

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
FLAVONOIDES Y ORGANOAZUFRADOS EN AROS DE
CEBOLLA, MEDIANTE DLLME-HPLC-UV**



Brom. Florencia Fernanda Duran Zabaleta
Directora: Dra. Alejandra B. Camargo

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

-Mendoza, 2016-

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOIDES Y
ORGANOAZUFRADOS EN AROS DE CEBOLLA, MEDIANTE DLLME-
HPLC-UV**

Florencia Fernanda Duran Zabaleta
e-mail: florenciaduran.88@gmail.com

Directora: Dra. Alejandra B. Camargo

Comité Evaluador:

Presidente: Dra. Patricia Piccoli

Vocal: Lic. Brom. Andrea Antonioli

Vocal: Lic. Brom. Nora Martinengo

Suplente: Msc. Miguel Cirrincione

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Cromatografía para Agroalimentos
Facultad De Ciencias Agrarias
Universidad Nacional De Cuyo
Mendoza, 2016**

RESUMEN

La cebolla (*Allium cepa*) presenta características tanto saborizantes como benéficas para la salud. La mayoría de estas últimas se atribuyen a fitoquímicos entre ellos, compuestos organoazufrados (OSCs): dimetil-disulfuro (DMDS), metilpropil-disulfuro (MPDS), metrilpropil-trisulfuro (MPTS) y flavonoles: rutina, quercetina y camferol.

Se han reportado metodologías analíticas que permiten la extracción, detección y cuantificación de ambas familias de compuestos químicos, pero cuando resulta de interés evaluar los principales compuestos funcionales, hay que contemplar la determinación conjunta de ambos grupos de fitoquímicos. Por esta razón surgió el interés por desarrollar un método analítico para extraer y cuantificar flavonoles y OSCs en cebolla cruda mediante HPLC-UV (fase móvil: MeOH (0,6 % AF)-agua (0,6% AF)) a una λ de 260 nm usando una columna C 8. Este método fue validado satisfactoriamente.

Por otro lado, antecedentes previos han demostrado que la cocción mediante fritura preserva los compuestos OSCs y flavonoles en *Allium*. Asimismo, en la actualidad los aros de cebolla fritos son unas de las formas de presentación más populares. Por esta razón, se evaluó el impacto del empleo de una tecnología novedosa de fritura “rapid air” (consume menos aceite que la forma tradicional) y el efecto del el uso de rebozadores, sobre los niveles de fitoquímicos de cebolla

El presente trabajo consistió entonces en dos etapas: en la primera el desarrollo analítico con el fin de la determinación de OSCs y flavonoles para lo cual se usó la técnica de microextracción líquida-líquida dispersiva (DLLME). En una segunda fase, la metodología desarrollada fue aplicada para evaluar los niveles de compuestos bioactivos de interés en aros de cebolla rebozando con pan para freír, pan horno y harina previo a la fritura.

En base a los resultados de la aplicación de DLLME-HPLC-UV a los aros de cebolla rebozados y fritos mediante tecnología “rapid air” se encontró que la fritura disminuyó significativamente los niveles promedios de principios bioactivos excepto rutina que se mantuvo respecto al contenido de la cebolla cruda. Por otro lado, aplicación de rebozadores disminuyó significativamente el contenido promedio de DMDS comparado con muestras crudas. Con respecto a los flavonoles se produce variabilidad según el tipo de rebozador aplicado, del analito y si se compara con muestra cruda o cocida.

PALABRAS CLAVES

Allium cepa, HPLC-UV, DLLME, aros de cebolla fritos, flavonoles, organoazufrados.

AGRADECIMIENTOS

- ~ A mi familia de sangre y del corazón por ser el motor de mi vida y por su apoyo incondicional, por darme la oportunidad de alcanzar mis propios logros y permitirme hacer la carrera.
- ~ A mi novio y amigas por estar siempre presente tanto en los buenos y malos momentos, y por saber esperar, escuchar y aconsejarme.
- ~ A mi directora de tesis, la Dra. Alejandra B. Camargo, quién desde el primer día que estuve en el laboratorio me recibió con los brazos abiertos dándome su confianza, guiándome en todo momento y enseñándome a trabajar con dedicación y compromiso pero con alegría.
- ~ A la Dra. Jorgelina C. Altamirano, y Dra. Roxana E. González por su colaboración.
- ~ A mis compañeras de laboratorio y amigas: Dra. Daniela Locatelli, Lic. Cecilia Fusari, Lic. Carolina Torres y Lic. Daniela Ramirez, por acompañarme en este camino con su dulzura y cariño, siempre dispuestas a colaborar, enseñándome sobre el trabajo en equipo.
- ~ A los profesores y a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo por la formación profesional recibida.

ÍNDICE

RESUMEN ii

PALABRAS CLAVES iii

AGRADECIMIENTOS iv

ABREVIATURAS viii

INDICE DE TABLAS x

INDICE DE FIGURAS xi

I. INTRODUCCIÓN 2

 I.1. ORIGEN E HISTORIA DE CEBOLLA: *ALLIUM CEPA* 2

 I.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA 2

 I.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA 2

 I.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA 3

 I.5. COMPUESTOS BIOACTIVOS 4

 I.6. COMPUESTOS FENÓLICOS 4

 I.6.1. CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL 5

 I.6.1.1. Compuestos flavonoides 6

 I.6.1.1.1. Biosíntesis de compuestos flavonoides 8

 I.7. COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS (OSCs) 11

 I.7.1. FORMACIÓN DE PRECURSORES DEL AROMA: ACSOs 12

 I.7.2. FORMACIÓN DE TIOSULFINATOS 14

 I.8. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA CEBOLLA 15

 I.8.1. PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFÚNGICAS 16

 I.8.2. PROPIEDADES ANTIPARASITARIAS 16

 I.8.3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES 16

 I.8.4. PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS 17

 I.8.5. PROPIEDADES RELACIONADAS CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES 18

