes necessàries per establir la simbiosi entre bacteris fixadors de nitrogen i el rizoma de les lleguminoses i n'hi ha que actuen com a senyals per atraure insectes pol·linitzadors o dispersadors de llavors (Treutter, 2006).

El contingut d'àcids hidroxibenzoics en els aliments sol ser molt baix, exceptuant alguns fruits vermells, la ceba i el te. Els àcids hidroxicinnàmics són més abundants, es troben en concentracions elevades en el cafè i en tota la fruita. L'àcid cafeic n'és el més freqüent en la naturalesa, especialment en forma combinada amb àcid quínic. D'aquests, l'àcid clorogènic (*5-caffeoylequinic acid*) és el que domina en els vegetals, excepte pels fruits en drupa i en el gènere *Brassica*, on s'hi troba l'isòmer en posició 3, l'àcid neoclorogènic (Clifford 1999; Manach *et al.*, 2004).

Els flavonols és el grup de flavonoides més estesos en els vegetals, es troben presents en tot el regne vegetal excepte en les algues. Aquests, es troben principalment en els teixits superficials (pell i fulles), motiu pel qual la seva concentració en un fruit o verdura depèn molt de la seva relació superfície/volum. Les cebes, *Brassica* spp, els porros i els fruits vermells són vegetals rics en flavonols. Les flavones són menys abundants; els únics aliments identificats fins el moment abundants en flavones són el julivert, l'api i algunes herbes. A la pell dels cítrics s'hi han identificat flavones polimetoxilades (són els flavonoides més hidrofòbics). Les flavanones es troben en altes concentracions en els cítrics, i són particularment abundants en l'*albedo* (part blanca i esponjosa). Les isoflavones es troben gairebé exclusivament en les lleguminoses; la soja i els seus derivats en són fonts importants. Els flavanols (flavan-3-ols) i les seves

formes polimèriques (proantocianidines o tanins condensats) es troben en una gran varietat d'aliments vegetals, però són especialment abundants en el vi negre, el te, el cafè i la xocolata. Els fruits vermellos són rics en antocianines, les quals els donen el color característic. Aquests pigments també es troben presents en el vi negre (Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009). Altres grups de flavonoides com les calcones, les dihidrocalcones o els flavanonols, són menys abundants en els aliments, amb algunes excepcions. La taula 1.4 mostra alguns aliments especialment rics en determinats compostos fenòlics.

El tomàquet i l'enciam són fonts importants de compostos fenòlics. En el tomàquet s'hi han descrit més de vuit-cents metabòlits, dels quals, almenys cent catorze són compostos fenòlics (Moco *et al.*, 2006; Lijima *et al.*, 2008; Slimestad i Verheul, 2009). No obstant, només alguns són majoritaris i tenen rellevància des del punt de vista nutricional, com l'àcid clorogènic, *naringenin chalcone*, *naringenin* i els glucòsids de *quercetin* i *kaempferol* (Le Gall *et al.*, 2003; Slimestad i Verheul, 2005; Simonetti *et al.*, 2005). Els compostos fenòlics majoritaris de l'enciam, segons la bibliografia, són principalment èsters d'àcid cafeic amb àcid quínic i tartàric, i glucòsids de *quercetin* (Ferrer *et al.*, 1997; Caldwell, 2003; Llorach *et al.*, 2008). La taula 1.5 mostra el contingut de compostos fenòlics estimat per diferents autors en enciam i tomàquet, utilitzant el mètode de polifenols totals (PFT).

Grup	Compostos representatius	Aliments destacats	Contingut mitjà mg/kg (o mg/L)
Àcids fenòlics			
Àcids hidroxibenzoics	Àcid gà·lic, Gal·lotanins	Mora Gerd	80-270 60-100
Àcids hidroxicinnàmics	Àcid cafeic, Àcid clorogènic, Àcid <i>p</i> -cumàric	Nabiu Kiwi	2000-2200 600-1000
Flavonoides			
Flavonols	<i>Kaempferol</i> , <i>Quercetin</i> , <i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	Ceba Col	350-1200 300-600
Flavones	<i>Apigenin</i> , <i>Luteolin</i>	Julivert Api	240-1850 20-140
Flavanones	<i>Naringenin</i> , <i>Hesperetin</i> , <i>Eriodictyol</i>	Suc de taronja Suc d'aranja	215-685 100-650
Isoflavones	<i>Daidzein</i> , <i>Genistein</i>	Farina de soja Tofu	800-1800 80-700
Flavanols	<i>Catechin</i> , <i>Epicatechin</i> , <i>Procyanolins</i>	Xocolata Te verd Vi negre	460-610 100-800 80-300
Antocianines	<i>Cyanidin</i> , <i>Delphinidin</i> , <i>Malvidin</i>	Albergínia Grosella	7500 1300-4000

Taula 1.4. Els diferents grups de compostos fenòlics presents en els vegetals, amb alguns dels compostos més característics de cada grup, i aliments en particular on cada grup és especialment abundant, juntament amb la concentració. (Adaptat de Manach *et al.*, 2004).

Font bibliogràfica	Polifenols totals	
	Enciam (mg GAE/100g PF)	Tomàquet (mg GAE/100g PF)
Bahorun <i>et al.</i> , 2004	13	35
Brat <i>et al.</i> , 2006	36	14
Proteggente <i>et al.</i> , 2002	14	30
Stratil <i>et al.</i> , 2006	91	89

Taula 1.5. Valors de polifenols totals en enciam i tomàquet segons bibliografia, obtinguts utilitzant el reactiu de Folin-Ciocalteu.

Abreviatures: **GAE**, equivalents d'àcid gàl·lic; **PF**, pes fresc.

1.3.4 – Mètodes analítics

És possible trobar un gran nombre de mètodes analítics per a compostos fenòlics en la literatura, donat l'interès que desperta la seva presència en els aliments.

Extracció

L'extracció dels compostos fenòlics s'ha de realitzar tenint en compte la seva inestabilitat, ja que durant l'extracció, la presència d'enzims en la matriu i el contacte amb la llum i l'oxigen afavoreixen reaccions d'hidròlisi, oxidació i isomerització (Robards, 2003). A part del mètode d'extracció i el dissolvent escollit, el temps i la temperatura també són crítics per a l'extracció. D'aquests paràmetres en depèn la correcta solubilització dels compostos fenòlics i la seva estabilitat. Els pK_a dels compostos fenòlics poden anar de 8 a 12 mentre que els seus coeficients de partició o/w comprenen valors entre $6 \cdot 10^{-4}$ i 1,5. Això significa que els compostos fenòlics presenten una considerable diversitat en termes d'acidesa i de polaritat, i això impossibilita l'extracció òptima de tots els tipus de compostos fenòlics amb un únic dissolvent (Robards, 2003).

Els dissolvents més utilitzats, per a l'extracció d'un ampli rang de compostos fenòlics de matrius diverses, són barreges aquoses de metanol, etanol i acetona. El metanol extreu amb facilitat els compostos fenòlics excepte els de més pes molecular, com les procianidines polimèriques, les quals s'estreuen més bé amb acetona. L'extracció d'antocianines millora amb el metanol acidificat o amb acetona. Les mostres fresques requereixen menys proporció d'aigua en el solvent d'extracció que les mostres seques. A més a més, en el cas del metanol, és necessari un mínim del 70% per inactivar les polifenol oxidases, indispensable per a obtenir recuperacions òptimes (Robards, 2003).

Hidròlisi

Els compostos fenòlics presents en els vegetals poden ser caracteritzats com es troben originalment en els teixits (compostos fenòlics intactes) o bé es pot procedir a la seva hidròlisi. La hidròlisi àcida dels extractes permet simplificar la separació cromatogràfica, obtenint els flavonoides aglicons a partir dels flavonoides glicosilats (majoritaris en mostres vegetals) i els àcids fenòlics a partir dels seus èsters. Amb la reducció de la gran diversitat de flavonoides glicosilats presents en les mostres vegetals als seus

respectius aglicons, es pot identificar i quantificar un nombre més reduït de compostos (Crozier *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2000). Una via alternativa a la hidròlisi àcida és desglicosilar els flavonoides mitjançant una hidròlisi enzimàtica, més selectiva. En alguns estudis s'ha utilitzat la β -glucuronidasa HP-2 d'*Helix pomatia* (Torres *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006). Amb aquestes tècniques, pot alterar-se la diversitat de compostos fenòlics presents en una mostra, perquè es poden produir pèrdues i es poden formar artefactes.

Mètodes cromatogràfics

La separació i anàlisi individual dels compostos fenòlics s'ha realitzat per HPLC, per chromatografia de gasos (GC) o per electroforesi capil·lar (CE). La GC no és gaire utilitzada, donada la limitada volatilitat dels flavonoides glicosilats. Per aquest motiu, en GC es necessita derivatitzar, fent les analisis més llargues, costoses i amb patrons de fragmentació difícils d'interpretar. La CE permet obtenir una bona eficiència de separació, però s'utilitza molt poc per a l'anàlisi de compostos fenòlics (Cuyckens i Claeys, 2004; Harnly *et al.*, 2007).

Per separar compostos fenòlics la chromatografia líquida HPLC és amb diferència la tècnica més utilitzada, i gairebé només s'utilitzen columnes RP (C_{18}). La majoria dels compostos fenòlics són àcids febles que es comporten com a molècules neutres i relativament hidrofòbiques en una fase mòbil dèbilment àcida. En RP s'elueixen primer els compostos més polars, i els temps de retenció augmenten juntament amb la hidrofobicitat. Malgrat que hi ha un solapament considerable en els temps de retenció segons les diferents classes de compostos fenòlics, es poden fer certes generalitzacions (Harnly *et al.*, 2007):

- Els àcids fenòlics s'elueixen primer i els flavonoids aglicons i polimetoxilats s'elueixen últims.
- El temps de retenció, és en general, inversament proporcional al grau de glicosilació.
- Amb el mateix glicòsid i a la mateixa posició, l'ordre d'elució dels aglicons és el següent: flavanones, flavonols i flavones.
- La posició de l'enllaç glicosídic influeix; per al mateix aglicó i glicòsid, l'ordre és el següent: 7-O-glicòsid, 3-O-glicòsid i 4'-O-glicòsid.
- El glicòsid influeix; per al mateix aglicó i posició de l'enllaç, l'ordre és el següent: galactòsid, glucòsid, pentòsid (xilòsid, arabinopiranòsid i arabinofuranòsid), ramnòsid i glucurònid.

Detecció

La LC normalment és acompanyada amb detecció per DAD, proveint així dels espectres d'absorció UV dels compostos separats. Els anells aromàtics dels compostos fenòlics són cromòfors que permeten obtenir espectres UV característics (taula 1.6). Així doncs, l'espectre UV permet distingir la classe, el grau d'oxidació o fins i tot el grau de puresa d'un pic chromatogràfic. Les antocianidines, per la seva part, tenen bandes d'absorció dins l'espectre de llum visible (fet que els dóna color). Com a complement del DAD a vegades s'utilitza també un detector per fluorescència (FLD), per als pocs compostos fenòlics que presenten fluorescència natural, especialment els flavonols. La robustesa de la detecció per DAD i les propietats cromòfores dels compostos fenòlics fan de la detecció per DAD una tècnica molt idònia per a la quantificació d'aquests compostos (Harnly *et al.*, 2007).

Compost fenòlic	Classe	Màxims UV (nm)
<u>Àcids fenòlics</u>		
<i>Gallic acid</i>	Àcid hidroxibenzoic	271.
<i>Caffeic acid</i>	Àcid hidroxicinnàmic	323.
<i>p-Coumaric acid</i>	Àcid hidroxicinnàmic	309.
<u>Flavonoides</u>		
<i>Catechin</i>	Flavanol (flavan-3-ol)	279.
<i>Apigenin</i>	Flavona	267, 338.
<i>Quercetin</i>	Flavonol	255, 367.
<i>Naringenin</i>	Flavanona	288.

Taula 1.6. Màxims d'absorbància a l'espectre UV d'alguns compostos fenòlics.
Font: Abad-García *et al.* 2007.

Amb el desenvolupament de les interfases com la ionització a pressió atmosfèrica (API), l'espectrometria de masses (MS i MSⁿ) es va poder acoblar a la cromatografia líquida, ja que una mostra líquida (procedent de la LC) es pogué fer passar a fase gasosa dins un mateix sistema. L'electroesprai (*electrospray ionization*, ESI) és una interfase API molt adequada per a compostos iònics i amb elevat pes molecular. La mostra líquida amb els analits es carrega elèctricament aplicant-li un alt voltatge, convertint-se en un esprai. El líquid es va carregant fins que esdevé inestable, i per repulsió de Coulomb acaba explotant formant petites gotetes altament carregades (Lemière, 2001). La LC-MSⁿ ha esdevingut una tècnica molt emprada per a l'anàlisi i caracterització dels compostos fenòlics en mostres vegetals, ja que ofereix informació sobre la massa molecular i les característiques estructurals dels compostos (Cuyckens i Claeys, 2004).

Un sistema HPLC-ESI-MS/MS de triple quadrupol (QqQ) consta de l'equip de chromatografia líquida acoblat a una interfase (API) d'electroesprai (ESI) i a un sistema d'analitzadors de ions en tandem (MS/MS). Després de la interfase, els analits carregats passen a l'analitzador de masses. Cada quadrupol està format per quatre o més barres magnètiques paral·leles, que condueixen els analits carregats mitjançant un voltatge. El primer i el tercer quadrupols (Q1 i Q3), aplicant un voltatge determinat, poden capturar o separar en l'espai els analits en funció de la seva massa i la seva càrrega (*m/z*). El segon quadrupol (q2) permet fragmentar els analits que hi passen aplicant-hi un voltatge (cel·la de col·lisió). La fragmentació dels analits a q2 s'anomena "dissociació induïda per col·lisió" (CID) i per què succeeix cal omplir la cel·la de col·lisió amb un gas inert (habitualment argó). El ió (o ions) seleccionat en el primer quadrupol s'anomena "ió pare" (*father*), mentre que els fragments obtinguts a la cel·la de col·lisió s'anomenen "ions fills" (*daughters*) (Lemière, 2001). Segons la configuració de Q1, q2 i Q3, el triple quadrupol pot funcionar en diferents modalitats, com les mostrades en la figura 1.4.

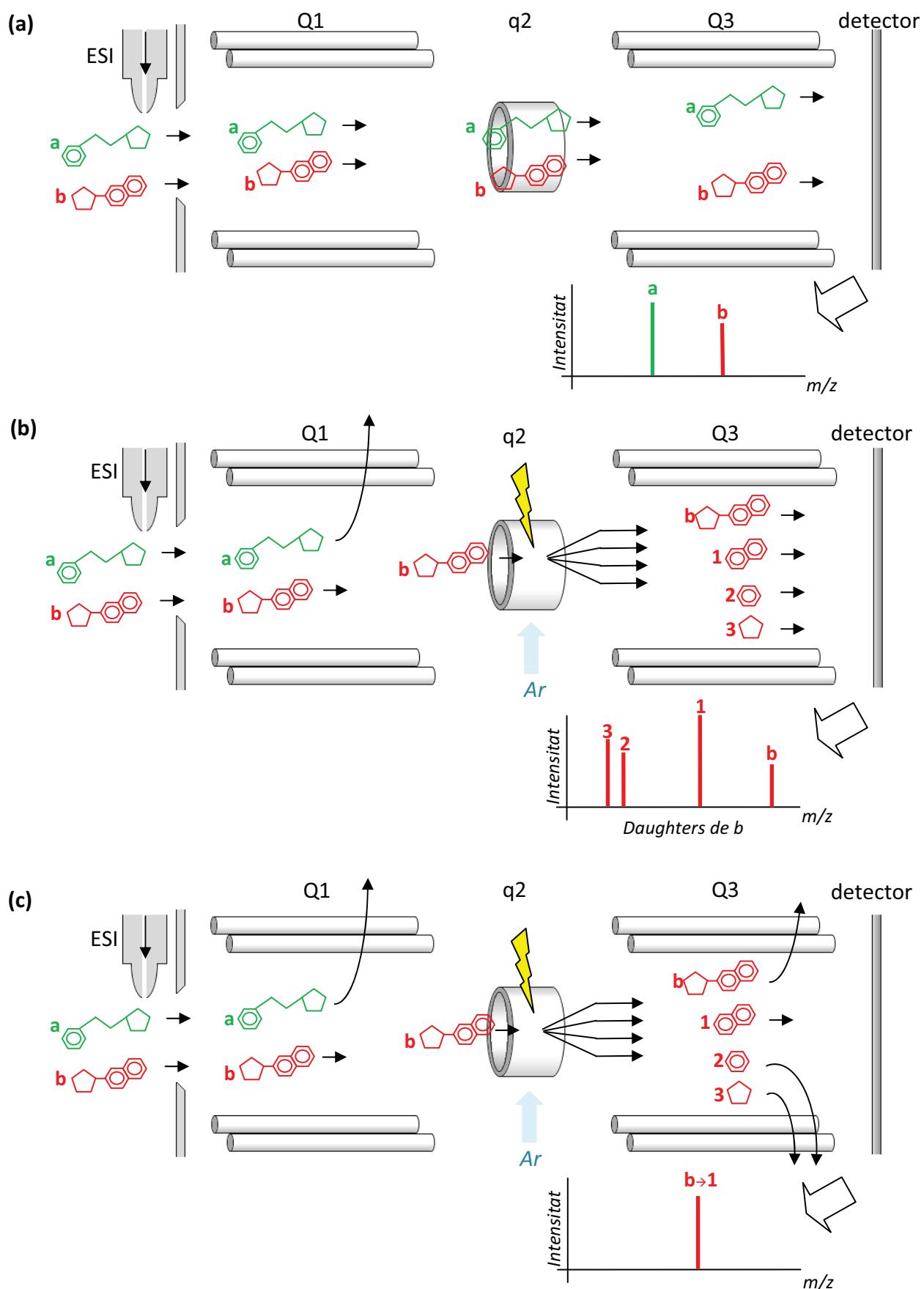


Figura 1.4. Esquema dels modes de funcionament d'un triple quadrupol:

- (a) Scan.
- (b) Product ion scan.
- (c) Single reaction monitoring.

1. Introducció

-*Scan*: Q1, q2 i Q3 condueixen els analits carregats fins al detector.

-*Product ion scan*: Q1 deixa passar els analits amb un únic valor m/z seleccionat; q2 els fragmenta i Q3 analitza els fragments. Aquest mode permet obtenir informació estructural d'un compost determinat, ja que Q1 deixa passar una única m/z (informant sobre el pes molecular del compost) i Q3 permet detectar tots els fragments obtinguts d'aquest compost (informant sobre el pes molecular dels fragments, característics d'una estructura determinada).

-*Single/multiple reaction monitoring (SRM/MRM)*: Q1 deixa passar només els analits amb un o més valors m/z seleccionats, q2 els fragmenta i Q3 selecciona els fragments amb un valor m/z determinat. Aquest mode és el que ofereix una sensibilitat i una selectivitat més alta, ja que Q1 elimina tots els interferents de m/z diferents a la de l'analit buscat i Q3 deixa passar només el(s) fragment(s) que són propis i característics del compost analitzat (transició específica d'un compost).

La informació obtinguda, el temps de retenció i els espectres UV, MS i de fragmentació MS/MS permeten identificar (i quantificar) els compostos d'una mostra, si aquesta informació concorda amb la obtinguda a partir d'un patró. Si no es pot disposar del patró comercial d'un compost determinat (fet habitual en els compostos fenòlics), la informació estructural obtinguda per MS i eventualment l'espectre UV permeten fer una identificació provisional (Moco *et al.*, 2006).

Mètodes espectrofotomètrics

Les separacions cromatogràfiques donen una informació valuosa, però difícilment es poden determinar tots els compostos fenòlics d'una mostra amb uns temps i costos d'anàlisi acceptables. Per aquest motiu sovint s'ha recorregut a l'estimació global de compostos fenòlics per mètodes espectrofotomètrics (Stratil *et al.*, 2006).

Els mètodes més utilitzats, des de fa temps, es basen en el reactiu de Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Aquest reactiu és un complex fosfotungstat-fosfomolibdat que es redueix en presència de compostos fenòlics, formant un compost blau. L'absorció a 725 nm és proporcional a la quantitat de compostos fenòlics presents a la mostra, els quals es quantifiquen habitualment en equivalents d'àcid gàl·lic (GAE) o àcid cafeic (CAE). Un inconvenient important d'aquesta tècnica és la presència d'interferents que també redueixen el reactiu de Folin-Ciocalteu; és el cas de l'àcid ascòrbic i dels sucres. Donat que els extractes vegetals que s'analitzen sovint contenen elevades concentracions d'AA, els mètodes a vegades inclouen una correcció de l'AA (restant el valor d'absorbància provocat per l'AA present a la mostra, el qual es coneix determinant separatadament l'AA de la mateixa mostra) (Asami *et al.*, 2003).

1.4- Influència de les pràctiques agronòmiques en el contingut de vitamina C i compostos fenòlics en els aliments vegetals

La presència de vitamina C i compostos fenòlics en els vegetals es veu fortament afectada per nombrosos factors. Els més destacables són la varietat (genotip), les condicions ambientals (llum, temperatura, humitat, CO₂ atmosfèric i pol·luents) i les pràctiques agrícoles (propietats del sòl, qualitat de l'aigua, nutrició mineral, pesticides, herbicides, salinitat, empelt, poda, sistemes de creixement, promotores del creixement, maduresa i danys mecànics o malalties). L'efecte d'aquests factors pot explicar-se pel paper que juguen la vitamina C i els compostos fenòlics dins el metabolisme de les plantes i en la seva resposta a les condicions d'estrès (Dorais *et al.*, 2008). Així com les condicions ambientals difícilment es poden regular, una bona estratègia per a aconseguir hortalisses amb nivells òptims de vitamines i antioxidantss és incidir en les pràctiques agrícoles.

La selecció de la varietat a cultivar és un paràmetre que convé considerar, donat que influeix decisivament en el contingut de vitamines i antioxidantss. Actualment, i dins el marc de la globalització, moltes varietats de verdures i hortalisses històricament lligades a zones molt concretes són substituïdes per altres varietats més competitives comercialment. Aquest fet s'accentua per l'enveliment de la pagesia i que el sector agrari tendeix a unificar-se en grans empreses, deixant de banda les peculiaritats agrícoles que puguin haver en una regió determinada (DARP, 2000).

Hi ha certes pràctiques agrícoles que per motius culturals o pel seu menor impacte ambiental és convenient potenciar-les davant altres pràctiques menys respectuoses. És el cas, per exemple, d'aquelles pràctiques que permeten la substitució dels productes fitosanitaris que s'utilitzen en el tractament dels cultius contra les plagues o de l'ús de fertilitzants químics. La substitució total o parcial d'aquests agents químics permet disminuir l'afectació que poden causar en el medi ambient, així com disminuir l'impacte que poden tenir en la salut dels consumidors. A més, poden incorporar-se en els sistemes de cultiu ecològic, on no és permès l'ús de productes químics. D'altra banda, la utilització d'algunes d'aquestes pràctiques pot comportar un augment en el valor nutricional dels vegetals, incrementant així el valor afegit dels productes vegetals de cultiu ecològic (Schmidt *et al.*, 2006)

Fertilització

La disponibilitat del nitrogen inorgànic influeix en la síntesi de metabòlits secundaris, proteïnes i sòlids solubles; així doncs, cal esperar que el sistema de fertilització influeixi en la presència d'aquests components. S'ha trobat que aportacions excessives de nitrogen provoquen una disminució del contingut en vitamina C (i l'acumulació de nitrat en hortalisses foliars), mentre que alguns estudis comparatius han trobat nivells més alts de vitamina C en cultius amb fertilització orgànica que en la convencional (Mitchell *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Per aquesta raó, una estratègia basada en modular la disponibilitat dels nutrients per potenciar alguns components nutritius és la fertilització a dosis expressament baixes de nitrogen i/o d'altres minerals (*low input system*) (Schmidt *et al.*, 2006).

1. Introducció

Aplicació d'elíctor com a tractament antifúngic

Davant un atac per fongs la majoria de plantes responen amb la síntesi de compostos fenòlics i fitoalexines. S'activa així una via de defensa de la planta per aturar la proliferació de la malaltia. S'ha comprovat que aquestes vies de defensa es poden activar mitjançant la presència de determinades substàncies, malgrat manqui la presència dels fongs (McNally *et al.*, 2002). Aquestes substàncies es coneixen amb el terme elíctor, i el *chitosan* i *Milsana*® en són dos exemples. El *Chitosan* és un polisacàrid catiònic, insoluble i de gran pes molecular, que s'estreu habitualment de l'exosquelet de crustacis. *Milsana*® és un extracte comercial de la planta *Reynoutria sachalinensis*, una poligonàcia originària del nord-est asiàtic.

Possiblement els mecanismes de defensa de les plantes necessiten la presència d'un senyal d'alarma per ser activats, com per exemple un component propi del patogen. El *Chitosan* i *Milsana*®, simulant aquests senyals d'alarma, poden actuar com a inductors de les vies de defensa, i per tant, de la síntesi de compostos fenòlics. L'aplicació de chitosan o *Milsana*® al cultiu pot tenir un doble efecte: en primer lloc, la resistència a la proliferació de fongs (la planta ja està preparada abans que aparegui la malaltia) i en segon lloc, obtenir verdures amb nivells més alts de compostos fenòlics (Benhamou *et al.*, 1998; Fofana *et al.*, 2002).

Diversificació ecològica per al control natural de plagues

El maneig de l'hàbitat, establint plantes amb flor entorn al cultiu, permet proveir de pol·len i néctar a espècies depredadores dels insectes que poden constituir una plaga. Aquests depredadors, difícilment poden instal·lar-se en un camp convencional tractat amb insecticides, mentre que determinades plantes representen un fort reclam per a ells. Un exemple és l'ús dels caps blancs (*Lobularia maritima*, família de les Brassicàcies) per atraure sírfids, alguns dels quals són depredadors de pugó (àfids) en la fase larvària i consumidors de néctar en la fase adulta. Si l'establiment de sírfids és suficient, es redueix la presència d'àfids a nivells òptims sense la necessitat de tractaments químics (Colley i Luna, 2000; Landis *et al.*, 2000). No es coneix l'efecte d'aquestes pràctiques sobre els constituents nutricionals de les verdures.

2. Objectius

Aquest treball s'engloba dins un projecte finançat per la Unió Europea en el qual es busca incrementar més les propietats nutritives del tomàquet, l'enciam i la coliflor, identificant aquelles pràctiques de cultiu que hi tenen un efecte positiu, i potenciar-les. Una part dels compostos presents en les verdures que tenen interès nutritiu són la vitamina C i els compostos fenòlics (àcids fenòlics i flavonoides). Dins aquest marc, els objectius d'aquest estudi han estat:

- Desenvolupar un mètode HPLC-DAD fiable per quantificar la vitamina C total en enciams i tomàquets.
- Identificar els compostos fenòlics majoritaris en les varietats d'enciam i tomàquet objectes d'estudi, per UPLC-DAD-MS/MS.
- Desenvolupar un mètode HPLC-DAD fiable per quantificar els principals compostos fenòlics de les mostres d'enciam i tomàquet.

2. Objectius

3. Materials i mètodes

3.1- Mostres

Tomàquet (*Solanum lycopersicum* L.)

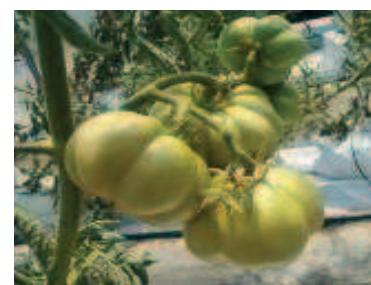
Les tomaqueries de planter varen ser trasplantades en hivernacle el febrer del 2008 en el centre de l'IRTA a Cabrils (Barcelona). El cultiu es prolongà uns 5 mesos, fins al moment de la collita. S'utilitzaren tres varietats: Pera de Girona, Montserrat (considerades locals) i Caramba (fig.3.1). Es seguí un disseny experimental factorial complet, amb un total de 24 combinacions de factors amb 8 rèpliques (192 mostres). La figura 3.2 representa esquemàticament les variables independents del disseny experimental.



Caramba



Pera de Girona



Montserrat

Figura 3.1. Varietats de tomàquet utilitzades.

Les condicions agronòmiques de creixement foren les habituals per a un cultiu de tomàquet d'hivernacle, i homogènies per a totes les plantes, exceptuant dos paràmetres: la fertilització i el tractament antifúngic. Referent a la fertilització, es tractà un grup amb dosi alta de nitrogen en la solució de nutrients ($9,50 \text{ mEq/L } \text{NO}_3^- + 0,43 \text{ mEq/L } \text{NH}_4^+$) i un altre grup amb dosi baixa de nitrogen ($5,31 \text{ mEq/L } \text{NO}_3^- + 0,43 \text{ mEq/L } \text{NH}_4^+$). La fertilització es realitzà mesclant la solució de nutrients amb l'aigua de reg per goteig. Pel que fa al tractament antifúngic, un grup es tractà amb sofre (80%) 2,5 g/L i un altre grup amb Milsana® (*Bio-Farming-Systems*, Alemanya) 3 mL/L. L'aplicació d'aquests productes fou a nivell foliar, mitjançant esprai, en intervals de 7 dies (a partir de l'estadi *sisena inflorescència visible*, a principis de maig). Per tal d'avaluar també la resistència de les tomaqueries enfront a la presència d'oïdi, es varen sacsejar plantes infectades amb aquest fong per sobre del cultiu.

Els tomàquets (n=206) foren recol·lectats a partir del mes de juny, en dos estadis diferents de maduració: 5 i 10 (segons el *Code Couleur Tomate*, Ctifl, França). Després de la collita, els tomàquets han estat ràpidament refrigerats (4 °C fins a 2 hores després de la collita), envasats al buit (preservant-los de la llum i l'oxigen) i posteriorment congelats (-80 °C fins al moment de les anàlisis).

3. Materials i mètodes

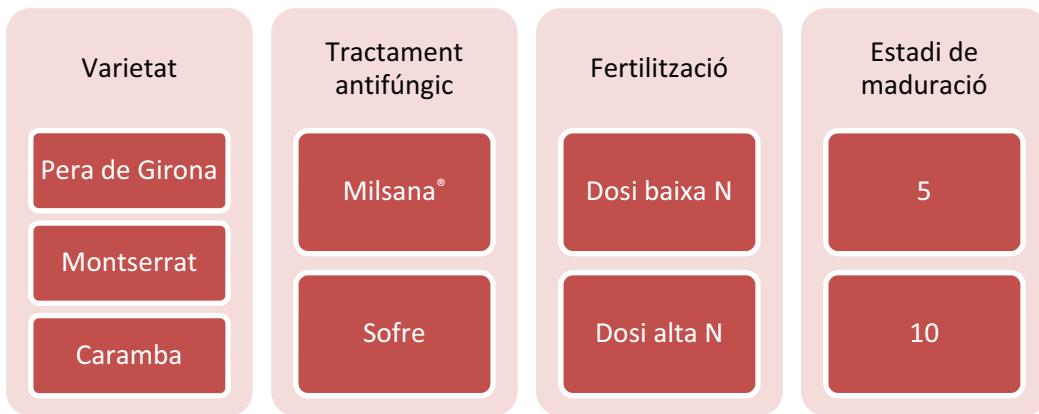


Figura 3.2. Els quatre factors agronòmics considerats en el disseny experimental.

Enciam (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*)

Els enciams, de la varietat romana (cos), varen ser plantats en camps de tres localitats diferents, durant els anys 2007 i 2008. A cada camp, es varen diferenciar dos blocs amb una estratègia per a combatre les plagues diferent a cada un (fig. 3.3):

- *Convencional*: ús dels pesticides utilitzats habitualment en el cultiu d'enciam.
- *Lobularia*: ús de la diversificació ambiental amb *Lobularia maritima* com a planta companya, amb l'objectiu d'atraure els depredadors naturals de les plagues.

Les localitats foren:

- Santa Susanna (Maresme, Barcelona). Cultiu realitzat el 2007 (n = 8+8).
- L'Estartit (Baix Empordà, Girona). Cultiu realitzat el 2008 (n = 4+4).
- Riudellots de la Selva (La Selva, Girona). Cultiu realitzat el 2008 (n = 4+4).



Figura 3.3. Cultiu d'enciam en els blocs “Convencional” (ús de pesticides) i “Lobularia” (diversificació ambiental).

Els enciams varen ser recol·lectats durant el mes de juny, ràpidament refrigerats (4 °C), rentats amb aigua (corrent i ultrapura), envasats al buit (preservant-los de la llum i l'oxigen) i congelats a -80 °C el mateix dia de la collita.

3.2- Reactius i patrons

L'aigua ultrapura s'ha obtingut amb el sistema de purificació Milli-Q Advantage, de Millipore Ibérica (Madrid, Espanya). El metanol grau HPLC s'ha obtingut de J.T. Baker (Deventer, Països Baixos). L'acetonitril grau MS s'ha obtingut de Merck (Darmstadt, Alemanya). El DTT, TCA, àcid fosfòric, àcid hidrogenfosfòric, EDTA, carbonat de sodi, àcid clorhídric, TBHQ, àcid acètic, àcid fòrmic, reactiu de Folin-Ciocalteu, β -glucuronidasa tipus HP-2 d'*Helix pomatia*, β -glucosidasa d'ametlla i β -glucosidasa d'*Aspergillus niger* s'han obtingut de Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya).

Els patrons d'àcid ascòrbic, àcid cafeic, àcid p-cumàric, àcid gàlico, *5-caffeoylequinic acid, quercetin-3-O-rutinoside, naringenin, naringenin-7-O-rhamnoglucoside, quercetin-3-O-rhamnoside, myricetin, quercetin, luteolin, apigenin i kaempferol* han estat obtinguts de Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya). Els patrons de *kaempferol-3-O-rutinoside, naringenin-7-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-glucoside i myricetin-3-O-rhamnoside* han estat obtinguts d'Extrasynthèse (Genay, França). Els patrons de *1,3-dicaffeoylquinic acid i caffeoyltartaric acid* s'han obtingut de ChromaDex (Santa Ana, EEUU). Els patrons de *quercetin-3-O-glucuronide i 3-caffeoylequinic acid* s'han obtingut de TransMIT (Gießen, Alemanya). El patró de *dicaffeoyltartaric acid* s'ha obtingut de PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Alemanya).

3.3- Anàlisi de vitamina C en tomàquet i enciam

3.3.1- Extracció i conversió

Les mostres de tomàquet i enciam conservades a -80 °C varen ser mòltes (congelades) en una picadora Blixer 3 (Robot Coupe, Isleworth, Regne Unit). L'extracció de vitamina C es realitza en medi àcid i amb presència d'antioxidant, per preservar la seva estabilitat. Es van assajar tres protocols diferents d'extracció, detallats a continuació.

Protocol 1

Adaptació de les condicions d'extracció descrites per Brause *et al.* (2003) en fruita, on es va utilitzar DTT 0,1 % com a agent reductor per preservar l'AA i al mateix temps reduir el DHA a AA. Aquests autors també varen utilitzar TCA 2 % per precipitar proteïnes, si els extractes en contenien (no era necessari per acidificar el medi, donat que les mostres del seu estudi eren suficientment àcides). Un gram de mostra homogènia va ser abocat en 10 mL de TCA 2 %-DTT 0,1 %, es va agitar 1 min en vòrtex i es va centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a 4 °C en una centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

Protocol 2

Modificació del protocol 1, emprant àcid fosfòric en comptes de TCA. Un gram de mostra homogènia va ser abocat en 10 mL de H₃PO₄ 5 %-DTT 0,1 %, es va agitar 1 min en vòrtex i es va centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a 4 °C en una centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

Protocol 3

Adaptació del mètode descrit per López *et al.* (2005) en olives de taula, on es va utilitzar HPO₃ (àcid metafosfòric) 6% per acidificar i EDTA 1 mM com a quelant de metalls, per preservar l'AA durant l'extracció. Va seguir una fase de conversió, on es va utilitzar DTT 0,2 % en tampó fosfat a pH 7 i K₂HPO₄ 45 %, aturant la reducció mitjançant l'addició de H₃PO₄ 2 M. Un gram de mostra homogènia es va abocar en HPO₃ 6 % - EDTA 1 mM, fins a un pes final de 10 g. Es va agitar 1 min en vòrtex i es mantingué en un agitador orbital AN-2 (SBS Instruments) durant 5 min a 4 °C. Es va centrifugar a 10.000 rpm durant 10 min a 4 °C en una centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU). Cinc-cents µL de sobredendant es mesclaren amb 300 µL de tampó fosfat pH 7 – DTT 0,2 % i 150 µL de K₂HPO₄ 45 %, es mantingueren 10 min a temperatura ambient i a les fosques i posteriorment s'afegeiren 300 µL de H₃PO₄ 2M.

3.3.2- Anàlisi HPLC-DAD

Els extractes tractats amb els protocols 1 i 3 s'han diluït per fer-los compatibles amb la fase mòbil; amb els extractes del protocol 2 no fou necessari. Immediatament abans de la LC els extractes foren filtrats amb filtres de membrana de *nylon* 13 mm de diàmetre i 0,45 µm de porus (Teknokroma, St. Cugat del Vallès, Barcelona).

L'anàlisi cromatogràfica es va realitzar en un cromatògraf líquid Agilent Series 1100, equipat amb un detector DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU). Per a la separació es va utilitzar una columna Zorbax SB-Aq (3,0 x 150 mm), Ø de partícula 3,5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU). La fase mòbil utilitzada va consistir en H₂O-H₃PO₄ pH 2,3, amb flux isocràtic de 0,45 mL/min i a temperatura ambient. Es varen injectar 10 µL de cada extracte i es va enregistrar l'absorbància a 244 nm. Les dades cromatogràfiques foren controlades amb el programari Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU).

Identificació i quantificació de l'àcid ascòrbic

El pic corresponent a AA en les mostres va identificar-se mitjançant la injecció de patró, comparant el temps de retenció i l'espectre UV, i amb extractes fortificats. Es realitzaren extractes de tomàquet i enciam fortificats amb patró d'AA per confirmar la identificació del pic. La quantificació d'AA en els extractes metanòlics d'enciam i tomàquet es portà a terme mitjançant dues rectes de calibració; per als extractes dels protocols 1 i 2 s'obtingué una recta amb solucions patró d'AA a diferents concentracions, relacionant ng d'AA injectats i àrea cromatogràfica obtinguda. Per als extractes del protocol 3, s'obtingué la recta de calibració amb solucions patró a diferents concentracions tractades amb el procés de conversió.

Factor de capacitat

El factor de capacitat (k) del pic d'AA es calculà segons l'expressió següent:

$$k = (t_{AA} - t_0)/t_0$$

on t_{AA} és el temps de retenció de l'AA i t₀ és el temps mort (temps corresponent a un analit que no es reté).

Recuperació

El càlcul de la recuperació per a cada protocol d'extracció es realitzà amb mostres comercials de tomàquet i enciam fortificades. La fortificació s'ha realitzat afegint una quantitat coneguda d'AA a la mostra abans de l'extracció. La recuperació es va calcular seguint l'esquema de la taula 3.1, tenint en compte l'augment en la quantitat d'àcid ascòrbic mesurat per HPLC en la mostra fortificada respecte a la mateixa mostra sense fortificar.

Mostra sense fortificar	→ (x) ng AA	(x) es determina per HPLC
Mostra fortificada	→ (x+y) ng AA	(x+y) es determina per HPLC

Fortificació:

Valor observat	→ (y) ng AA = (x+y)-(x)
Valor teòric (esperat)	→ (z) ng AA

$$\% \text{ Recuperació} = y / z \cdot 100$$

Taula 3.1. Càlcul de la recuperació pels mètodes d'extracció i anàlisi.

Plats teòrics

L'eficàcia de la separació del mètode d'anàlisi d'AA s'avaluà amb el paràmetre de plats teòrics (N). Es calculà amb la funció següent:

$$N = a \left(\frac{t_R}{W\%} \right)^2$$

on “ t_R ” és el temps de retenció de l'analit, “ $W\%$ ” és l'amplada del pic a la meitat de l'altura i “a” és la constant 5,54 (depèn del tipus d'amplada de pic utilitzada per a fer el càlcul). Per al càlcul s'utilitzà una solució diluïda de patró d'AA.

Límit de detecció

La concentració mínima d'AA present en el tomàquet i l'enciam capaç de ser detectada amb el mètode d'anàlisi de compostos fenòlics intactes es calculà considerant una relació senyal/soroll de 3. El límit de detecció (LOD) s'expressà com a la concentració d'AA present en el vegetal que origina un pic amb l'alçada equivalent a l'alçada llindar detectable. El càlcul es realitzà amb l'alçada del pic obtinguda injectant una solució patró d'AA en quantitat coneguda en les condicions cromatogràfiques del mètode. Es considerà tot el procés de càlcul (amb els factors de recuperació i dilució) per convertir la quantitat d'AA corresponent al pic llindar detectable a la seva concentració corresponent en el vegetal.

Repetibilitat

La repetibilitat intra-dia del mètode d'anàlisi d'AA amb extracció en $\text{HPO}_3\text{-EDTA} + \text{DTT}$ (extracció 3) en tomàquet es calculà analitzant tres extractes diferents del mateix tomàquet, per a tres tomàquets diferents i en el mateix dia. La repetibilitat intra-dia del mètode en enciam es calculà de la mateixa manera.

3. Materials i mètodes

3.4- Extracció de compostos fenòlics en tomàquet

3.4.1- Mètodes d'extracció

Els extractes es varen realitzar amb metanol 100 %, donat que les mostres eren fresques (amb alt contingut d'aigua), per tal d'optimitzar la dissolució dels flavonoides i els àcids fenòlics a l'extracte. Va descartar-se l'ús de temperatures elevades per evitar la degradació dels compostos fenòlics. Es varen provar i comparar tres mètodes d'extracció diferents amb el mateix tomàquet, amb dues rèpliques per a cada protocol.

La mostra a -80 °C va ser mòlta encara congelada en una picadora Blixer 3 (Robot Coupe, Isleworth, Regne Unit). Cinc grams de la mostra homogènia varen ser abocats en 20 g de metanol, i tractats amb els següents procediments d'extracció:

Mètode 1: Agitació

Es mantingué 2 hores en un agitador orbital AN-2 (SBS Instruments) a 4 °C i es centrifugà a 12.000 rpm durant 10 min a 4 °C en una centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

Mètode 2: Maceració

Es mantingué *overnight* (16 h) a 4 °C i es centrifugà a 12.000 rpm durant 10 min a 4 °C en una centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

Mètode 3: Ultrasons

Es mantingué 15 min en un bany d'ultrasons (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona) en aigua freda (0 °C) i es centrifugà a 12.000 rpm durant 10 min a 4°C en una centrífuga centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

3.4.2- Anàlisi de polifenols totals

El mètode utilitzat per a aquest assaig és una modificació del descrit per Singleton i Rossi (1965), basat en el reactiu de Folin-Ciocalteu. En un matràs de 50 mL, es mesclaren 35 mL d'aigua ultrapura, 2,5 mL d'extracte metanòlic i 2,5 mL de reactiu Folin-Ciocalteu, es barreja bé la mescla i es deixà 3 minuts a temperatura ambient. A continuació s'afegeiren 5 mL de solució Na₂CO₃ al 35% i s'enrasà el matràs amb aigua ultrapura. Es barreja la mescla i es deixà 2 hores a temperatura ambient i foscor. Es prengueren alíquots per mesurar la absorbància en un espectro-fotòmetre Graphicord UV-240 (Shimadzu, Kyoto, Japó) a 725 nm. La lectura espectrofotomètrica es féu contra un blanc de reactius.

El contingut en polifenols totals s'expressà en *caffein acid equivalents* (CAE), utilitzant una recta de calibració obtinguda amb solucions patró de *caffein acid* a diferents concentracions: 10, 20, 100 i 200 mg/L.

3.5- Anàlisi de compostos fenòlics hidrolitzats en extractes de tomàquet

3.5.1- Mètodes d'hidròlisi dels extractes

Va estudiar-se la conveniència de fer una hidròlisi dels extractes per simplificar el procés d'identificació i quantificació dels compostos fenòlics. Amb el mateix extracte metanòlic de tomàquet, es provà la hidròlisi en medi àcid i mitjançant enzims, amb diferents condicions. La figura 3.4 mostra esquemàticament les condicions d'hidròlisi assajades.

Hidròlisi àcida

Es va adaptar el mètode descrit per Crozier *et al.* (1997). Tubus amb alíquots de 5 g van evaporar-se completament sota flux de nitrogen i s'hi van afegir 2 mL de solució metanol 50% – HCl 1,2 M – TBHQ 1,6 g/L – AA 0,1 M. Els tubs tapats es van col·locar en un termobloc (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona) fixat a 90°C durant 1 hora o 2 hores.

Hidròlisi àcida	Hidròlisi enzimàtica		
HCl 1,2 M 90 °C 1 hora	β -glucuronidasa <i>d'Helix pomatia</i> pH = 4,8 37 °C 18 hores	β -glucosidasa <i>d'ametlla</i> pH = 4,8 37 °C 18 hores	β -glucosidasa <i>d'Aspergillus niger</i> pH = 4,0 37 °C 18 hores

Figura 3.4. Esquema de les condicions d'hidròlisi assajades.

Hidròlisi enzimàtica

Es va utilitzar el mètode descrit per Torres *et al.* 2005 amb β -glucuronidasa, i es van provar dues glucosidases més. Tubus amb alíquots d'extracte de 5 g van evaporar-se completament sota flux de nitrogen i s'hi van afegir 2 mL de tampó acetat (0,78 M – AA 0,1 M) i 100 μ L d'extracte comercial amb els enzims següents:

- β -glucuronidasa tipus HP-2 *d'Helix pomatia*, EC 3.2.1.31 (tampó a pH 4,8).
- β -glucosidasa *d'ametlla*, EC 3.2.1.21 (tampó a pH 4,8).
- β -glucosidasa *d'Aspergillus niger*, CAS 9033-06-1 (tampó a pH 4,0).

Les mostres van incubar-se a 37°C en un bany termostatic durant 18 hores. Seguint el protocol de la hidròlisi amb β -glucuronidasa també es van analitzar mostres “blanc” en les quals només es van afegir els reactius, per avaluar la presència de contaminants.

3. Materials i mètodes

3.5.2- Anàlisi HPLC-DAD

Es va afegir metanol als extractes hidrolitzats (100 µL als tubs d'hidròlisi àcida i 500 µL als tubs d'hidròlisi enzimàtica) per tenir un percentatge de metanol similar al de les condicions inicials del gradient. Es filtraren amb filtres de membrana PTFE de porositat PTFE de 0,45 µm abans d'injectar-los al sistema HPLC.

El sistema cromatogràfic consistí en un equip Waters (Waters, Milford, EEUU) equipat amb DAD i FLD. Per a la separació es va utilitzar una columna XBridge Shield C18 4,6 x 150 mm, Ø de partícula 3,5 µm (Waters, Milford, EEUU). El volum d'injecció de les mostres fou de 80 µL. La separació es va realitzar amb un gradient lineal entre 70 % B (metanol 5 % - H₃PO₄ pH 2,5) i 30 % A (metanol 100 % - H₃PO₄ pH 2,5) a 35 % B i 65 % A en 60 minuts. Es fixà el flux de fase mòbil a 1,1 mL/min i la temperatura de la columna a 35 °C. El sistema fou controlat amb el programari Empower 2 Pro (Waters, Milford, EEUU).

La identificació dels flavonoides hidrolitzats es realitzà injectant solucions patró en les mateixes condicions cromatogràfiques que les mostres hidrolitzades, comparant els temps de retenció i els espectres UV dels patrons amb els dels pics obtinguts amb els extractes hidrolitzats. També s'utilitzaren extractes fortificats.

3.6- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extractes de tomàquet

3.6.1- Anàlisi UPLC-DAD-ESI-MS/MS

Anàlisi de compostos fenòlics intactes (no hidrolitzats)

Una alíqua de 7 g dels extractes en metanol foren evaporats fins a sequedad sota flux de nitrogen a temperatura ambient i reconstituïts en 1 mL de fase mòbil (acetonitril 5 % - àcid fòrmic 0,1 %). Es filtrà amb filtres de membrana PTFE de porositat 0,2 µm abans d'injectar-ho al sistema UPLC. El sistema cromatogràfic consistí en un equip Acquity UPLC (Waters, Milford, EEUU) equipat amb DAD, interfase amb electroesprai i espectròmetre de masses de triple quadrupol. Per a la separació es va utilitzar una columna Acquity Shield RP₁₈ BEH 1,0 x 150 mm, Ø de partícula 1,7 µm (Waters, Milford, EEUU). El volum d'injecció de les mostres fou de 5 µL. La separació es va realitzar amb un gradient lineal de 100% A (acetonitril 5 % - àcid fòrmic 0,1 %) inicials a 72 % A – 28 % B (acetonitril 60 % - àcid fòrmic 0,1 %) als 25 minuts i finalment 40 % A – 60 % B als 40 minuts. Es fixà el flux de fase mòbil a 0,130 mL/min i la temperatura de la columna a 35 °C. L'electroesprai es fixà a polaritat negativa (ESI⁻). El triple quadrupol es configurà en els modes *scan* i *product ion scan*. En ambdós casos el voltatge del capil·lar fou de 2,5 KV, la temperatura de la font de 140 °C, la temperatura de desolvatació de 350 °C, el flux del gas de desolvatació (nitrogen) de 350 L/h, el flux del gas del con (nitrogen) de 20 L/h. En el mode *product ion scan*, el gas de col·lisió (argó) es fixà a 0,10 mL/min. Pels compostos fenòlics amb disponibilitat de patró comercial, els paràmetres de l'espectròmetre de masses es varen optimitzar per obtenir la fragmentació idònia de cada un d'ells, mitjançant un test previ dels paràmetres MS/MS sobre els compostos patró, utilitzant la infusió de solucions de compostos patró i l'aplicació AutoTune del programari. El sistema fou controlat amb el programari MassLynx (Waters, Milford, EEUU).

Identificació dels compostos fenòlics

Solucions patró diluïdes de flavonoides i àcids fenòlics foren injectades en les mateixes condicions cromatogràfiques que els extractes. El temps de retenció i l'espectre UV serviren per relacionar els compostos presents en els extractes amb els patrons disponibles. La identificació dels pics amb patró disponible es confirmà amb la informació obtinguda per MS (pes molecular) i MS/MS (espectre de fragmentació). Els altres pics majoritaris sense patró disponible s'identificaren de forma provisional amb l'espectre UV (paràmetre característic de les diferents classes de compostos fenòlics), i la informació MS i MS/MS, recollida en la bibliografia.

3.6.2- Anàlisi HPLC-DAD

Anàlisi de compostos fenòlics intactes (no hidrolitzats)

Una alíqua de 7 g dels extractes en metanol foren evaporats completament sota flux de nitrogen, reconstituïts en 1 mL de fase mòbil (metanol 33,5 % -H₃PO₄ pH 2,5) i filtrats amb filtres de membrana PTFE de porositat 0,45 µm abans d'injectar-los al sistema HPLC. El sistema cromatogràfic consistí en un equip Waters (Waters, Milford, EEUU) equipat amb DAD i FLD. Per a la separació es va utilitzar una columna XBridge Shield RP₁₈ BEH 4,6 x 150 mm, Ø de partícula 3,5 µm (Waters, Milford, EEUU). El volum d'injecció de les mostres fou de 80 µL. La separació cromatogràfica es va realitzar amb un gradient lineal entre 70 % B (metanol 5 % - H₃PO₄ pH 2,5) i 30 % A (metanol 100 % - H₃PO₄ pH 2,5) a 35 % B i 65 % A en 60 minuts. Es fixà el flux de fase mòbil a 1,1 mL/min i la temperatura de la columna a 35 °C. El sistema fou controlat amb el programari Empower 2 Pro (Waters, Milford, EEUU).

Identificació dels compostos fenòlics

Una sèrie d'extractes foren analitzats per UPLC-DAD-ESI-MS/MS i per HPLC-DAD. Donat que les fases mòbils i estacionàries dels dos sistemes foren substancialment equivalents, amb fase estacionària C₁₈ unida a través d'un grup polar a un substrat *ethylene bridged hybrid* (BEH) (Waters Cromatografia, 2009), els perfils dels chromatogrames obtinguts foren similars. Els pics identificats en el primer sistema s'associaren amb els pics obtinguts en el segon sistema, tenint en compte el desfasament en els temps de retenció i l'àrea relativa. A més, solucions patró diluïdes de flavonoides i àcids fenòlics foren injectades en les mateixes condicions cromatogràfiques del sistema HPLC-DAD que els extractes. Novament, el temps de retenció i l'espectre UV serviren per relacionar els compostos presents en els extractes amb els patrons disponibles. També es fortificaren extractes per recolzar la identificació dels pics amb patró disponible. La resta de pics majoritaris sense disponibilitat de patró, s'identificaren de forma provisional amb la informació obtinguda per MS i MS/MS, després d'haver-los associat amb els pics obtinguts en el sistema UPLC.

Quantificació dels compostos fenòlics

Els compostos presents en els extractes de tomàquet dels quals es disposava de patró, es quantificaren utilitzant rectes de calibració externes obtingudes amb solucions patró a diferents concentracions, relacionant la quantitat (ng) injectada amb l'àrea chromatogràfica obtinguda. Els compostos presents en els extractes i dels quals no es disposava de patró foren quantificats utilitzant la recta de calibració externa d'un compost d'estructura molecular similar, tenint en compte la diferència de pes molecular. Per tenir en compte les pèrdues de compostos durant les anàlisis, es calculà la recuperació del mètode (percentatge inicial de compostos fenòlics en la mostra que són detectats al final del procés d'anàlisi), i

3. Materials i mètodes

s'aplicà aquest factor en el resultat final. Les dilucions i concentracions de la mostra sofertes durant el procés d'anàlisi també es consideraren en el càlcul.

Recuperació

La recuperació de l'anàlisi dels compostos fenòlics intactes es calculà amb mostres de tomàquet fortificades amb quantitats conegeudes dels patrons de *5-caffeoylequinic acid, quercetin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-rutinoside, naringenin i naringenin chalcone* afegides en les mostres abans de l'extracció. L'augment en la quantitat de cada flavonoïde en la mostra fortificada respecte a la mateixa mostra sense fortificar correspon a aquella quantitat de compost fenòlic que es va afegir i que es recupera al final del procés d'anàlisi. Per calcular aquest augment, s'analitzaren set mostres de tomàquet, de les quals, es feren dos extractes de cada una. Un dels extractes es fortificà a un nivell determinat (dins un rang coherent amb la quantitat present en el tomàquet) i l'altre extracte s'analitzà sense fortificar. El procediment del càlcul fou el mateix que el utilitzat amb l'AA (taula 3.1).

Plats teòrics

L'eficàcia de la separació del mètode d'anàlisi de compostos fenòlics intactes en tomàquet s'avaluà amb el paràmetre de plats teòrics (N). Es calculà amb la funció ja descrita en l'apartat 3.3.2. Per al càlcul s'utilitzà una mescla de patrons que s'analitzà utilitzant el protocol d'anàlisi de compostos fenòlics intactes.

Límit de detecció

El límit de detecció (LOD) per a cada compost present en el tomàquet es calculà seguint la descripció de l'apartat 3.3.2. El càlcul es realitzà amb les alçades dels pics obtingudes injectant una mescla de patrons en quantitats conegeudes en les condicions cromatogràfiques del mètode. Es considerà tot el procés de càlcul (amb els factors de recuperació i dilució) per convertir la quantitat de compost fenòlic corresponent al pic llindar detectable a la seva concentració corresponent en el tomàquet.

Repetibilitat del mètode

La repetibilitat intra-dia de l'anàlisi dels compostos fenòlics intactes en tomàquet es calculà seguint la descripció de l'apartat 3.3.2.

3.7- Anàlisi de compostos fenòlics intactes en extractes d'enciam

3.7.1- Extracció

Es va seguir el mateix procediment d'extracció que amb els tomàquets, utilitzant el mètode amb ultrasons. La mostra congelada (-80 °C) va ser molta en una picadora Blixer 3 (Robot Coupe, Isleworth, Regne Unit), mantenint-les sempre en fred. Cinc grams varen ser abocats en 20 g de metanol, es mantingué 15 min en un bany d'ultrasons (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona) en aigua freda (0 °C) i es centrifugà a 12.000 rpm durant 10 min a 4 °C en una centrífuga centrífuga J2-MC (Beckman-Coulter, Fullerton, EEUU).

3.7.2- Anàlisi UPLC-DAD-ESI-MS/MS

Anàlisi de compostos fenòlics intactes

Una alíquota de 4 g dels extractes en metanol foren evaporats fins a sequedad sota flux de nitrogen i reconstituïts en 1 mL de fase mòbil (acetonitril 5 % - àcid fòrmic 0,1 %). Es filtrà en filtres de membrana PTFE de porositat 0,2 µm abans d'injectar-ho al sistema UPLC. El sistema cromatogràfic consistí en un equip Acquity UPLC (Waters, Milford, EEUU) equipat amb DAD, interfase amb electroesprai i espectòmetre de masses de triple quadrupol. Per a la separació es va utilitzar una columna Acquity Shield RP₁₈ BEH 1,0 x 150 mm, Ø de partícula 1,7 µm (Waters, Milford, EEUU). El volum d'injecció de les mostres fou de 5 µL. La separació chromatogràfica es realitzà amb un gradient lineal de 100% A (acetonitril 5 % - àcid fòrmic 0,1 %) inicials a 35 % A – 65 % B (acetonitril 60 % - àcid fòrmic 0,1 %) als 30 minuts. Es fixà el flux de fase mòbil a 0,130 mL/min i la temperatura de la columna a 35°C. L'electroesprai es fixà a polaritat negativa (ESI⁻). El triple quadrupol es configurà en els modes *scan* i *product ion scan*. En ambdós casos el voltatge del capilar fou de 2,5 KV, la temperatura de la font de 140 °C, la temperatura de desolvatació de 350 °C, el flux del gas de desolvatació (nitrogen) de 350 L/h, el flux del gas del con (nitrogen) de 20 L/h. En el mode *product ion scan*, el gas de col·lisió (argó) es fixà a 0,10 mL/min. Els paràmetres de l'espectòmetre de masses es varen optimitzar per obtenir la fragmentació idònia de cada compost fenòlic, mitjançant un test previ dels paràmetres MS/MS sobre compostos patró, utilitzant la infusió de solucions de compostos patró i l'aplicació AutoTune del programari. El sistema fou controlat amb el programari MassLynx (Waters, Milford, EEUU).

Identificació dels compostos fenòlics

S'injectaren patrons de compostos fenòlics en les mateixes condicions chromatogràfiques que els extractes per comparar els temps de retenció i els espectres UV. El pes molecular i els espectres de fragmentació obtinguts per MS i MS/MS completaren la informació. Com en el tomàquet, els altres pics majoritaris sense patró disponible s'identificaren de forma provisional comparant l'espectre UV i la informació MS i MS/MS amb la citada en la bibliografia. En els casos que no hi hagué bibliografia per comparar, es féu una anàlisi MS/MS/MS (MS³), induint a una primera fragmentació dels compostos en el con (i realitzant una segona fragmentació en el CID) per dilucidar-ne la seva estructura.

3.7.3- Anàlisi HPLC-DAD

Anàlisi d'extractes

Una alíquota de 4 g dels extractes en metanol foren evaporats completament sota flux de nitrogen, reconstituïts en 1 mL de fase mòbil (metanol 5 %-H₃PO₄ pH 2,5) i filtrats en filtres de membrana PTFE de porositat 0,45 µm abans d'injectar-los al sistema HPLC. El sistema cromatogràfic consistí en un equip Waters (Waters, Milford, EEUU) equipat amb DAD i FLD. Per a la separació es va utilitzar una columna XBridge Shield RP₁₈ BEH 4,6 x 150 mm, Ø de partícula 3,5 µm (Waters, Milford, EEUU). El volum d'injecció de les mostres fou de 80 µL. La separació chromatogràfica es dugué a terme amb un gradient lineal entre 95 % B (metanol 5 % - H₃PO₄ pH 2,5) i 5 % A (metanol 100 % - H₃PO₄ pH 2,5) a 45 % B i 55 % A en 70 minuts. Es fixà el flux de fase mòbil a 1,1 mL/min i la temperatura de la columna a 35 °C. El sistema fou controlat amb el programari Empower 2 Pro (Waters, Milford, EEUU).

3. Materials i mètodes

Identificació dels compostos fenòlics

Els pics obtinguts en cromatogrames d'extractes analitzats per UPLC-DAD-MS/MS es transferiren als pics obtinguts en els chromatogrames dels mateixos extractes analitzats per HPLC-DAD, tenint en compte el desfasament en el temps de retenció i l'àrea relativa. També s'utilitzaren patrons per relacionar les compostos presents en els extractes amb els patrons disponibles, i novament, s'utilitzaren extractes fortificats per recolzar la identificació. La resta de pics majoritaris sense disponibilitat de patró s'identificaren de forma provisional amb la informació obtinguda per MS i MS/MS, després d'haver-los associat amb els pics obtinguts en el sistema UPLC.

Quantificació dels compostos fenòlics

Els compostos presents en els extractes d'enciam dels quals es disposava de patró, es quantificaren utilitzant rectes de calibració en matriu obtingudes amb mostres d'enciam fortificades amb patró a diferents concentracions, relacionant quantitat (ng) de compost en la mostra amb l'àrea chromatogràfica obtinguda. Els compostos presents en els extractes i dels quals no es disposava de patró foren quantificats utilitzant la recta de calibració en matriu d'un compost d'estructura molecular similar, tenint en compte la diferència de pes molecular.

Plats teòrics

L'eficàcia de la separació del mètode d'anàlisi de compostos fenòlics intactes en enciam s'avaluà amb el paràmetre de plats teòrics (N). Es calculà amb la funció ja descrita en l'apartat 3.3.2. Per al càlcul s'utilitzà una mescla de patrons que s'analitzà utilitzant el protocol d'anàlisi de compostos fenòlics intactes.

Límit de detecció

El límit de detecció (LOD) per a cada compost present en l'enciam es calculà seguint la descripció de l'apartat 3.3.2. En aquest cas, el càlcul de la concentració en l'enciam de cada compost fenòlic que origina un pic corresponent a un senyal/soroll de 3 es realitzà amb les alçades dels pics obtingudes injectant una mostra d'enciam i utilitzant les rectes de calibració en matriu.

Repetibilitat del mètode

La repetibilitat intra-dia de l'anàlisi dels compostos fenòlics intactes en enciam es calculà seguint la descripció de l'apartat 3.3.2.

4. Resultats i discussió

4.1- Anàlisi de vitamina C en tomàquet i enciam

4.1.1- Anàlisi HPLC-DAD

La columna utilitzada, apta per a fases mòbils 100% aquoses, juntament amb el flux isocràtic de H_2O - H_3PO_4 van permetre retenir l'AA ($k = 0,68$) dels extractes injectats i eluir-lo en un pic ben resolt i separat d'altres components de la matriu. La figura 4.1 mostra el cromatograma d'un patró d'AA, el qual surt amb un temps de retenció de 2,4 min en les condicions cromatogràfiques d'aquest treball, i la figura 4.2 mostra el seu espectre UV.

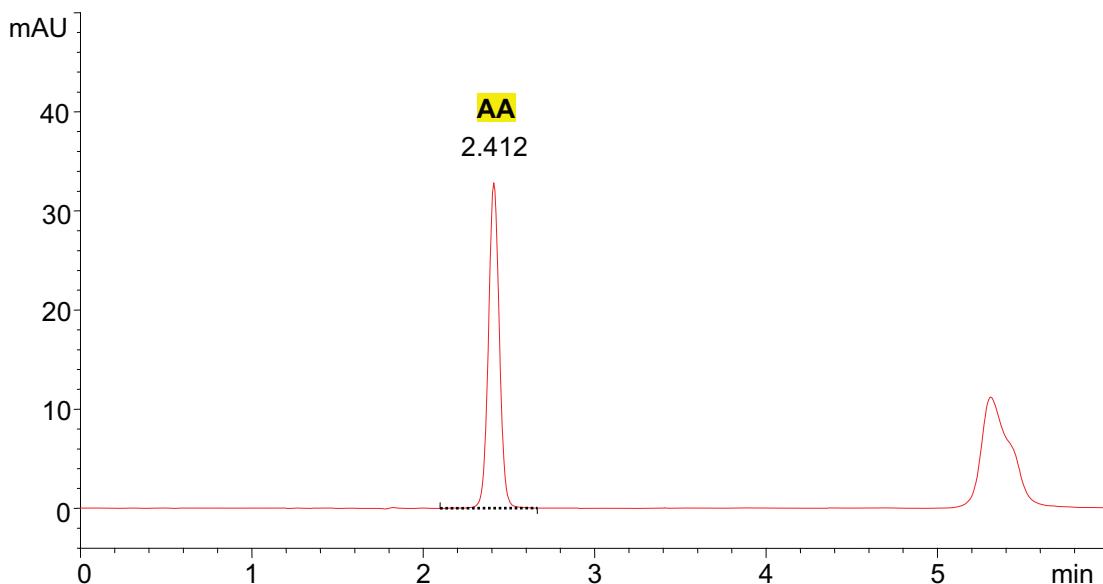


Figura 4.1. Cromatograma a $\lambda=244$ nm d'una solució patró d'AA (10mg/L), amb un volum d'injecció de 15 μL .

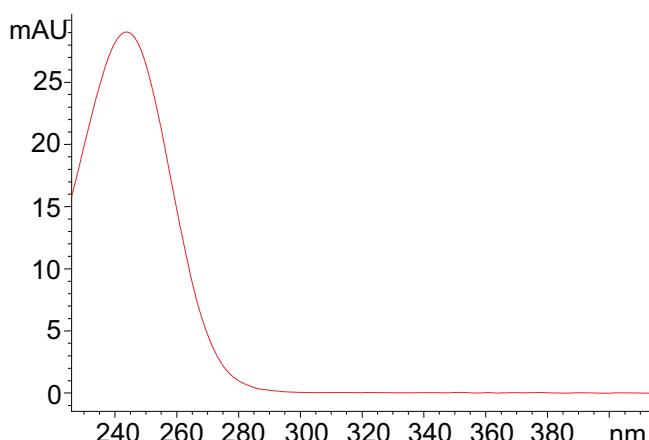


Figura 4.2. Espectre UV del pic de l'AA, corresponent al pic amb $t_{\text{R}}=2,412$ min de la figura 4.1.

4. Resultats i discussió

Les rectes de calibració obtingudes per a cada protocol es mostren en les figures 4.3 (pels protocols 1 i 2) i 4.4 (pel protocol 3).

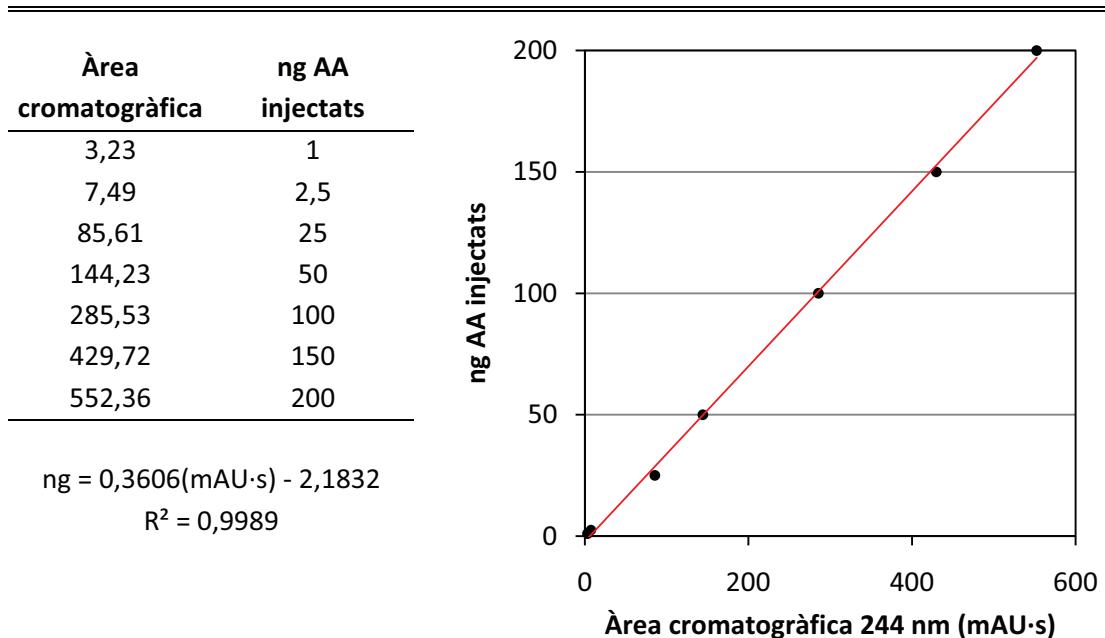


Figura 4.3. Recta de calibració utilitzada per a la quantificació d'AA en les mostres tractades amb els protocols 1 (extracció amb TCA-DTT) i 2 (extracció amb H₃PO₄-DTT).

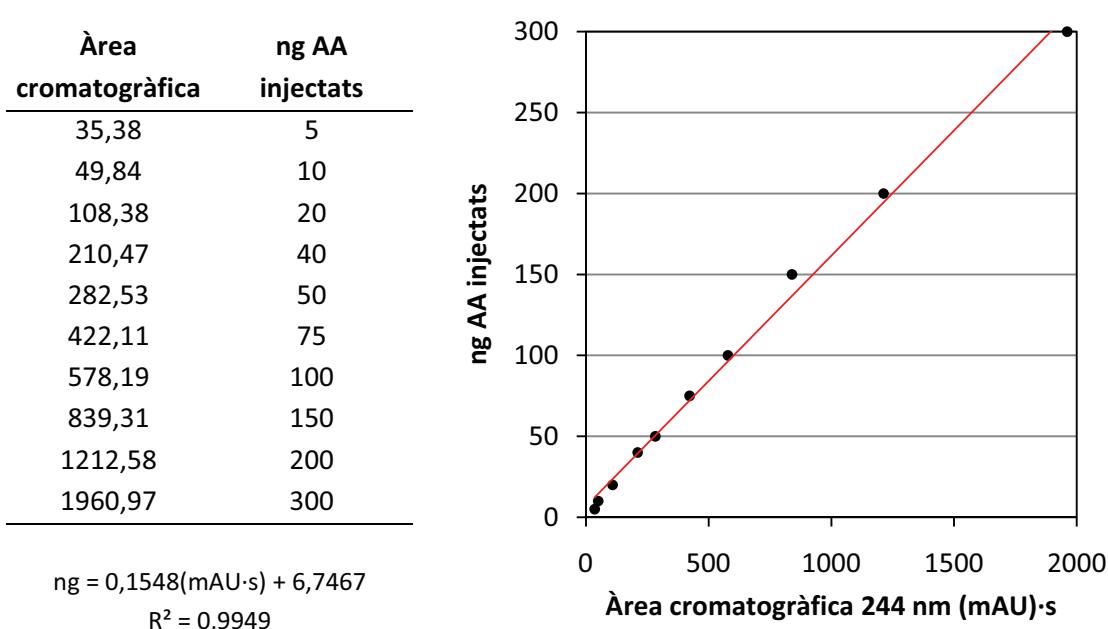


Figura 4.4. Recta de calibració utilitzada per a la quantificació d'AA en les mostres tractades amb el protocol 3 (extracció amb HPO₃-EDTA + DTT).

4.1.2- Extracció i conversió

L'extracció de les mostres de tomàquet i enciam utilitzant TCA i DTT (protocol 1) va permetre extreure l'àcid ascòrbic amb una recuperació satisfactoria (entorn el 80 %), però els cromatogrames presentaven un pic mal resolt (probablement degut a la presència de TCA a l'extracte) molt a prop del pic d'AA (figs. 4.5 i 4.6), fet que no passà utilitzant H_3PO_4 i DTT (protocol 2, figs. 4.7 i 4.8) com tampoc amb el HPO_3 amb fase de conversió (protocol 3, figs. 4.9 i 4.10).

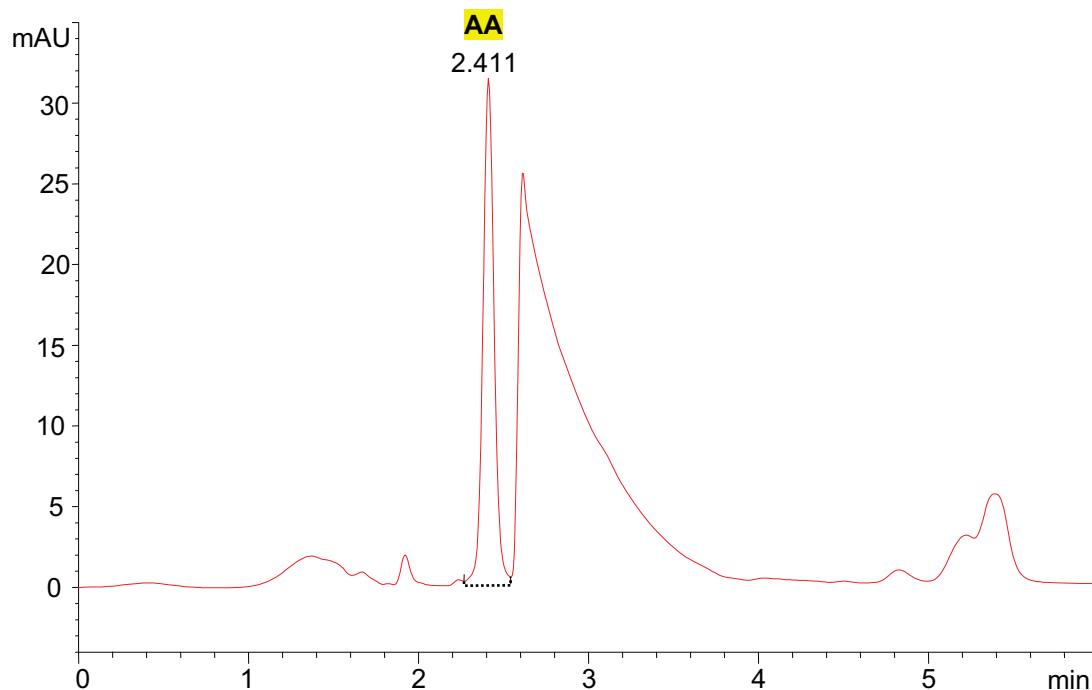


Figura 4.5. Cromatograma a $\lambda=244$ nm d'una mostra d'enciam extreta amb TCA-DTT (protocol 1).

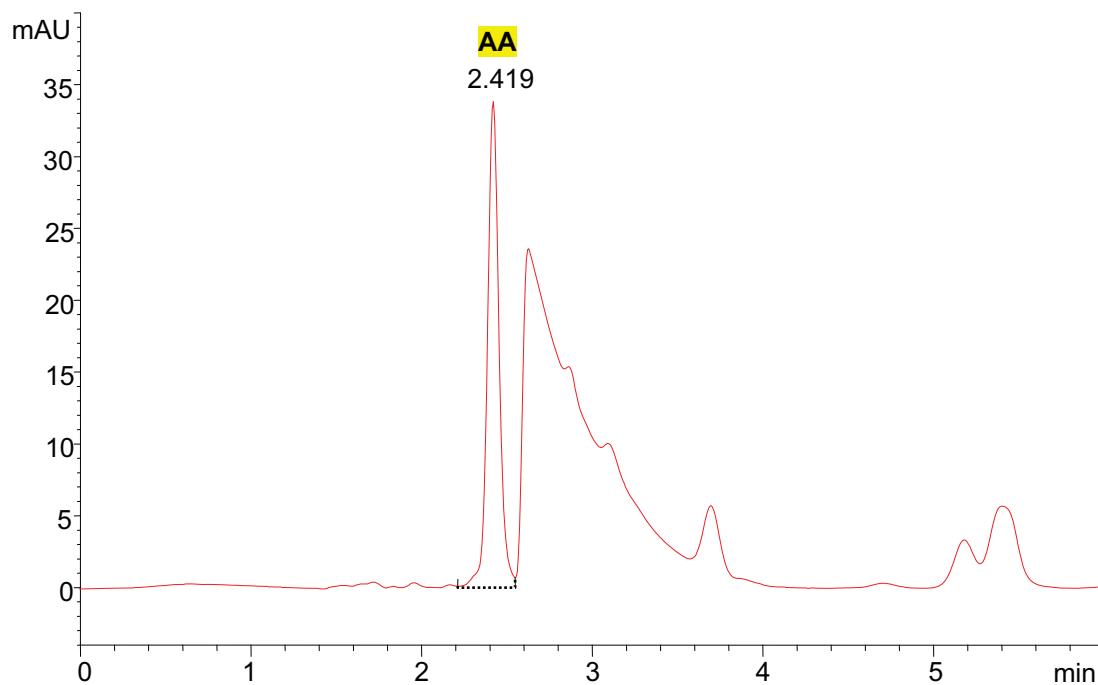


Figura 4.6. Cromatograma a $\lambda=244$ nm d'una mostra de tomàquet extreta amb TCA-DTT (protocol 1).

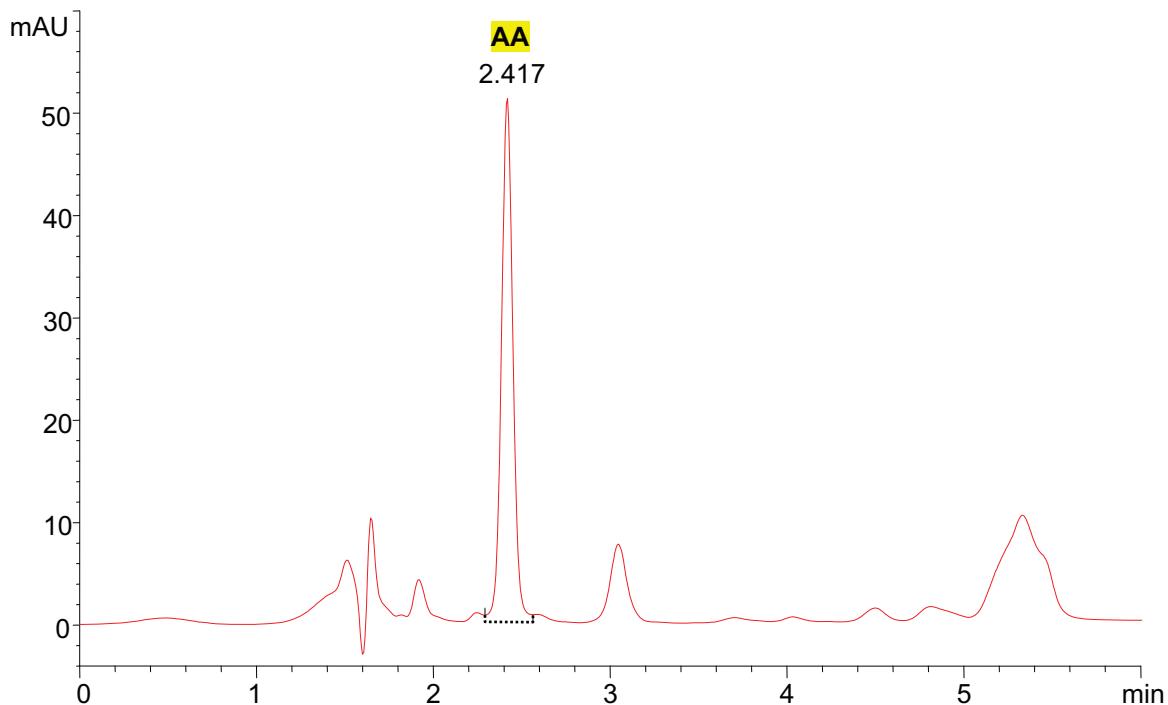


Figura 4.7. Cromatograma a $\lambda=244$ nm d'una mostra d'enciam extreta amb H_3PO_4 -DTT (protocol 2).

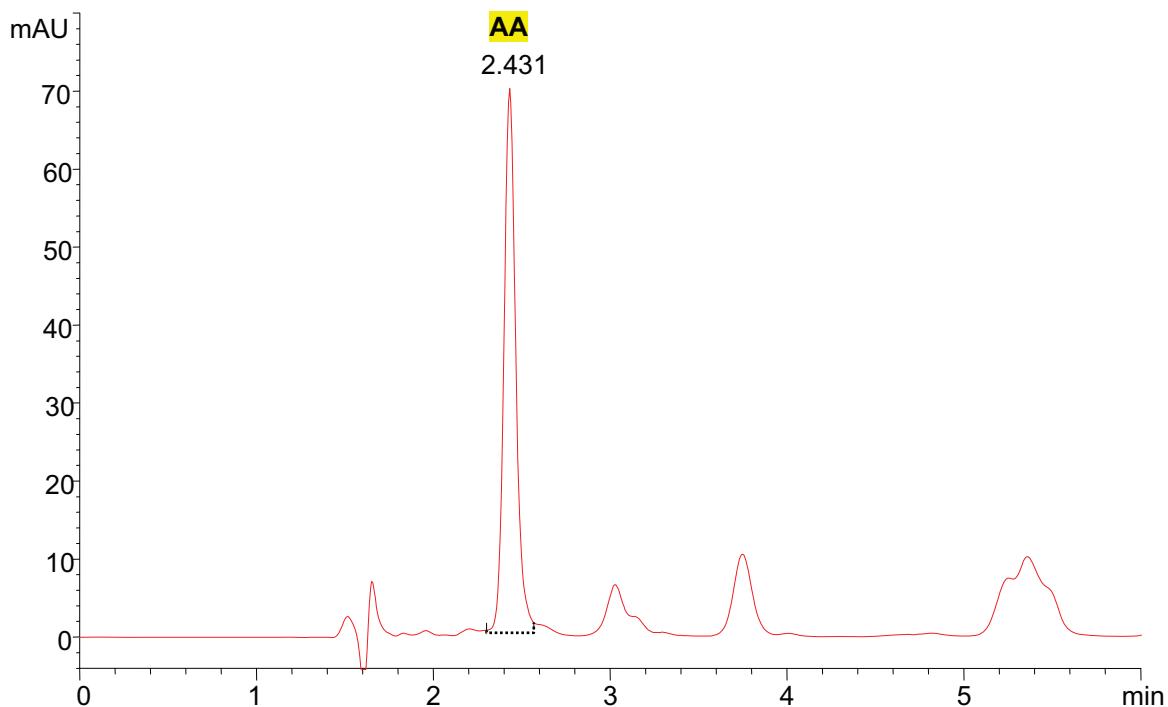


Figura 4.8. Cromatograma a $\lambda=244$ nm d'una mostra de tomàquet extreta amb H_3PO_4 -DTT (protocol 2).

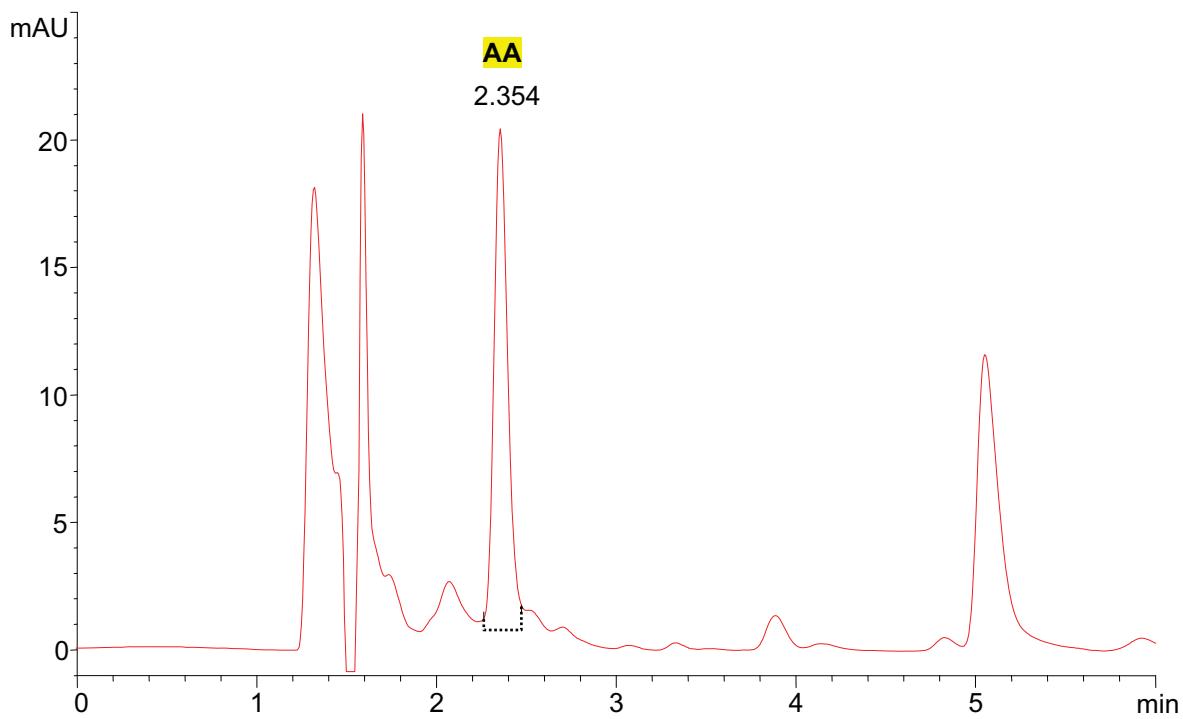


Figura 4.9. Cromatograma a $\lambda=244\text{ nm}$ d'una mostra d'enciam extreta amb $\text{HPO}_3\text{-EDTA} + \text{DTT}$ (protocol 3).

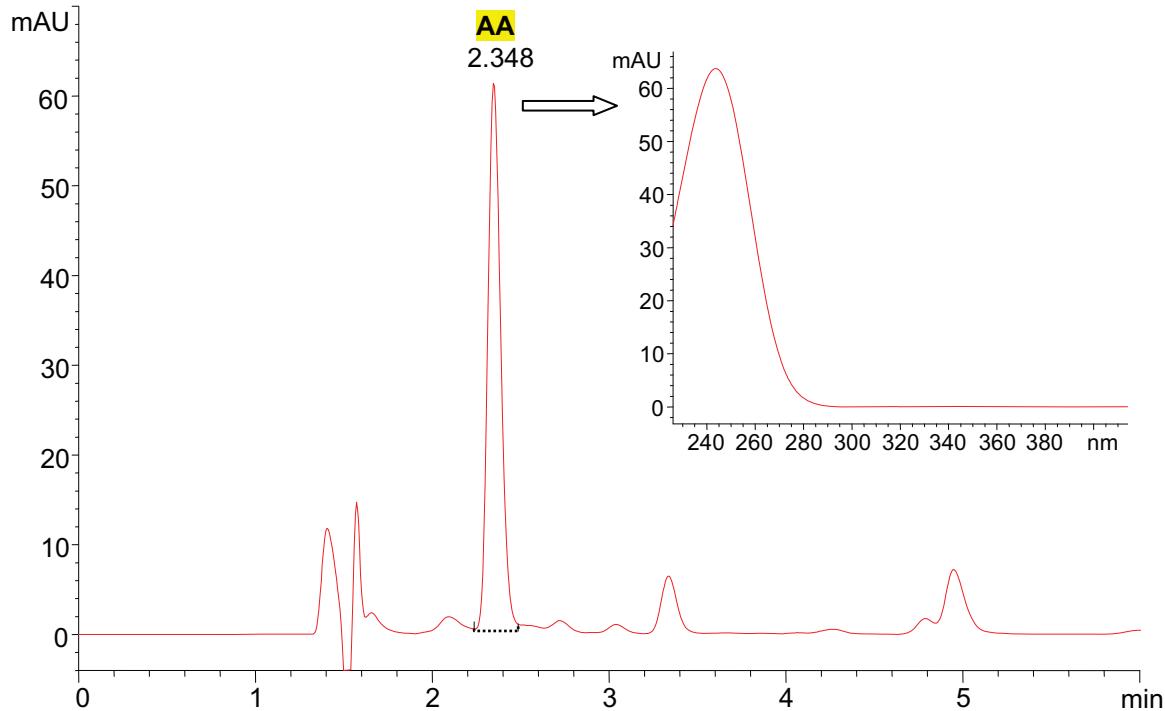


Figura 4.10. Cromatograma a $\lambda=244\text{ nm}$ d'una mostra de tomàquet extreta amb $\text{HPO}_3\text{-EDTA} + \text{DTT}$ (protocol 3). Es mostra l'espectre UV del pic d'AA (per a comparació amb patró d'AA vegeu figura 4.2).

4. Resultats i discussió

Avaluació del mètode

La recuperació d'AA observada en les mostres de tomàquet i enciam, utilitzant el protocol d'extracció 3 ($\text{HPO}_3\text{-EDTA} + \text{DTT}$), es mostren a la taula 4.1. L'obtenció de cromatogrames més nets i una recuperació més elevada amb els extractes seguint el protocol 3 (extracció amb $\text{HPO}_3\text{-EDTA}$ i fase de conversió amb DTT), va fer descartar els altres dos i que s'utilitzés aquest darrer per a la determinació dels efectes dels tractaments agronòmics sobre el contingut en vitamina C del tomàquet i de l'enciam. El límit de detecció i la repetibilitat del mètode d'anàlisi de vitamina C es calcularen emprant l'extracció del protocol 3.

Matriu	Fortificació	n	Recuperació mitjana	CV
<i>Tomàquet</i>	25 mg/kg	8	80,5 %	3,4 %
<i>Enciam</i>	10-15 mg/kg	3	77,5 %	10,0 %

Taula 4.1. Recuperació obtinguda en les dues matrius (tomàquet i enciam) amb l'anàlisi de vitamina C.

El pic d'AA tingué un temps de retenció mig de 2,37 minuts ($n = 20$, $CV = 0,56\%$). El nombre de plats teòrics (N) obtinguts pel pic d'AA, injectant 50 ng d'AA, foren de 4.920. Tenint en compte l'alçada del soroll i els factors de dilució del mètode d'anàlisi, el LOD calculat fou de 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) en tomàquet i enciam.

Les determinacions de la concentració de vitamina C realitzades el mateix dia en tres tomàquets i per triplicat (tres extraccions diferents de cada tomàquet), tingueren un coeficient de variació mitjà del 4,7 %. Les anàlisis realitzades en enciam, seguint el mateix procediment que els tomàquets, tingueren un coeficient de variació mitjà de 2,9 %.

La taula 4.2 mostra els valors d'AA determinats per a deu mostres d'enciam i deu de tomàquet. Es situen dins el rang de valors presentats per altres autors (vegeu taula 1.2). Amb el mètode d'extracció amb $\text{HPO}_3\text{-EDTA}$ i fase de conversió amb DTT, juntament amb la columna Zorbax SB-Aq (Agilent Technologies, 2009) s'aconseguí aïllar el pic d'AA d'altres interferents, utilitzant aigua- H_3PO_4 com a fase mòbil. L'ús d'una fase mòbil 100 % aquosa i d'una columna de diàmetre 3 mm permeté realitzar la separació minimitzant la generació de residus tòxics, al mateix temps que s'aconsegueix reduir el temps de retenció de l'AA mantenint el seu factor de capacitat (k). Amb aquesta metodologia no fou necessari l'ús de tampons en la fase mòbil que ha estat utilitzat en altres mètodes (Iwase *et al.*, 2000; Gökmen *et al.*, 2000; Lykkesfeldt, 2000; Brause *et al.*, 2003), ni fer les derivatitzacions necessàries per un sistema de detecció amb fluorimetria (Proteggente *et al.*, 2002; Nováková *et al.*, 2008). El LOD observat fou similar (Iwase, 2000; Heudi *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006) o inferior (Rodríguez-Comesana *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006; Burini, 2007; Odriozola-Serrano *et al.*, 2007) al descrit per altres mètodes d'anàlisi en aliments.

	n	mg Vitamina C / kg PF
Tomàquet	10	108 - 167
Enciam	10	100 - 131

Taula 4.2. Rang de valors (mínim-màxim) de vitamina C total (AA i DHA) en deu mostres d'enciam i tomàquet, determinats amb la el mètode d'anàlisi HPLC-DAD desenvolupat.

4.2- Extracció de compostos fenòlics en tomàquet

Per comparar l'eficàcia dels diferents mètodes d'extracció es va fer l'anàlisi de polifenols totals dels diferents extractes. La recta de calibració obtinguda per a l'assaig de polifenols totals es mostra en la figura 4.11.

Per als tres mètodes d'extracció assajats s'obtingueren valors de polifenols totals semblants, sent el mètode amb ultrasons el que va donar valors d'extracció lleugerament més alts (taula 4.3). Per motius de temps (15 minuts als ultrasons respecte les 2 hores en agitació i 12 hores en maceració) es va optar per utilitzar aquest mètode per a l'estudi de les condicions agronòmiques sobre el contingut en compostos fenòlics dels tomàquets i dels enciams.

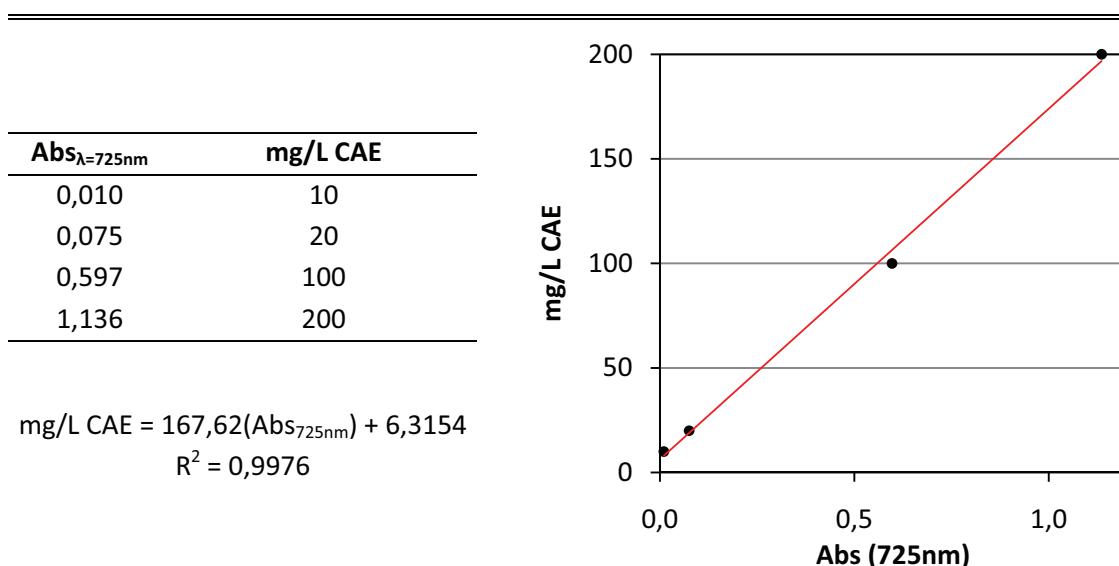


Figura 4.11. Recta de calibració utilitzada per a la quantificació dels polifenols totals, expressat en equivalents de *caffeic acid* (CAE).

Extracció	Rèplica	mg/kg CAE	Mitjana
Agitació	1	226,85	225,18
	2	223,50	
Maceració	1	220,05	219,68
	2	219,30	
Ultrasons	1	226,85	233,13
	2	239,40	

Taula 4.3. Polifenols totals expressats en equivalents de *caffeic acid* (CAE) d'una mateixa mostra de tomàquet, utilitzant tres mètodes d'extracció diferents (dues extraccions independents per cada mètode).

4.3- Anàlisi de compostos fenòlics hidrolitzats en extractes de tomàquet

4.3.1- Anàlisi HPLC-DAD de patrons de compostos fenòlics

Els patrons de flavonoides i àcids fenòlics analitzats sortien eluïts en els temps de retenció especificats a la taula 4.4. El gradient, columna i fase mòbil utilitzats permeten separar bé en 51 minuts un ampli ventall de compostos fenòlics, des dels àcids fenòlics simples més hidròfils (*gallic acid*, $k = 0,70$), als flavonoides aglicons menys hidròfils (*kaempferol*, $k = 31,13$). Els flavonoides glicosilats sortien amb temps de retenció intermedis. Els espectres UV de cada un es mostren a la figura 4.12.

Compost	t_R (min)	Compost	t_R (min)
<i>Gallic acid</i>	2,55	<i>Kaempferol-3-O-rutinoside</i>	24,52
<i>Caffeic acid</i>	4,46	<i>Myricetin-3-O-rhamnoside</i>	25,76
<i>Chlorogenic acid</i>	6,26	<i>Myricetin</i>	26,57
<i>p-Coumaric acid</i>	10,72	<i>Naringenin</i>	33,43
<i>Naringenin-7-O-rhamnoglucoside</i>	11,87	<i>Quercetin</i>	38,98
<i>Naringenin-7-O-glucoside</i>	12,56	<i>Naringenin chalcone</i>	41,12
<i>Quercetin-3-O-glucoside</i>	17,64	<i>Luteolin</i>	41,15
<i>Quercetin-3-O-rhamnoside</i>	18,40	<i>Apigenin</i>	49,42
<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	19,28	<i>Kaempferol</i>	51,20
<i>Kaempferol-3-O-glucoside</i>	24,07		

Taula 4.4. Temps de retenció típics (t_R) dels patrons injectats en HPLC-DAD, amb les condicions cromatogràfiques descrites a l'apartat 3.5.2.

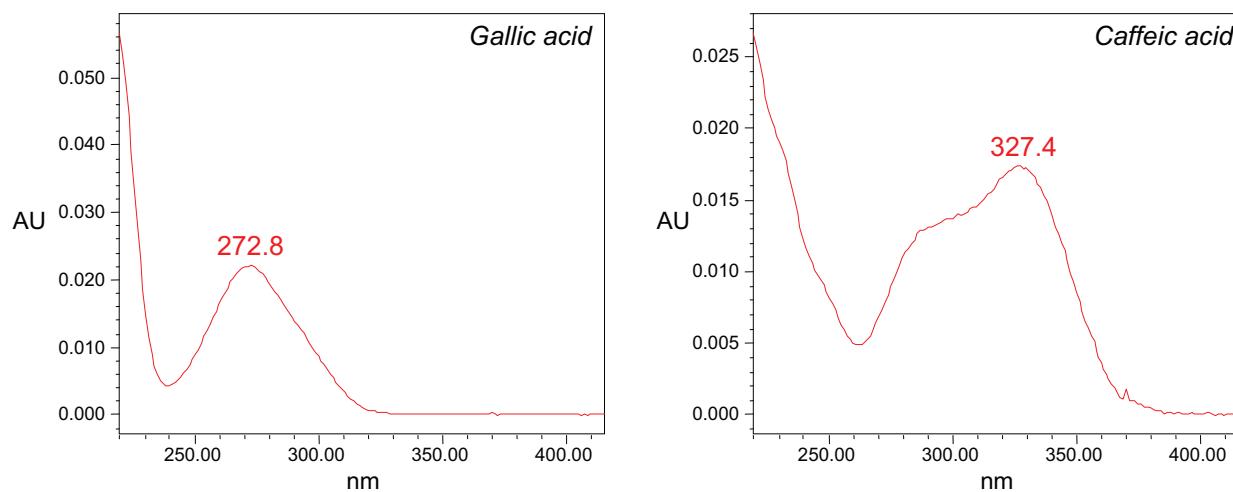


Figura 4.12. Espectres UV dels patrons d'àcids fenòlics i flavonoides obtinguts en l'equip HPLC-DAD.
(continua a la pàgina següent)

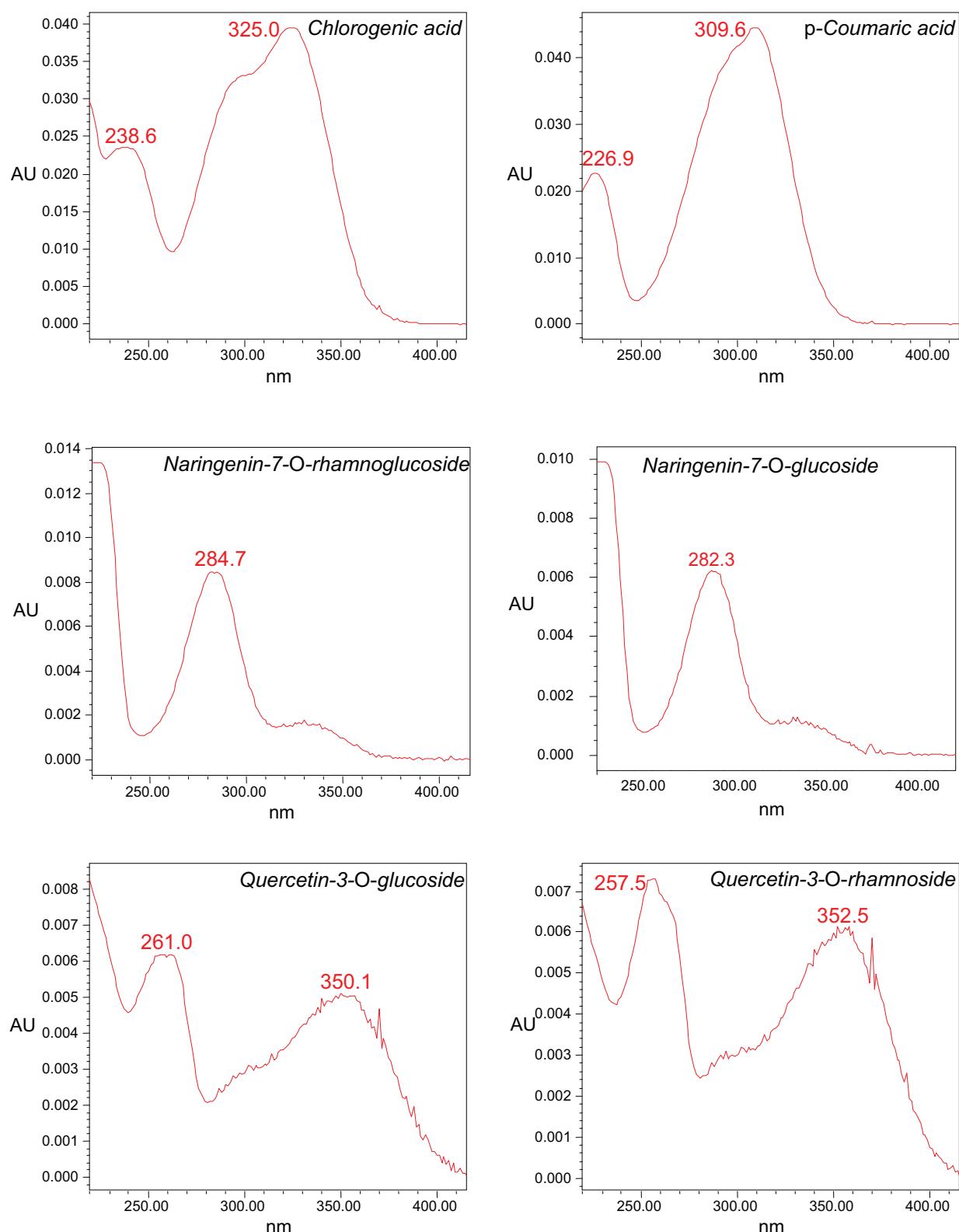


Figura 4.12. Espectres UV dels patrons d'àcids fenòlics i flavonoides obtinguts en l'equip HPLC-DAD.
(continua a la pàgina següent)

4. Resultats i discussió

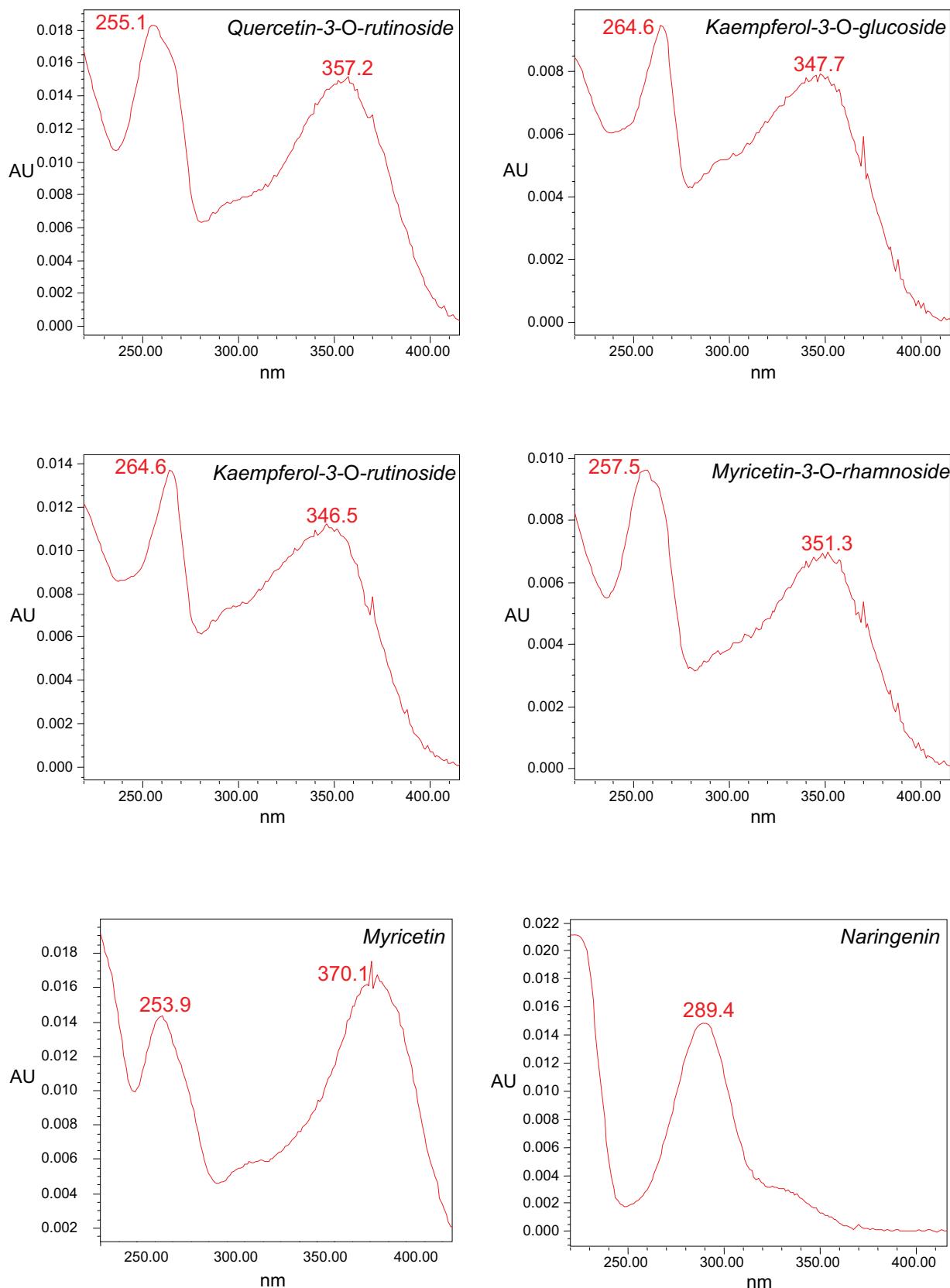


Figura 4.12. Espectres UV dels patrons d'àcids fenòlics i flavonoides obtinguts en l'equip HPLC-DAD.
(continua a la pàgina següent)

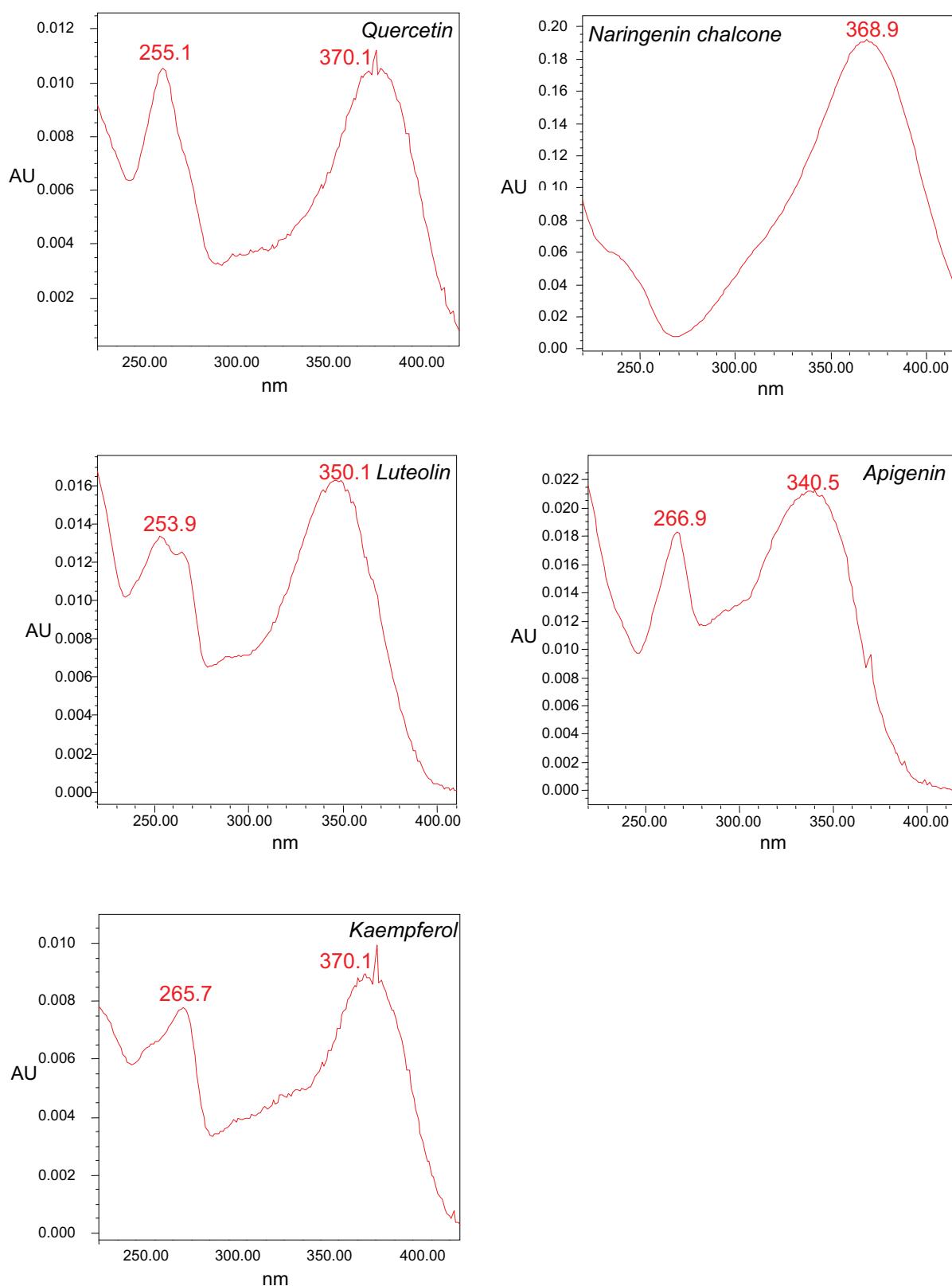


Figura 4.12. Espectres UV dels patrons d'àcids fenòlics i flavonoides obtinguts en l'equip HPLC-DAD.
(continuació)

4.3.2- Hidròlisi àcida

S'obtingueren cromatogrames amb pics més importants en els extractes d'una hora que amb els de dues hores, fet que indicà que dues hores d'hidròlisi eren excessives per a l'estabilitat dels flavonoides. S'identificaren els aglicons *quercetin*, *kaempferol* i *naringenin* (figs. 4.13 i 4.14).

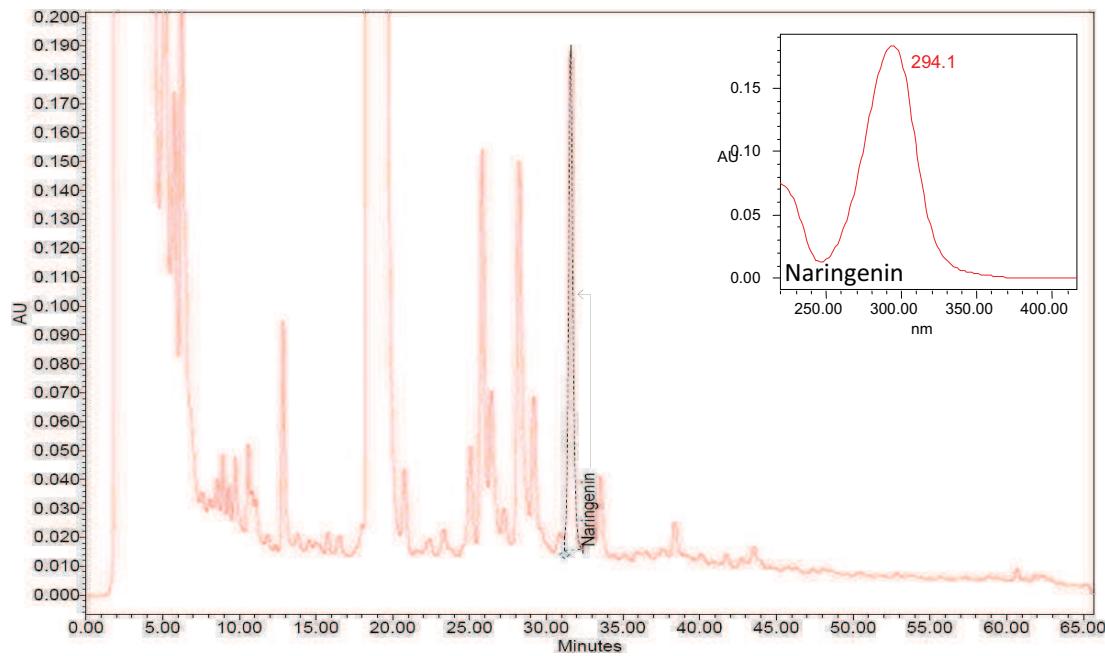


Figura 4.13. Cromatograma a 288 nm d'extracte amb hidròlisi àcida d'una hora de tomàquet. S'identifica el flavonoide *naringenin*, amb el respectiu espectre UV.

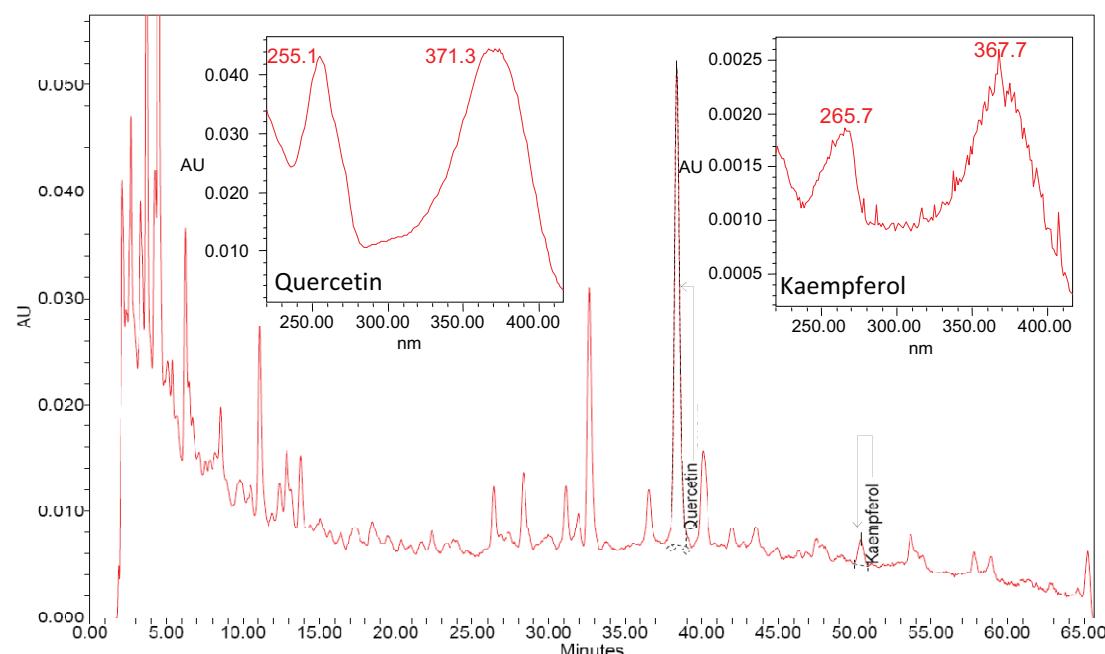


Figura 4.14. Cromatograma a 370 nm d'extracte amb hidròlisi àcida d'una hora de tomàquet. S'identifiquen els flavonoides *quercetin* i *kaempferol*, amb els respectius espectres UV.

4.3.3- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'ametlla

Es pogueren identificar els flavonoides *naringenin* i *naringenin chalcone* (figs 4.15 i 4.16).

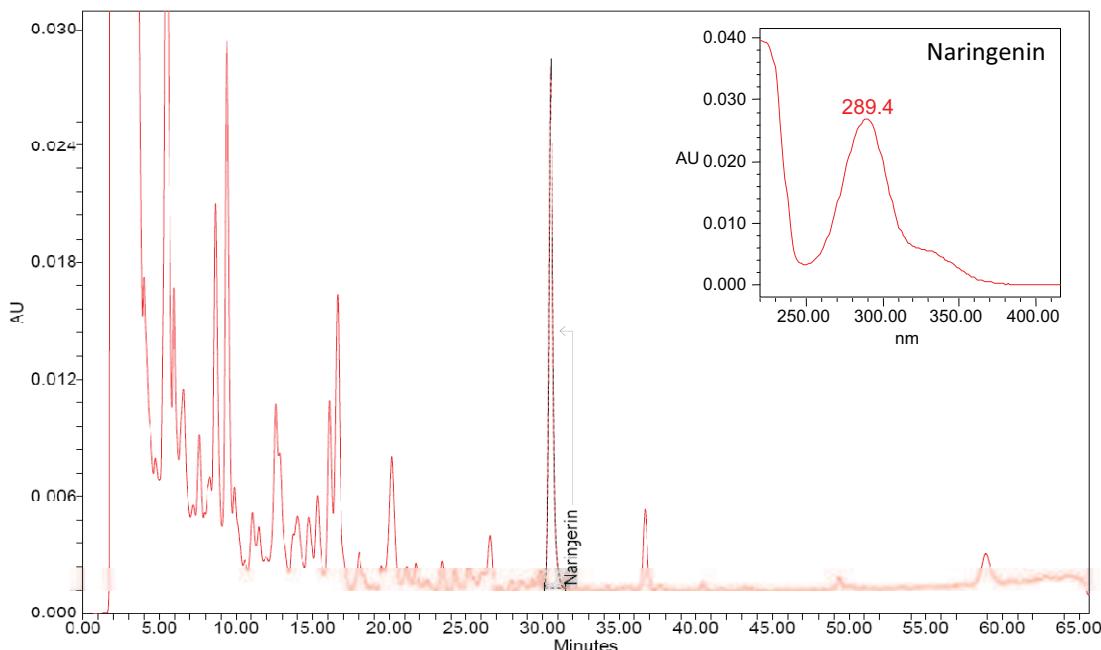


Figura 4.15. Cromatograma a 288 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'ametlla. S'identifica el flavonoide *naringenin*, amb el respectiu espectre UV.

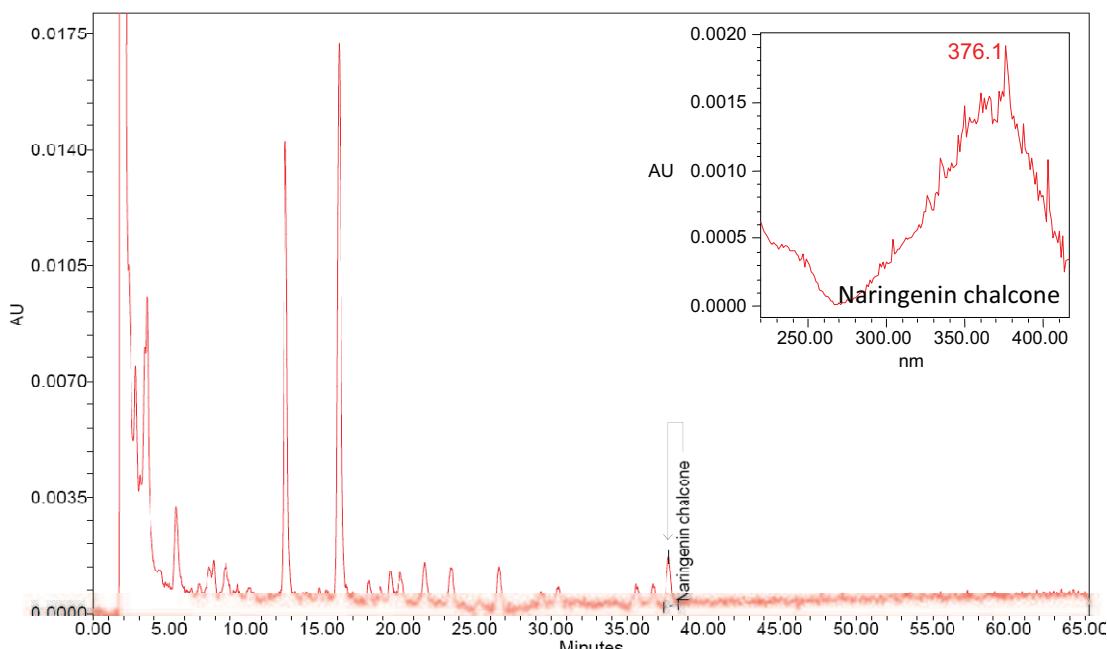


Figura 4.16. Cromatograma a 370 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'ametlla. S'identifica el flavonoide *naringenin chalcone*, amb el respectiu espectre UV.

4.3.4- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'*Aspergillus nigra*

S'identificaren els flavonoides naringenin, quercetin i naringenin chalcone (figs 4.17 i 4.18).

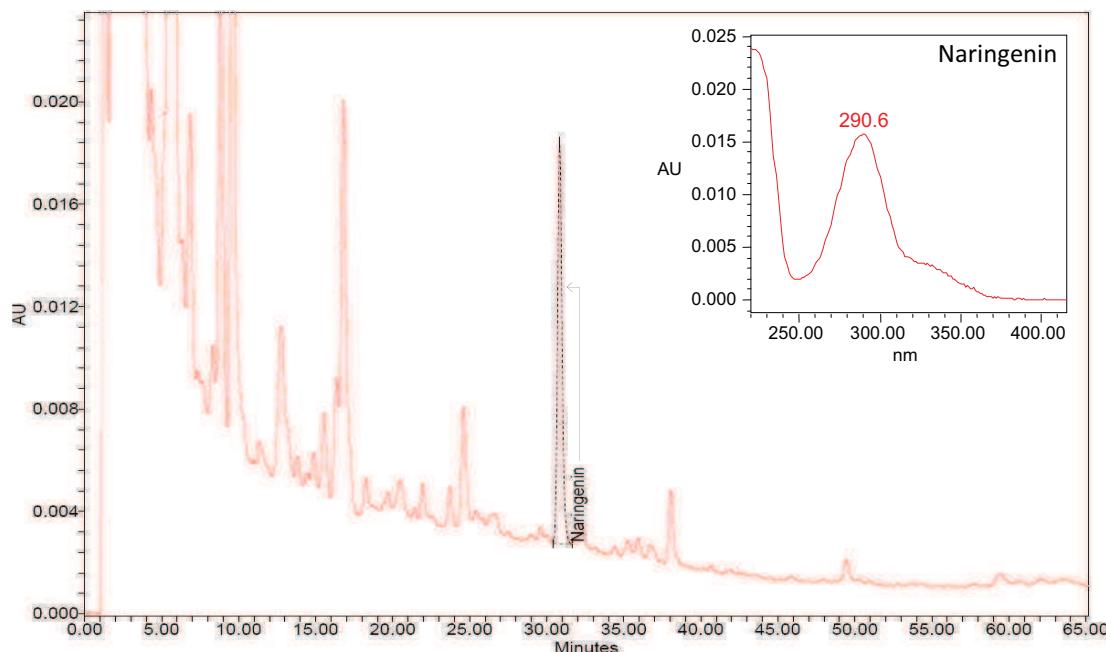


Figura 4.17. Cromatograma a 288 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'*A. nigra*. S'identifica el flavonoide naringenin, amb el respectiu espectre UV.

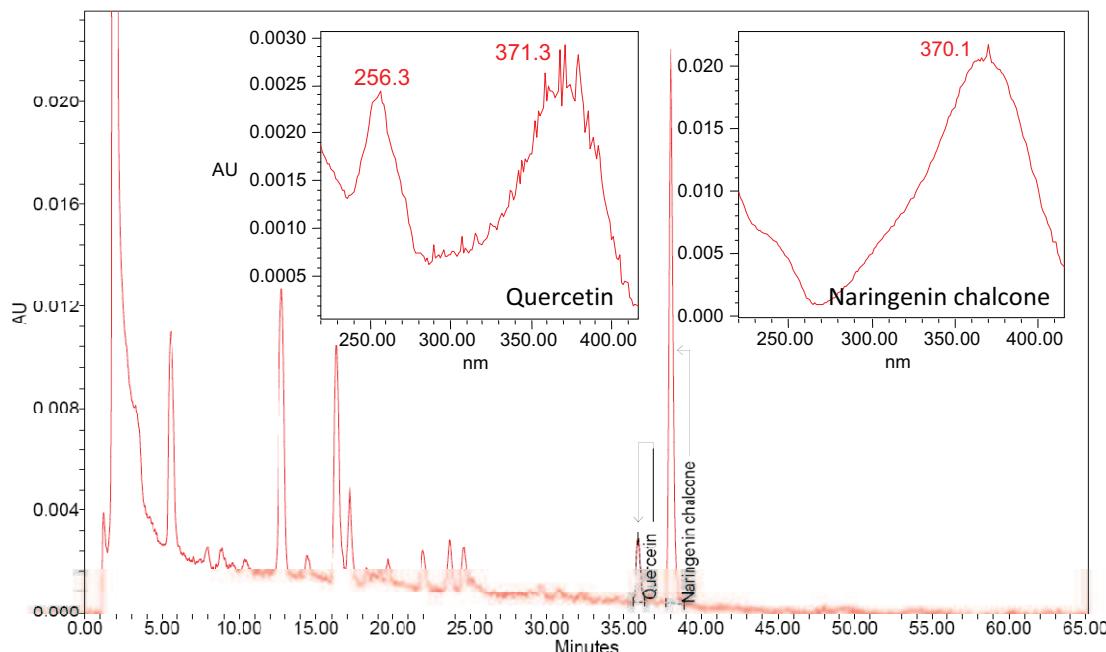


Figura 4.18. Cromatograma a 370 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucosidasa d'*A. nigra*. S'identifiquen els flavonoides quercetin i naringenin chalcone, amb els respectius espectres UV.

4.3.5- Hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa d'*Helix pomatia*

Les anàlisis de les mostres “blanc” (fig. 4.19) mostraren que *luteolin* es trobava present en la solució de β -glucuronidasa d'*Helix pomatia*, sent doncs un artefacte de la hidròlisi. En els extractes de tomàquet hidrolitzats amb β -glucuronidasa s’identificaren els flavonoides *naringenin*, *quercetin*, *luteolin* (artefacte), *naringenin chalcone*, *apigenin* i *kaempferol* (figs. 4.20 i 4.21).

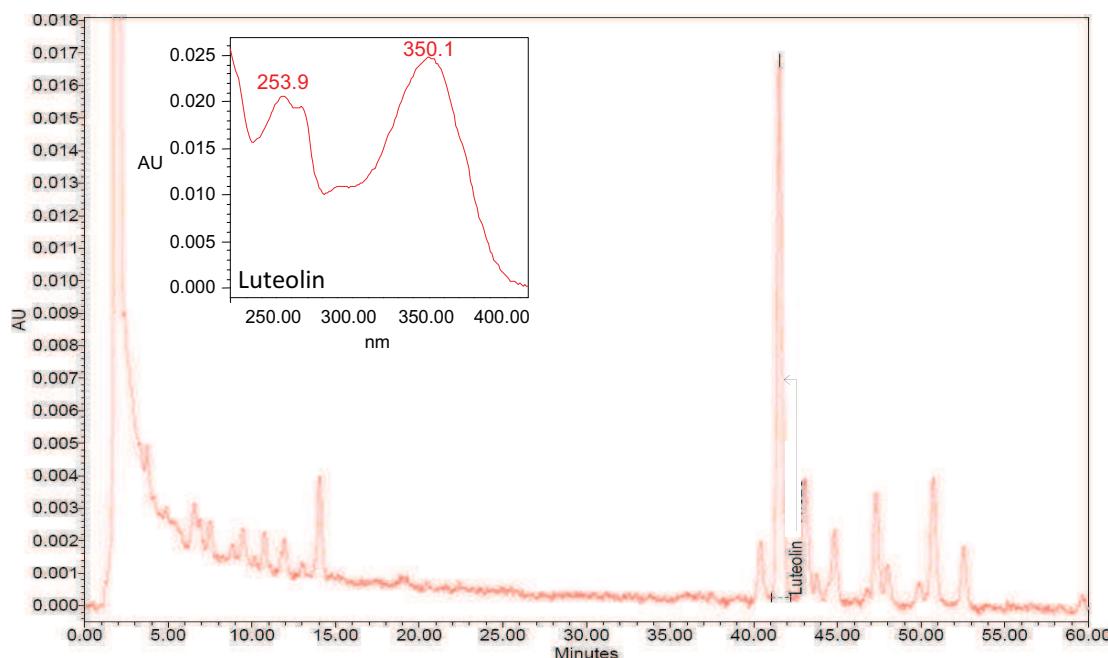


Figura 4.19. Cromatograma a 370 nm d'un blanc de reactius (sense extracte) d'hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa d'*H. pomatia*. S'identifica el flavonoide *Luteolin*, amb el respectiu espectre UV.

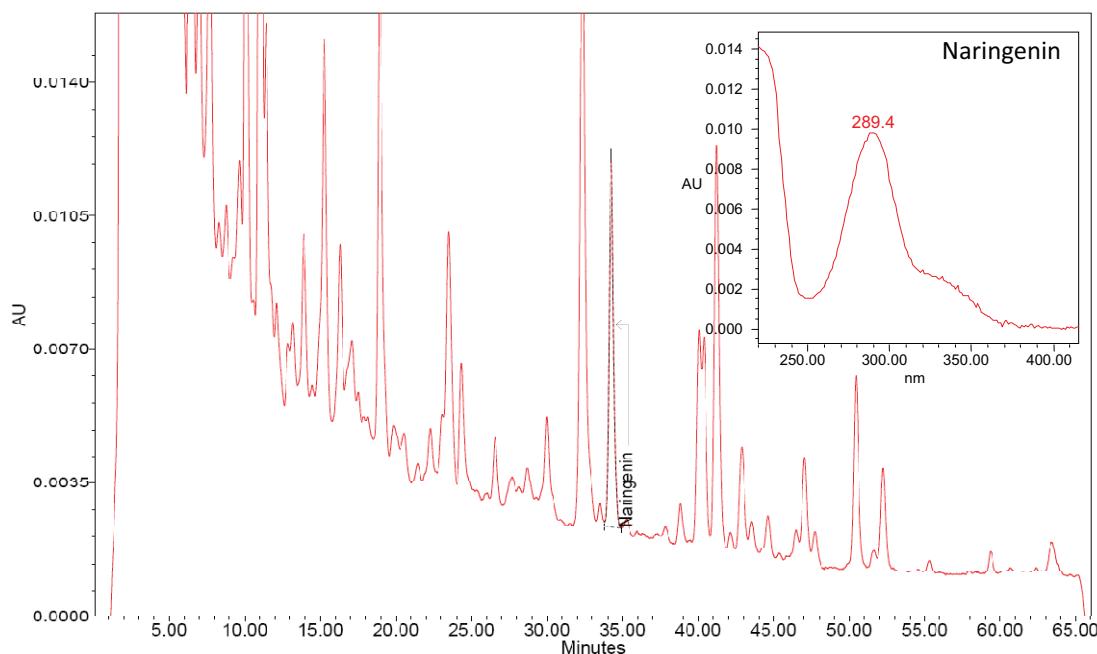


Figura 4.20. Cromatograma a 288 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa d'*H. pomatia*. S'identifica el flavonoide *naringenin*, amb el respectiu espectre UV.

4. Resultats i discussió

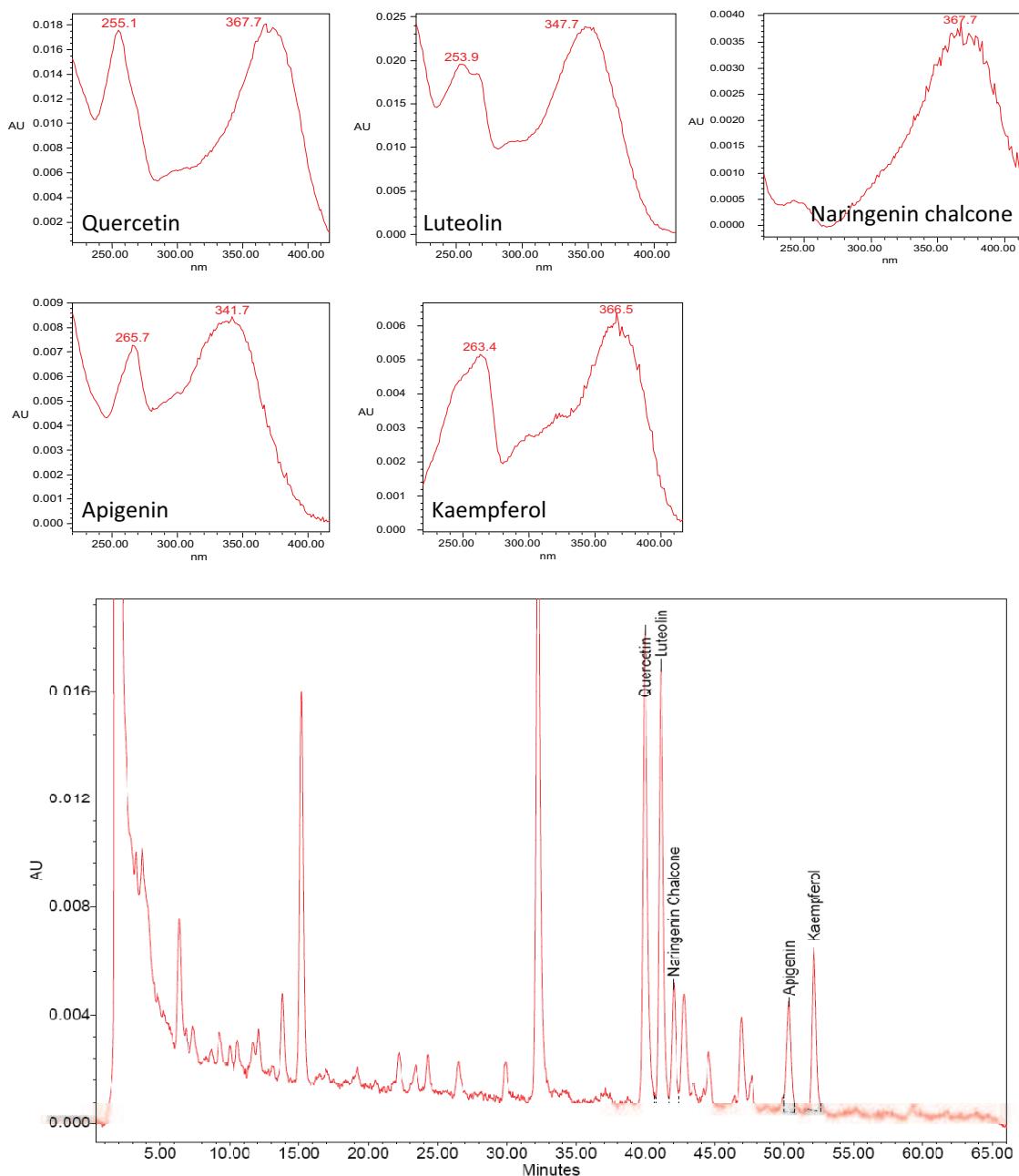


Figura 4.21. Cromatogramma a 370 nm d'extracte amb hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa d'*H. pomatia*. S'identifiquen els flavonoides quercetin, luteolin, naringenin chalcone, apigenin i kaempferol, amb els respectius espectres UV.

La durada de les analisis, amb el temps afegit necessari per a les hidròlisis (una hora en la hidròlisi àcida i divuit en les enzimàtiques), juntament amb els resultats poc satisfactoris i poc reproduïbles de les diferents proves d'hidròlisi, feren descartar la inclusió d'una etapa d'hidròlisi en el mètode d'anàlisi de compostos fenòlics en tomàquet.

4.4- Anàlisi de compostos fenòlics intacles en extracte de tomàquet

4.4.1- Identificació per UPLC-DAD-MS/MS

Les figures 4.22 i 4.23 mostren els cromatogrames UPLC típics d'un extracte de tomàquet a 288 nm i 353 nm respectivament, amb els pics majoritaris corresponents a possibles compostos fenòlics enumerats. Es descartà la presència dels altres patrons considerats, entre ells, els aglicons *quercetin* i *kaempferol* (presents en els extractes hidrolitzats). Quatre dels pics majoritaris d'aquests extractes coincidiren en t_R i espectres UV amb patrons de compostos fenòlics (veure chromatograma dels patrons a fig. 4.24), el que permeté identificar-los:

- (2): *5-caffeoylequinic acid (chlorogenic acid)*
- (4): *quercetin-3-O-rutinoside*
- (8): *naringenin*
- (10): *naringenin chalcone*

La informació MS i MS/MS obtinguda dels pics majoritaris permeté identificar provisionalment sis compostos fenòlics més (comparant amb dades bibliogràfiques), i recolzar la identificació dels compostos fenòlics coincidents amb patrons (comparant amb la informació MS i MS/MS obtinguda dels patrons). Els pics es detectaren a l'espectròmetre de masses amb un desfasament de 0,15 minuts respecte al detector DAD. La taula 4.5 mostra un recull de les dades MS i MS/MS de cada pic utilitzades per a la seva identificació.

La figura 4.25 presenta l'espectre UV del patró *5-caffeoylequinic acid* (5-CaQA) i del pic (2), coincidents. La figura 4.26a mostra un MS scan amb els ions de m/z^- 353 seleccionats (m/z^- pròpia dels ions pares dels isòmers de *caffeoylequinic acid*), on apareixen el pics (1) i (2), molt propers entre ells. El temps de retenció de (2) coincidí amb el del patró de 5-CaQA. El seu espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.26c) s'ajustà a l'esperat per a 5-CaQA, segons l'esquema jeràrquic de Clifford per a la identificació dels àcids hidroxicinnàmics (Clifford *et al.*, 2003) i amb altres referències bibliogràfiques (Moco *et al.*, 2006; Lin i Harnly, 2007; Ola *et al.*, 2009) amb un pic base de m/z^- 191 ($[quinic\ acid - H]^-$) i un iò secundari feble o no detectable de m/z^- 179 ($[caffeic\ acid - H]^-$). La figura 4.26b mostra l'estruccura molecular del 5-CaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ha estat identificat prèviament en tomàquet (Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

La figura 4.27 mostra l'espectre UV de (1), que com (2), és el propi d'un derivat d'àcid cafeic. La figura 4.28a mostra un MS scan amb els ions de m/z^- 353 seleccionats. Segons l'esquema jeràrquic de Clifford (Clifford *et al.*, 2003) i altres referències bibliogràfiques (Moco *et al.*, 2006; Lin i Harnly, 2007), el seu espectre de fragmentació MS/MS fou el propi del *4-caffeoylequinic acid* (4-CaQA, també anomenat *cryptochlorogenic acid*) (fig. 4.28c), amb un pic base de m/z^- 173 ($[quinic\ acid - H - H_2O]^-$), i amb els fragments m/z^- 191 ($[quinic\ acid - H]^-$), m/z^- 179 ($[caffeic\ acid - H]^-$) i m/z^- 135 ($[caffeic\ acid - COOH]^-$). La figura 4.28b mostra l'estruccura molecular del 4-CaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat. En una anàlisi posterior, es descartà la possibilitat de confusió amb l'isòmer *3-caffeoylequinic acid (neochlorogenic acid)*, gràcies a l'adquisició d'un patró pur d'aquest compost (el seu temps de retenció no coincideix amb (1) ni amb (2)). De totes maneres, pel fet de no poder confirmar la identitat de (1) amb un patró pur, es considerà la seva identificació com a provisional. 4-CaQA ja ha estat prèviament descrit en

4. Resultats i discussió

tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009). Per a la descripció d'aquests compostos es va seguir la nomenclatura recomanada per la IUPAC (vegeu taula 1.3).

La figura 4.29 mostra l'espectre UV del patró de *quercetin-3-O-rutinoside* (Q-Rut) i del pic (**4**), coincidents. La figura 4.30a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 609 seleccionats (m/z^- dels ions pare de Q-Rut), on apareix només (**4**) com a pic amb aquesta m/z^- , amb el mateix temps de retenció que el patró de Q-Rut. El seu espectre de fragmentació MS/MS fou el propi d'aquest flavonol glicosilat (fig. 4.30c), amb un fragment de m/z^- 301 ($[quercetin - H]^-$) obtingut a partir de la pèrdua de la rutinosa (disacàrid de glucosa i ramnosa) (Mauri *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000; Le Gall *et al.*, 2003; Moco *et al.*, 2006). La figura 4.30b mostra l'estructura molecular de Q-Rut i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ha estat descrit prèviament en tomàquet (Mauri *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000; Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

A la figura 4.31 s'hi mostra l'espectre UV del patró de *naringenin* (Nar) i del pic (**8**), coincidents. La figura 4.32a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 271 seleccionats (m/z^- dels ions pare de Nar i de *naringenin chalcone*), on apareixen dos pics, (**8**) i (**10**). El pic (**8**), amb el mateix temps de retenció que el patró de Nar, tingué l'espectre de fragmentació MS/MS esperat per a aquesta flavanona (fig. 4.32c), amb fragments de m/z^- 177, 151, 119, 107 i 93 (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006; Tsimogiannis *et al.*, 2007). La figura 4.32b mostra l'estructura molecular de Nar i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ja ha estat descrit en tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

La figura 4.33 mostra l'espectre UV del patró de *naringenin chalcone* (NarChalc) i del pic (**10**), coincidents. La figura 4.34a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 271 seleccionats, on apareixen el pic de *naringenin* (**8**) i el pic (**10**), amb el temps de retenció del patró de NarChalc. L'espectre de fragmentació MS/MS fou el propi per a aquesta calcona (fig. 4.34c), amb fragments de m/z^- 151, 119 i 107 (Moco *et al.*, 2006; Tsimogiannis *et al.*, 2007). La figura 4.34b mostra l'estructura molecular de NarChalc i el model de fragmentació MS/MS proposat. Altres treballs han descrit prèviament aquest compost en el tomàquet (Le Gall *et al.*, 2003; Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

Els altres compostos fenòlics majoritaris, sense disponibilitat de patró, s'identificaren provisionalment utilitzant la informació obtinguda per DAD, MS i MS/MS. Per DAD es detectaren tres derivats d'àcid cafeic més (a part de 4-CaQA i 5-CaQA): (**6**), (**7**) i (**9**), a t_R 24,46, 27,51 i 35,65 min respectivament (fig. 4.23). Per MS ESI- en mode MS *scan* s'obtingueren els respectius valors m/z^- dels seus ions moleculars:

(**6**): m/z^- 515

(**7**): m/z^- 515

(**9**): m/z^- 677

La figura 4.35 presenta l'espectre UV del pic (**6**), característic d'un derivat d'àcid cafeic. La figura 4.36a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 515 seleccionats, amb els pics (**6**) i (**7**). L'espectre de fragmentació MS/MS de (**6**) (fig. 4.36c) coincidí amb el d'un *dicafeoylquinic acid* (DiCaQA), compost format per l'esterificació de dos àcids cafeics en un àcid quínic, d'acord amb la bibliografia (Clifford *et al.*, 2005; Moco *et al.*, 2006; Lin i Harnly, 2007). S'obtingué un fragment de m/z^- 353 ($[cafeoylquinic acid - H]^-$). La figura 4.36b mostra l'estructura molecular d'un DiCaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat.

La figura 4.37 mostra l'espectre UV del pic (7), també propi d'un derivat d'àcid cafeic. La figura 4.38a mostra un MS *scan* amb els ions m/z^- 515 seleccionats, amb el pic (7). Com el pic (6), l'espectre de fragmentació MS/MS de (7) (fig. 4.38c) també presentà un fragment de m/z^- 353 ([*caffeoylequinic acid* – H] $^-$), a més a més dels fragments amb m/z^- 179 ([*caffeic acid* – H] $^-$) i 173 ([*quinic acid* – H – H₂O] $^-$). Amb aquesta informació contrastada amb la bibliografia (Clifford *et al.*, 2005; Moco *et al.*, 2006; Lin i Harnly, 2007), el compost (6) s'identificà provisionalment com a *dicafeoylquinic acid I* (DiCaQA I) i el compost (7) com a *dicafeoylquinic acid II* (DiCaQA II). La figura 4.38b mostra l'estructura molecular de DiCaQA II i el model de fragmentació MS/MS proposat. La presència dels isòmers DiCaQA ja ha estat esmentada en altres treballs realitzats amb tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

La figura 4.39 presenta l'espectre UV del pic (9), que com en els dos anteriors casos, fou el típic d'un derivat d'àcid cafeic. La figura 4.40a mostra un MS *scan* amb els ions m/z^- 677 seleccionats, on s'obtingueren els pics (9) i (9*). L'espectre de fragmentació MS/MS de (9) (fig. 4.40c) fou característic per a un *tricaffeoylquinic acid* (TriCaQA) (Moco *et al.*, 2006; Clifford *et al.* 2007), amb fragments de m/z^- de 515 ([DiCaQA – H] $^-$), 353 ([CaQA – H] $^-$) i 173 ([*quinic acid* – H – H₂O] $^-$). La figura 4.40b mostra l'estructura molecular de TriCaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ja ha estat prèviament descrit en tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

El pic (9bis) restà sense identificar, en no obtenir-se un espectre UV (fig. 4.41) ni un espectre de fragmentació coneguts. La figura 4.42a mostra un MS *scan* amb els ions m/z^- 677 seleccionats, amb el pic 9bis; la figura 4.42b mostra l'espectre de fragmentació de 9bis.

Per DAD es detectà també un compost (3) amb espectre UV de flavonol a t_R 20,53 min (fig. 4.43). El ió pare obtingut per MS ESI $^-$ d'aquest compost tingué m/z^- 741. La figura 4.44a mostra un MS *scan* amb els ions m/z^- 741 seleccionats, amb el pic (3). Un dels ions fills obtinguts per MS/MS (fig. 4.44c) tingué m/z^- 301 ([*quercetin* – H] $^-$). Els altres fragments obtinguts concorden amb la descomposició d'un trisacàrid amb pes molecular 458 Da unit a *quercetin*, compost per una desoxihexosa (m/z^- 164), una hexosa (m/z^- 179) i una pentosa (m/z^- 150). El fragment de m/z^- 609 correspon a *quercetin* unit al disacàrid de desoxihexosa i hexosa amb pèrdua de la pentosa ([*quercetin-deoxyhexoside-hexoside* – H] $^-$), mentre que el fragment de m/z^- 179 es correspon amb l'hexosa lliure. Donat que en el tomàquet ja s'hi ha identificat el compost *quercetin-3-O-rutinoside* (m/z^- 609), és a dir, *quercetin* unit a un disacàrid de desoxihexosa (ramnosa) i hexosa (glucosa), el més provable és que aquests dos glúcids també es trobin presents a (3). Amb la informació obtinguda, es designà de forma provisional aquest compost amb el nom de *quercetin trisaccharide* (Q-Tris). La identificació d'aquest compost s'ajusta a la informació prèviament descrita en la bibliografia (Mauri *et al.*, 1999; Moco *et al.*, 2006). La figura 4.44b mostra l'estructura molecular de Q-Tris i el model de fragmentació MS/MS proposat. Altres treballs han descrit anteriorment aquest compost en tomàquet (Mauri *et al.*, 1999; Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

Un darrer compost de m/z^- 593 (5), fou detectat per MS *scan* a t_R 24,54 min (fig. 4.45a). El temps de retenció i el pes molecular foren coincidents amb el patró de *kaempferol-3-O-rutinoside* (K-Rut). També fou coincident l'espectre de fragmentació MS/MS (4.45c), amb la formació d'un ió fill de m/z^- 285 ([*kaempferol* – H] $^-$) (Le Gall *et al.*, 2003, Moco *et al.*, 2006). La figura 4.45b mostra l'estructura molecular de K-Rut i el model de fragmentació MS/MS proposat. Emprant el sistema UPLC aquesta informació no pogué ser complementada amb el corresponent espectre UV, degut a que aquest compost sortí coeluit amb *dicafeoylquinic acid I*. K-Rut ha estat prèviament identificat en tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Slimestad i Verheul, 2009).

4. Resultats i discussió

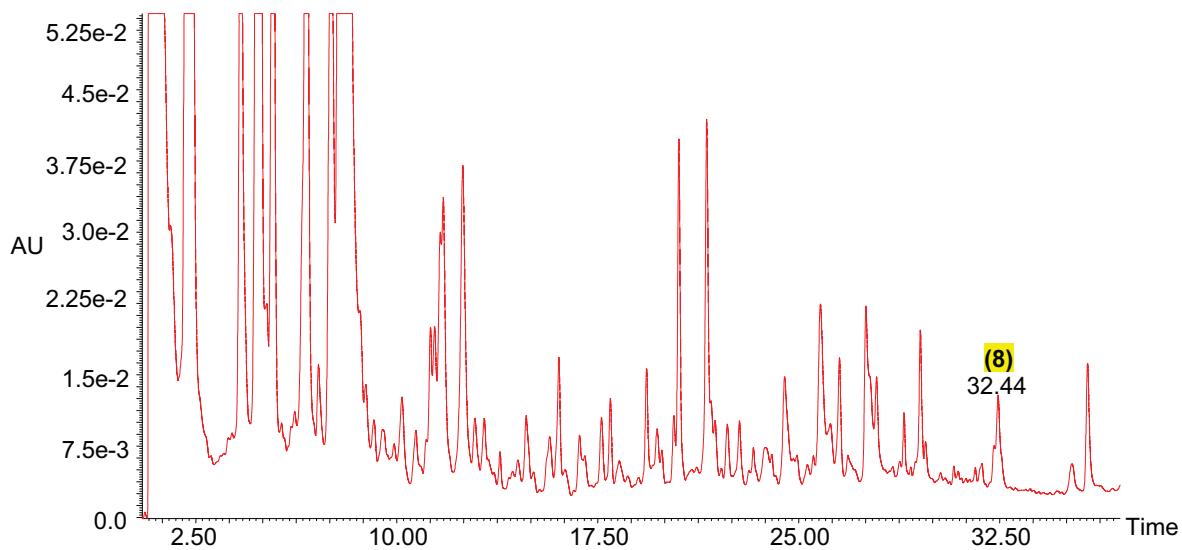


Figura 4.22. Cromatograma UPLC a 288 nm d'extracte de tomàquet.

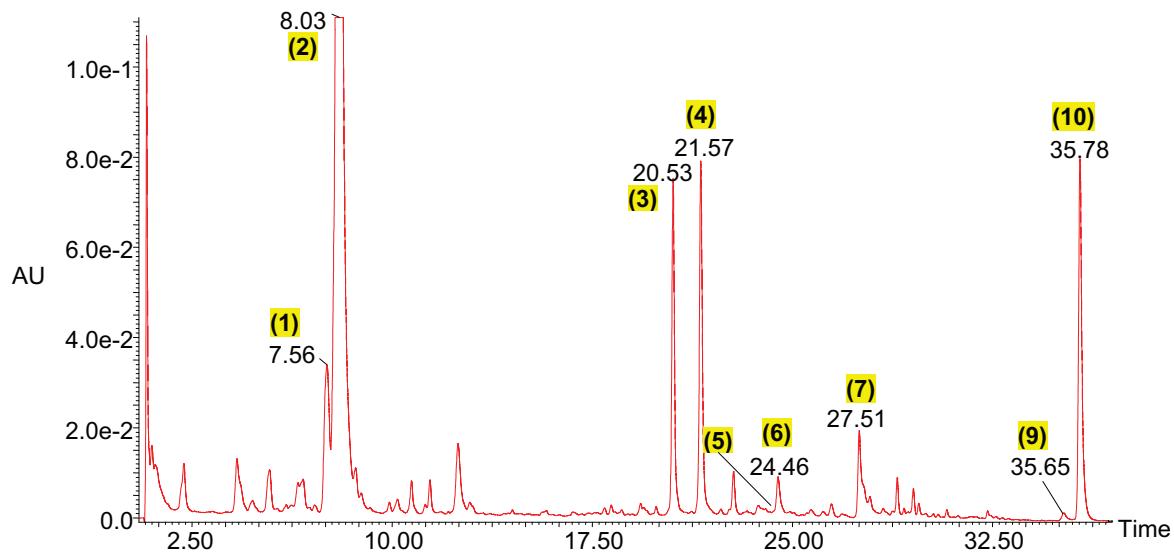


Figura 4.23. Cromatograma UPLC a 353 nm d'extracte de tomàquet.

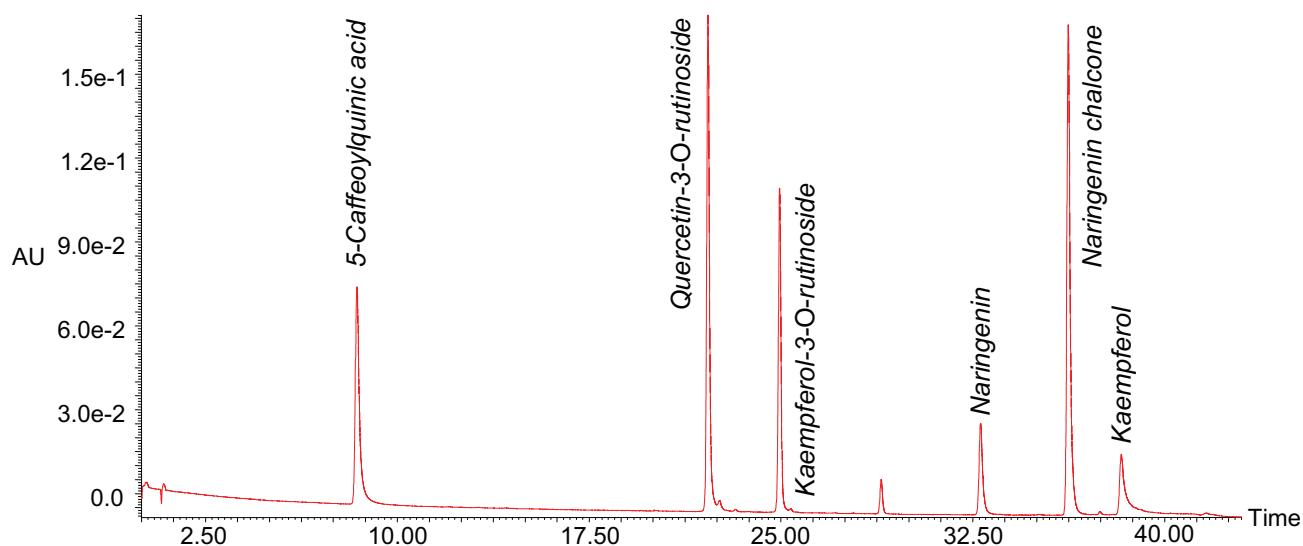


Figura 4.24. Cromatograma UPLC a 353 nm de patrons de compostos fenòlics.

Compost	[M-H] ⁻ (m/z ⁻)	Voltatge Con (V)	Energia col·isió (eV)	UPLC-DAD-MS/MS			Referències
				Tomàquet	Patrons	Bibliografia	
(1) 4-Caffeoylquinic acid - 4-CaQA	353	-30	-15	191 (40%), 179 (90%), 173 (100%), 135 (40%).	-	191 ^b , 179 ^c , 173 ^b , 135 ^c .	^a Clifford 2003, ^b Moco 2006, ^c Lin 2007.
(2) 5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA	353	-30	-15	191 (100%).	191 (100%).	191 ^{abcd} , 179 ^{ac} , 173 ^{bc} , 135 ^c .	^a Clifford 2003, ^b Moco 2006, ^c Lin 2007, ^d Ola 2009.
(3) Quercetin trisaccharide - Q-Tris	741	-30	-25	741 (100%), 609 (10%), 301 (20%), 179 (10%).	-	301 ^{ab} , 271 ^b , 255 ^b .	^a Mauri 1999, ^b Moco 2006.
(4) Quercetin-3-O-rutinoside - Q-Rut	609	-30	-25	609 (100%), 301 (20%).	609 (100%), 301 (25%).	465 ^c , 301 ^{abcd} , 271 ^d , 255 ^d .	^a Mauri 1999, ^b Stewart 2000, ^c Le Gall 2003*, ^d Moco 2006.
(5) Kaempferol-3-O-rutinoside - K-Rut	593	-30	-25	593 (100%), 285 (90%).	285 (100%).	447 ^a , 285 ^{ab} .	^a Le Gall 2003, ^b Ola 2009.
(6) Dicaffeoylquinic acid I - DiCaQA I	515	-30	-30	353 (100%).	-	353 ^{abc} , 335 ^{ab} , 191 ^{abc} , 179 ^{bc} , 173 ^{abc} , 135 ^c .	^a Clifford 2003, ^b Moco 2006, ^c Lin 2007.
(7) Dicaffeoylquinic acid II - DiCaQA II	515	-30	-30	353 (40%), 179 (100%), 173 (60%).	-	353 ^{abc} , 335 ^{ab} , 191 ^{abc} , 179 ^{bc} , 173 ^{abc} , 135 ^c .	^a Clifford 2003, ^b Moco 2006, ^c Lin 2007.
(8) Naringenin - Nar	271	-30	-20	177 (20%), 151 (100%), 119 (40%), 107 (20%), 93 (20%)	177 (30%), 151 (100%), 119 (50%), 107 (30%), 93 (10%)	177 ^a , 151 ^{ab} , 119 ^a , 107 ^a , 93 ^a , 83 ^a .	^a Sánchez-Rabaneda 2003, ^b Ma 2006.
(9) Tricaffeoylquinic acid - TriCaQA	677	-30	-30	515 (100%), 353 (50%), 173 (100%).	-	515 ^{ab} , 497 ^b , 353 ^a , 335 ^b , 179 ^a , 173 ^a .	^a Moco 2006, ^b Clifford 2007.
(10) Naringenin chalcone - NarChalc	271	-30	-20	151 (100%), 119 (15%), 107 (15%).	151 (100%), 119 (10%), 107 (10%).	151 ^a .	^a Moco 2006.

Taula 4.5. Llista dels compostos presents en els extractes de tomàquet avaluats, amb les respectives dades MS i MS/MS utilitzades per a la seva identificació.

4. Resultats i discussió

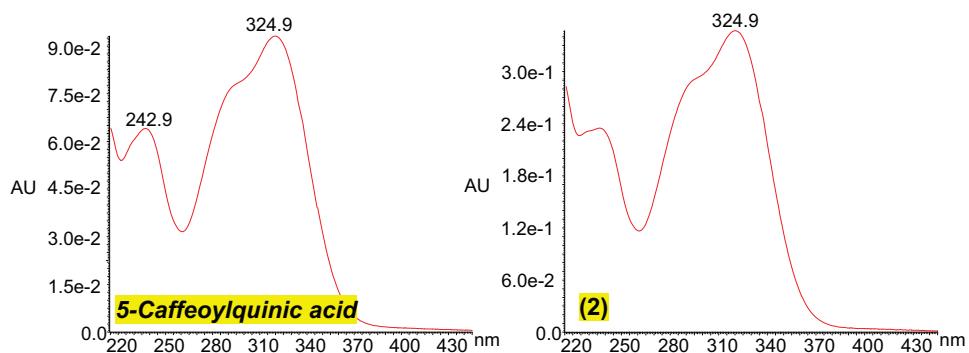


Figura 4.25. Espectre UV del patró de **5-Caffeoylquinic acid** (esquerra) i del pic (2) de l'extracte de tomàquet (dreta).

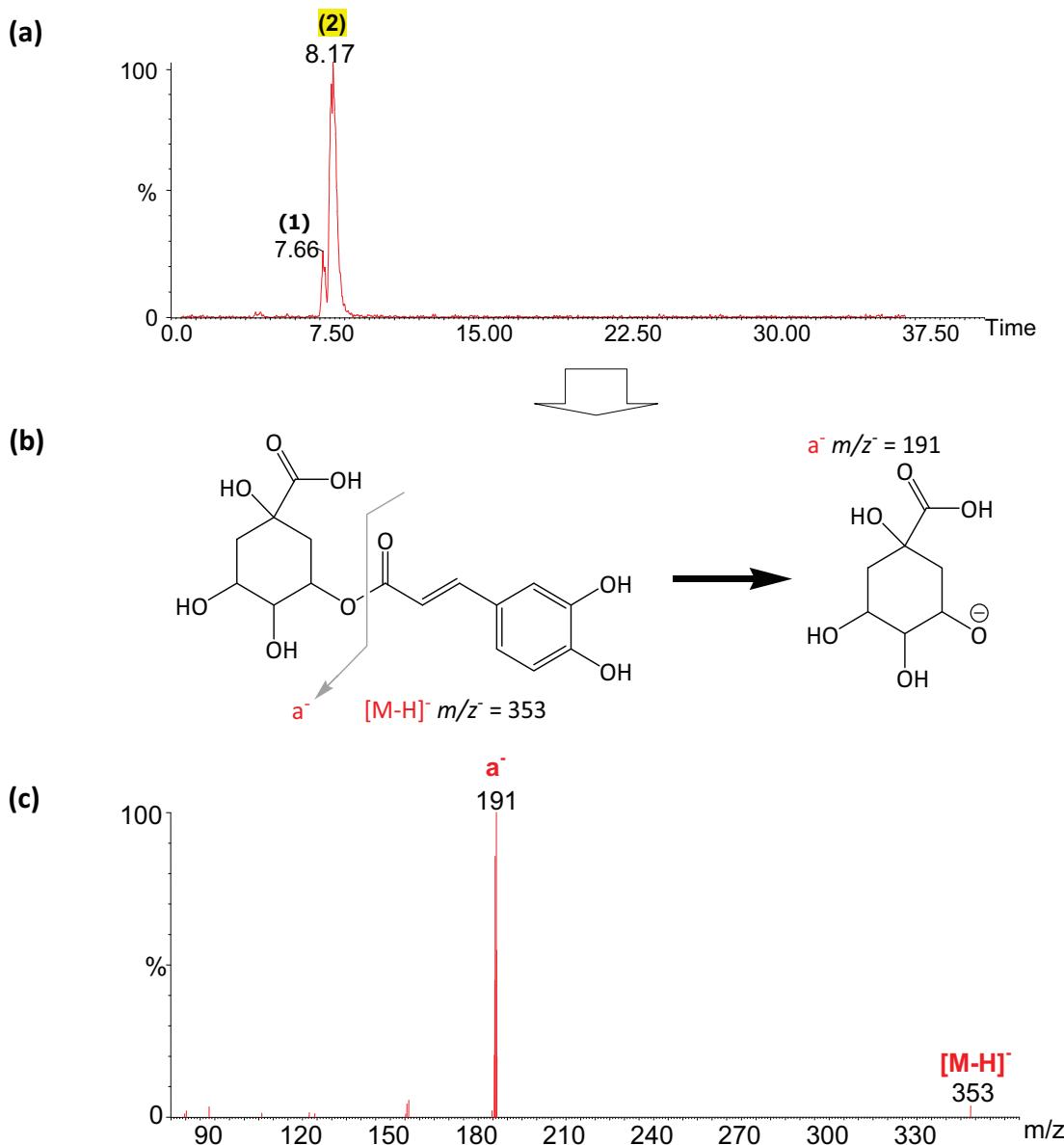


Figura 4.26. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- = 353$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (2) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (2) amb $t_R = 8.17$ min.

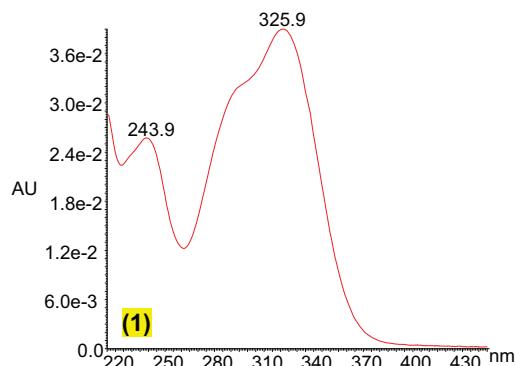


Figura 4.27. Espectre UV del pic (1) de l'extracte de tomàquet.

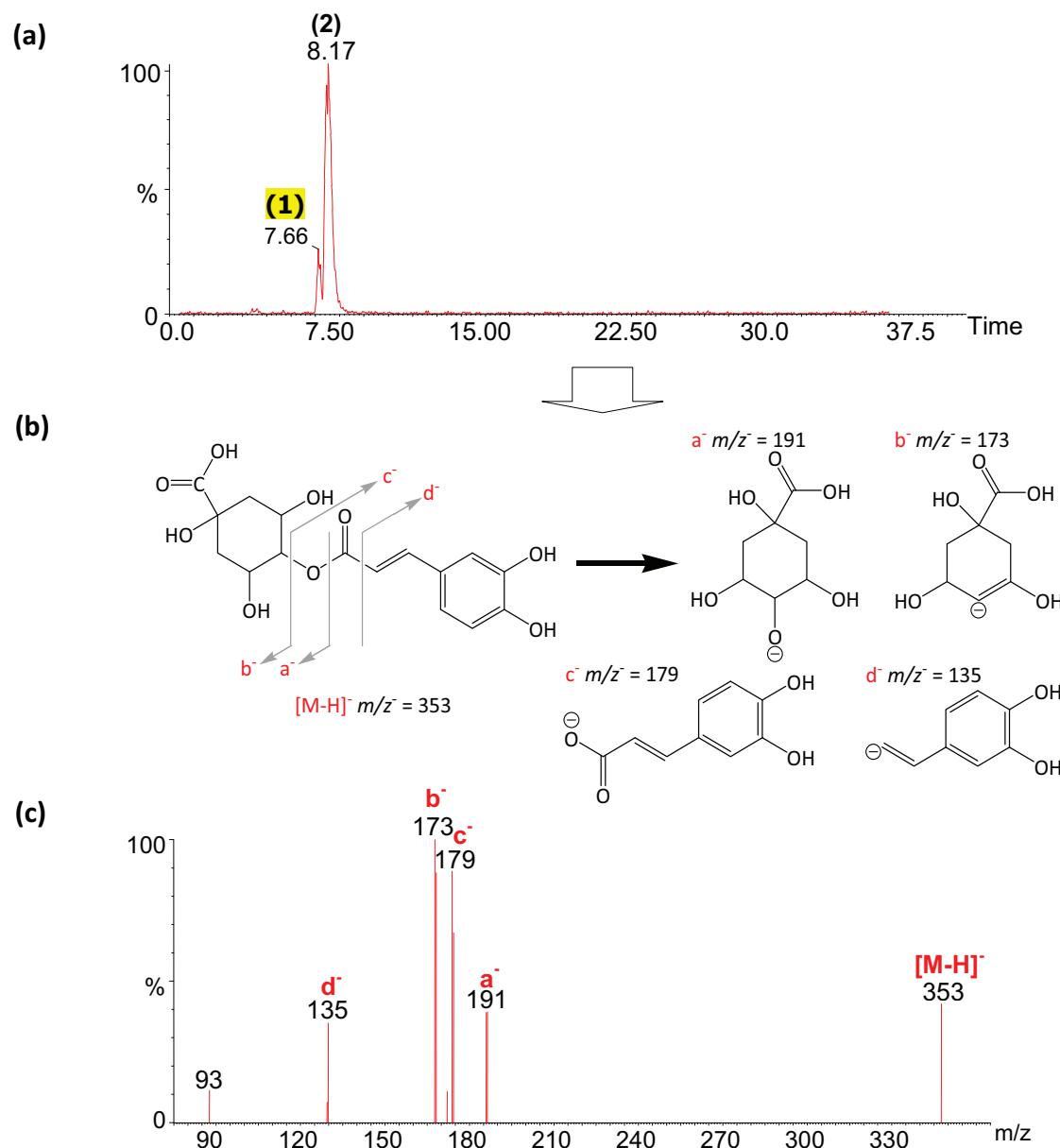


Figura 4.28. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- = 353$ seleccionats.

(b) Estructura molecular de (1) i model de fragmentació MS/MS proposats.

(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (1) amb $t_R = 7.66$ min.

4. Resultats i discussió

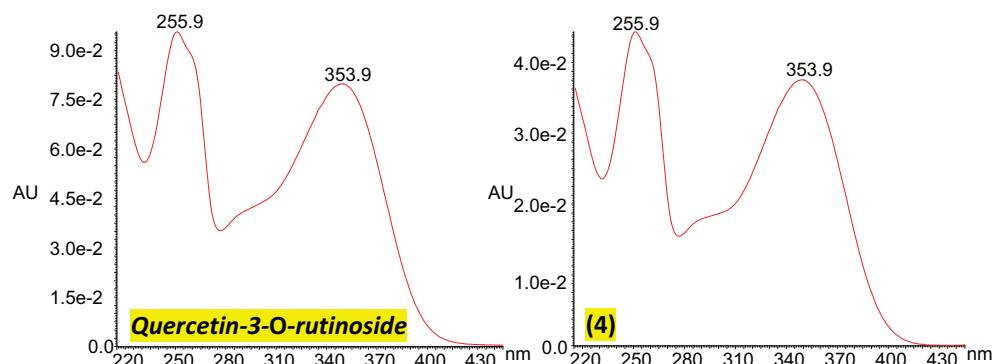


Figura 4.29. Espectre UV del patró de *quercetin-3-O-rutinoside* (esquerra) i del pic (4) de l'extracte de tomàquet (dreta).

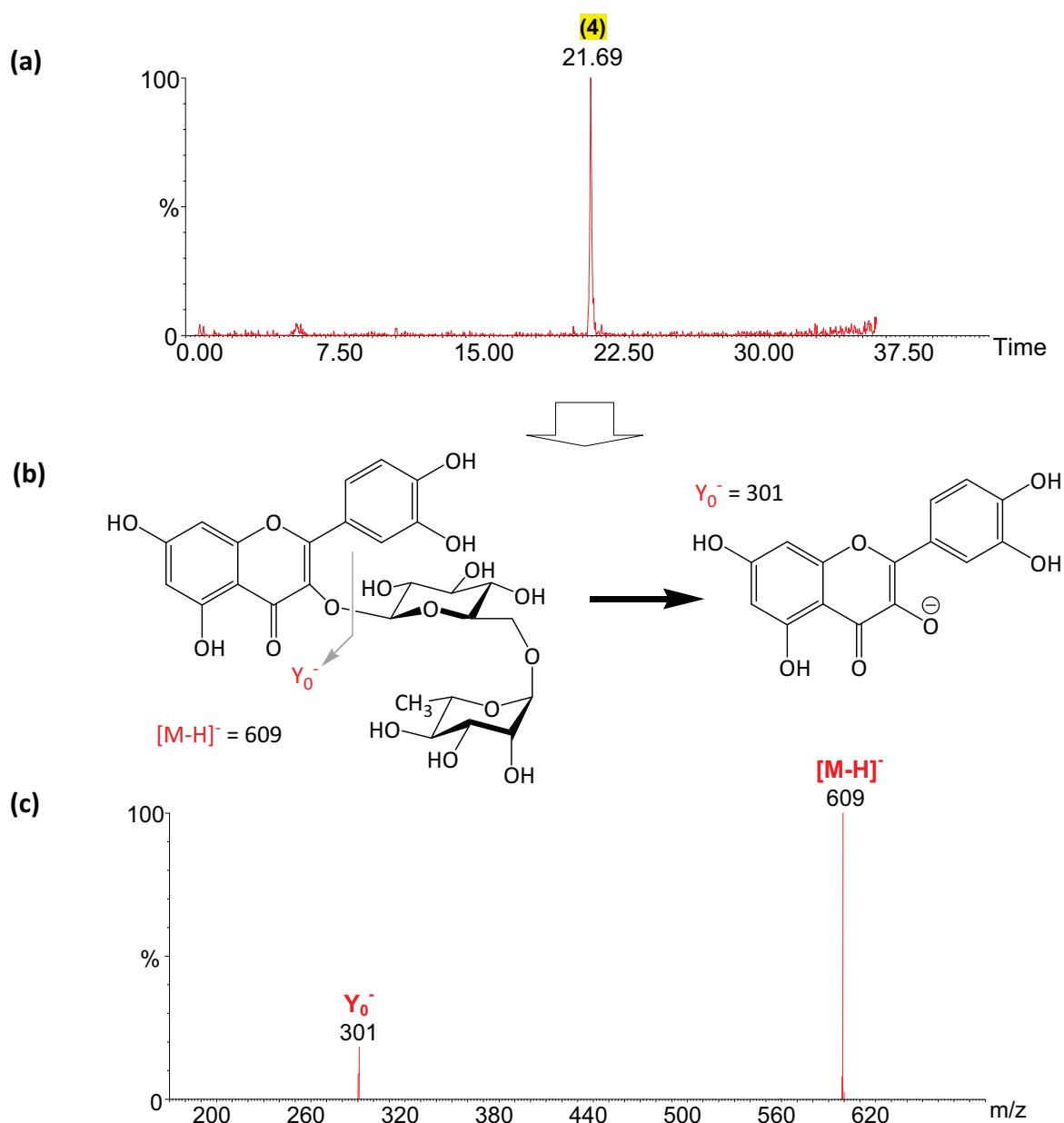


Figura 4.30. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 609$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (4) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-25 eV) del compost (4) amb t_R 21,69 min.

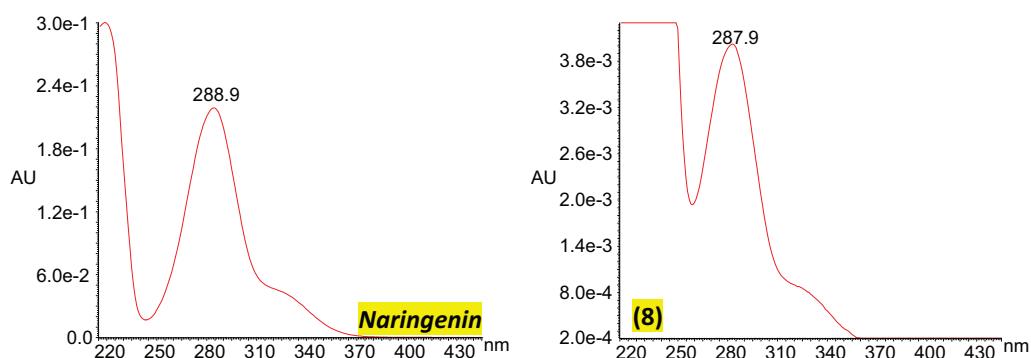


Figura 4.31. Espectre UV del patró de **naringenin** (esquerra) i del pic (8) de l'extracte de tomàquet (dreta).

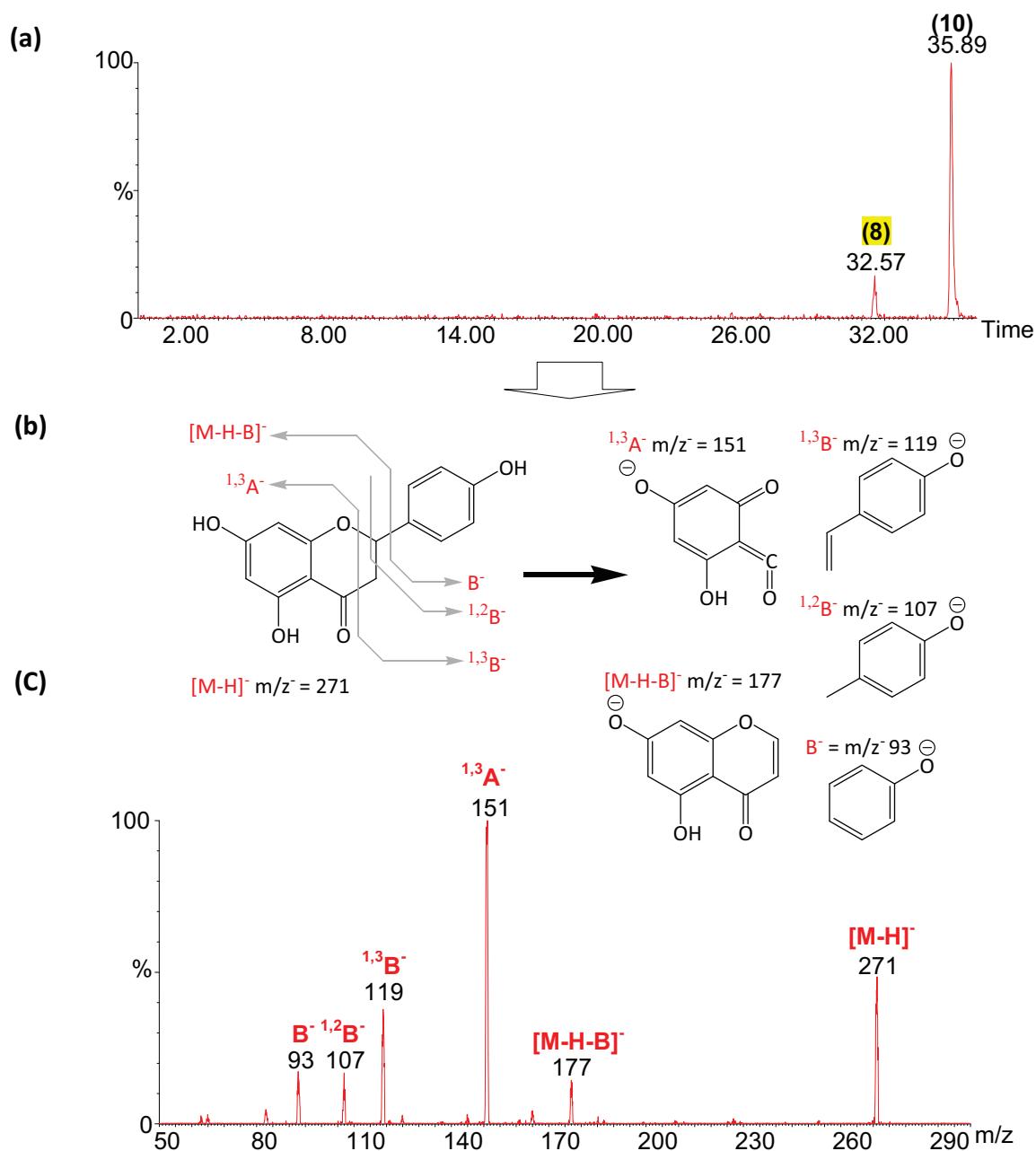


Figura 4.32. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z = 271$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (8) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-20 eV) del compost (8) amb $t_R = 32,57$ min.

4. Resultats i discussió

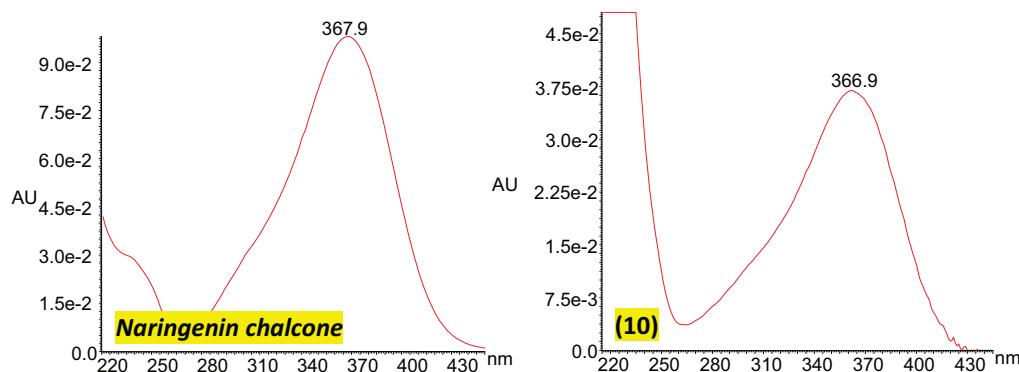


Figura 4.33. Espectre UV del patró de *naringenin chalcone* (esquerra) i del pic (10) de l'extracte de tomàquet (dreta).

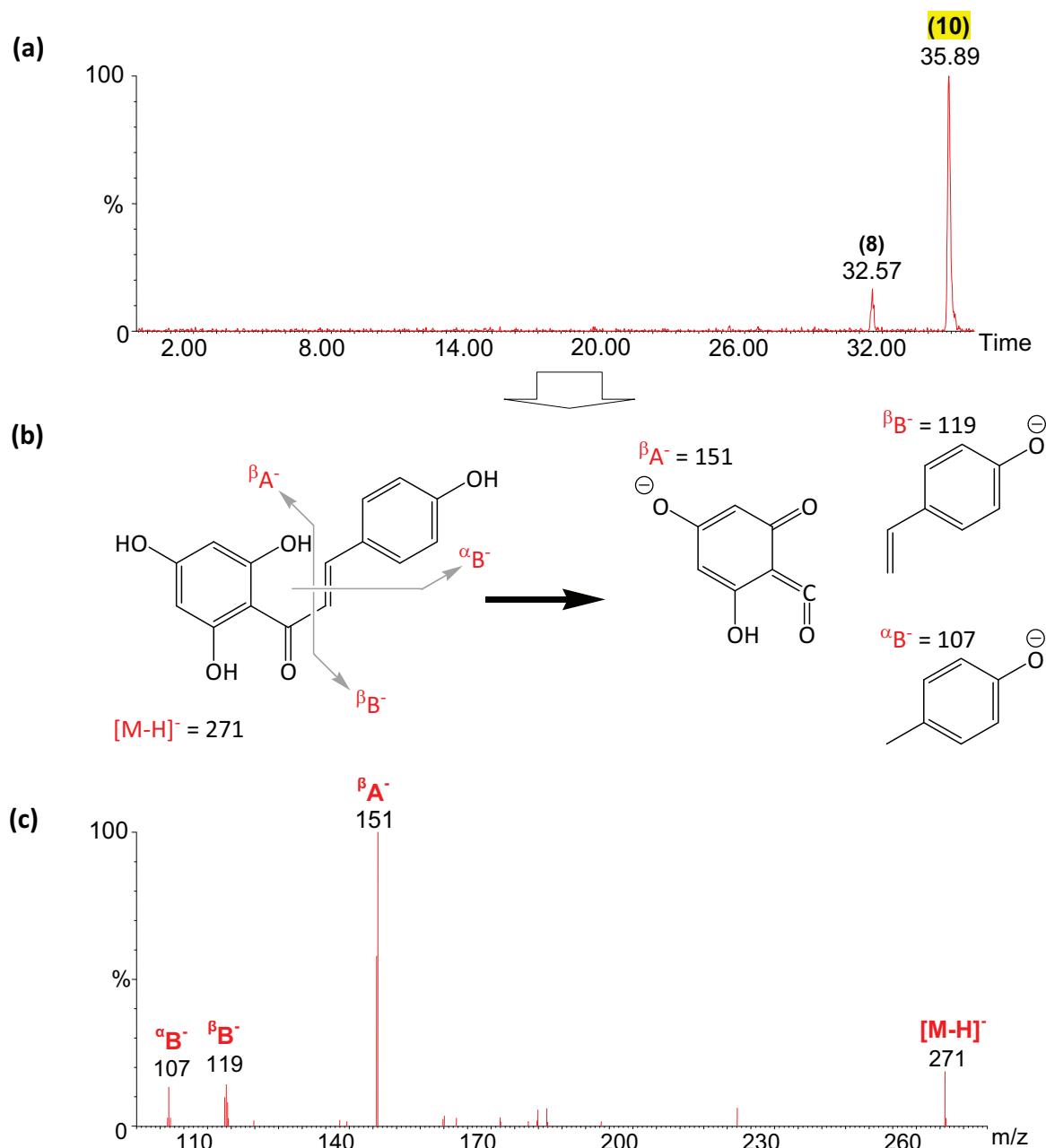


Figura 4.34. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 271$ seleccionats.

(b) Estructura molecular de (10) i model de fragmentació MS/MS proposats.

(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-20eV) del compost (10) amb $t_R = 35,89$ min.

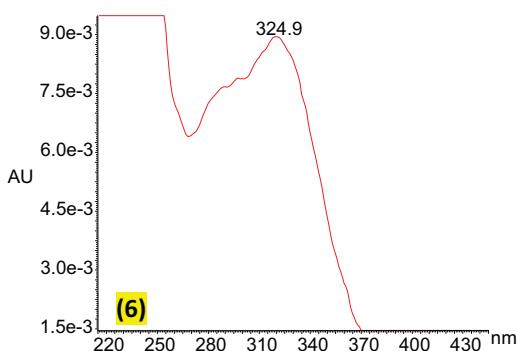


Figura 4.35. Espectre UV del pic (6) de l'extracte de tomàquet.

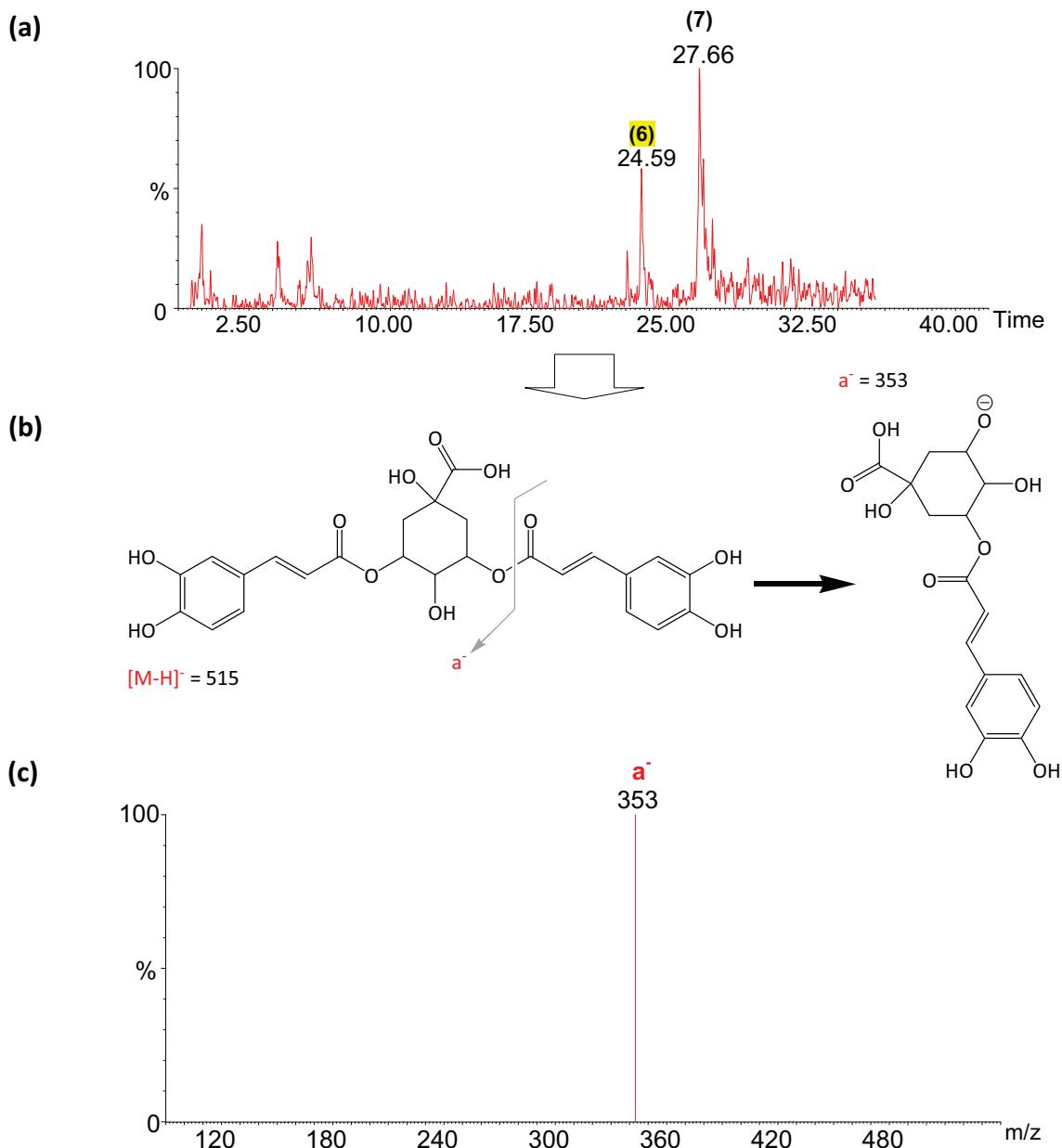


Figura 4.36. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 515$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (6) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-30 eV) del compost (6) amb t_R 24,59 min.

4. Resultats i discussió

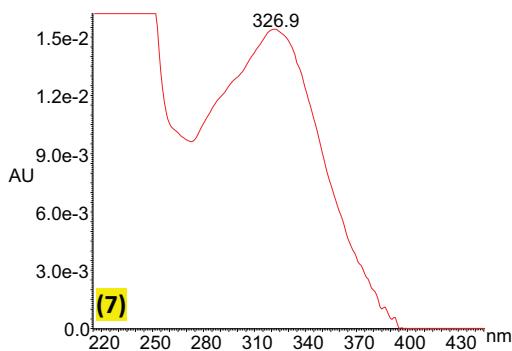


Figura 4.37. Espectre UV del pic (7) de l'extracte de tomàquet.

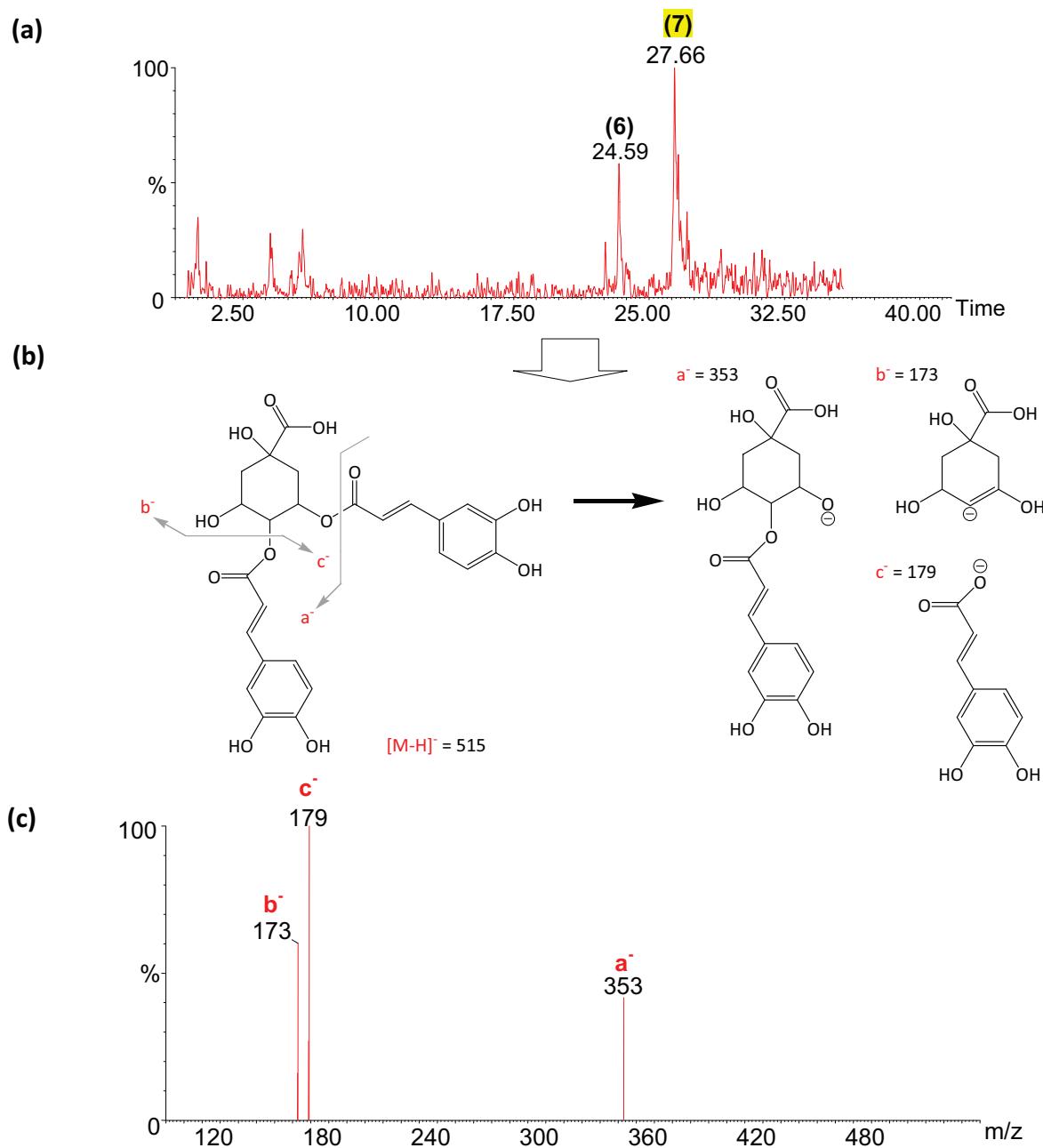


Figura 4.38. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 515$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (7) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-30 eV) del compost (7) amb t_R 27,66 min.

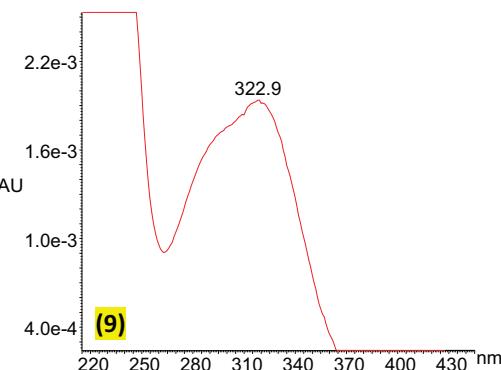


Figura 4.39. Espectre UV del pic (9) de l'extracte de tomàquet.

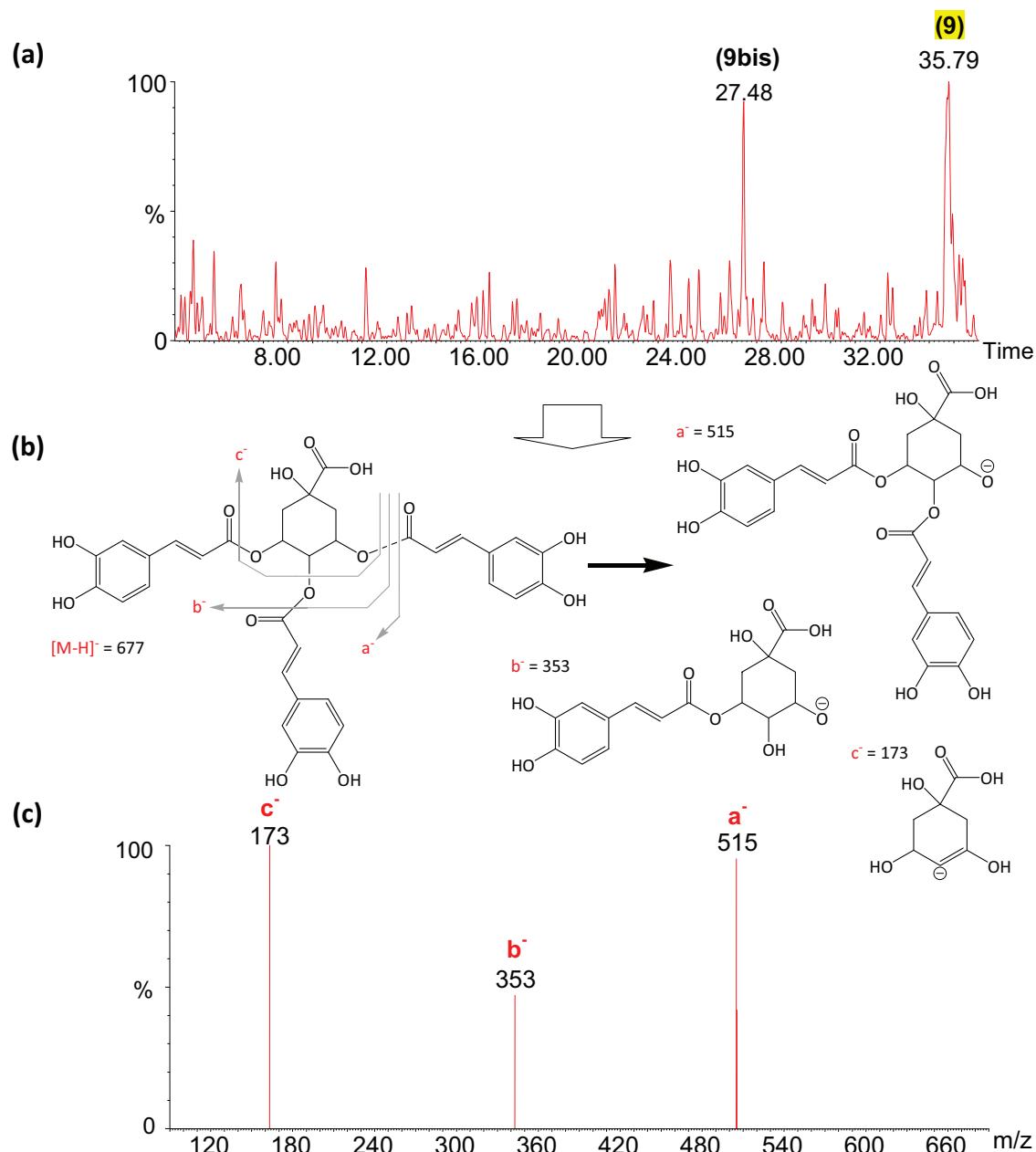


Figura 4.40. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 677$ seleccionats.
 (b) Estructura molecular de (9) i model de fragmentació MS/MS proposats.
 (c) Espectre de fragmentació MS/MS (-30 eV) del compost (9) amb $t_R = 35,79$ min.

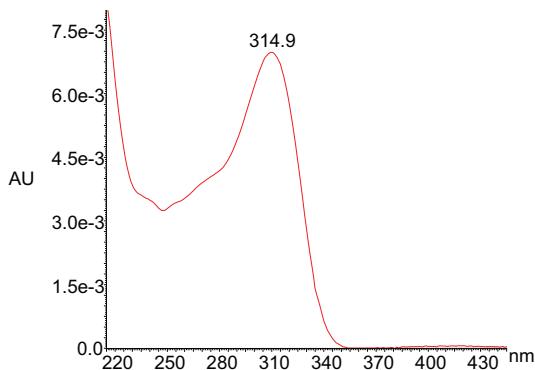


Figura 4.41. Espectre UV del compost (9bis) no identificat de l'extracte de tomàquet.

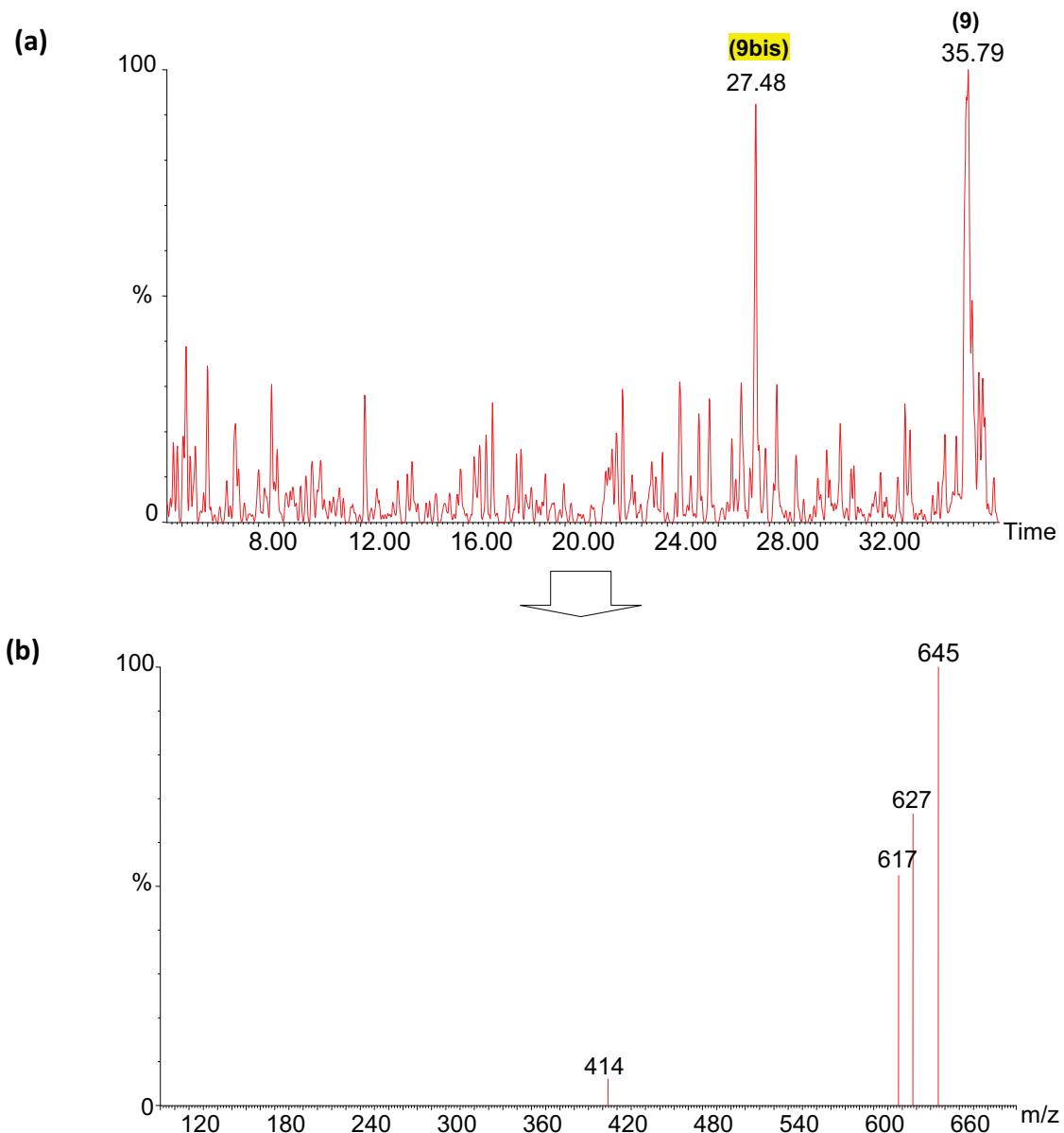


Figura 4.42. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 677$ seleccionats.

(b) Espectre de fragmentació MS/MS (-30 eV) del compost (9bis) amb t_R 27,48 min.

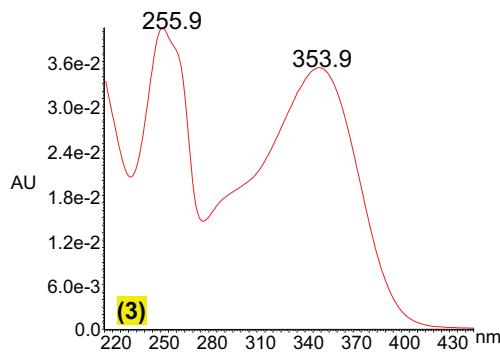


Figura 4.43. Espectre UV del pic (3) de l'extracte de tomàquet.

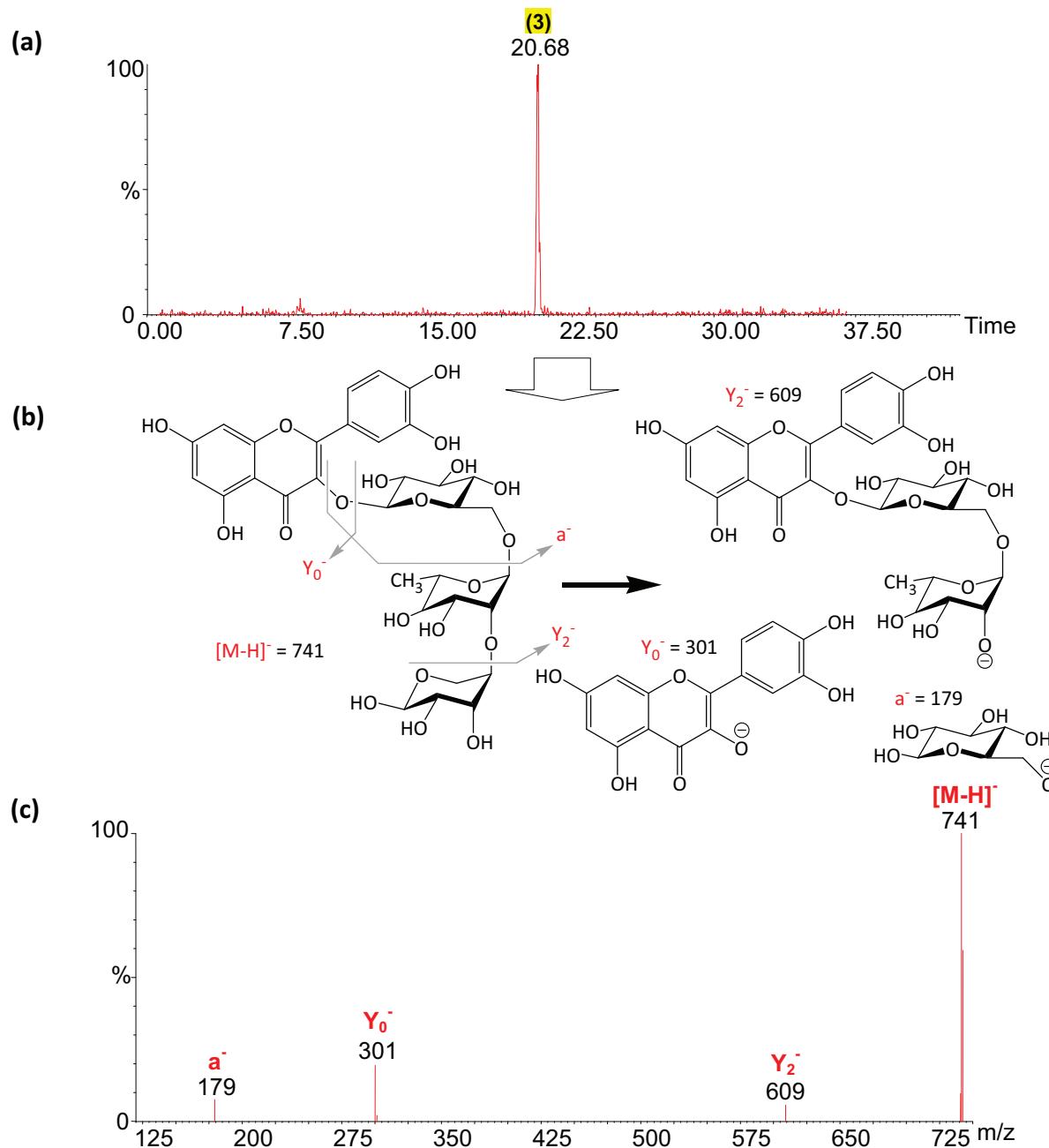


Figura 4.44. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els $m/z^- 741$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (3) i model de fragmentació MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-25 eV) del compost (3) amb t_R 20,68 min.

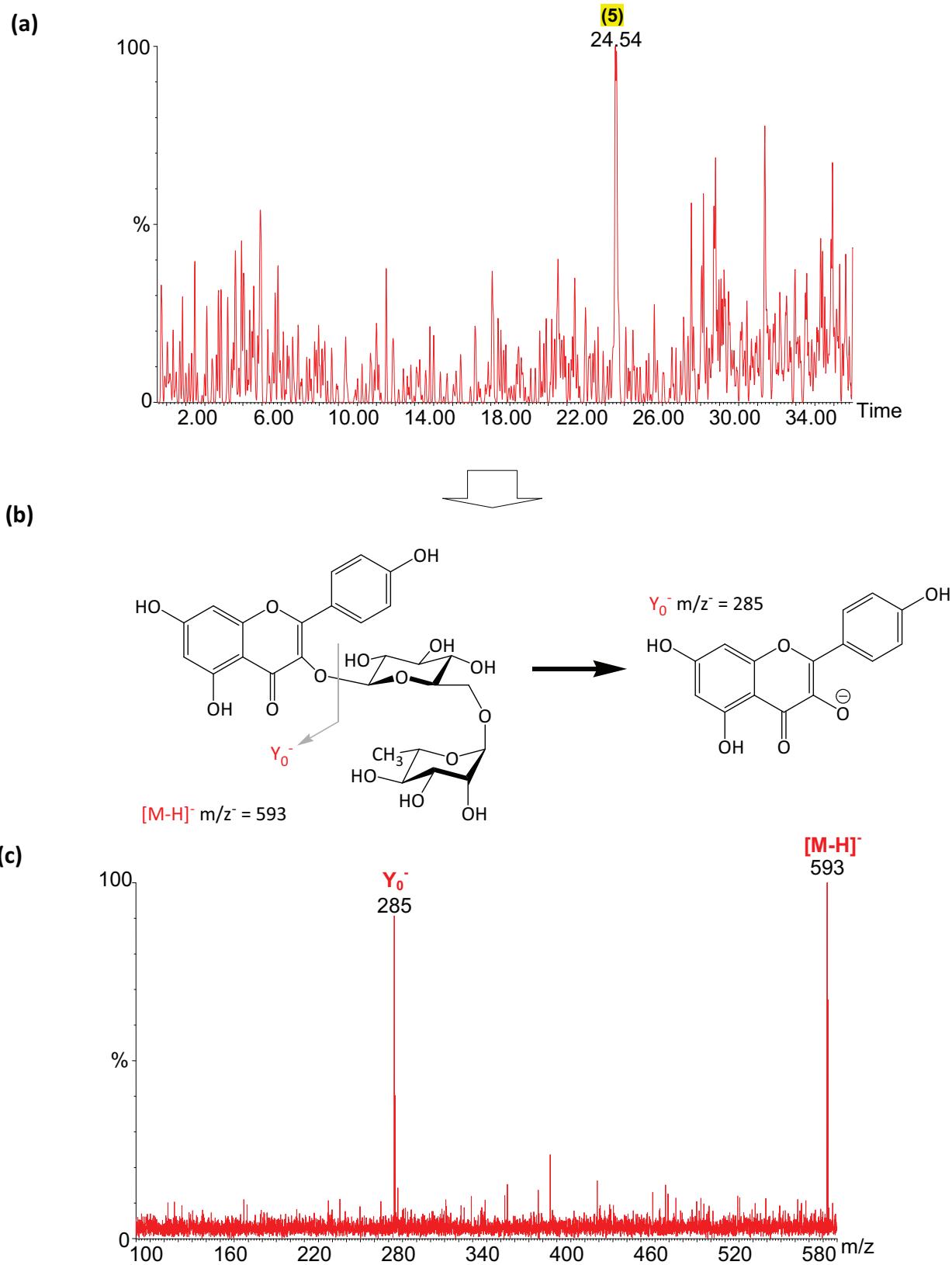


Figura 4.45. (a) MS scan d'extracte de tomàquet amb els ions $m/z^- 593$ seleccionats.
 (b) Estructura molecular de (5) i model de fragmentació MS/MS proposats.
 (c) Espectre de fragmentació MS/MS (-25 eV) del compost (5) amb t_R 24,54 min.

4.4.2- Anàlisi HPLC-DAD

Identificació HPLC-DAD

Per poder obtenir una separació HPLC comparable amb la obtinguda en UPLC es va adaptar la composició de la fase mòbil i el gradient. La figura 4.46 mostra un cromatograma d'una solució de patrons. Els compostos fenòlics majoritaris dels extractes de tomàquet analitzats es separaren en 42 minuts. Els pics identificats en els chromatogrames UPLC-DAD pogueren situar-se en els chromatogrames HPLC-DAD comparant els espectres UV, temps de retenció i la seva àrea relativa (figs. 4.47 i 4.48). L'ordre d'elució de tots els components no fou el mateix en els dos sistemes, probablement degut a les diferències entre les dues fases mòbils (H_2O -metanol- H_3PO_4 en HPLC i H_2O -acetonitril- CH_2O_2 en UPLC). En HPLC, els dos àcids *dicaffeoylquinic* s'avancaren als flavonols glicosilats que els precedien en UPLC: *dicaffeoylquinic acid I* s'avancà a *quercetin-3-O-rutinoside* i *kaempferol-3-O-rutinoside*, mentre que *dicaffeoylquinic acid II* s'avancà a *kaempferol-3-O-rutinoside*. La identificació numèrica dels pics coincideix amb la descrita prèviament en els chromatogrames UPLC (l'ordre de numeració és segons el temps de retenció en UPLC). Els quatre compostos fenòlics amb disponibilitat de patró pogueren ser confirmats mitjançant fortificació: *5-caffeoylechinic acid (2)*, *quercetin-3-O-rutinoside (4)*, *naringenin (8)* i *naringenin chalcone (10)*.

S'aïllà un pic amb espectre de flavonol (5), el qual coincidí en t_R i en espectre amb el patró de *kaempferol-3-O-rutinoside* (K-Rut). Com els altres compostos amb disponibilitat de patró, es confirmà la identitat de (5) utilitzant extractes de tomàquet fortificats; chromatogrames d'extractes fortificats amb patró de K-Rut donaren lloc a pics (5) amb més àrea que els mateixos extractes sense fortificar. Així doncs, es confirmà la identitat del compost de pes molecular 594 Da detectat per UPLC-MS a t_R 24,54 min i del qual no es pogué extreure un espectre UV útil (fig. 4.45).

La figura 4.49 mostra els espectres UV de cada un dels compostos identificats en els extractes intactes de tomàquet, juntament amb el del compost patró quan aquest fou disponible. La taula 4.6 resumeix els paràmetres de cada compost emprats per a la seva identificació en els extractes de tomàquet avaluats. Els compostos fenòlics identificats amb la informació obtinguda però sense patró disponible es consideraren amb identificació provisional.

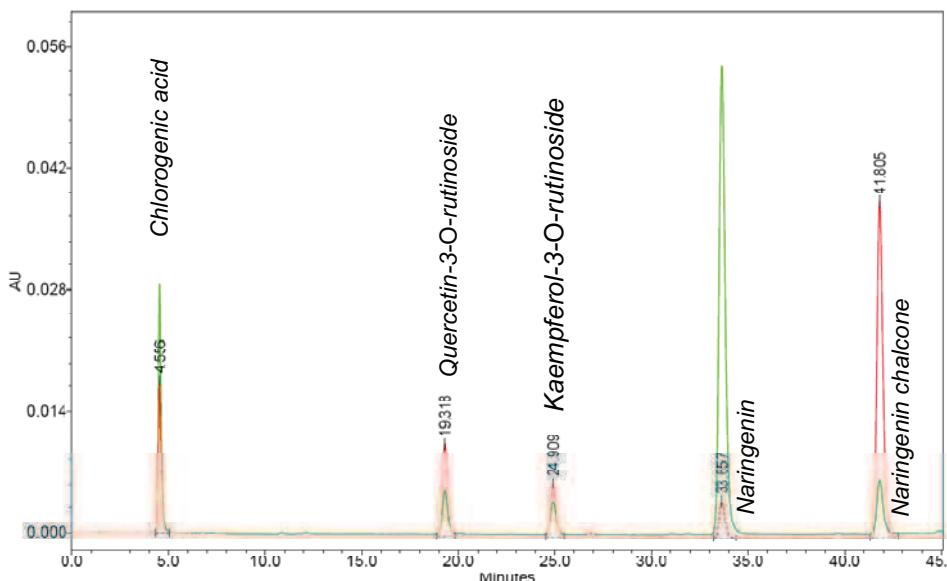


Figura 4.46.
Cromatograma HPLC a 353 nm (en vermell) i 288 nm (en verd) de flavonoïdes patrons.

4. Resultats i discussió

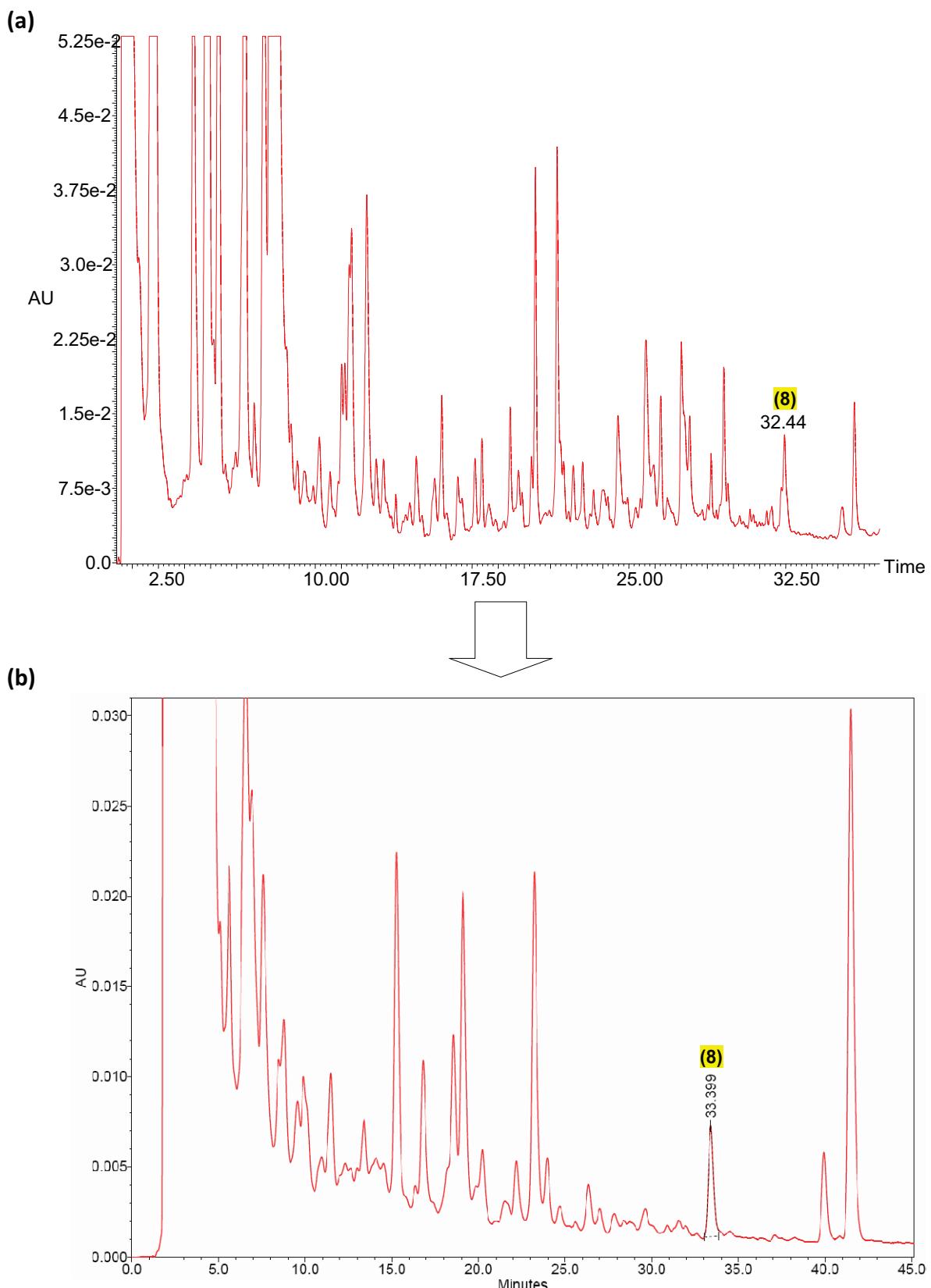


Figura 4.47. Transferència dels pics identificats en un chromatograma UPLC **(a)** a un chromatograma HPLC **(b)**, registrats a 288 nm. Identificació del pic: **(8): Naringenin.**

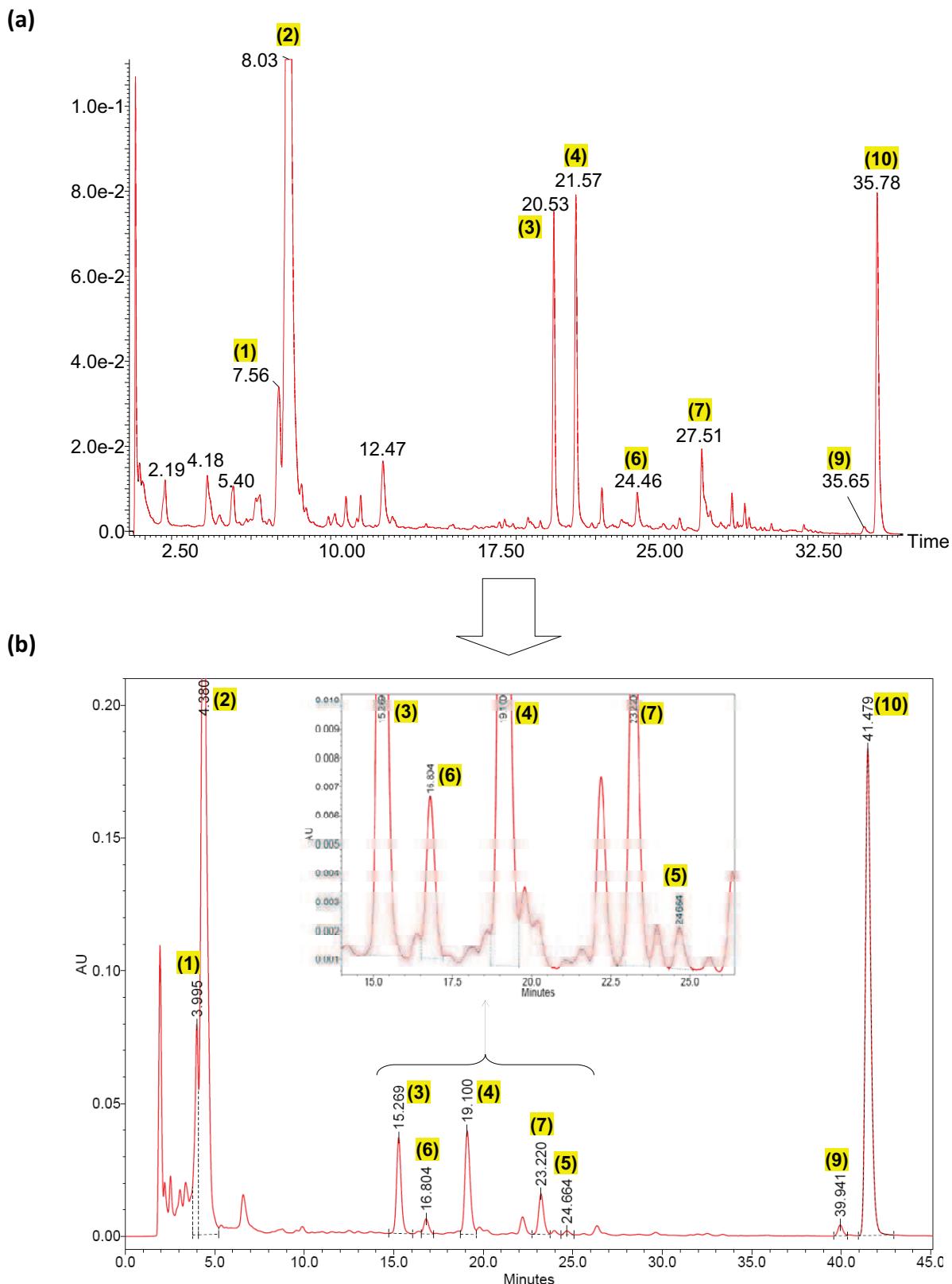


Figura 4.48. Transferència dels pics identificats en un cromatograma UPLC (a) a un cromatograma HPLC (b), registrats a 353 nm. Identificació dels pics: (1): 4-Caffeoylquinic acid; (2): 5-Caffeoylquinic acid; (3): Quercetin-3-O-trisaccharide; (4): Quercetin-3-O-rutinoside; (5): Kaempferol-3-O-rutinoside; (6): Dicaffeoylquinic acid I; (7): Dicaffeoylquinic acid II; (9): Tricaffeoylquinic acid; (10): Naringenin chalcone.

4. Resultats i discussió

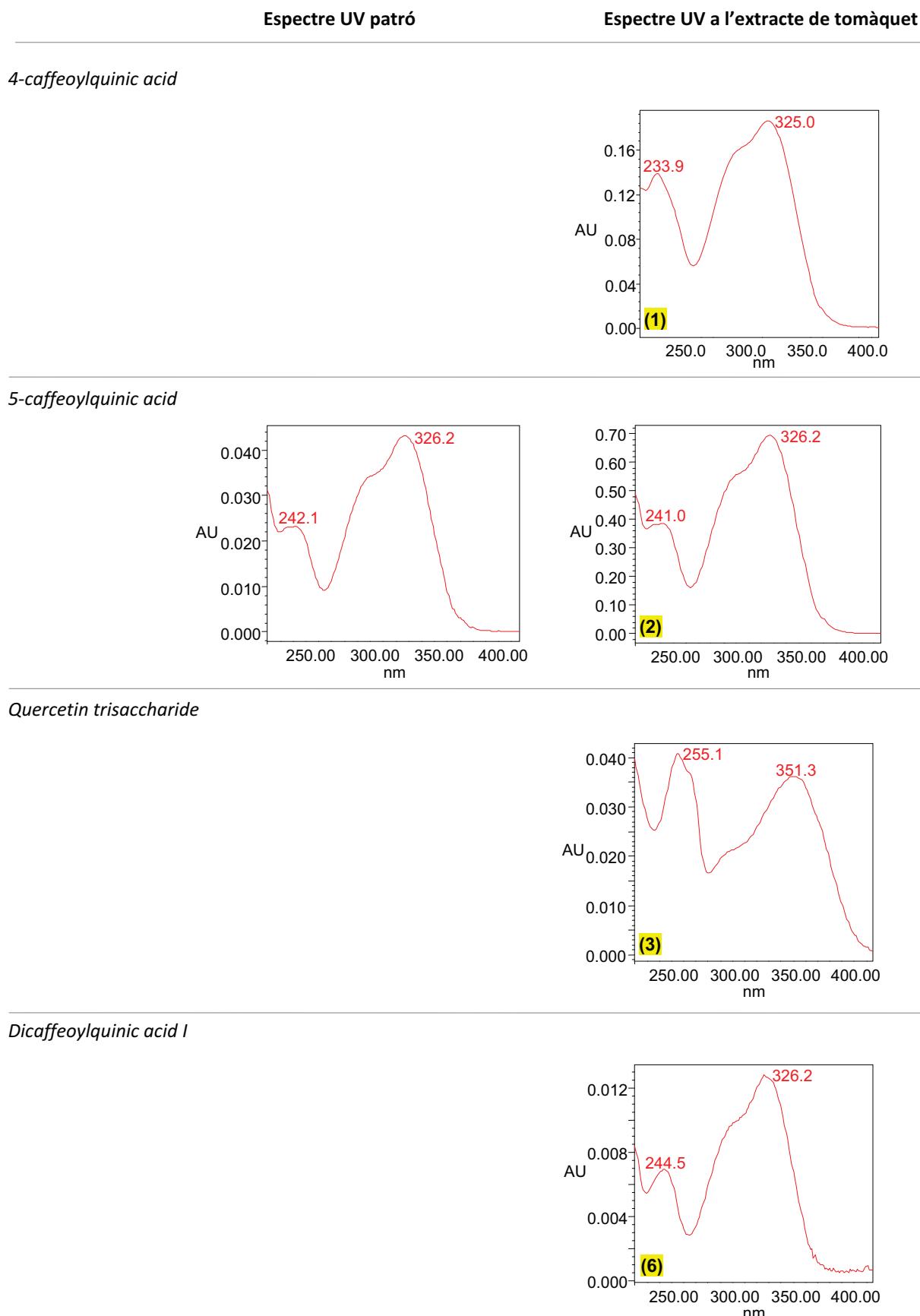


Figura 4.49. Espectres HPLC-UV dels compostos fenòlics intactes identificats en el tomàquet, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continua a la pàgina següent*)

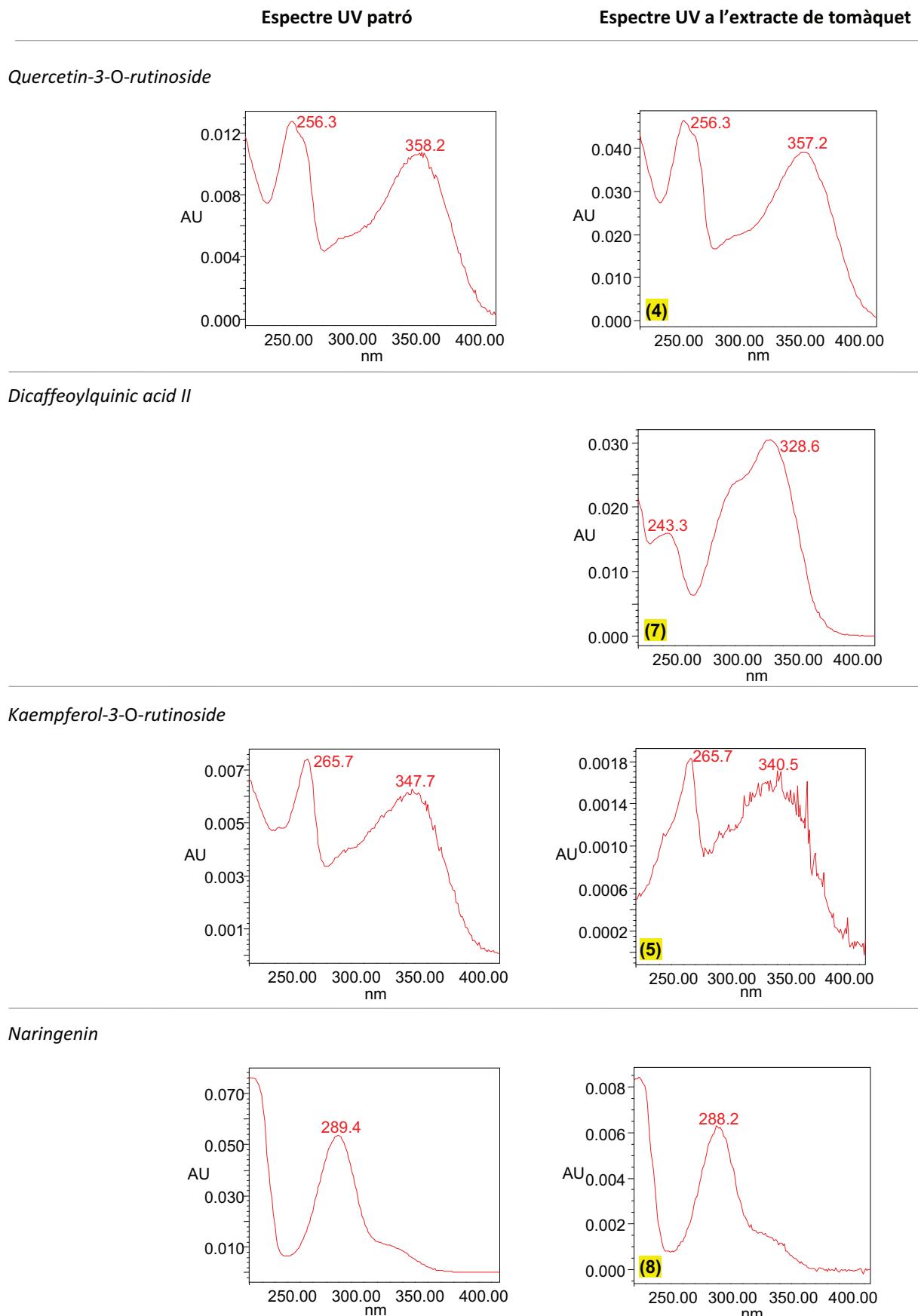


Figura 4.49. Espectres HPLC-UV dels compostos fenòlics intacles identificats en el tomàquet, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continua a la pàgina següent*)

4. Resultats i discussió

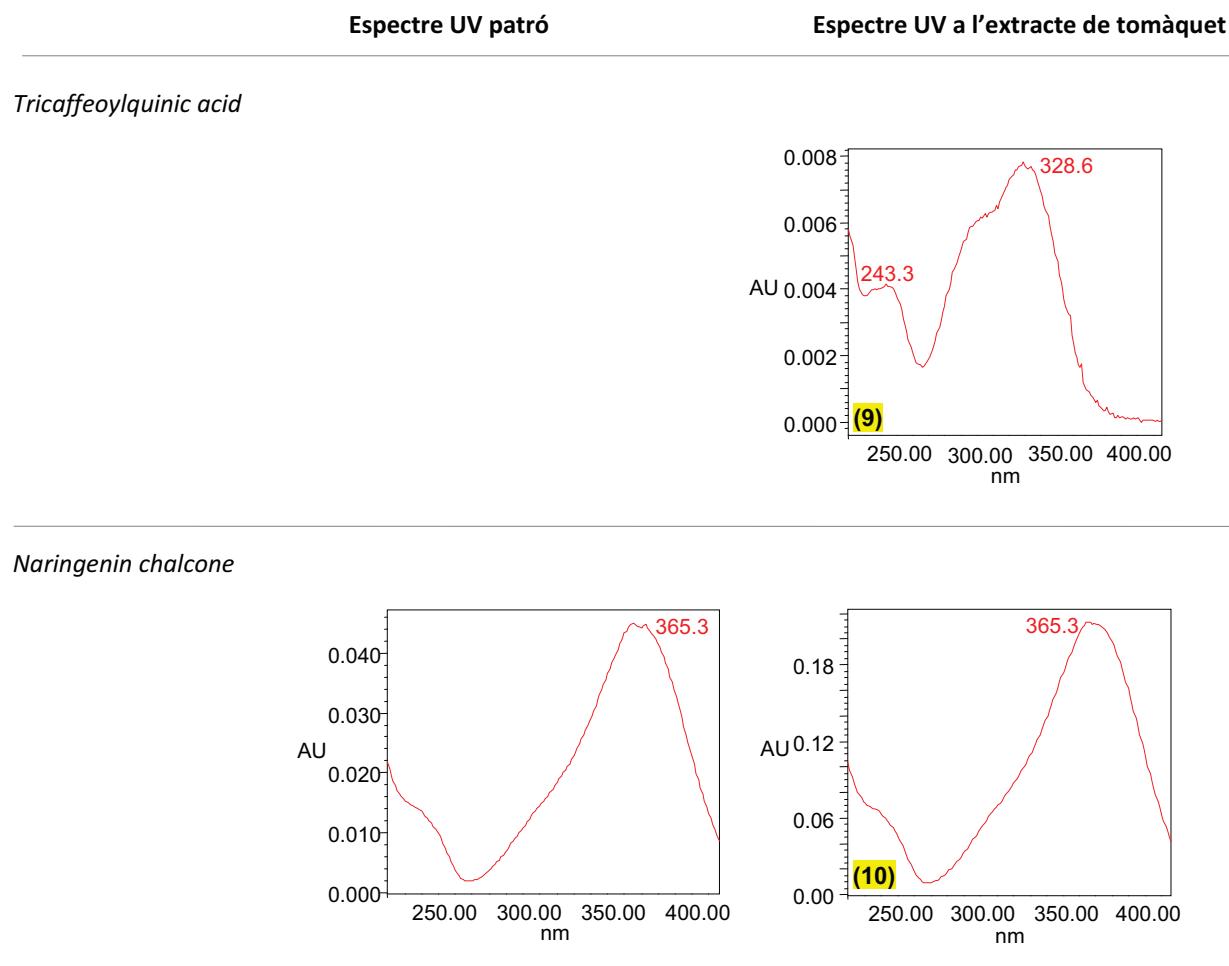


Figura 4.49. Espectres HPLC-UV dels compostos fenòlics intacles identificats en el tomàquet, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continuació*)

(a)

Compost	RT típic (min)	UPLC-DAD	
		Max UV (nm) Tomàquet	Patrons
(1) 4-Caffeoylquinic acid - 4-CaQA	4,32	327.	329.
(2) 5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA	5,92	314.	-
(3) Quercetin trisaccharide - Q-Tris	6,31	323.	324.
(4) Quercetin-3-O-rutinoside - Q-Rut	8,61	311.	-
(5) Kaempferol-3-O-rutinoside - K-Rut	15,08	259, 357.	256, 357.
(6) Dicaffeoylquinic acid I - DiCaQA I	15,23	330.	329.
(7) Dicaffeoylquinic acid II - DiCaQA II	15,92	327.	-
(8) Naringenin - Nar	16,11	256, 355.	-
(9) Tricaffeoylquinic acid - TriCaQA	17,99	318.	-
(10) Naringenin chalcone - NarChalc	20,97	314.	-

(b)

Compost	HPLC-DAD							
	Tomàquet		Patrons					
Compost	RT (min)	n	CV (%)	Max UV (nm)	RT (min)	n	CV (%)	Max UV (nm)
(1) 4-Caffeoylquinic acid - 4-CaQA	3,86	12	0,81	325	-	-	-	-
(2) 5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA	4,21	12	1,29	326	4,45	10	0,54	326.
(3) Quercetin trisaccharide - Q-Tris	14,95	10	0,39	255, 351	-	-	-	-
(4) Quercetin-3-O-rutinoside - Q-Rut	18,81	12	0,12	256, 357	18,84	10	0,77	256, 358
(5) Kaempferol-3-O-rutinoside - K-Rut	24,36	4	0,07	266, 340	24,38	10	0,63	266, 348.
(6) Dicaffeoylquinic acid I - DiCaQA I	16,57	12	0,21	326	-	-	-	-
(7) Dicaffeoylquinic acid II - DiCaQA II	23,04	12	0,13	329	-	-	-	-
(8) Naringenin - Nar	33,25	4	0,15	288	33,25	10	0,37	289.
(9) Tricaffeoylquinic acid - TriCaQA	39,83	12	0,13	329	-	-	-	-
(10) Naringenin chalcone - NarChalc	41,38	5	0,07	365	41,38	10	0,36	365.

Taula 4.6.

Llista dels compostos fenòlics presents en els extractes de tomàquet avaluats.

(a) Temps de retenció típics i màxims UV dels compostos identificats i dels patrons, obtinguts en el sistema UPLC-DAD-MS/MS.

(b) Temps de retenció (mitjana obtinguda de n mostres, amb el coeficient de variació CV) i màxims UV dels compostos identificats i dels patrons, obtinguts en el sistema HPLC-DAD.

4. Resultats i discussió

Quantificació dels compostos fenòlics amb HPLC-DAD

La taula 4.7 mostra esquemàticament els paràmetres relacionats amb la quantificació per a cada compost. La quantificació dels compostos amb patró comercial disponible (*5-caffeoylequinic acid*, *quercetin-3-O-rutinoside*, *kaempferol-3-O-rutinoside*, *naringenin* i *naringenin chalcone*) es realitzà mitjançant les rectes de calibració representades a la figura 4.50. Les àrees cromatogràfiques de cada compost s'enregistraren en una longitud d'ona propera al seu màxim d'absorció. Els derivats de *caffeic acid* (*caffeoylequinic acid I*, *caffeoylequinic acid II* i *tricaffeoylquinic acid*) es quantificaren emprant la recta de *5-caffeoylequinic acid* mentre que *quercetin trisaccharide* amb la de *quercetin-3-O-rutinoside*. La quantitat d'aquests compostos s'expressà en “equivalents de *5-caffeoylequinic acid*” en el primer cas i en “equivalents de *quercetin-3-O-rutinoside*” en el segon. El resultat en equivalents es corregí considerant el pes molecular de cada compost, assumint que l'absorbància originada per una molècula és la mateixa que una molècula d'estructura similar però pes diferent.

	Compost	λ	Concentració expressada en equivalents de...
(1)	<i>4-caffeoylequinic acid</i>	330 nm	<i>5-caffeoylequinic acid</i>
(2)	<i>5-caffeoylequinic acid</i>	330 nm	-
(3)	<i>Quercetin trisaccharide</i>	353 nm	<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>
(4)	<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	353 nm	-
(5)	<i>Kaempferol-3-O-rutinoside</i>	353 nm	-
(6)	<i>Dicaffeoylquinic acid I</i>	330 nm	<i>5-caffeoylequinic acid</i>
(7)	<i>Dicaffeoylquinic acid II</i>	330 nm	<i>5-caffeoylequinic acid</i>
(8)	<i>Naringenin</i>	288 nm	-
(9)	<i>Tricaffeoylquinic acid</i>	330 nm	<i>5-caffeoylequinic acid</i>
(10)	<i>Naringenin chalcone</i>	370 nm	-

Taula 4.7. Longitud d'ona utilitzada en DAD per a l'enregistrament de les àrees cromatogràfiques de cada compost (λ) i expressió dels resultats en equivalents dels compostos sense patró disponible.

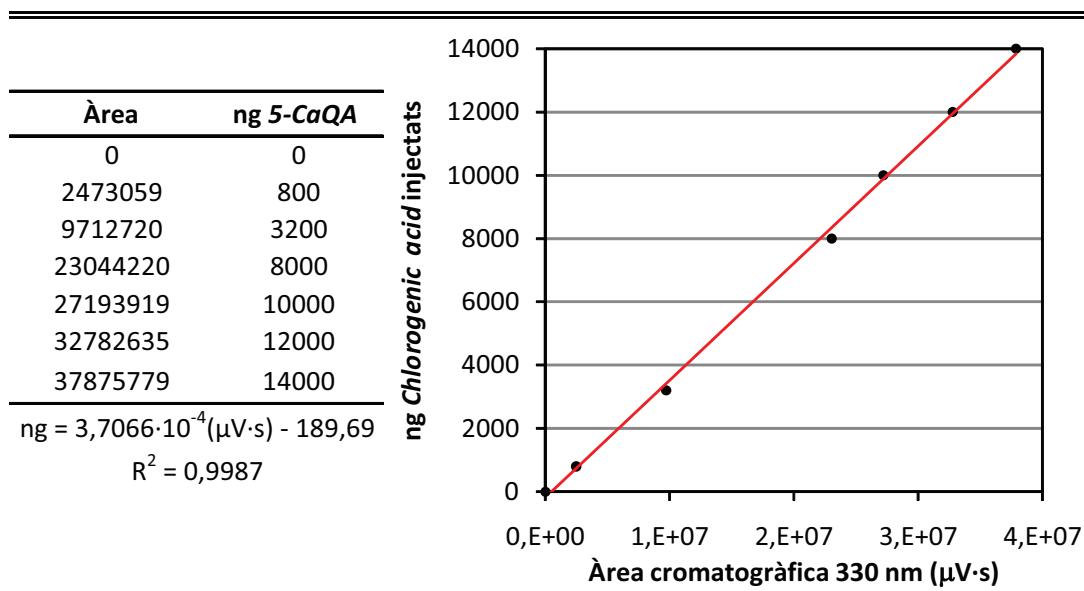


Figura 4.50. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes de tomàquet.
(continua a la pàgina següent)

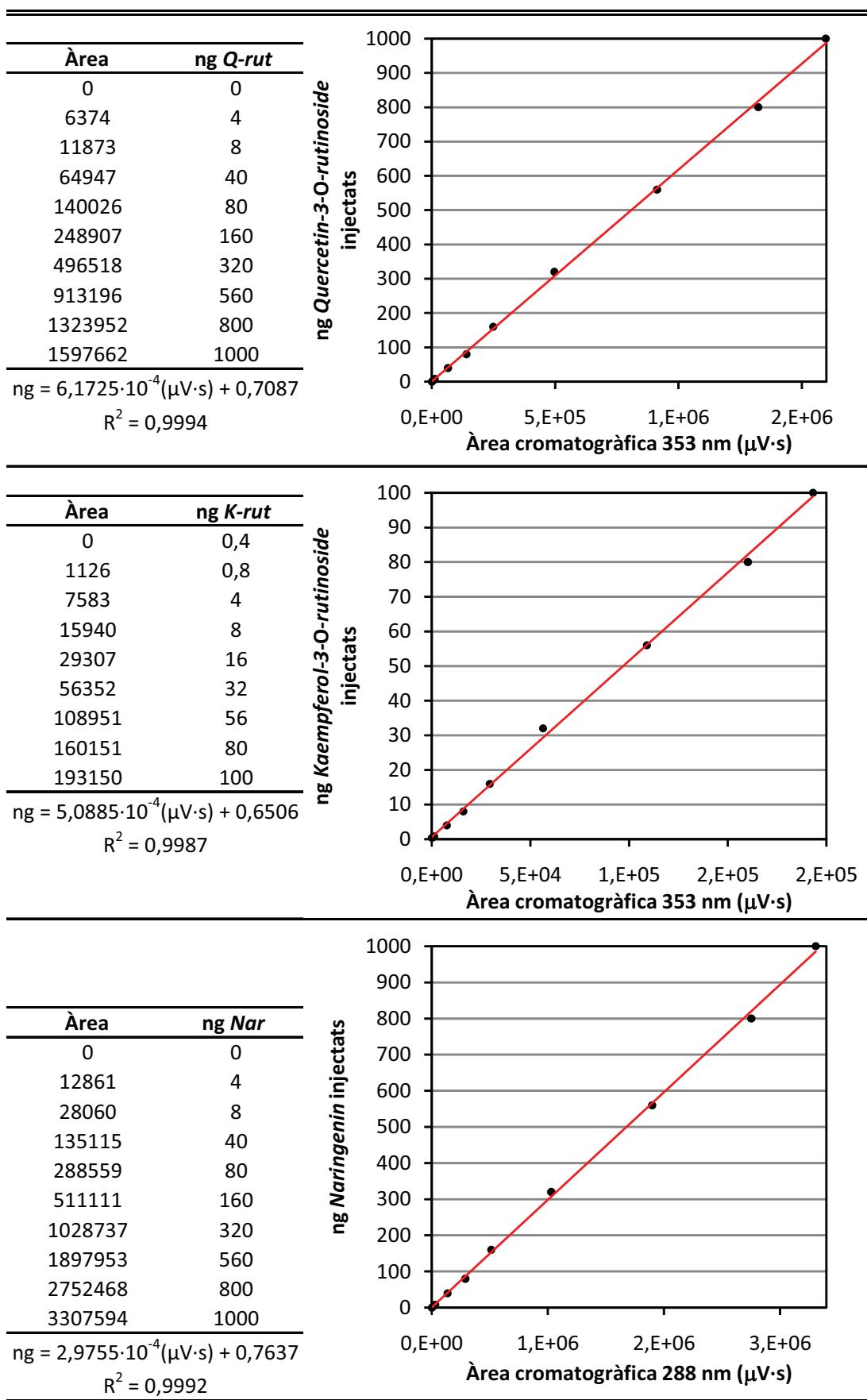


Figura 4.50. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes de tomàquet.
 (continua a la pàgina següent)

4. Resultats i discussió

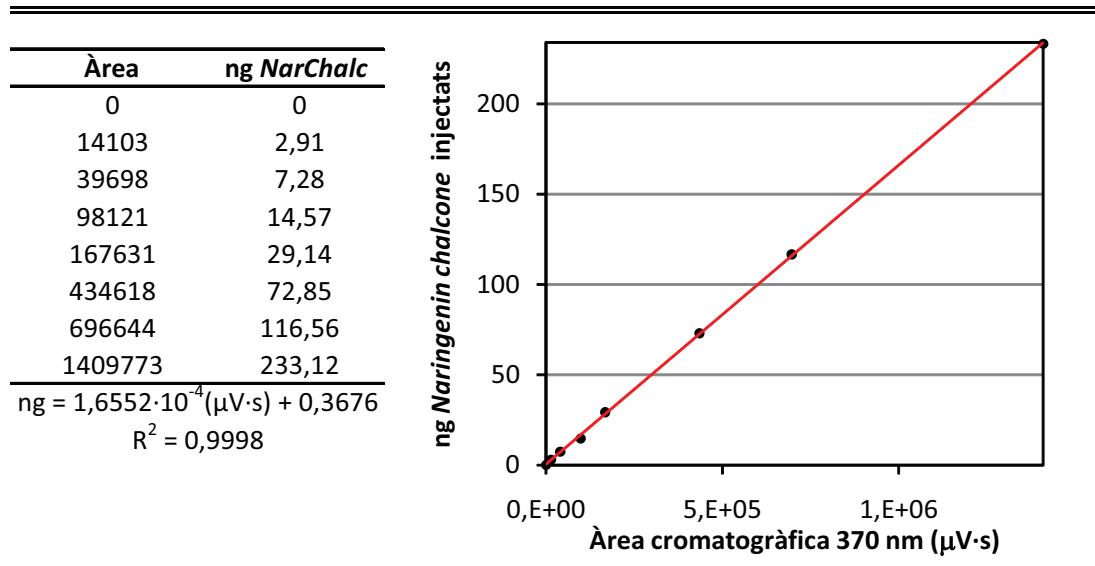


Figura 4.50. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes de tomàquet.
(continuació)

Recuperació

Amb el protocol assajat, la recuperació més alta s'obtingué amb *5-caffeoylequinic acid*, mentre que la més baixa fou la mesurada per *naringenin chalcone*. Els valors obtinguts es troben representats en la taula 4.8.

Compost	Rang fortificacions	Recuperació mitjana	CV
<i>5-Caffeoylquinic acid</i>	50 - 150 mg/kg	102,0 %	9,0 %
<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	1,10 - 2,50 mg/kg	90,9 %	8,2 %
<i>Kaempferol-3-O-rutinoside</i>	0,50 - 1,30 mg/kg	95,9 %	6,9 %
<i>Naringenin</i>	2,80 - 7,25 mg/kg	80,2 %	4,4 %
<i>Naringenin chalcone</i>	1,40 - 2,90 mg/kg	67,7 %	7,8 %

Taula 4.8. Mitjana dels valors de recuperació obtinguts a partir d'un nombre $n=7$ de mostres fortificades, i el coeficient de variació (CV) d'aquests valors. Es mostren els nivells mínims i màxims de fortificació utilitzats per a cada compost.

Plats teòrics

Els plats teòrics obtinguts per a cada compost fenòlic patró, amb el mètode d'anàlisi HPLC-DAD, es mostren a la taula 4.9.

	ng	t _R (min)	W½ (min)	N
5-caffeoylequinic acid	909	4,503	0,142	5.571
Quercetin-3-O-rutinoside	909	19,117	0,278	26.197
Kaempferol-3-O-rutinoside	454	24,693	0,308	35.609
Naringenin	2.582	33,555	0,325	59.055
Naringenin chalcone	1.054	41,713	0,289	115.414

Taula 4.9 Plats teòrics obtinguts per als patrons dels compostos fenòlics. Els valors fan referència a una quantitat de compost patró injectada al sistema HPLC-DAD (ng).

Abreviatures: t_R: temps de retenció; W½: amplada del pic a mitja altura;

N: nombre de plats teòrics.

Límit de detecció

La taula 4.10 mostra els límits de detecció (LOD) obtinguts per als compostos fenòlics identificats en els extractes de tomàquet. Els LOD obtinguts comprenen valors entre 1 µg/kg (1 ppb) en pes fresc i 30 µg/kg. Els valors més baixos s'obtingueren en aquells compostos que donen un senyal UV més alt, és a dir, aquells que per una determinada quantitat de compost originen pics cromatogràfics més alts.

	LOD (µg/kg)
4-Caffeoylquinic acid	1
5-Caffeoylquinic acid	1
Quercetin trisaccharide	21
Quercetin-3-O-rutinoside	18
Kaempferol-3-O-rutinoside	15
Dicaffeoylquinic acid I	2
Dicaffeoylquinic acid II	2
Naringenin	7
Tricaffeoylquinic acid	2
Naringenin chalcone	30

Taula 4.10. LOD obtinguts per als compostos fenòlics del tomàquet.

Repetibilitat del mètode

La repetibilitat intra-dia del mètode fou variable segons el compost fenòlic, amb *dicaffeoylquinic acid I* amb el coeficient de variació més baix (3,16) i *quercetin-3-O-rutinoside* amb el més alt (10,97). La taula 4.11 mostra els valors de coeficient de variació obtinguts per a cada compost fenòlic.

	CV									
4-CaQA	5-CaQA	DiCaQA I	DiCaQA II	TriCaQA	Q-Tris	Q-Rut	K-Rut	Nar	NarChalc	
3,85 %	5,62 %	3,16 %	4,80 %	5,25 %	7,39 %	10,97 %	9,22 %	7,70 %	9,32 %	

Taula 4.11. Valors de coeficient de variació (CV) mitjans obtinguts en analitzar tres tomàquets per triplicat.
(per detall de les abreviatures vegeu taula 4.5)

4. Resultats i discussió

Mostres analitzades

El mètode d'anàlisi HPLC-DAD de compostos fenòlics en tomàquet desenvolupat permet la quantificació rutinària de deu compostos fenòlics de forma relativament senzilla, a partir de la identificació dels compostos majoritaris per UPLC-DAD-MS/MS. Hi ha mètodes d'anàlisi descrits prèviament que permeten la caracterització d'un gran nombre de compostos fenòlics en tomàquet (Moco *et al.*, 2006; Moco *et al.*, 2008; Lijima *et al.*, 2008), però no els quantifiquen. La majoria de mètodes d'anàlisi quantitatius descrits en la bibliografia utilitzen la hidròlisi (Hertog, 1996; Crozier *et al.*, 1997; Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Chassy *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007) o bé quantifiquen un nombre inferior de compostos (Stewart *et al.*, 2000; Slimestad i Verheul, 2005).

La taula 4.12 mostra els valors mínims i màxims obtinguts de les analisis de compostos fenòlics de dotze mostres tomàquet (quatre mostres de tres varietats diferents). L'àcid clorogènic (*5-caffeoylequinic acid*) fou el compost fenòlic majoritari en les mostres de les tres varietats de tomàquet analitzades. Els derivats glicosilats de *quercetin* (*quercetin-3-O-rutinoside* en la varietat *Caramba* i *quercetin trisaccharide* en les varietats *Montserrat* i la *Pera de Girona*) foren els flavonoides majoritaris. Les mostres de la varietat *Caramba*, més riques en flavonoides, també tingueren un important contingut en *naringenin chalcone*, present només en traces en les altres dues varietats analitzades. Respecte a la varietat *Caramba*, les varietats *Pera de Girona* i especialment *Montserrat* tingueren un alt contingut en derivats d'àcid hidroxicinnàmic, principalment d'àcid clorogènic.

(a)	Varietat	mg/kg PF			
		4-CaQA ¹	5-CaQA	DiCaQA I ¹	DiCaQA II ¹
	Caramba	7,3 - 17,0	27,2 - 42,2	1,5 - 3,1	3,0 - 5,5
	Montserrat	6,7 - 17,1	47,0 - 104,5	2,2 - 3,2	8,2 - 13,5
	Pera de Girona	4,5 - 8,3	38,7 - 60,1	1,2 - 2,1	3,9 - 5,5

(b)	Varietat				
		Q-Rut	Q-Tris ²	K-Rut	Nar
	Caramba	8,5 - 14,2	10,9 - 14,2	< LOD - 0,4	0, 1- 0,4
	Montserrat	1,4 - 3,2	< 0,1 - 4,5	< LOD	< LOD
	Pera de Girona	0,7 - 0,9	1,4 - 2,7	< LOD	< LOD

Taula 4.12. Rangs de concentracions (mínim-màxim) obtinguts dels derivats d'àcid hidroxicinnàmic **(a)** i dels flavonoides **(b)** majoritaris de les tres varietats de tomàquet analitzades. S'analitzaren quatre mostres de cada varietat. **PF:** en pes fresc. **(1)**: equivalents de 5-CaQA; **(2)**: equivalents de Q-Rut.
(per detall de les abreviatures vegeu taula 4.5)

4.5- Anàlisi de compostos fenòlics intacles en extracte d'enciam

4.5.1- Identificació per UPLC-DAD-MS/MS

La figura 4.51 mostra un cromatograma a 330 nm d'un extracte d'enciam analitzat, amb els pics majoritaris corresponents a compostos fenòlics enumerats. La figura 4.52 mostra un cromatograma a 330 nm d'una solució de patrons; quatre dels pics obtinguts en extracte d'enciam coincidiren en temps de retenció i espectre UV amb patrons disponibles:

- (1): *caffeoyleltartaric acid (caftaric acid)*
- (3): *5-caffeoylequinic acid (chlorogenic acid)*
- (5): *quercetin-3-O-glucuronide*
- (6): *Dicaffeoyltartaric acid (chicoric acid)*

Com en l'anàlisi de tomàquet, la informació MS (pes molecular) i MS/MS (espectre de fragmentació) permeté confirmar la identificació d'aquests compostos, comparant-la amb la informació obtinguda amb patrons. Per MS i MS/MS s'identificaren provisionalment sis compostos més, dels quals no hi hagué patró disponible (taula 4.13).

La figura 4.53 mostra l'espectre UV del patró de *caffeoyleltartaric acid* (CaTA) i del pic (1), coincidents. La figura 4.54a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 311 seleccionats (m/z^- pròpia del ió molecular de CaTA), on apareix el pic (1) amb el temps de retenció del patró de CaTA. El seu espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.54c) fou el propi per a aquest àcid fenòlic (Llorach *et al.*, 2008), amb la formació dels ions fills de m/z^- 179 ($[caffeic\ acid - H]^-$) i 149 ($[tartaric\ acid - H]^-$). La figura 4.54b mostra l'estruccura molecular de CaTA i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ha estat descrit en enciam en treballs previs (Ferreres *et al.*, 1997; Caldwell *et al.*, 2003; Sobolev *et al.*, 2005; Llorach *et al.*, 2008).

La figura 4.55 presenta l'espectre UV del patró de *5-caffeoylequinic acid* (5-CaQA) i del pic (3), coincidents. La figura 4.56a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 353 seleccionats (m/z^- pròpia dels ions pare de 5-CaQA), on apareix (3) amb el mateix temps de retenció que el patró de 5-CaQA. El seu espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.56c) coincidí amb el descrit a la bibliografia (Clifford *et al.*, 2003; Lin i Harnly, 2007; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008), amb un fragment de m/z^- 191 ($[quinic\ acid - H]^-$). La figura 4.56b mostra l'estruccura molecular de 5-CaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ha estat identificat anteriorment en enciam (Ferreres *et al.*, 1997; Hohl *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2002; Caldwell *et al.*, 2003; Nicolle *et al.*, 2004; Sobolev *et al.*, 2005; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008).

La figura 4.57 mostra l'espectre UV del patró de *quercetin-3-O-glucuronide* (Q-Gluc) i del pic (5), coincidents. La figura 4.58a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 477 seleccionats, la m/z^- dels ions moleculars de Q-Gluc, on apareix (5) amb el mateix temps de retenció que el patró de Q-Gluc. L'espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.58c) fou el propi d'aquest flavonol (Cantos *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2004; Llorach *et al.*, 2008), amb el fragment de m/z^- 301 corresponent a l'aglicó *quercetin* ($[quercetin - H]^-$). La figura 4.58b mostra l'estruccura molecular de Q-Gluc i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ja ha estat descrit en enciam (Ferreres *et al.*, 1997; DuPont *et al.*, 2000; Hohl *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2002; Llorach *et al.*, 2004; Nicolle *et al.*, 2004; Llorach *et al.*, 2008).

4. Resultats i discussió

En la figura 4.59 s'hi mostra l'espectre UV del patró de *dicaffeoyltartaric acid* (DiCaTA) (chicoric acid) i del pic (**6**), coincidents. La figura 4.60a mostra un MS *scan* amb els ions de m/z^- 743 (m/z^- dels ions pare de DiCaTA) seleccionats, on apareix (**6**) amb el mateix temps de retenció que el patró de DiCaTA. L'espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.60c) coincidí amb el descrit per a aquest àcid hidroxicinnàmic (Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008; Ola *et al.*, 2009), amb ions fills de m/z^- 311 ($[\text{CaTA} - \text{H}]^-$), 293 ($[\text{CaTA} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$), 179 ($[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$) i 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$). La figura 4.60b mostra l'estrucció molecular de DiCaTA i el model de fragmentació MS/MS proposat. Aquest compost ha estat identificat prèviament en enciam (Ferrerres *et al.*, 1997; Hohl *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2002; Caldwell *et al.*, 2003; Nicolle *et al.*, 2004; Sobolev *et al.*, 2005; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008).

Els altres pics majoritaris varen identificar-se provisionalment amb la informació DAD, MS i MS/MS obtinguda. L'espectre UV permeté classificar els compostos presents en els extractes en tres grups:

- Derivats de flavonol: pics (**5**) i (**8**).
- Derivats d'àcid cafeic: pics (**1**), (**3**), (**6**) i (**7**).
- Derivats d'àcid cumàric: pics (**2**), (**4**), (**9**) i (**10**).

El pic (**8**) presentà un espectre UV típic de flavonol (fig. 4.61). El ió molecular obtingut per MS *scan* de m/z^- 549 (fig. 4.62a), i l'espectre de fragmentació MS/MS (fig. 4.62c) coincidiren amb les dades descrites pel compost *quercetin-3-O-malonylglucoside* (Q-MaGlu) (Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008; Heimler *et al.*, 2009). L'anàlisi MS/MS obtingué els fragments amb m/z^- 505 ($[\text{quercetin-3-O-malonylglucoside} - \text{COOH}]^-$), 463 ($[\text{quercetin-3-O-glucoside} - \text{H}]^-$, per pèrdua del grup malonyl) i 301 ($[\text{quercetin} - \text{H}]^-$, per pèrdua del grup malonylglucoside). La figura 4.62b mostra l'estrucció molecular de Q-MaGlu i el model de fragmentació MS/MS proposat. Q-MaGlu ja havia estat identificat prèviament en enciam (Ferrerres *et al.*, 1997; DuPont *et al.*, 2000; Hohl *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2002; Caldwell *et al.*, 2003; Llorach *et al.*, 2004; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008).

L'espectre UV de (**7**) (fig. 4.63) fou el típic d'un derivat d'àcid cafeic. L'anàlisi MS *scan* mostrà que el seu ió pare tingueré m/z^- 515, la pròpia d'un *dicaffeoylquinic acid* (DiCaQA) (veure monitorització *scan* amb m/z^- 515 seleccionada, fig. 4.64a). El temps de retenció no coincidí amb el del patró de *1,3-dicaffeoylquinic acid* (fig. 4.52, espectre UV a fig. 4.63), el que descartà la presència d'aquest isòmer. De totes maneres, el seu espectre de fragmentació (fig. 4.64c) coincidí amb el d'un DiCaQA, amb els ions fills de m/z^- 353 ($[\text{CaQA} - \text{H}]^-$), 191 ($[\text{quinic acid} - \text{H}]^-$), 179 ($[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$) i 135 ($[\text{caffeic acid} - \text{H} - \text{COO}]^-$) (Lin i Harnly, 2007; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008; Ola *et al.*, 2009). Els treballs realitzats prèviament en enciam descriuen únicament la presència de l'isòmer *3,5-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid)* en aquest vegetal (Ferrerres *et al.*, 1997; Romani *et al.*, 2002; Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008); per aquest motiu, (**7**) s'identificà provisionalment com a *3,5-dicaffeoylquinic acid* (3,5-DiCaQA). La figura 4.64b mostra l'estrucció molecular de 3,5-DiCaQA i el model de fragmentació MS/MS proposat.

Quatre compostos majoritaris tingueren espectre UV característic de derivat d'àcid cumàric, amb un màxim d'absorció proper a 310 nm: (**2**), (**4**), (**9**) i (**10**). La figura 4.65 mostra l'espectre UV de (**2**). Els fragments obtinguts per MS/MS de (**2**) (fig. 4.66c) tingueren m/z^- 163 ($[\text{coumaric acid} - \text{H}]^-$) i m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$). El valor m/z^- del ió pare de (**2**) fou de 295 (fig. 4.66a), el que concorda amb *coumaroyltartaric acid* (CoTA) (Cantos *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2005). Conseqüentment, s'identificà provisionalment aquest compost com a CoTA; la figura 4.66b mostra la seva estructura molecular i el

model de fragmentació MS/MS proposat. No s'han trobat referències bibliogràfiques d'aquest compost en enciam.

La figura 4.67 mostra l'espectre UV de (4). Dos fragments obtinguts per MS/MS de (4) (fig. 4.68c) tingueren m/z^- 191 i 173, propis de *quinic acid* ($[quinic\ acid - H]^-$) i ($[quinic\ acid - H - H_2O]^-$ respectivament) (Clifford *et al.*, 2003). L'altre fragment MS/MS obtingut tingué m/z^- 163, propi de *cumaric acid* ($cumaric\ acid - H]^-$). L'espectre de fragmentació MS/MS i el ió pare de m/z^- 337 (fig. 4.68a) concorden amb el descrit per la bibliografia (Clifford *et al.*, 2003; Lin i Harnly, 2007) per a *cumaroylquinic acid* (CoQA). S'identificà provisionalment el compost (4) com a CoQA; la figura 4.68b mostra la seva estructura molecular i el model de fragmentació MS/MS proposat. No es té constància de cap referència bibliogràfica sobre aquest compost en enciam.

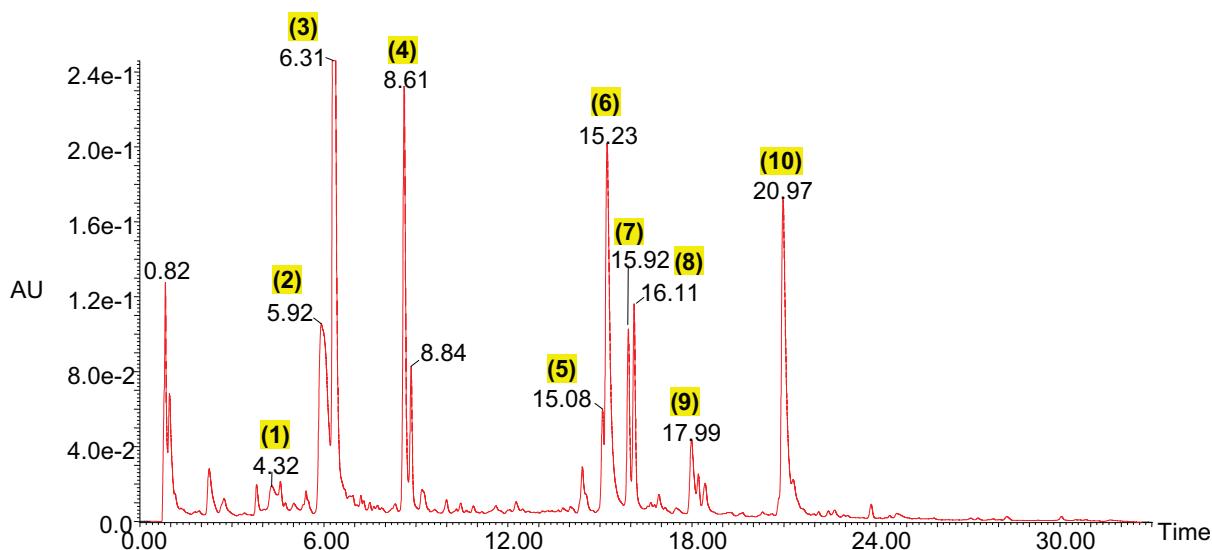


Fig. 4.51. Cromatograma UPLC a 330 nm d'extracte d'enciam.

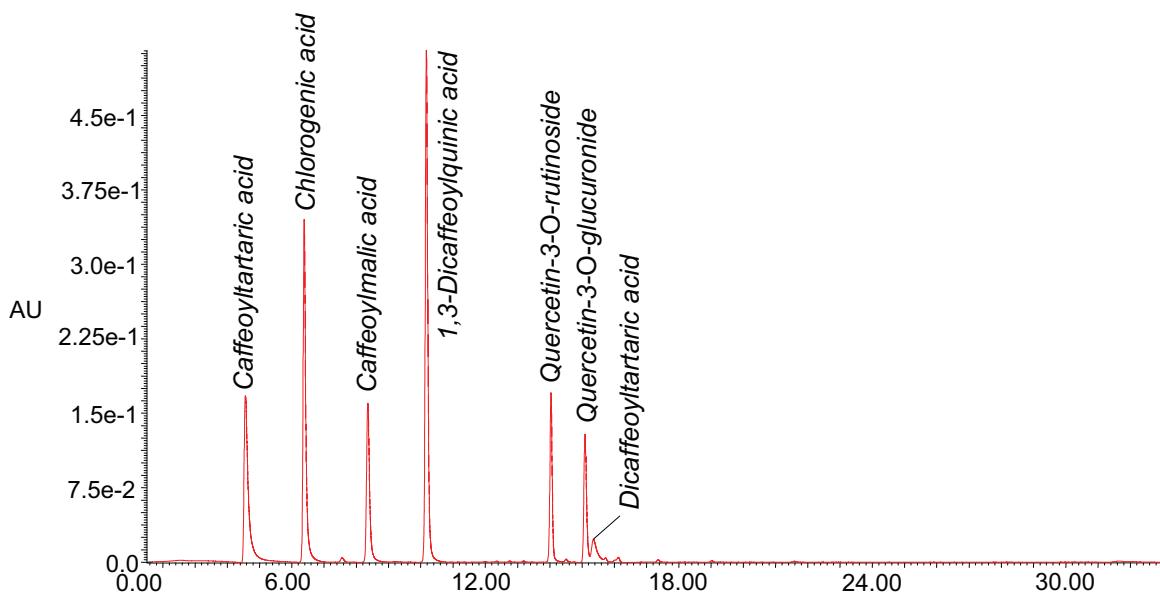


Fig. 4.52. Cromatograma UPLC a 330 nm de compostos fenòlics patrons.

Compost	[M-H] ⁻ (m/z ⁻)	Voltatge Con (V)	Energia col·lisió (eV)	UPLC-DAD-MS/MS (m/z ⁻)			Referències
				Enciam	Patrons	Bibliografia	
(1) <i>Caffeoyltartaric acid - CaTA</i>	311	-25	-15	179 (100 %), 149 (100 %).	179 (100 %), 149 (100 %).	179 ^{a,b} , 149 ^b , 135 ^b .	^a Cantos 2002, ^b Llorach 2008.
(2) <i>Coumaroyltartaric acid - CoTA</i>	295	-25	-15	163 (100 %), 149 (20 %).	-	163 ^{a,b} .	^a Cantos 2002, ^b Amaral 2005.
(3) <i>5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA</i>	353	-30	-15	191 (100 %).	191 (100 %).	191 ^{abcd} , 179 ^{abd} , 173 ^b , 135 ^b .	^a Clifford 2003, ^b Lin 2007, ^c Pernice 2007, ^c Llorach 2008.
(4) <i>Coumaroylquinic acid - CoQA</i>	337	-25	-15	191 (100 %), 173 (5 %), 163 (5 %).	-	191 ^{ab} , 173 ^{ab} , 163 ^{ab} .	^a Clifford 2003, ^b Lin 2007.
(5) <i>Quercetin-3-O-glucuronide - Q-Gluc</i>	477	-30	-25	477 (100 %), 301 (20 %).	477 (100 %), 301 (15 %).	301 ^{abc} .	^a Cantos 2002, ^b Mullen 2004, ^c Llorach 2008.
(6) <i>Dicaffeoyltartaric acid - DiCaTA</i>	473	-30	-15	311 (100 %), 293 (60 %), 179 (10 %), 149 (25 %).	311 (100 %), 293 (70 %), 179 (20 %), 149 (30 %).	311 ^{abc} , 293 ^{ab} , 179 ^c , 161 ^a , 149 ^a , 135 ^a .	^a Pernice 2007, ^b Llorach 2008, ^c Ola 2009.
(7) <i>3,5-Dicaffeoylquinic acid - 3,5-DiCaQA</i>	515	-30	-15	353 (100 %), 191 (15 %), 179 (15 %), 135 (5 %).	-	353 ^{abcd} , 191 ^{abd} , 179 ^{acd} , 173 ^a , 161 ^a , 135 ^a .	^a Lin 2007, ^b Pernice 2007, ^c Llorach 2008, ^d Ola 2009.
(8) <i>Quercetin-3-O-malonylglicoside - Q-MaGlu</i>	549	-30	-25	505 (100 %), 463 (20 %), 301 (80 %).	-	505 ^{bc} , 463 ^a , 387 ^b , 301 ^{bc} .	^a Pernice 2007, ^b Llorach 2008, ^c Heimler 2009.
(9) <i>Coumaroylcaffeoyltartaric acid - CoCaTA</i>	457	-30	-15	311 (75 %), 295 (70 %), 277 (75 %), 179 (100 %), 163 (25 %), 149 (20 %).	-	-	-
(10) <i>Dicoumaroyltartaric acid - DiCoTA</i>	441	-30	-15	295 (40 %), 277 (100 %), 163 (15 %), 149 (5 %).	-	-	-

Taula 4.13. Llista dels compostos presents en els extractes d'enciam evaluats, amb les respectives dades utilitzades per a la seva identificació en el sistema UPLC-MSⁿ. Abreviatures: V: voltatge.

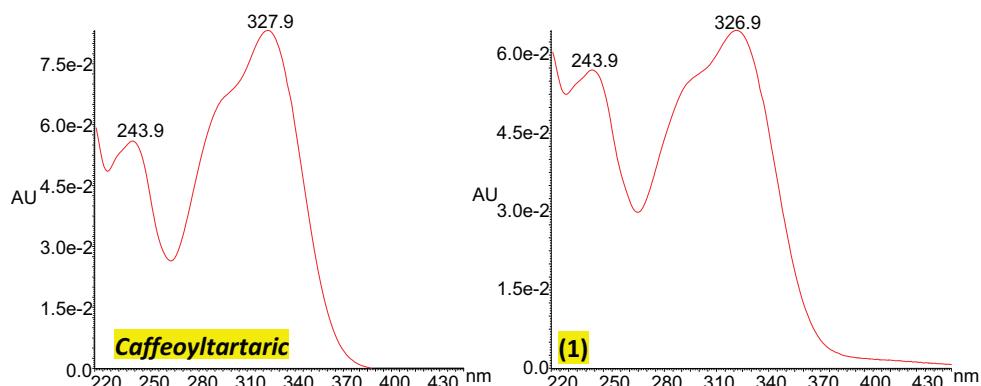


Figura 4.53. Espectre UV del patró de **caffeoyletartaric acid** (esquerra) i del pic (1) de l'extracte d'enciam (dreta).

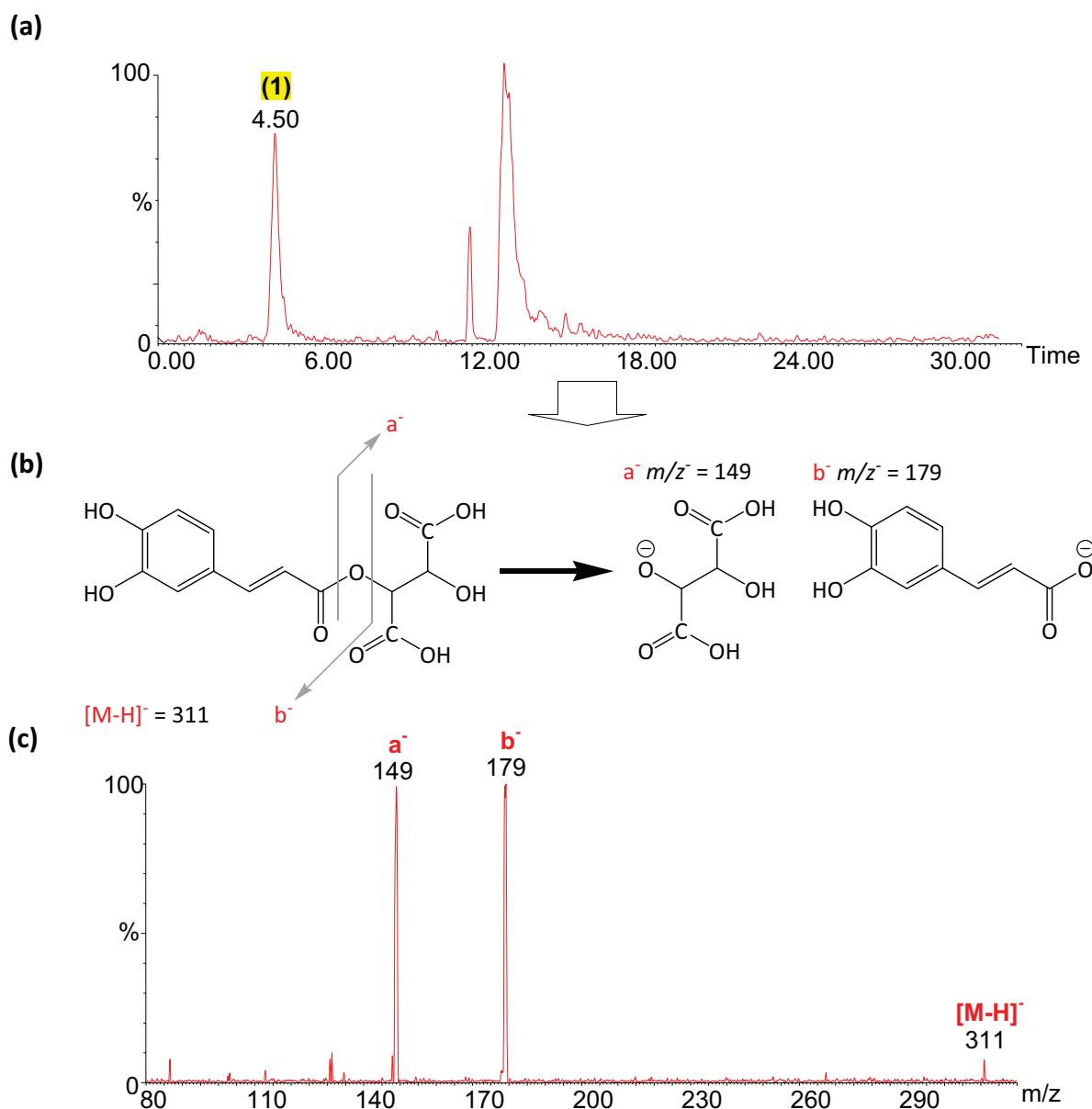


Figura 4.54. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z = 311$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (1) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (1) amb $t_R = 4,50$ min.

4. Resultats i discussió

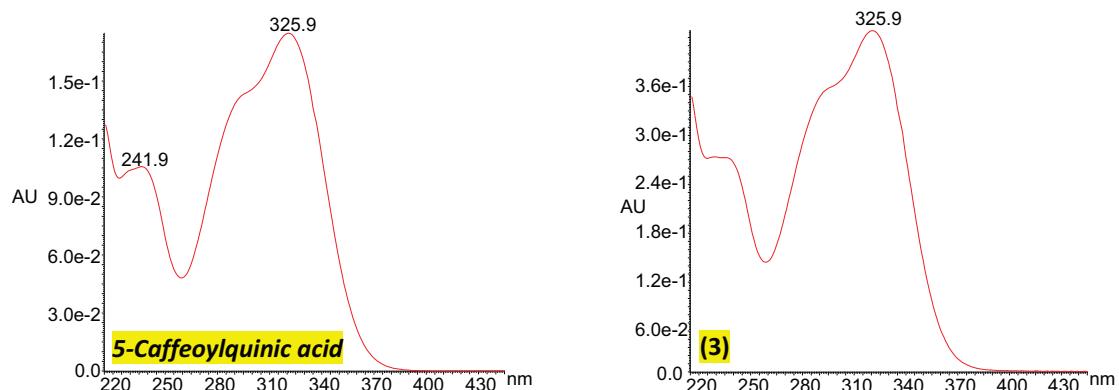


Figura 4.55. Espectre UV del patró de *caffeoarylquinic acid* (esquerra) i del pic (3) de l'extracte d'enciam (dreta).

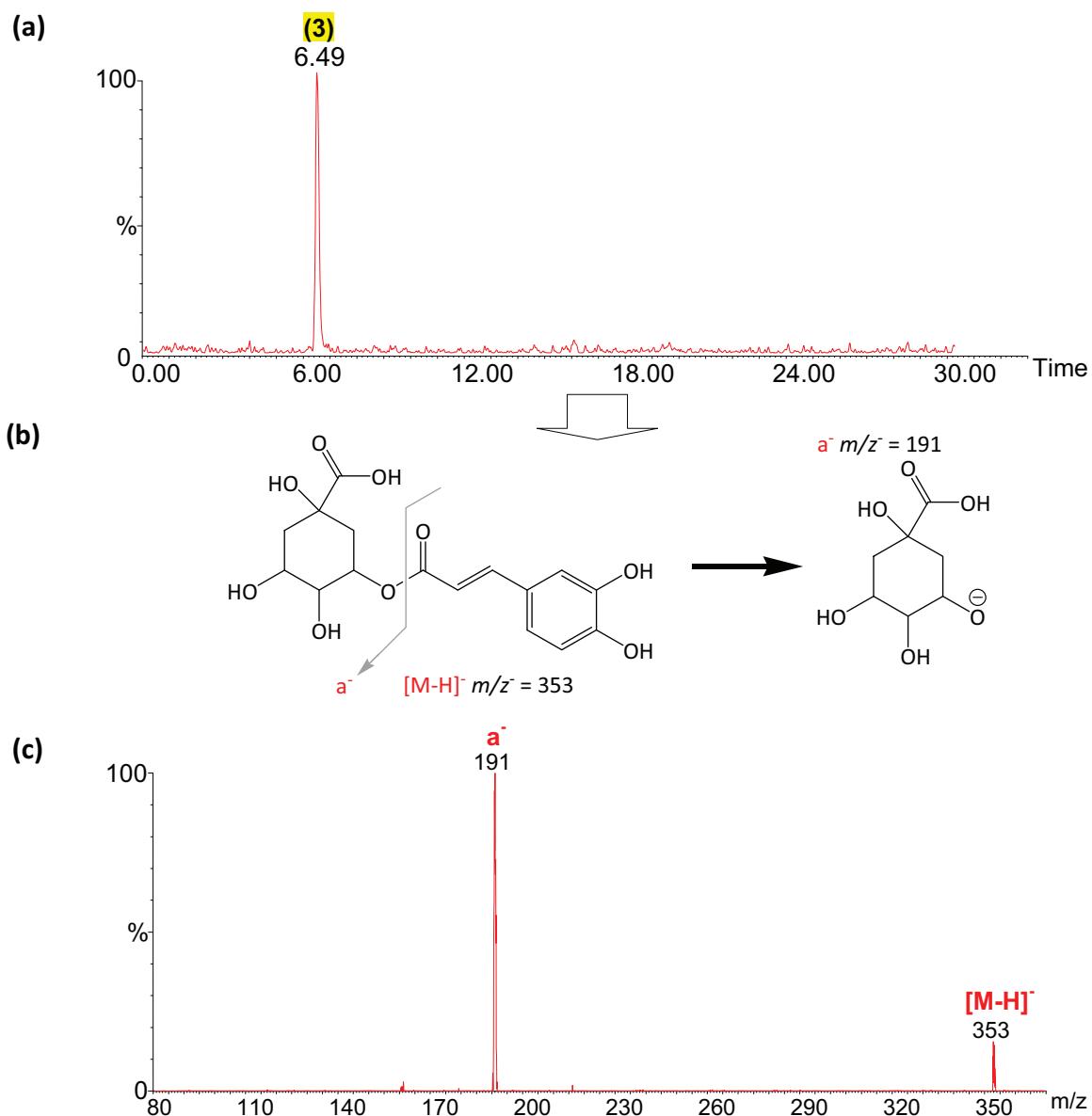


Figura 4.56. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z = 353$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (3) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (3) amb $t_R = 6,49$ min.

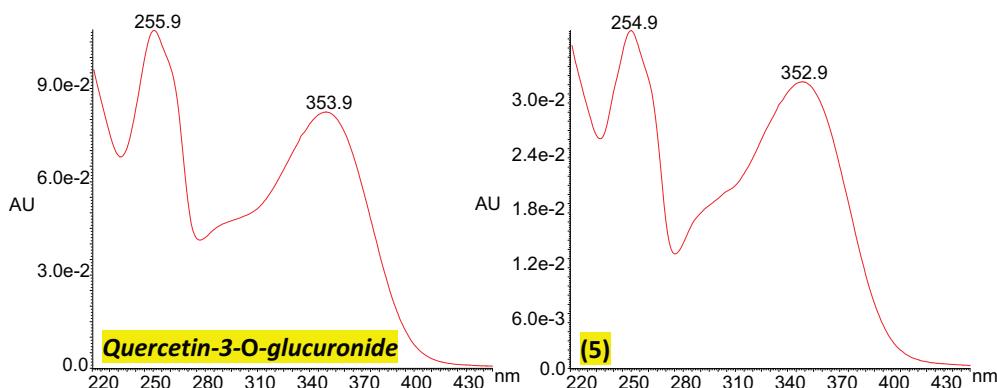


Figura 4.57. Espectre UV del patró de **Quercetin-3-O-glucuronide** (esquerra) i del pic (5) de l'extracte d'enciam (dreta).

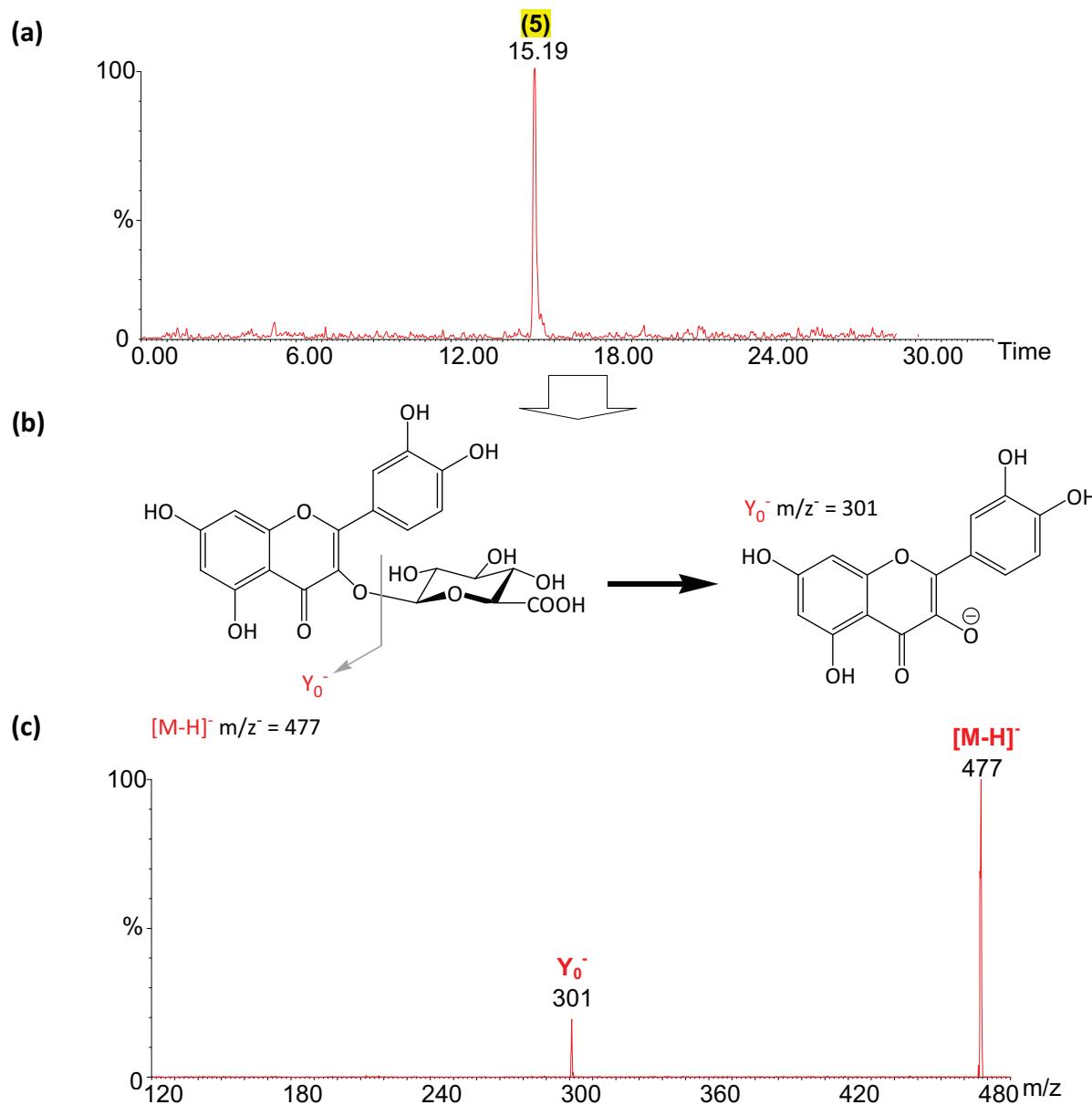


Figura 4.58. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z = 477$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (5) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (5) amb $t_R = 15.19$ min.

4. Resultats i discussió

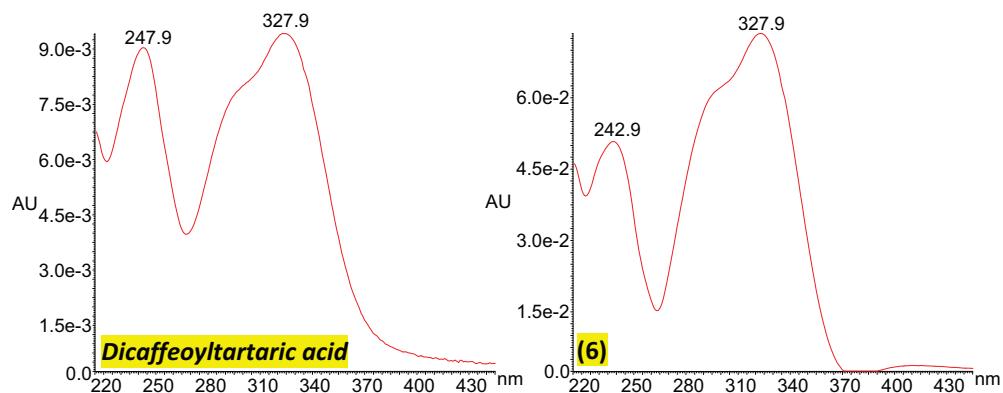


Figura 4.59. Espectre UV del patró de **dicaffeoyltartaric acid** (esquerra) i del pic (6) de l'extracte d'enciam (dreta).

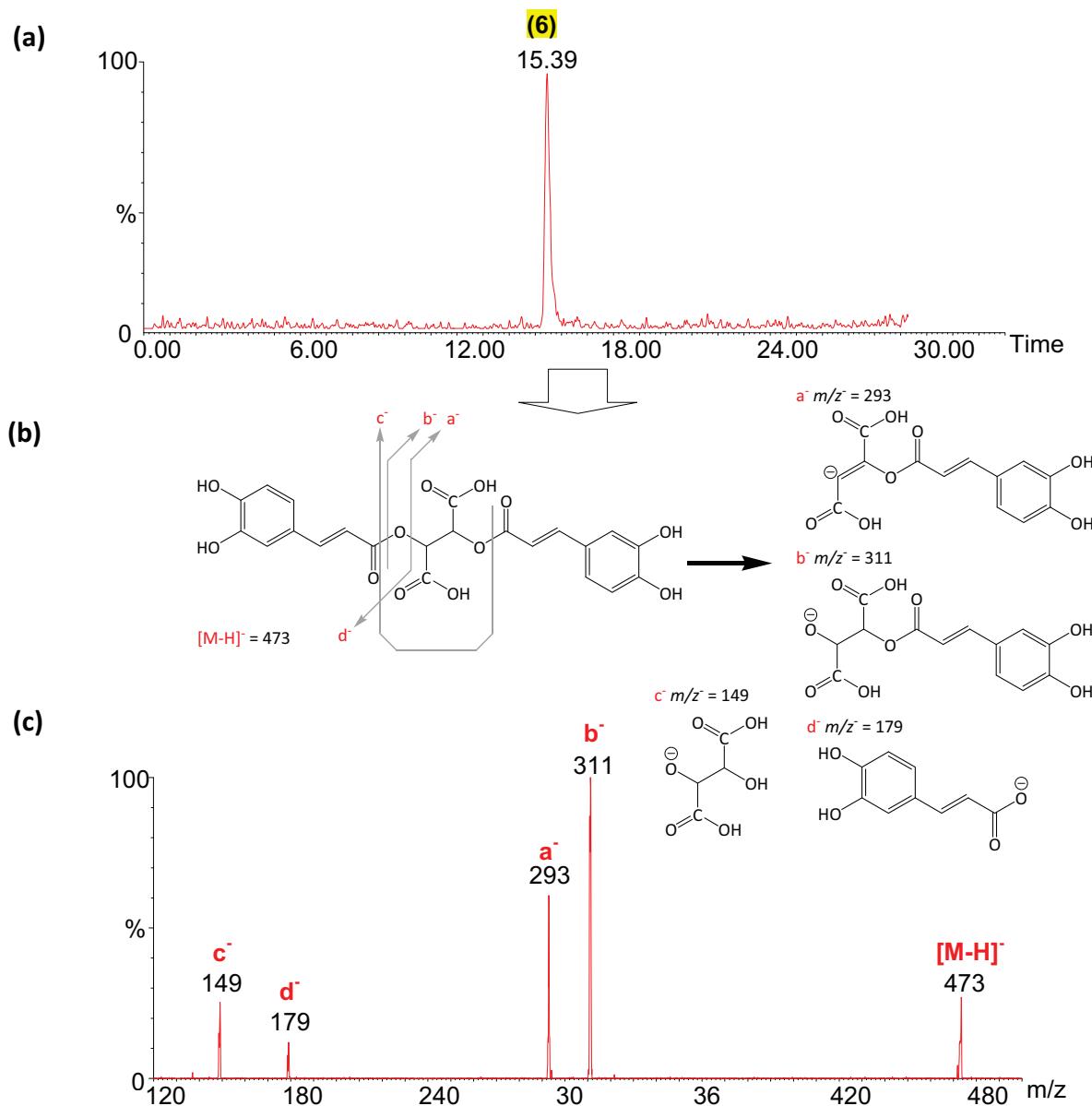


Figura 4.60. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z^- = 473$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (6) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (6) amb $t_R = 15,39$ min.

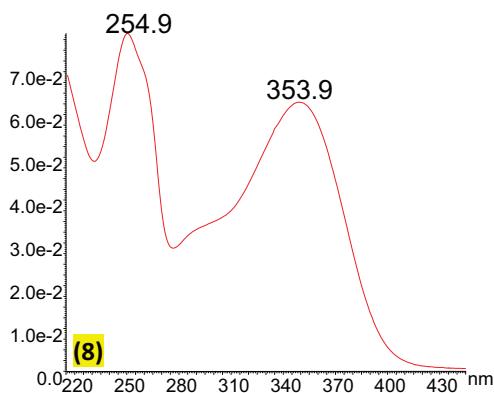


Figura 4.61. Espectre UV del patró del pic (8) de l'extracte d'enciam.

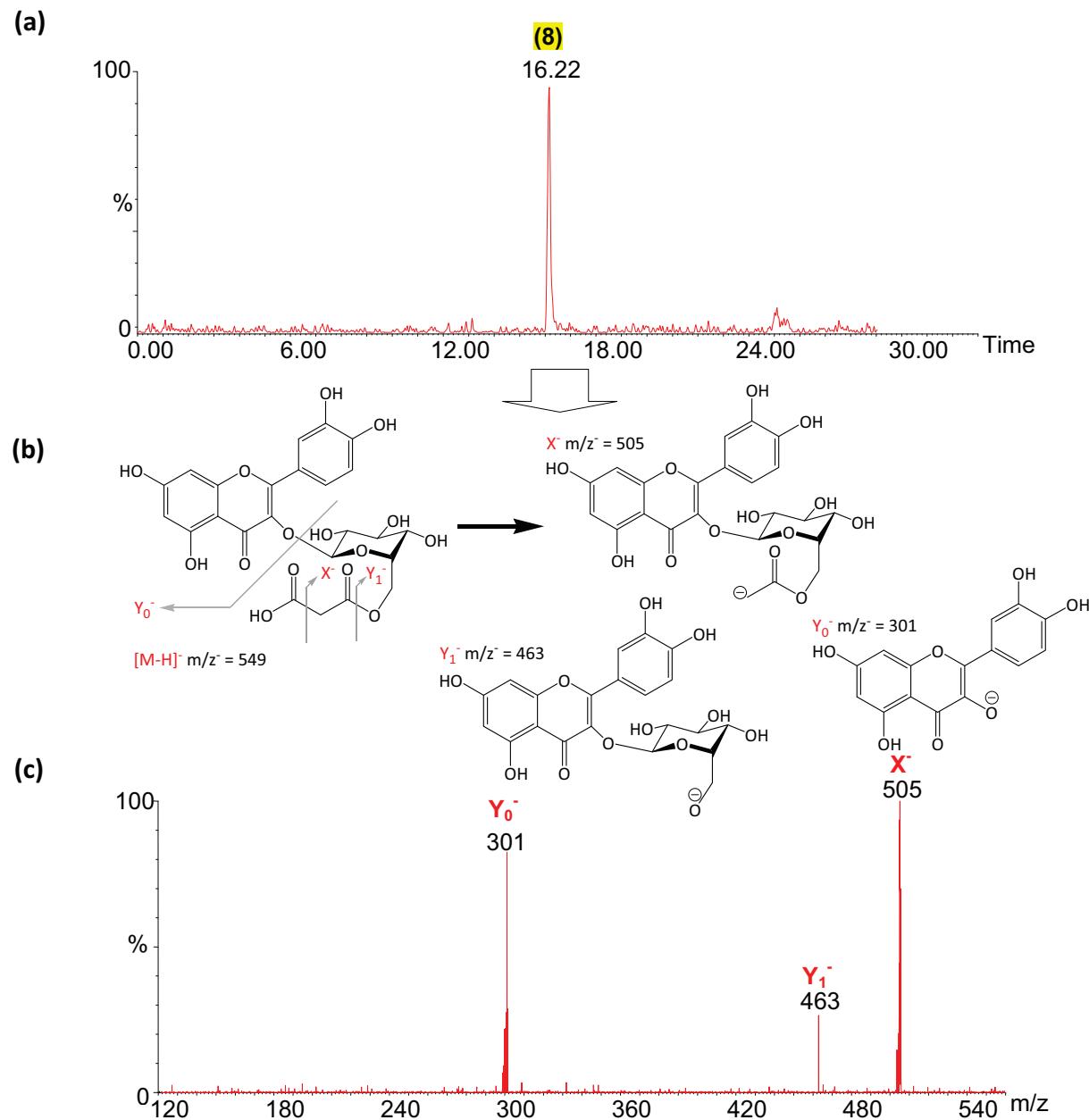


Figura 4.62. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z = 549$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (8) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (8) amb $t_R = 16.22$ min.

4. Resultats i discussió

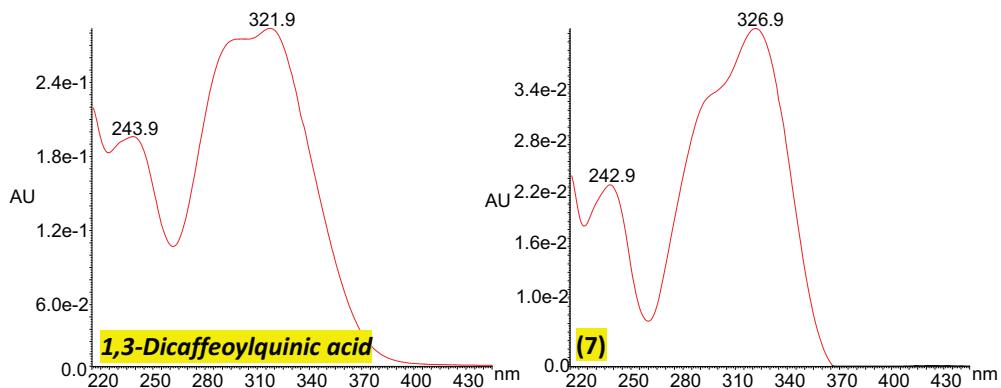


Figura 4.63. Espectre UV del patró de 1,3-dicaffeoylquinic acid (cynarin) (esquerra) i del pic (7) de l'extracte d'enciam (dreta).

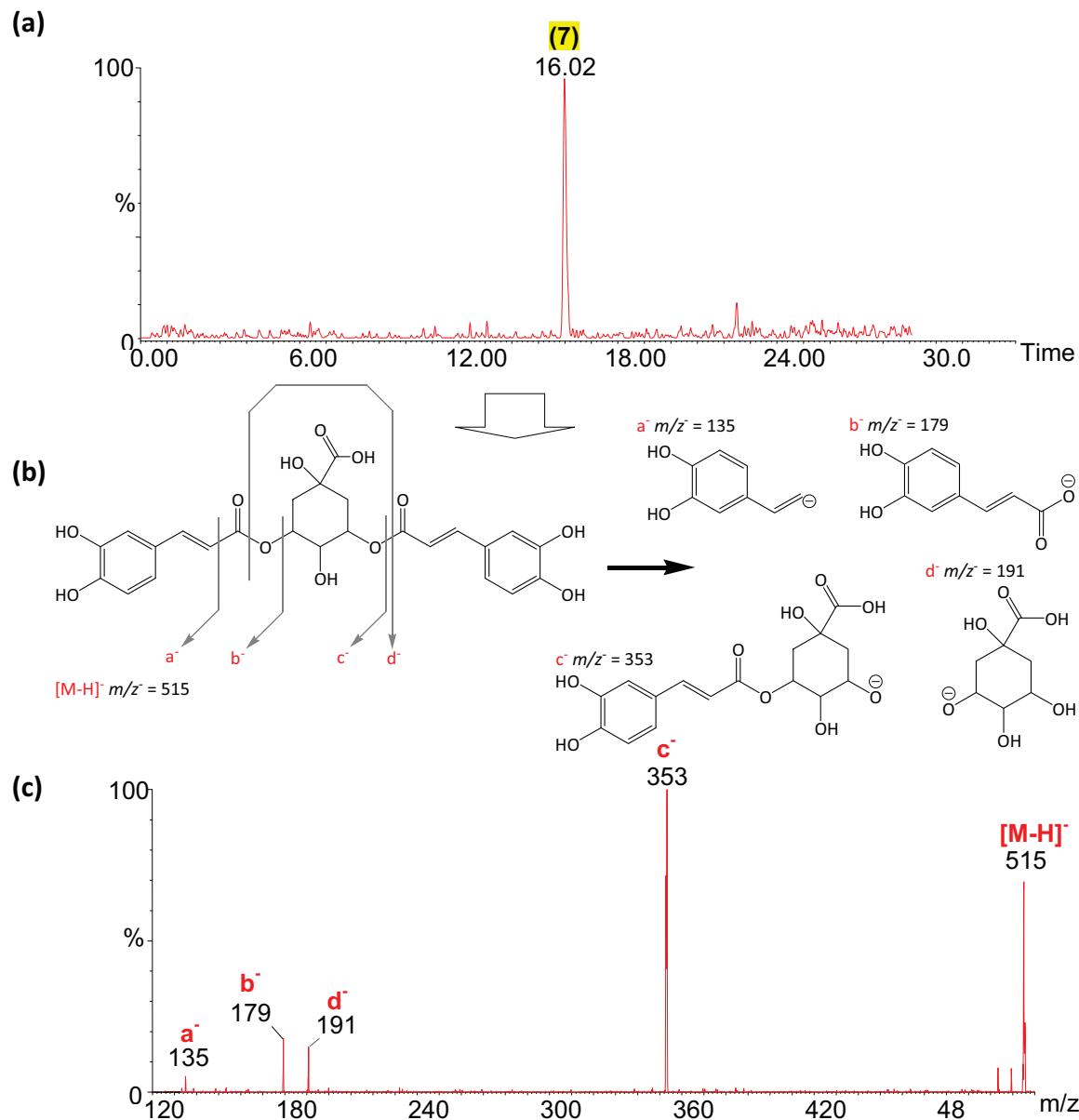


Figura 4.64. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions m/z 515 seleccionats.
(b) Estructura molecular de (7) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (7) amb t_{R} 16,02 min.

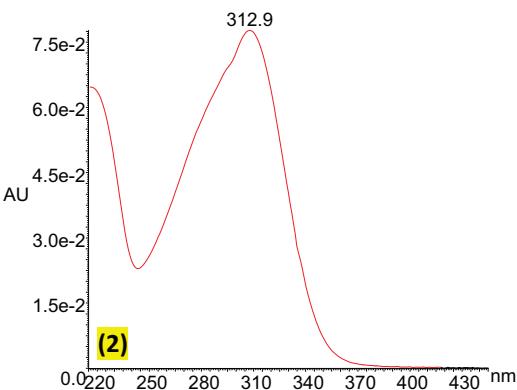


Figura 4.65. Espectre UV del pic (2) de l'extracte d'enciam.

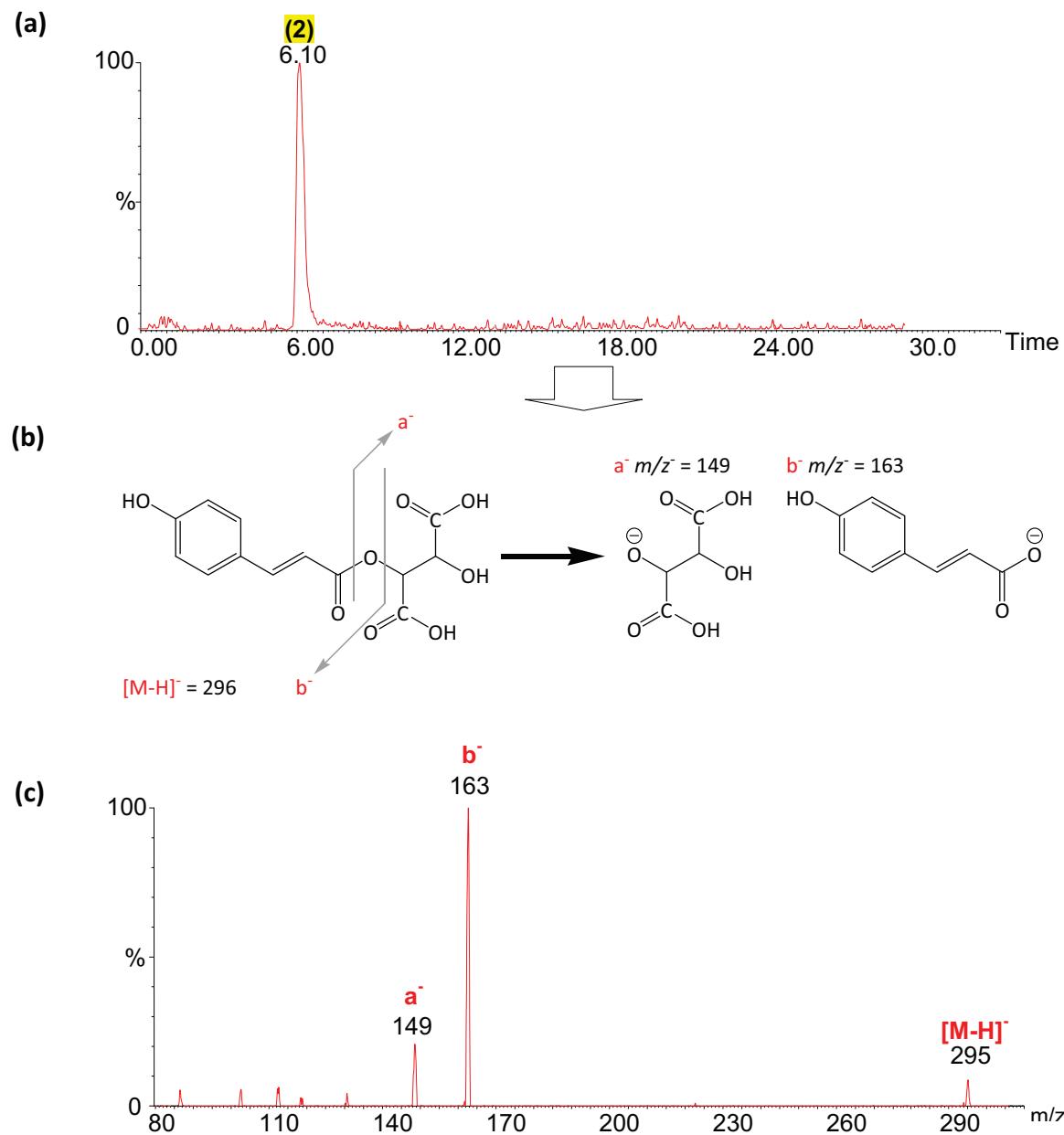


Figura 4.66. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions $m/z = 295$ seleccionats.
(b) Estructura molecular de (2) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (2) amb $t_R = 6.10$ min.

4. Resultats i discussió

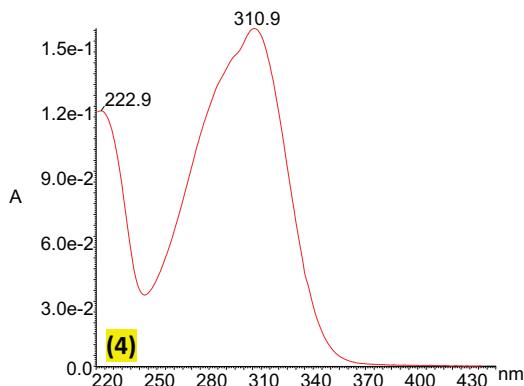


Figura 4.67. Espectre UV del pic (4) de l'extracte d'enciam.

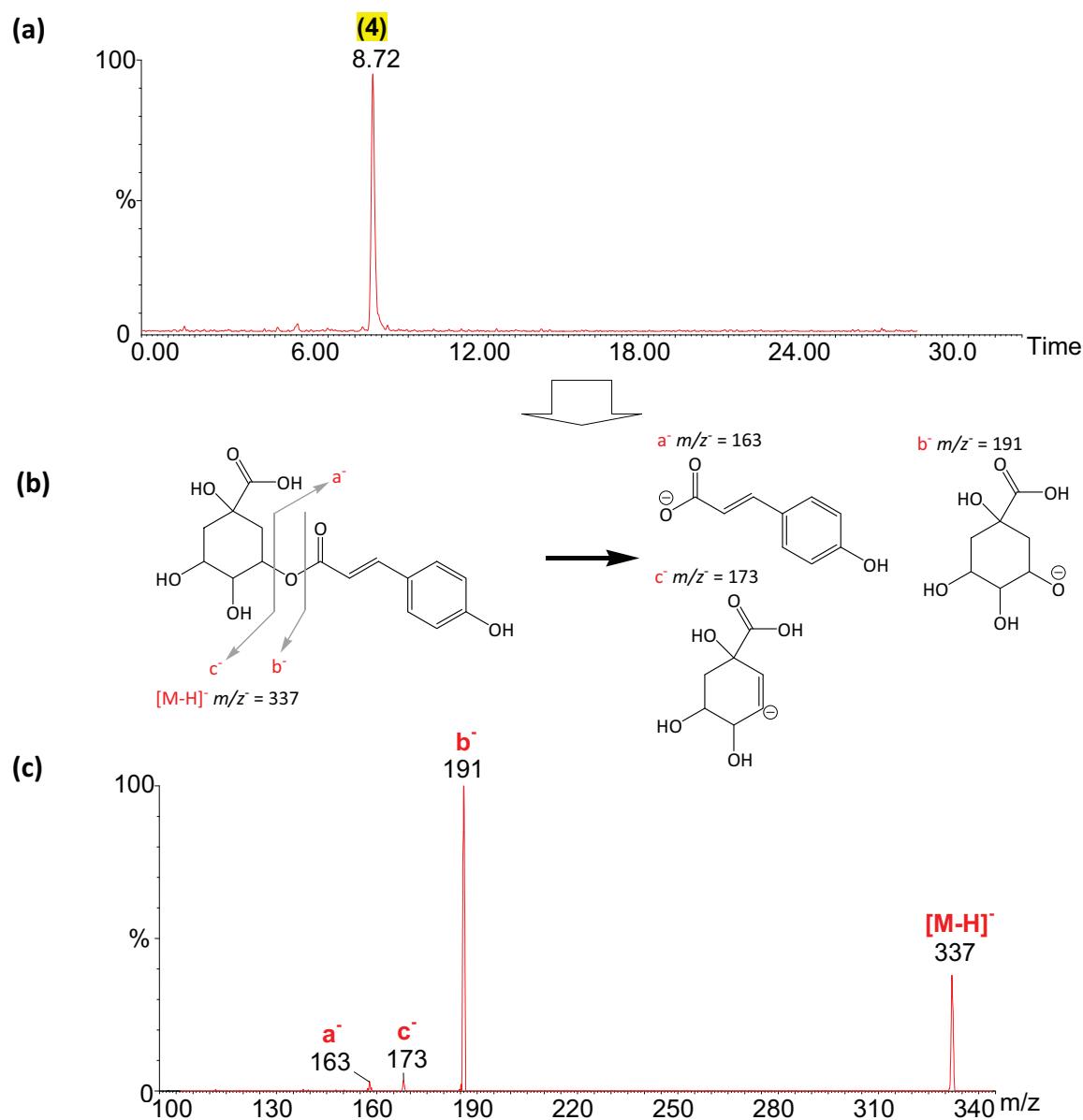


Figura 4.68. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions m/z 337 seleccionats.
(b) Estructura molecular de (4) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (4) amb $t_R = 8.72$ min.

Els espectres UV de (9) i (10) foren determinants per a la seva identificació. La figura 4.69 mostra l'espectre UV dels patrons d'àcid cafeic i àcid *p*-cumàric, així com el dels pics (9) i (10). Els espectres UV de (9) i (10) tingueren una important similitud amb el de l'àcid *p*-cumàric, tot i que, el màxim d'absorció de (9) estigué lleugerament desplaçat, aproximant-se al màxim de l'àcid cafeic.

El valor m/z^- del ió molecular de (10) obtingut per MS fou de 441 (fig. 4.70a). L'espectre de fragmentació de (10) obtingut per MS/MS mostrà principalment els ions de m/z^- 295 i 277 (fig. 4.70c). Aquests valors coincideixen amb el compost *dicoumaroyltartaric acid*, format per l'esterificació de dos *coumaric acids* amb un *tartaric acid*. El ió fill de m/z^- 295 correspongué a la formació del ió $[\text{CoTA} - \text{H}]^-$ per la pèrdua d'un *coumaric acid*, mentre que el de m/z^- 277 a la formació del ió $[\text{CoTA} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$ per la pèrdua d'un *coumaric acid* i una molècula d'aigua. La formació d'aquest últim ió fill és comparable a la observada en el DiCaTA (6), amb la formació del ió $[\text{CaTA} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$ per la pèrdua d'un *caffeic acid* i una molècula d'aigua (Pernice *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008). La pèrdua de la molècula d'aigua pot ser conseqüència de la formació d'un doble o triple enllaç entre dos carbonis (Tsimogiannis *et al.*, 2007). Per MS/MS s'obtingueren altres fragments amb poca abundància relativa, dos dels quals amb m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$) i m/z^- 163 ($[\text{coumaric acid} - \text{H}]^-$). Per confirmar la presència de *coumaric acid* i *tartaric acid* en l'estructura molecular de (10), es féu un anàlisi MS/MS/MS del ió fill amb m/z^- 295 (fig. 4.70c.I), el qual es fragmentà principalment en els ions néts amb m/z^- 163 ($[\text{coumaric acid} - \text{H}]^-$), m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$) i m/z^- 119 ($[\text{coumaric acid} - \text{H} - \text{COOH}]^-$) (Clifford *et al.*, 2003). Aquesta anàlisi MS/MS/MS es considerà necessària donada la impossibilitat de contrastar la informació amb patró comercial o bibliogràficament (no es té coneixement de cap treball previ sobre la identificació d'aquest compost), aportant informació sobre la composició estructural del principal fragment de (10) obtingut per MS/MS. Amb la informació DAD, MS, MS/MS i MS/MS/MS obtinguda, el compost (10) s'identificà provisionalment com a *dicoumaroyltartaric acid* (DiCoTA). La figura 4.70b mostra l'estructura molecular de DiCoTA, i els models de fragmentació MS/MS i MS/MS/MS proposats.

El ió molecular de (9) tingué un valor m/z^- de 457 (fig. 4.71a). El patró de fragmentació de (9) obtingut per MS/MS fou més complex que els anteriors (fig. 4.71c), amb nombrosos fragments, però tots ells ja obtinguts en altres pics: m/z^- 311 ($[\text{CaTA} - \text{H}]^-$), m/z^- 295 ($[\text{CoTA} - \text{H}]^-$), m/z^- 277 $[\text{CoTA} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$, m/z^- 179 ($[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$), m/z^- 163 ($[\text{coumaric acid} - \text{H}]^-$ i m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$)). Els valors MS i MS/MS obtinguts coincidiren amb els esperats per a *coumaroylcaffeoyleyltartaric acid* (CoCaTA), un àcid fenòlic compost per una molècula d'àcid cafeic i una d'àcid cumàric esterificades a àcid tartàric. Com en el cas de (10), no es té disponibilitat de patró comercial ni de referència bibliogràfica, i es va considerar necessària una anàlisi MS/MS/MS dels fragments més significatius obtinguts per MS/MS. Un dels fragments escollits fou el de m/z^- 295 ($[\text{CoTA} - \text{H}]^-$), i tal com s'esperava, s'obtingueren els fragments de m/z^- 163 ($[\text{coumaric acid} - \text{H}]^-$ i m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$)) (Cantos *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2005), a més d'un fragment de m/z^- 119 ($[\text{coumaric acid} - \text{COOH}]^-$, ja descrit per Clifford *et al.*, 2003) (fig. 4.71c.I). L'altre fragment escollit fou el de m/z^- 311 ($[\text{CaTA} - \text{H}]^-$), el qual es fragmentà en fragments de m/z^- 179 ($[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$), m/z^- 149 ($[\text{tartaric acid} - \text{H}]^-$) i també m/z^- 135 ($[\text{caffeic acid} - \text{COOH}]^-$) (Cantos *et al.*, 2002; Llorach *et al.*, 2008) (fig. 4.71c.II). La figura 4.71b mostra l'estructura molecular de CoCaTA, i els models de fragmentació MS/MS i MS/MS/MS proposats.

La taula 4.14 mostra tots els fragments obtinguts per MS/MS dels pics identificats com a derivats d'àcids hidroxicinnàmics, amb la seva descripció i de quins compostos naturals presents en l'enciam s'han obtingut.

4. Resultats i discussió

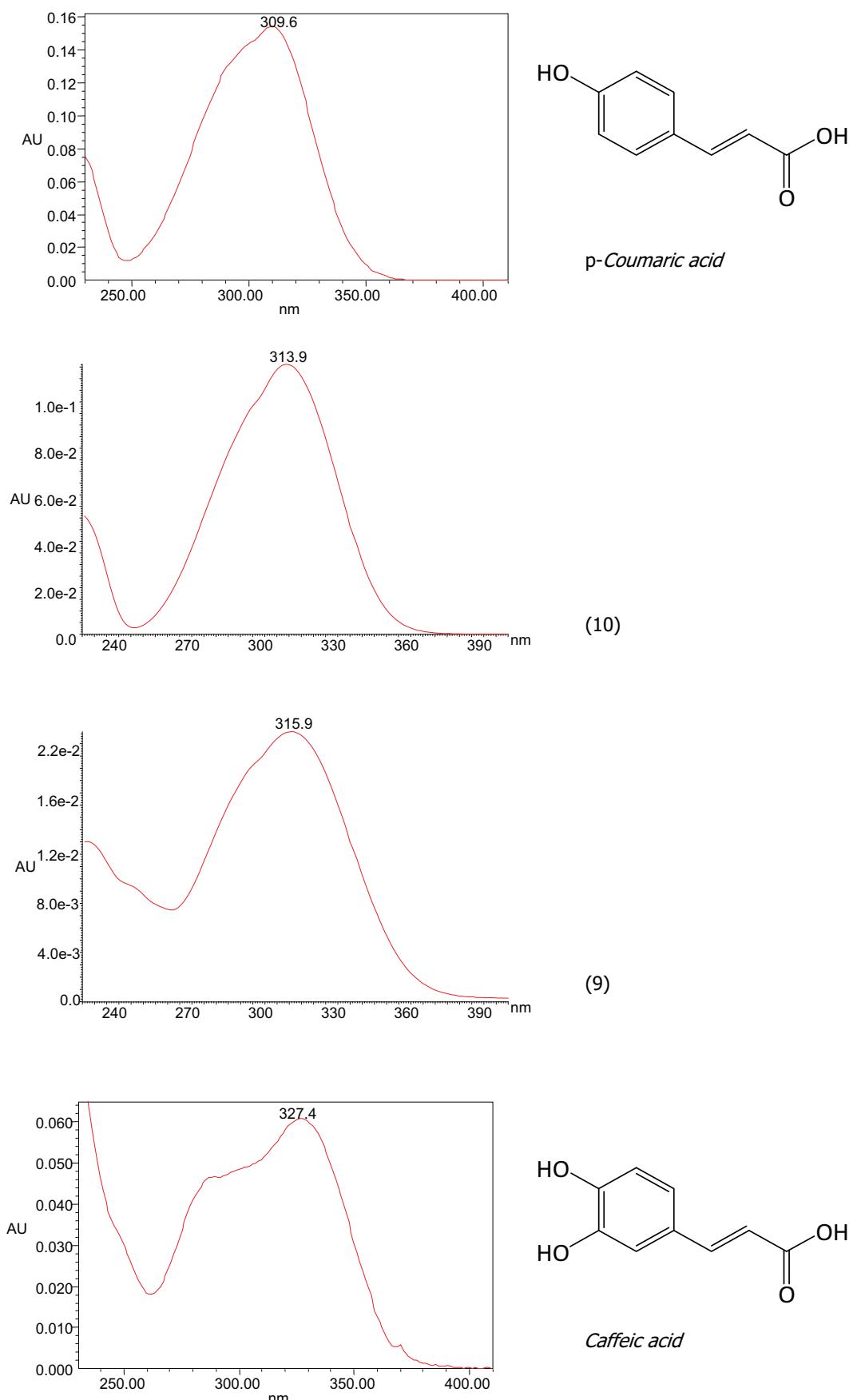


Figura 4.69. Espectres UV dels patrons de p-coumaric acid i caffeic acid, amb les seves estructures moleculars representades, i espectres UV dels pics (9) i (10).

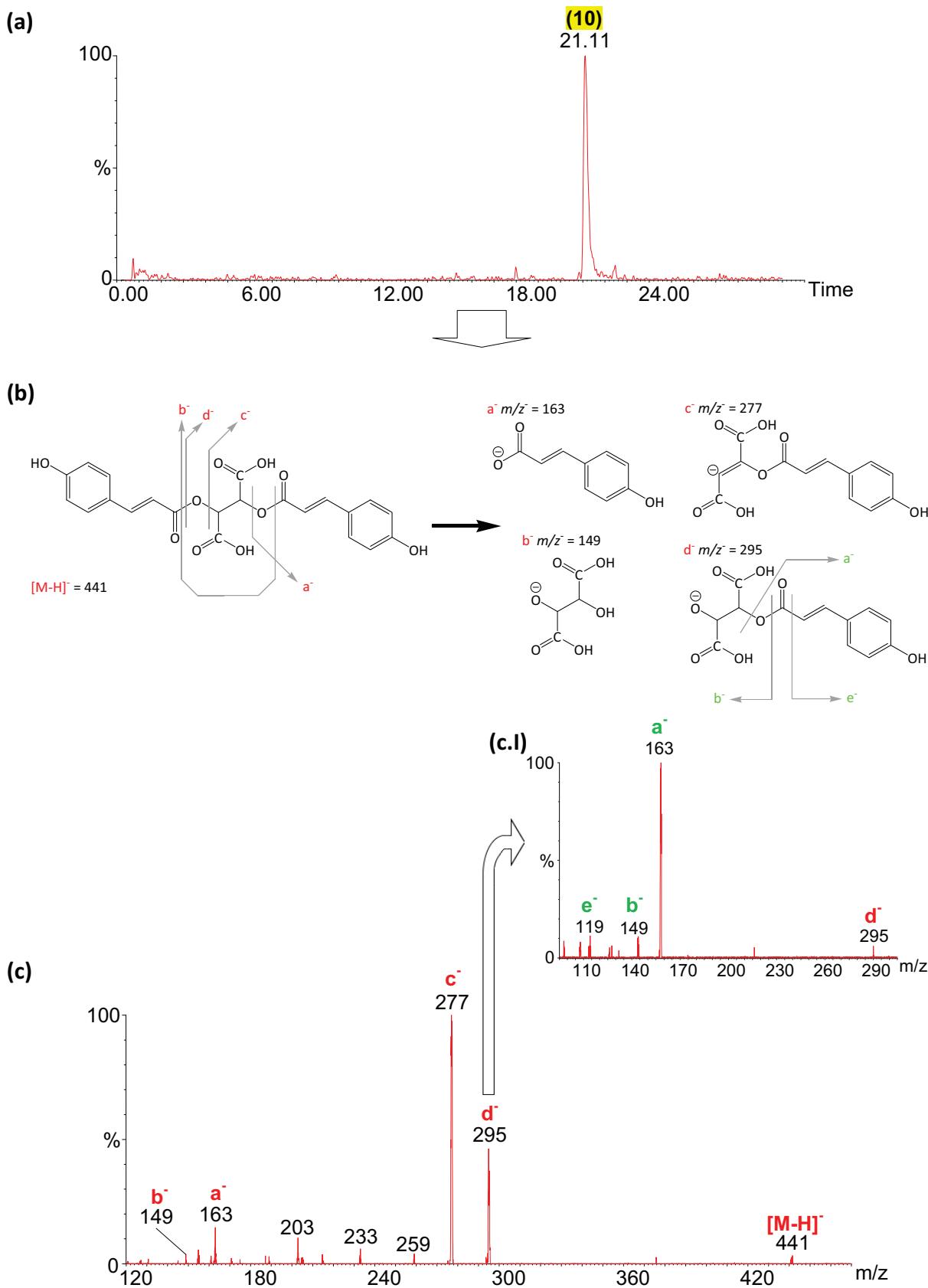


Figura 4.70. (a) MS scan amb selecció dels ions m/z 441.
(b) Estructura molecular de (10) i models de fragmentació MS/MS i MS/MS/MS proposats.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (10) amb t_R 21,12 min.
(c.I) Espectre de fragmentació MS/MS/MS (-15 eV) del fragment (d^-).

4. Resultats i discussió

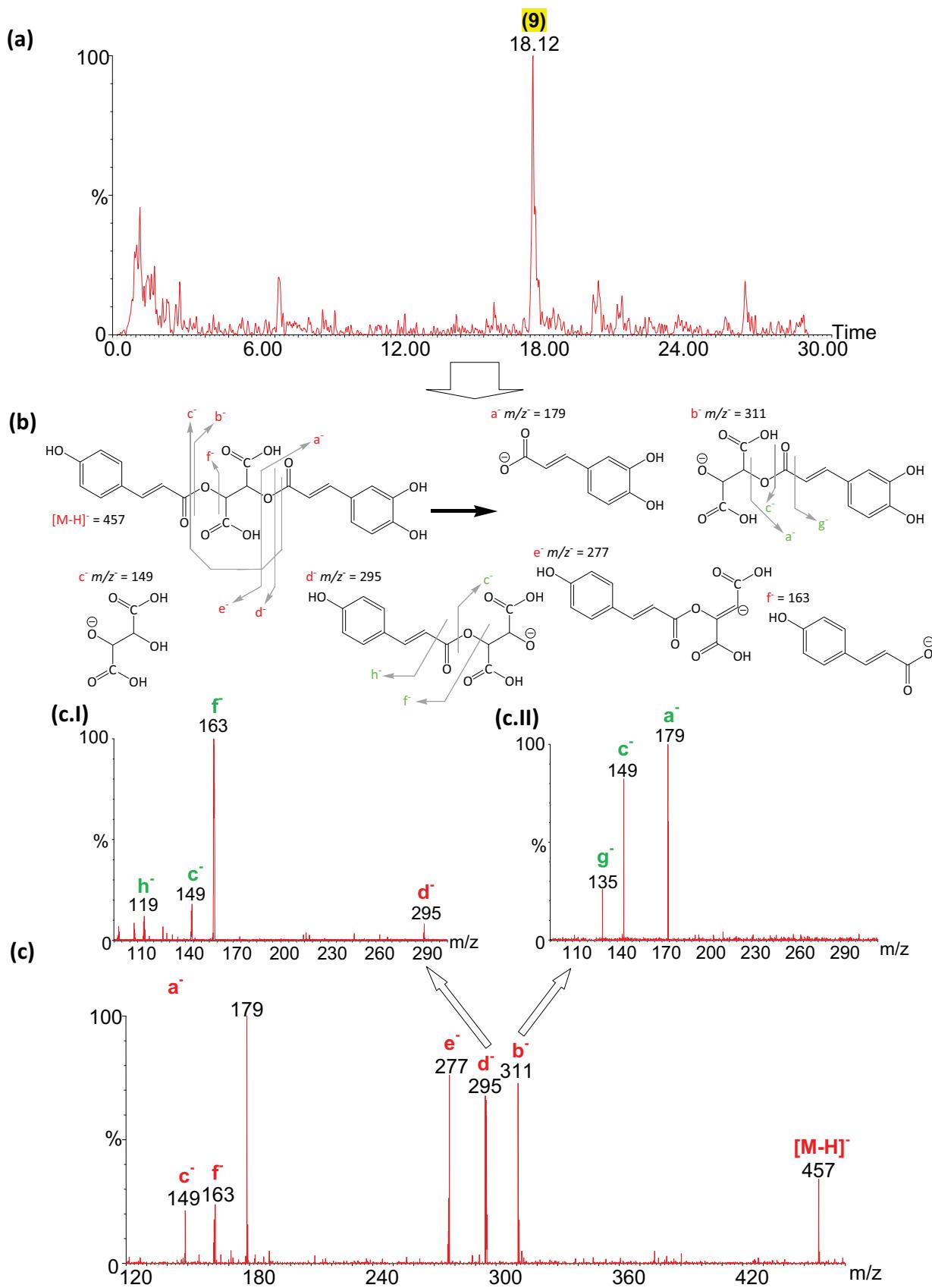


Figura 4.71. (a) MS scan d'extracte d'enciam amb els ions m/z 457 seleccionats.
(b) Estructura molecular de (9) i model de fragmentació MS/MS proposat.
(c) Espectre de fragmentació MS/MS (-15 eV) del compost (9) amb t_r 21,12 min.
(c.I) Espectre de fragmentació MS/MS/MS (-15 eV) del fragment (d⁻).
(c.II) Espectre de fragmentació MS/MS/MS (-15 eV) del fragment (b⁻).

<i>m/z</i>	Identificació fragment	Pics	Identificació pics
135	$[Caffeic\ acid - COOH]^-$	7	3,5-Dicaffeoylquinic acid
		1	Caffeoyltartaric acid
		2	Coumaroyltartaric acid
149	$[Tartaric\ acid - H]^-$	6	Dicaffeoyltartaric acid
		9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
		10	Dicoumaroyltartaric acid
163	$[Coumaric\ acid - H]^-$	2	Coumaroyltartaric acid
		4	Coumaroylquinic acid
		9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
173	$[Quinic\ acid - H_2O - H]^-$	10	Dicoumaroyltartaric acid
		4	Coumaroylquinic acid
		1	Caffeoyltartaric acid
179	$[Caffeic\ acid - H]^-$	6	Dicaffeoyltartaric acid
		7	3,5-Dicaffeoylquinic acid
		9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
191	$[Quinic\ acid - H]^-$	3	5-Caffeoylquinic acid
		4	Coumaroylquinic acid
		7	3,5-Dicaffeoylquinic acid
277	$[Coumaroyltartaric - H_2O - H]^-$	9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
		10	Dicoumaroyltartaric acid
293	$[Caffeoyltartaric - H_2O - H]^-$	6	Dicaffeoyltartaric acid
		9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
295	$[Coumaroyltartaric - H]^-$	10	Dicoumaroyltartaric acid
		6	Dicaffeoyltartaric acid
311	$[Caffeoyltartaric - H]^-$	9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
		7	3,5-Dicaffeoylquinic acid
353	$[Caffeoylquinic\ acid - H]^-$	9	Coumaroylcaffeoyltartaric acid
		7	3,5-Dicaffeoylquinic acid

Taula 4.14. Descripció dels fragments obtinguts per MS/MS en els derivats d'àcids hidroxicinnàmics identificats en enciam.

4.5.2- Anàlisi HPLC-DAD

Identificació HPLC-DAD

Es van adaptar el gradient i la composició de la fase mòbil en HPLC per poder obtenir una separació cromatogràfica comparable a la obtinguda en UPLC. La figura 4.72 mostra un chromatograma d'una solució de patrons. Els compostos fenòlics majoritaris dels extractes d'enciam es separaren en 56 minuts. La identificació dels pics es féu mitjançant la comparació dels espectres UV, temps de retenció i àrea relativa amb els dels pics dels chromatogrames UPLC-DAD, amb anàlisis dels mateixos extractes en els dos sistemes (fig. 4.73). Com passà en les anàlisis de tomàquet, l'ordre d'elució d'alguns components fou diferent en els dos sistemes, probablement degut a les diferències entre les dues fases mòbils. En les condicions chromatogràfiques emprades en HPLC, els dos flavanols es retenen més, i *quercetin-3-O-glucuronide* (5) s'elueix més tard que els dos derivats de *caffeic acid* que el precedien en UPLC (6 i 7), mentre que *quercetin-3-O-malonylglicoside* s'elueix més tard que *cumaroylcaffeoyletaric acid* (9). S'ha fet coincidir la numeració dels pics en UPLC i HPLC, en funció de l'ordre d'elució en UPLC.

La identificació de *caffeoyletaric acid* (1), *5-caffeoylquinic acid* (3), *quercetin-3-O-glucuronide* (6) i *dicaffeoyltartaric acid* (7) fou confirmada amb els respectius patrons comercials, utilitzant extractes fortificats. La resta de compostos fenòlics identificats amb la informació DAD, MS, MS/MS i MS/MS/MS obtinguda però sense patró disponible es consideraren amb identificació provisional. La figura 4.74 mostra els espectres UV de cada un dels compostos identificats en els extractes intactes d'enciam, juntament amb el del compost patró quan aquest fou disponible (excepte *3,5-dicaffeoylquinic acid* (7), que es mostra amb l'espectre UV del patró del seu isòmer *1,3-dicaffeoylquinic acid*). La taula 4.15 resumeix els paràmetres de cada compost emprats per a la seva identificació en els extractes d'enciam avaluats.

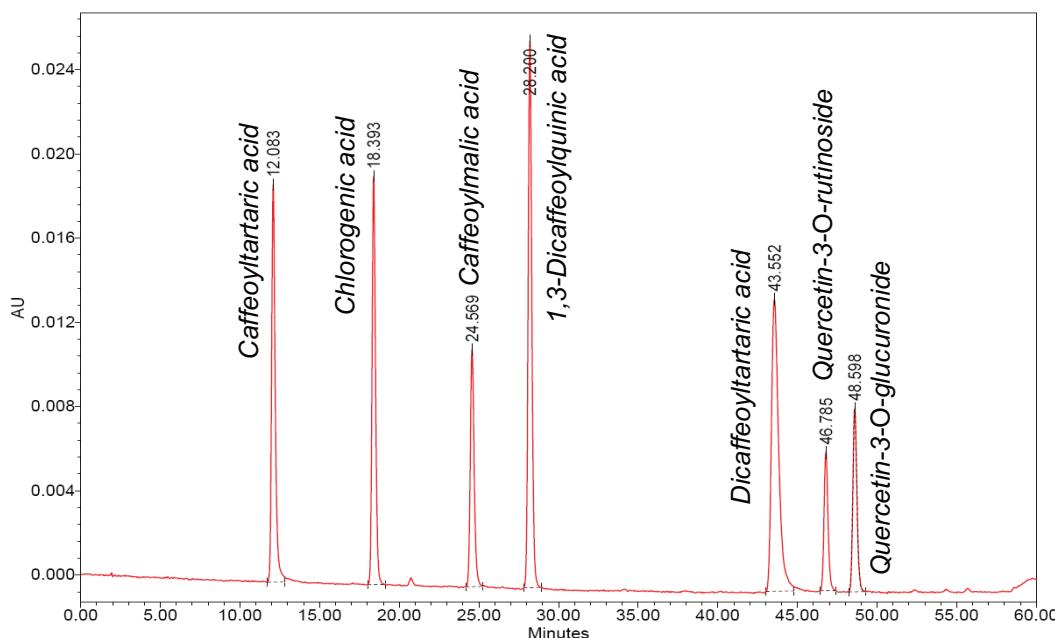


Figura 4.72. Chromatograma HPLC a 330 nm de compostos fenòlics patrons.

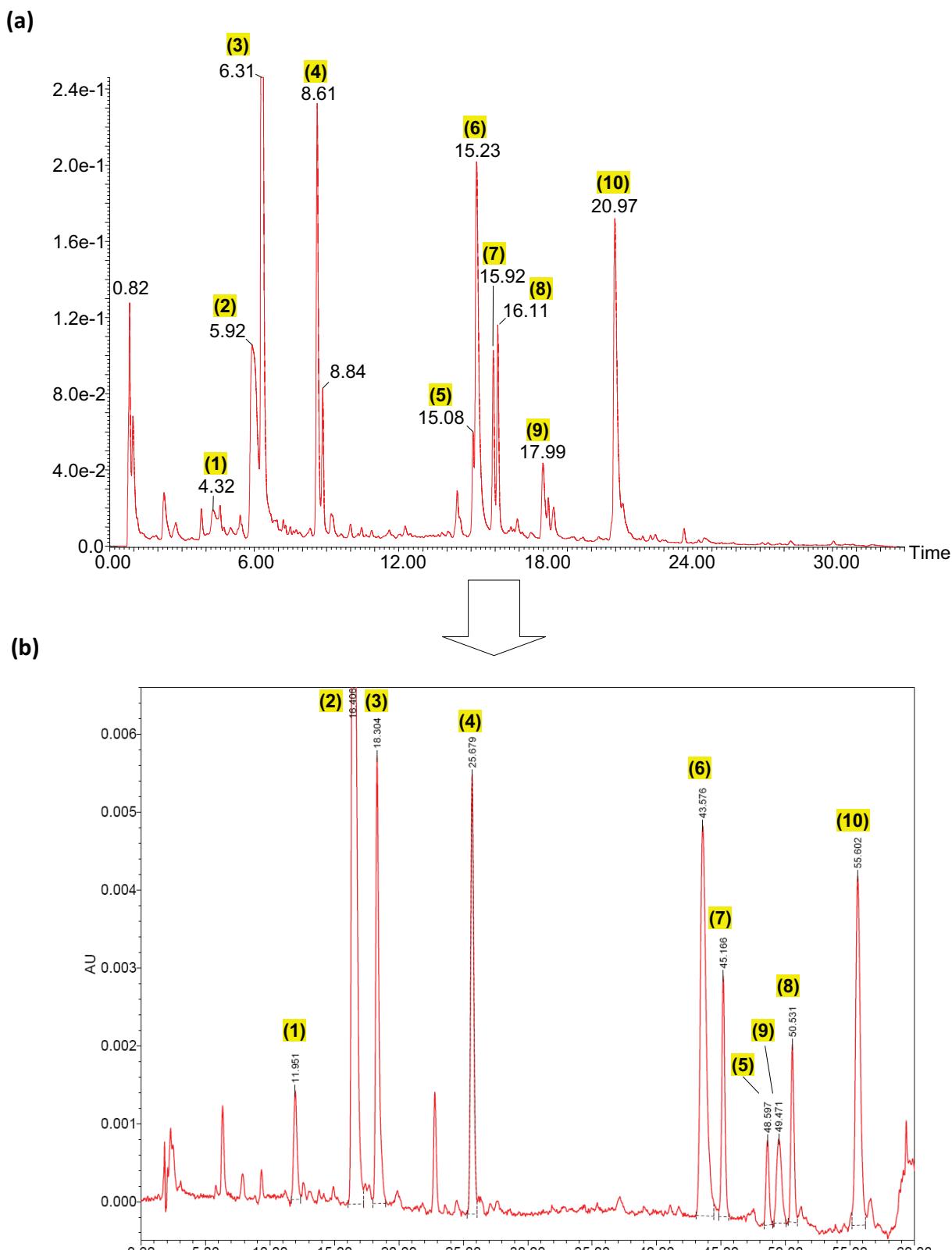


Figura 4.73. Transferència dels pics identificats en un cromatograma UPLC (a) a un cromatograma HPLC (b), els dos registrats a 330 nm. Identificació dels pics:

- (1): Caffeoyltartaric acid; (2): Coumaroyltartaric acid; (3): 5-caffeoylelquinic acid; (4): Coumaroylquinic acid;
- (5): Quercetin-3-O-glucuronide; (6): Dicaffeoyltartaric acid; (7): 3,5-Dicaffeoylquinic acid;
- (8): Quercetin-3-O-malonylglicoside; (9): Coumaroylcafeoyltartaric acid; (10): Dicoumaroyltartaric acid.

4. Resultats i discussió

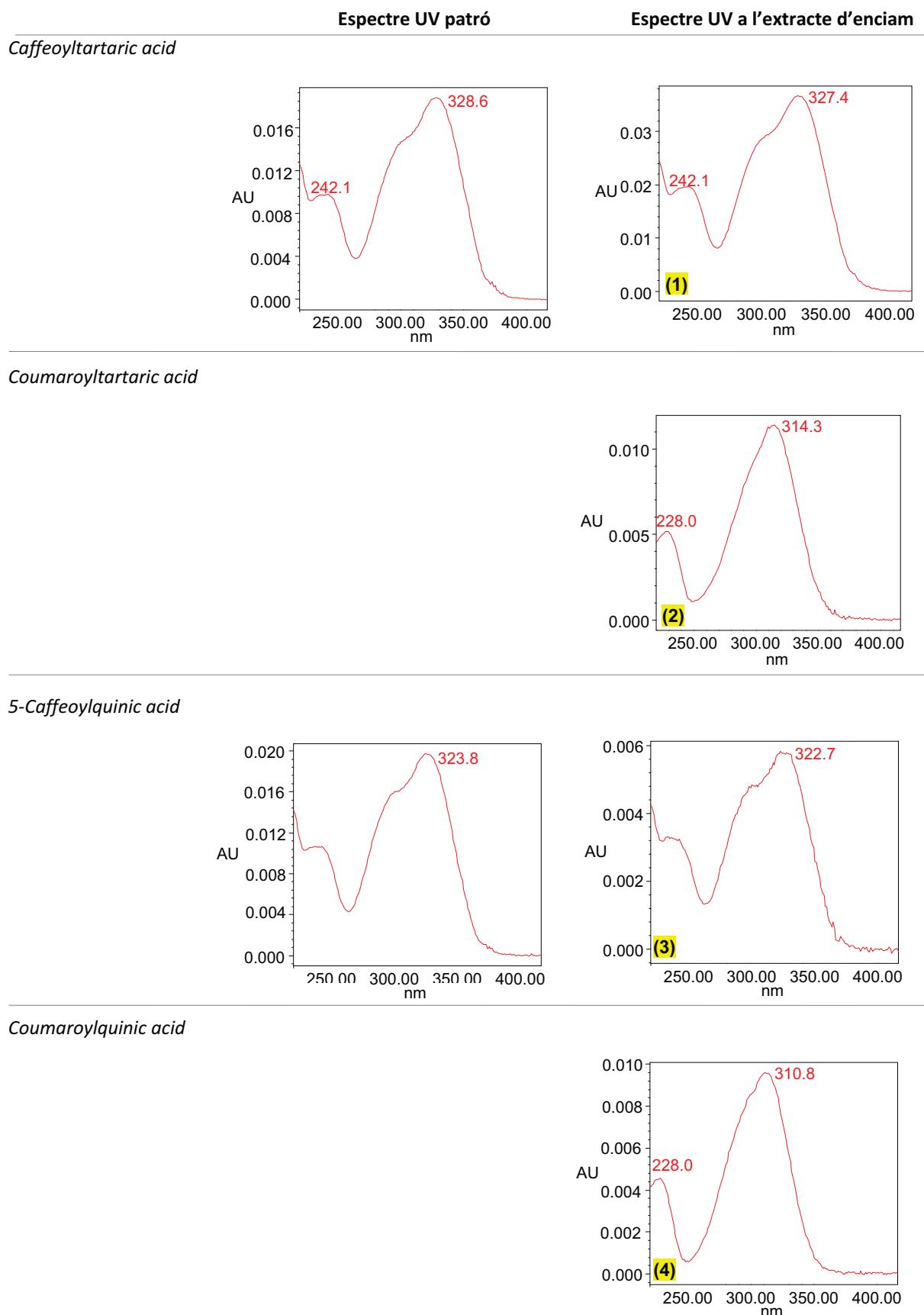


Figura 4.74. Espectre UV dels compostos fenòlics intacles identificats en l'enciam, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continua a la pàgina següent*)

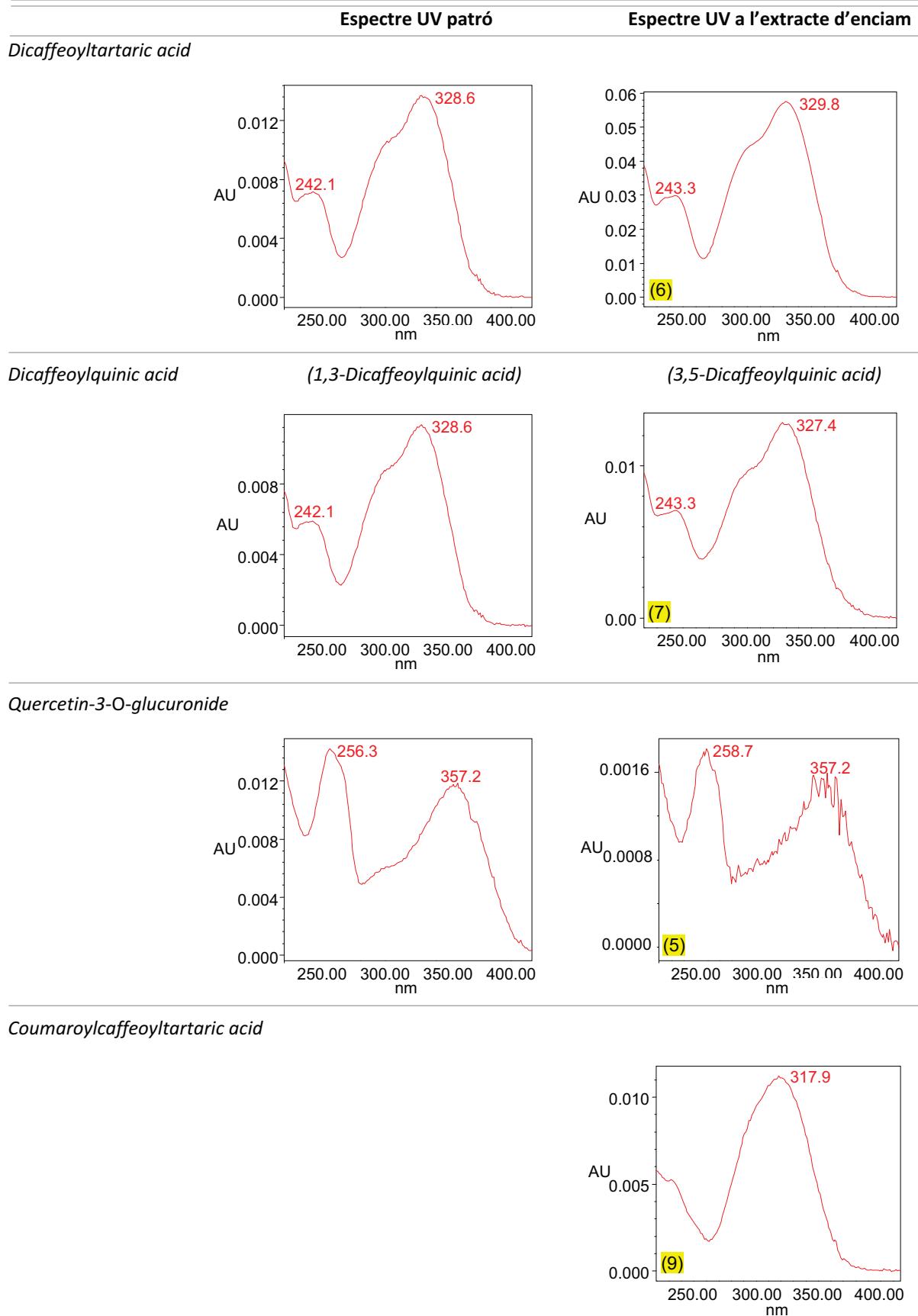


Figura 4.74. Espectre UV dels compostos fenòlics intactes identificats en l'enciam, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continua a la pàgina següent*)

4. Resultats i discussió

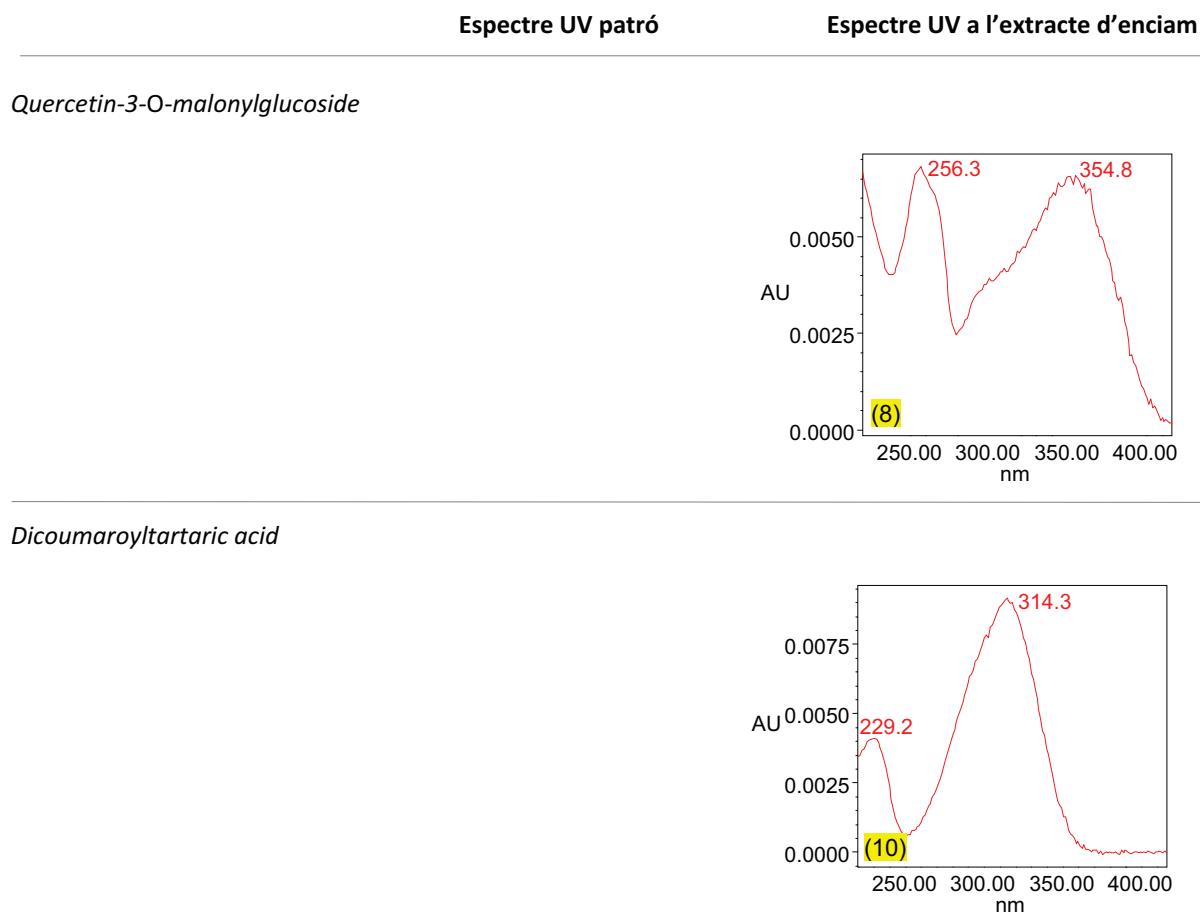


Figura 4.74. Espectre UV dels compostos fenòlics intacles identificats en l'enciam, amb els respectius patrons quan aquests eren disponibles. (*continuació*)

Compost	UPLC-DAD		
	RT típic (min)	Max UV (nm) Enciam	Patrons
(1) Caffeoyltartaric acid - CaTA	4,32	327.	328.
(2) Coumaroyltartaric acid - CoTA	5,92	313.	-
(3) 5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA	6,31	326.	326.
(4) Coumaroylquinic acid - CoQA	8,61	311.	-
(5) Quercetin-3-O-glucuronide - Q-Gluc	15,08	255, 353.	256, 354.
(6) Dicaffeoyltartaric acid - DiCaTA	15,23	328.	328.
(7) 3,5-Dicaffeoylquinic acid - 3,5-DiCaQA	15,92	327.	-
(8) Quercetin-3-O-malonylglucoside - Q-MaGlu	16,11	255, 354.	-
(9) Coumaroylcaffeoyltartaric acid - CoCaTA	17,99	318.	-
(10) Dicoumaroyltartaric acid - DiCoTA	20,97	314.	-

Taula 4.15.

Llista dels compostos fenòlics presents en els extractes d'enciam avaluats.

(a) Temps de retenció típics i màxims UV dels compostos identificats i dels patrons, obtinguts en el sistema UPLC-DAD-MS/MS.

(b) Temps de retenció (mitjana obtinguda de n mostres, amb el coeficient de variació CV) i màxims UV dels compostos identificats i dels patrons, obtinguts en el sistema HPLC-DAD.

Compost	HPLC-DAD							
	Enciam			Patrons				
RT (min)	n	CV (%)	Max UV (nm)	RT (min)	n	CV (%)	Max UV (nm)	
(1) Caffeoyltartaric acid - CaTA	11,82	10	0,23	327.	11,96	7	0,46	329.
(2) Coumaroyltartaric acid - CoTA	16,88	10	0,39	314.	-	-	-	-
(3) 5-Caffeoylquinic acid - 5-CaQA	18,33	10	0,11	323.	18,33	7	0,15	324.
(4) Coumaroylquinic acid - CoQA	25,85	10	0,04	311.	-	-	-	-
(5) Quercetin-3-O-glucuronide - Q-Gluc	48,53	10	0,08	259, 357.	48,60	7	0,04	256, 357.
(6) Dicaffeoyltartaric acid - DiCaTA	43,28	10	0,09	330.	43,54	7	0,11	329.
(7) 3,5-Dicaffeoylquinic acid - 3,5-DiCaQA	44,97	10	0,11	327.	-	-	-	-
(8) Quercetin-3-O-malonylglucoside - Q-MaGlu	50,47	10	0,04	256, 355.	-	-	-	-
(9) Coumaroylcaffeoyltartaric acid - CoCaTA	49,68	10	0,28	318.	-	-	-	-
(10) Dicoumaroyltartaric acid - DiCoTA	55,89	10	0,23	314.	-	-	-	-

4. Resultats i discussió

Quantificació dels compostos fenòlics amb HPLC-DAD

Per a la quantificació dels compostos fenòlics en les mostres analitzades, s'utilitzaren rectes de calibració en matriu. La taula 4.16 mostra esquemàticament els paràmetres relacionats amb la quantificació de cada compost. La quantificació de *caffeoyleltartaric acid*, *5-caffeoylequinic acid*, *dicaffeoyltartaric acid* i *quercetin-3-O-glucuronide* es realitzà mitjançant les rectes patró representades a la figura 4.75. Els altres compostos fenòlics identificats sense disponibilitat de patró es quantificaren amb la recta de calibració en matriu d'un compost fenòlic similar: la recta de calibració de *coumaric acid* s'utilitzà per quantificar els compostos derivats d'aquest àcid hidroxicinnàmic: *coumaroyltartaric acid*, *coumaroylquinic acid* i *dicoumaroyltartaric acid*; *3,5-dicaffeoylquinic acid* es quantificà amb la recta de calibració del seu isòmer *1,3-dicaffeoylquinic acid*; *coumaroylcaffeoyltartaric acid* amb la recta de *dicaffeoyltartaric acid* i *quercetin-3-O-malonylglucoside* amb la recta de *quercetin-3-O-rutinoside*. Les àrees cromatogràfiques de cada compost s'enregistraren en una longitud d'ona propera al seu màxim d'absorció. La quantitat d'aquests compostos s'expressà en "equivalents" del compost utilitzat per a la recta de calibració, i es calculà considerant la diferència de pesos moleculars entre el compost quantificat i el compost utilitzat per a la recta.

	Compost	λ	Concentració expressada en equivalents de:
(1)	<i>Caffeoyltartaric acid</i>	330	-
(2)	<i>Coumaroyltartaric acid</i>	310	<i>Coumaric acid</i>
(3)	<i>5-Caffeoylquinic acid</i>	330	-
(4)	<i>Coumaroylquinic acid</i>	310	<i>Coumaric acid</i>
(5)	<i>Quercetin-3-O-glucuronide</i>	350	-
(6)	<i>Dicaffeoyltartaric acid</i>	330	-
(7)	<i>3,5-Dicaffeoylquinic acid</i>	330	<i>1,3-Dicaffeoylquinic acid</i>
(8)	<i>Quercetin-3-O-malonylglucoside</i>	350	<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>
(9)	<i>Coumaroylcaffeoyltartaric acid</i>	330	<i>Dicaffeoyltartaric acid</i>
(10)	<i>Dicoumaroyltartaric acid</i>	310	<i>Coumaric acid</i>

Taula 4.16. Longitud d'ona utilitzada en DAD per a l'enregistrament de les àrees cromatogràfiques de cada compost (λ) i expressió dels resultats en equivalents dels compostos sense patró disponible.

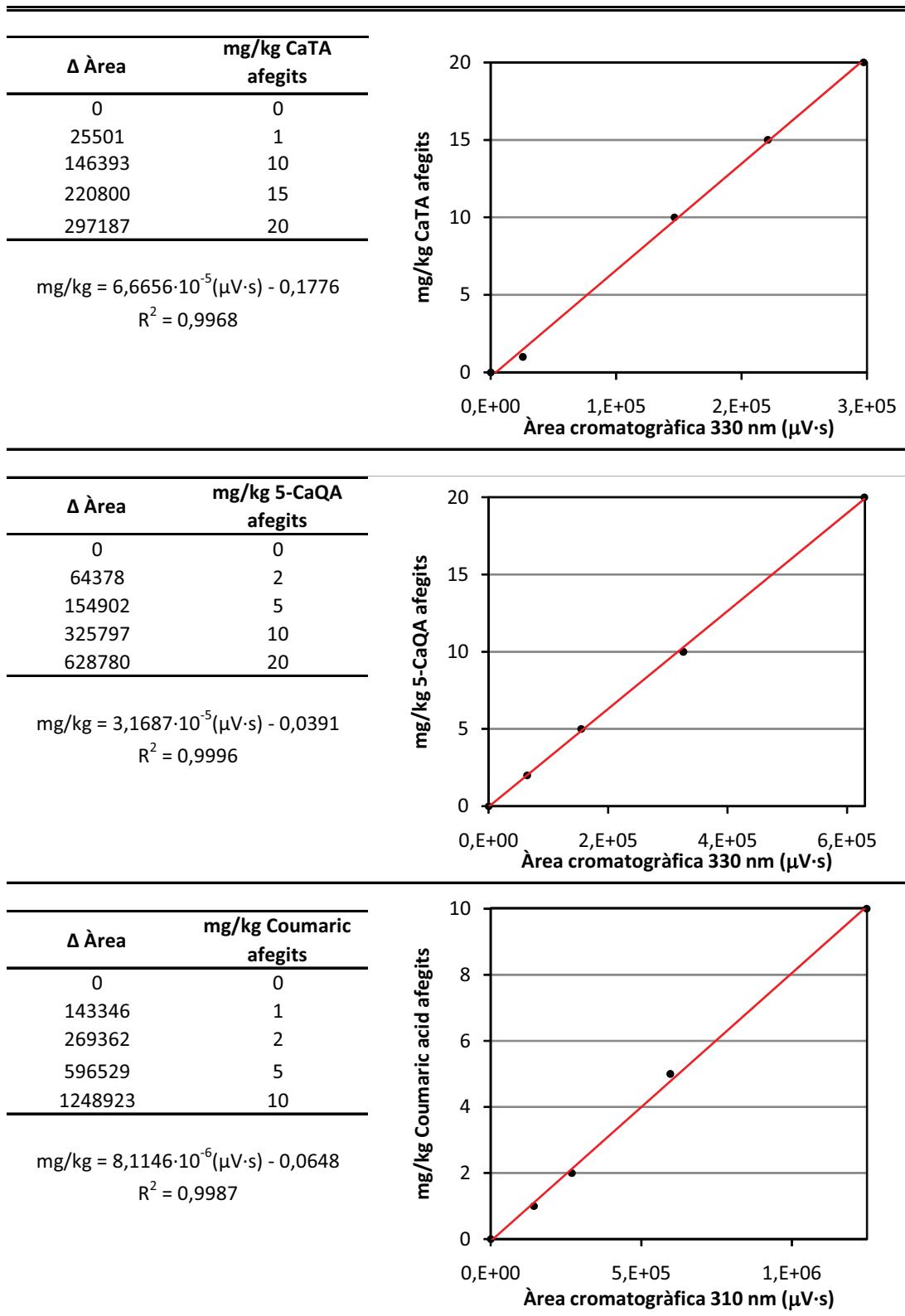


Figura 4.75. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes d'enciam.
 Δ Àrea fa referència a l'increment d'àrea respecte a la mostra sense fortificació.
(continua a la pàgina següent)

4. Resultats i discussió

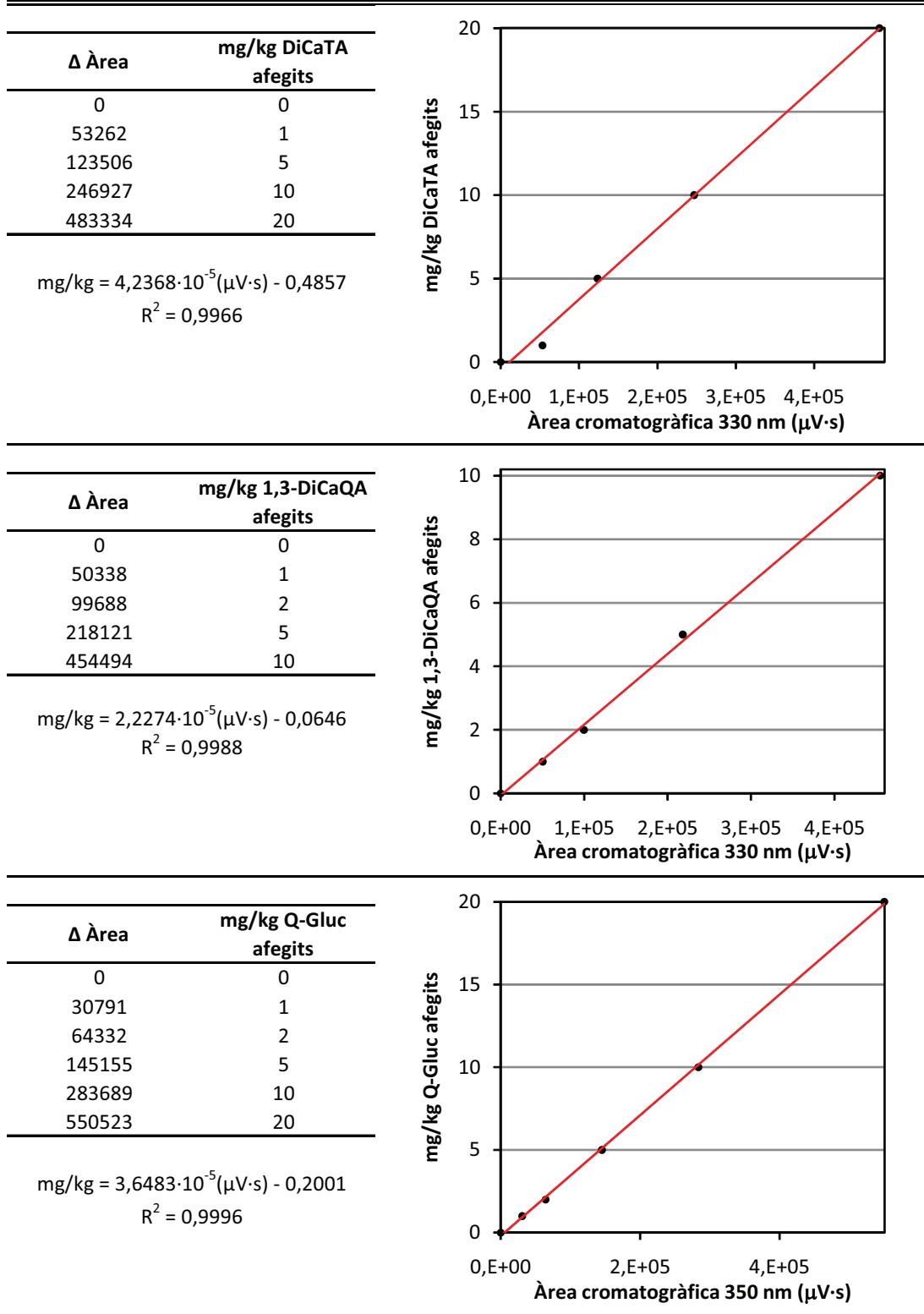


Figura 4.75. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes d'enciam.
 Δ Àrea fa referència a l'increment d'àrea respecte a la mostra sense fortificació.
(continua a la pàgina següent)

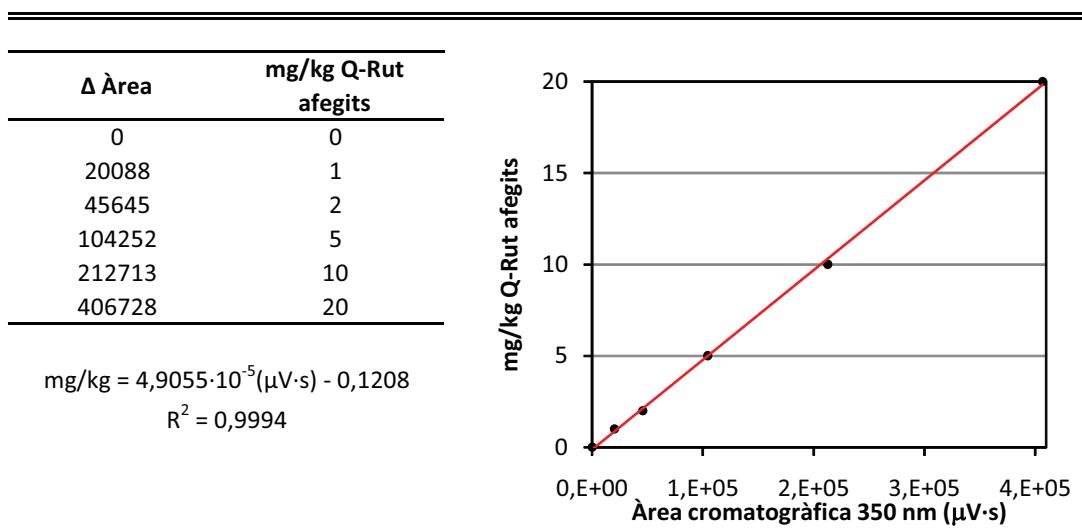


Figura 4.75. Rectes de calibració dels compostos fenòlics quantificats en els extractes d'enciam.
 $\Delta \text{Àrea}$ fa referència a l'increment d'àrea respecte a la mostra sense fortificació.
(continuació)

Plats teòrics

Els plats teòrics obtinguts per a cada compost fenòlic patró, amb el mètode d'anàlisi HPLC-DAD, es mostren a la taula 4.17.

	ng	t_R (min)	$W\frac{1}{2}$ (min)	N
<i>Caffeoyltartaric acid</i>	200	12,617	0,22	18.221
<i>Caffeoylmalic acid</i>	100	24,569	0,25	53.506
<i>5-Caffeoylquinic acid</i>	200	19,004	0,23	37.822
<i>Coumaric acid</i>	2.000	27,910	0,29	51.314
<i>1,3-dicaffeoylquinic acid</i>	200	28,715	0,24	79.306
<i>Dicaffeoyltartaric acid</i>	200	43,426	0,35	85.285
<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	200	46,894	0,25	194.924
<i>Quercetin-3-O-glucuronide</i>	100	48,598	0,27	179.481

Taula 4.17. Plats teòrics obtinguts per als patrons dels compostos fenòlics. Els valors fan referència a una quantitat de compost patró injectada al sistema HPLC-DAD (ng). Abreviatures: t_R : temps de retenció; $W\frac{1}{2}$: amplada del pic a mitja altura; N: nombre de plats teòrics.

Límit de detecció

La taula 4.18 mostra els límits de detecció (LOD) obtinguts per a cada compost fenòlic identificat en enciam, amb els paràmetres utilitzats per al seu càlcul. Les LOD obtingudes comprenen valors entre 144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (144 ppb) i 610 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en pes fresc. Els valors de LOD obtinguts en enciam són més alts que els obtinguts en tomàquet, degut al procediment utilitzat per al càlcul. En el càlcul del LOD de l'anàlisi de compostos fenòlics en tomàquet, es va utilitzar una mescla pura de patrons, obtenint cromatogrames on

4. Resultats i discussió

el soroll de la línia base era produït per la imprecisió del senyal elèctric generat pel PDA. En canvi, en el càlcul del LOD de l'anàlisi de compostos fenòlics en enciam, el soroll de la línia base era fonamentalment conseqüència de la matriu analitzada (més important que el soroll elèctric), en utilitzar-se una mostra d'extracte d'enciam en comptes d'una mescla pura de patrons.

	LOD ($\mu\text{g/kg}$)
<i>Caffeoyltartaric acid</i>	580
<i>Coumaroyltartaric acid</i>	243
<i>5-Caffeoylquinic acid</i>	200
<i>Coumaroylquinic acid</i>	144
<i>Quercetin-3-O-glucuronide</i>	160
<i>Dicaffeoyltartaric acid</i>	610
<i>3,5-Dicaffeoylquinic acid</i>	190
<i>Quercetin-3-O-malonylglucoside</i>	260
<i>Coumaroylcaffeoyltartaric acid</i>	319
<i>Dicoumaroyltartaric acid</i>	281

Taula 4.18. LOD obtinguts per als compostos fenòlics de l'enciam.

Repetibilitat del mètode

Com en l'anàlisi dels compostos fenòlics en tomàquet, la repetibilitat intra-dia del mètode en enciam fou variable segons el compost fenòlic (coeficients de variació representats a la taula 4.19). *3,5-Dicaffeoylquinic acid* fou el compost amb la repetibilitat més baixa, mentre que *coumaroylquinic acid* fou el compost amb la més alta (coeficient de variació més baix).

	CV									
CaTA	CoTA	5-CaQA	CoQA	Q-Gluc	DiCaTA	3,5-DiCaQA	Q-MaGlu	CoCaTA	DiCoTA	
7,42 %	4,70 %	7,31 %	4,12 %	8,61 %	7,82 %	12,32 %	10,43 %	7,89 %	7,98 %	

Taula 4.19. Valors de coeficient de variació (CV) mitjans obtinguts en analitzar tres enciams per triplicat.
(per detall de les abreviatures vegeu taula 4.15)

Mostres analitzades

El mètode HPLC-DAD descrit permet la quantificació de deu compostos fenòlics majoritaris de forma rutinària i relativament senzilla, amb la prèvia identificació dels compostos per UPLC-DAD-MS/MS. La taula 4.20 mostra els valors mínims i màxims obtinguts en l'anàlisi de deu mostres d'enciam. Els derivats d'àcid cafeic foren els principals compostos fenòlics dels enciams analitzats, seguidament dels derivats de d'àcid cumàric. Aquests es trobaren esterificats amb àcid tartàric o bé àcid quínic; el més important en les mostres analitzades fou l'àcid xicòric (*dicaffeoyltartaric acid*). El principal flavonoide en les mostres d'enciam analitzades fou el flavonol glicosilat *quercetin-3-O-malonylglucoside*.

Els resultats obtinguts concorden amb altres treballs publicats realitzats en enciam (Ferrer *et al.*, 1997; Romani *et al.*, 2002; Caldwell, 2003; Llorach *et al.*, 2004; Nicolle *et al.*, 2004; Llorach *et al.*, 2008) pel que fa a la identificació dels èsters d'àcid cafeic amb àcid quínic i tartàric com a principals compostos fenòlics de l'enciam. A més a més, s'identifiquen quatre compostos nous, èsters d'àcid cumàric amb àcid quínic i àcid tartàric, els quals no han estat identificats per cap treball previ en enciam que es tingui constància. Els treballs de Serafini *et al.* (2002) i Altunkaya i Gökmen (2009) fan referència a la presència d'àcid cumàric en mostres d'enciam (el primer treball després d'un tractament d'hidròlisi).

mg/kg PF				
CaTA	CoTA ¹	5-CaQA	CoQA ¹	Q-Gluc
15,8 – 70,7	2,0 – 5,2	9,4 – 43,1	2,6 – 5,8	0,4 – 3,7
<hr/>				
DiCaTA	3,5-DiCaQA ²	Q-MaGlu ⁴	CoCaTA ³	DiCoTA ¹
24,1 – 198,1	2,3 – 16,7	2,4 – 14,0	6,4 – 14,0	2,6 – 5,8

Taula 4.20. Rangs de concentracions (mínim-màxim) obtinguts dels compostos fenòlics majoritaris de les deu mostres d'enciam analitzades.

Abreviatures: **PF:** en pes fresc. ⁽¹⁾: equivalents de *cumaric acid*; ⁽²⁾: equivalents de 1,3-DiCaQA; ⁽³⁾: equivalents de DiCaTA; ⁽⁴⁾: equivalents de Q-Rut.

(per detall de les abreviatures vegeu taula 4.15)

5. Conclusions

Les conclusions que es desprenden d'aquest estudi són les següents:

- El mètode HPLC-DAD desenvolupat per a l'anàlisi de vitamina C permet la separació cromatogràfica de l'àcid ascòrbic en només dos minuts i mig, amb un baix consum de fase mòbil 100 % aquosa (minimització de la generació de residus). S'estableix un protocol relativament senzill i eficaç per a la quantificació de la vitamina C total (àcid ascòrbic i àcid dehidroascòrbic) en matrius vegetals (tomàquet i enciam).
- Per UPLC-DAD-MSⁿ s'ha pogut identificar deu compostos fenòlics majoritaris dels tomàquets i deu compostos fenòlics majoritaris dels enciams. La varietat sembla ser un factor important en la presència de compostos fenòlics en els tomàquets; les tres varietats analitzades presentaren un perfil clarament diferenciat. La composició en compostos fenòlics de l'enciam també sembla molt variable. De la mateixa manera que no s'ha detectat la presència en les mostres analitzades d'alguns compostos citats per la bibliografia (p.ex. *caffeoymalic acid*, *quercetin-3-O-glucoside*, *cyanidin-3-malonylglucoside*, *luteolin-7-glucuronide*), s'ha identificat quatre compostos que no han estat esmentats per treballs previs en enciam, que es tingui constància. Tots aquests compostos són derivats d'àcid cumàric: *coumaroylquinic acid*, *coumaroyltartaric acid*, *coumaroylcaffeoyletaric acid* i *dicoumaroyltartaric acid*.
- S'ha desenvolupat un mètode HPLC-DAD per a la quantificació dels compostos majoritaris en el tomàquet i en l'enciam, amb una metodologia relativament simple en comparació amb treballs publicats anteriorment. Es descarta la idoneïtat de realitzar una hidròlisi dels extractes.
- En general, els mètodes HPLC-DAD d'anàlisi de vitamina C i compostos fenòlics en enciam i tomàquet desenvolupats requereixen una preparació de la mostra considerablement ràpida, condició important per realitzar estudis sobre l'impacte dels factors agronòmics sobre la qualitat nutricional dels vegetals, en els quals s'ha d'analitzar un nombre elevat de mostres.

5. Conclusions

6. Bibliografia

Abad-García B., Berrueta L.A., López-Márquez D.M., Crespo-Ferrer I., Gallo B., Vicente F. (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.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Table de composition Cional 2008, <http://www.afssa.fr/TableCINAL/index.htm>.

Agilent Technologies (2009). <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/Icandlc-ms/zorbaxsb-aqreversedphasehplc/pages/default.aspx>

Agudo A., Cabrera L., Amiano P., Ardanaz E., Barricarte A., Berenguer T., Chirlaque M.D., Dorronsoro M., Jakobsen P., Larrañaga N., Martínez C., Navarro C., Quirós J.R., Sánchez M.J., Tormo M.J., González C.A. (2007). Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *American Journal of Clinical Nutrition* 85, 1634-1642.

Altunkaya A., Gökmén V. (2009). Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). *Food Chemistry* 117, 122-126.

Amaral J.S., Ferreres F., Andrade P.B., Valentão P., Pinheiro C., Santos A., Seabra R. (2005). Phenolic profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars grown in Portugal. *Natural Product Research* 19, 157-163.

Andersen Ø.M., Markham K.R. (2006). Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. *Taylor and Francis*, Boca Raton, EEUU.

Asami D.K., Hong Y.-J., Barrett D.M., Mitchell A.E. (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.

Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma O.I. (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.

Benhamou N., Kloepper J.W., Tuzun S. (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.

Benzie I.F.F. (1999). Vitamin C: prospective functional markers for defining optimal nutritional status. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 469-476.

Brat P., Georgé S., Bellamy A., Du Chaffaut L., Scalbert A., Mennen L., Arnault N., Amiot M.J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *The Journal of Nutrition* 136, 2368-2373.

Brause A.R., Woppard D.C., Indyk H.E. (2003). Determination of total vitamin C in fruit juices and related products by liquid chromatography: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 86, 367-374.

6. Bibliografia

- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Burini G. (2007). Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1154, 97-102.
- Caldwell C. (2003). Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 4589-4595.
- Cantos E., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A. (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grapes cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5691-5696.
- Chassy A.W., Bui L., Renaud E.N.C., Van Horn M., Mitchell A.E. (2006). Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8244-8252.
- Clifford M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362-372.
- Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2900-2911.
- Clifford M.N., Knight S., Kuhnert N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3821-3832.
- Clifford M.N., Weiguo W., Kirkpatrick J., Kuhnert N. (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.
- Colley M.R., Luna J.M. (2000). Relative attractiveness of potential beneficial insectary plants to aphidophagous hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Environmental Entomology* 29, 1054-1059.
- Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S., Black C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 590-595.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26, 965-1096.
- Cuyckens F., Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39, 1-15.
- Daayf F., Lattanzio V. (2008). Recent advances in polyphenol research. *Wiley-Blackwell*, Oxford, Regne Unit.
- Davey M.W., Van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. (2000). Review Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 825-860.
- De Leenheer A., Lambert W. E., Nelis H.J. (1992). Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. *Marcel Dekker Inc.*, Gant, Bèlgica.

Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) (2000). El sector agrari a Catalunya. Evolució, anàlisi i estadístiques (1986-2000). *Generalitat de Catalunya*, Barcelona.

Dorais M., Ehret D.L., Papadopoulos A.P. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews* 7, 231-250.

DuPont M.S., Mondin Z., Williamson G., Price K.R. (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.

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH) (2009). SwissFIR, Base de données suisse des valeurs nutritives, version on-line 2.11,
<http://www.swissfir.ethz.ch/datenbank>

Erdman J.W., Valentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J. (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition* 137, 718-737.

Erlejman A.G., Jaggers G., Fraga C.G., Oteiza P.I. (2008). TNF α -induced NF- κ B activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476, 186-195.

Ferrer F., Gil M.I., Castañer M., Tomás-Barberán F.A. (1997). Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4249-4254.

Fischer H.O.L., Dangschat G. (1932). Konstitution der chlorogensäure (3. mitteil. über chinasäure derivata). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 65 (6), 1037-1040.

Fofana B., McNally D., Labbé C., Boulanger R., Benhamou N., Séguin A., Bélanger R.R. (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.

Fontannaz P., Kilinç T., Heudi O. (2006). HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry* 94, 626-631.

Gökmen V., Kahraman N., Demir N., Acar J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 881, 309-316.

Harnly J.M., Bhagwat S., Lin L.-Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 47-61.

Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Romani A. (2009). Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* 114, 765-770.

Hernández Y., Lobo M.G., González M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* 96, 654-664.

Hertog M.G.L. (1996). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceedings of the Nutrition Society* 55, 385-397.

6. Bibliografia

Heudi O., Kılıç T, Fontannaz P. (2005). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A* 1070, 49-56.

Hohl U., Neubert B., Pforte H., Schonhof I., Böhm H. (2001). Flavonoid concentrations in the inner leaves of head lettuce genotypes. *European Food Research and Technology* 213, 205-211.

Idescat, Institut d'Estadística de Catalunya (2009). Anuari estadístic de Catalunya. www.idescat.cat

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (1976). Nomenclature of cyclitols: recommendations. *The Journal of Biochemistry* 153, 23-31.

Iwase H. (2000). Use of nucleic acids in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 881, 327-330.

Landis D.A., Wratten S.D., Gurr G.M. (2000). Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45, 175-201.

Lee S.K., Kader A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20, 207-220.

Le Gall G., Du Pont M.S., Mellon F.A., Davis A.L., Collins G.J., Verhoeven M.E., Colquhoun I.J. (2003). Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2438-2446.

Le Marchand L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomedecine and Pharmacotherapy* 56, 296-301.

Lemière F. (2001). Mass analysers for LC-MS. Chromatographyonline.findanalyticchem.com

Lijima Y., Nakamura Y., Ogata Y., Tanaka K., Sakurai N., Suda K., Suzuki T., Suzuki H., Okazaki K., Kitayama M., Kanaya S., Aoki K., Shibata D. (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *The Plant Journal* 54, 949-962.

Lin L-Z., Harnly J.M. (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.

Llorach R., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5109-5116.

Llorach R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., Ferreres F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* 108, 1028-1038.

López A., Montaño A., García P., Garrido A. (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.

- Lopes P., Drinkine J., Saucier C., Glories Y. (2006). Determination of L-ascorbic acid in wines by direct injection liquid chromatography using a polymeric column. *Analytica Chimica Acta* 555, 242-245.
- Ma Y., Li P., Chen D., Fang T., Li H., Su W. (2006). LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *International Journal of Pharmaceutics* 307, 292-299.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémesy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.
- Martínez-Ballesta M.C., López-Pérez L., Hernández M., López-Berenguer C., Fernández-García N., Carvajal M. (2008). Agricultural practices for enhanced human health. *Phytochemistry Reviews* 7, 251-260.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Provan G., Chesson A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 323-330.
- Mauri P.L., Iemoli L., Gardana C., Riso P., Simonetti P., Porrini M., Pietta P.G. (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.
- McNally D.J., Wurms K., Labbé C., Bélanger R.R. (2002). A standardized methodology for the study of induced glycosylated plant phenolics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 429-436.
- Mitchell A.E., Hong Y.-J., Koh E., Barrett D.M., Bryant D.E., Denison R.F., Kafka S. (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.
- Moco S., Bino R.J., Vorst O., Verhoeven H.A., De Groot J., Van Beek T.A., Vervoort J., De Vos C.H.R. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology* 141, 1205-1218.
- Moco S., Capanoglu E., Tikunov Y., Bino R.J., Boyacioglu D., Hall R.D., Vervoort J., De Vos R. C. H. (2007). Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 58, 4131-4146.
- Mullen W., Boitier A., Stewart A.J., Crozier A. (2004). Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1058, 163-168.
- Nicolle C., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.-L., Rock E., Michel H., Amouroux P., Remesey C. (2004). Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 2061-2069.
- Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418-425.
- Nováková L., Solich P., Solichová D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 942-958.

6. Bibliografia

Nutrient Data Laboratory, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture (2007). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1.

Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service (2008). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21.

Odriozola-Serrano I., Hernández-Jover T., Martín-Belloso O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry* 105, 1151-1158.

Ola S.S., Catia G., Marzia I., Francesco V.F., Afolabi A.A., Nadia M. (2009). HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cynamoil derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* 115, 1568-1574.

Pernice R., Scuderi D., Napolitano A., Fogliano V, Leonardi C. (2007). Polyphenol composition and qualitative characteristics of fresh-cut lettuce in relation to cultivar, mulching and storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82, 420-427.

Pietta P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

Proteggente A.R., Pannala A.S., Paganga G., Van Buren L., Wagner E., Wiseman S., Van de Put F., Dacombe C., Rice-Evans C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicals Research* 36 (2), 217-233.

Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1000, 657-691.

Rodríguez-Comesaña M., García-Falcón M.S., Simal-Gándara J. (2002). Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: screening of β-carotene and ascorbic acid contents. *Food Chemistry* 79, 141-144.

Romani A., Pinelli P., Galardi C., Sani G., Cimato A., Heimler D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* 79, 337-342.

Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Casals I., Andrés-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventós R.M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* 38, 35-42.

Schmidt C., Lück L., Shotton P., Seal C., Brandt K., Leifert C. (2006). Effect of organic and conventional crop production systems on food quality and safety. Treball presentat a Joint Organic Congress, Odense, Dinamarca.

Serafini M., Bugianesi R., Salucci M., Azzini E., Raguzzini A., Maiani G. (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.

Simonetti P., Gardana C., Riso P., Mauri P., Pietta P., Porrini M. (2005). Glycosylated flavonoids from tomato puree are bioavailable in humans. *Nutrition Research* 25, 717-726.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

Slimestad R., Verheul M. (2005). Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3114-3119.

Slimestad R., Verheul M. (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.

Sobolev A.P., Brosio E., Gianferri R., Segre A.L. (2005). Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* 43, 625-638.

Stewart A.J., Bozonnet S., Mullen W., Jenkins G.I., Lean M.E.J., Crozier A. (2000). Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2663-2669.

Stratil P., Klejdus B., Kubáň V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 607-616.

Torres C.A., Davies N.M., Yañez J.A., Andrews P.K. (2005). Disposition of selected flavonoids in fruit tissues of various tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9536-9543.

Torres C.A., Andrews P.K., Davies N.M. (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.

Treutter D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147-157.

Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12, 593-606.

United States Department of Agriculture (USDA). National Nutrient Database, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

Wang Z.-H., Li S.-X., Malhi S. (2008). Effects of fertilization and other agronomic measures on nutritional quality of crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 7-23.

Waters Cromatografia (2009). http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_ES&cid=511505

Willcox J.K., Catignani G.L., Lazarus S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (1), 1-18.

World Health Organization (WHO) i Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2002). Human vitamin and mineral requirements.

World Health Organization (WHO) i Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.