 I.8.6. EFECTO ANTIHISTAMÍNICO 18

 I.9. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CEBOLLA 19

 I.9.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MATRICES VEGETALES 19

 I.9.1.1. Microextracción en fase sólida (SPME) 20

 I.9.1.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) 20

 I.9.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN 21

 I.9.2.1. Principio básico de cromatografía 21

 I.9.2.1.1. Cromatografía gaseosa (del inglés Gas Chromatography (GC)) 22

 I.9.2.1.2. Cromatografía líquida de alta performance (del inglés High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)) 22

 I.9.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU RELACIÓN CON LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES 22

 I.9.4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU RELACIÓN CON LOS OSCs 23

 I.10. MÉTODOS DE COCCIÓN DE CEBOLLA Y SU RELACIÓN CON COMPUESTOS FITOQUÍMICOS 23

 I.11. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 23

 I.12. HIPÓTESIS 24

 I.13. OBJETIVOS 24

 I.13.1. OBJETIVOS GENERALES 24

 I.13.2. OBJETIVOS PARTICULARES 24

II. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS OPERACIONALES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONÓLES Y OSCs.....	26
II.1. INTRODUCCIÓN	26
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
II.2.1. REACTIVOS ANALÍTICOS, ESTÁNDARES Y DROGAS.....	26
II.2.1.1. Estándares analíticos.....	26
II.2.1.2. Reactivos.....	26
II.2.1.3. Drogas.....	26
II.2.2. EQUIPOS.....	26
II.2.3. MÉTODOS.....	27
II.2.3.1. Preparación de soluciones.....	27
II.2.3.1.1. Preparación de soluciones madre.....	27
II.2.3.1.2. Preparación de soluciones de trabajo.....	27
II.2.3.2. Optimización de parámetros cromatográficos.....	28
II.2.3.2.1. Elección de la fase estacionaria.....	28
II.2.3.2.2. Elección de fase móvil.....	28
II.2.3.2.3. Selección de longitud de onda para detector.....	29
II.2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
II.2.4.1. Elección de fase estacionaria y fase móvil.....	29
II.2.4.2. Elección de la longitud de onda de trabajo.....	30
II.2.4.3. Condiciones óptimas de trabajo.....	33
II.2.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	34
III. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MUESTRAS DE CEBOLLA MEDIANTE HPLC-UV	36
III.1. INTRODUCCIÓN	36
III.2. SELECTIVIDAD.....	37
III.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
III.2.1.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	37
III.2.1.2. Reactivos analíticos, estándares y drogas.....	37
III.2.1.3. Equipos.....	37
III.2.1.4. Material vegetal y acondicionamiento de la muestra.....	37
III.2.1.4.1. Preparación de la muestra.....	38
III.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
III.3. LINEALIDAD	39
III.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
III.3.1.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	40
III.3.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	40
III.3.1.3. Muestra.....	40
III.3.1.4. Metodología.....	40
III.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
III.4. PRECISIÓN.....	41
III.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
III.4.1.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	42
III.4.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	42
III.4.1.3. Metodología.....	42
III.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
III.5. EXACTITUD.....	43
III.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
III.5.1.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	44
III.5.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	44
III.5.1.3. Muestra.....	44
III.5.1.4. Metodología.....	44
III.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
III.6. SENSIBILIDAD: LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	46

III.6.1. MATERIALES Y MÉTODOS	46
III.6.1.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	46
III.6.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	46
III.6.1.3. Muestra.....	47
III.6.1.4. Metodología.....	47
III.6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
III.7. COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA CON OTRAS REPORTADAS EN LA LITERATURA	49
III.7.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
III.8. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	50
IV. APLICACIÓN DE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) A CEBOLLA COCIDA	52
IV.1. INTRODUCCIÓN.....	52
IV.2. APLICACIÓN DE DLLME.....	53
IV.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	53
IV.2.2. EVALUACIÓN DE LA PERFORMANCE DEL EMPLEO DE LA DLLME	53
IV.2.2.1. Ensayo de exactitud.....	53
IV.2.2.1.1. Materiales y métodos.....	54
IV.2.2.1.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	54
IV.2.2.1.1.2. Diseño del experimento.....	54
IV.2.2.1.1.3. Determinación de la recuperación de los analitos.....	55
IV.2.2.1.2. Resultados y discusión.....	55
IV.2.2.2. Aplicación de SLE-DLLME a muestras de cebolla cocida.....	55
IV.2.2.2.1. Materiales y métodos.....	55
IV.2.2.2.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	55
IV.2.2.2.1.2. Diseño del experimento.....	55
IV.2.2.2.2. Resultados y discusión.....	56
IV.3. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	56
V. CONSECUENCIA DEL REBOZADO Y FRITURA, EN LOS NIVELES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CEBOLLA.....	58
V.1. INTRODUCCIÓN.....	58
V.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOLES Y OSCs EN AROS DE CEBOLLA REBOZADOS Y FRITOS	58
V.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	58
V.2.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo.....	58
V.2.1.2. Muestra y diseño experimental.....	58
V.2.1.3. Metodología.....	59
V.2.1.3.1. Identificación y cuantificación de los analitos de interés en las muestras bajo estudio.....	59
V.2.1.3.2. Análisis estadístico de los datos.....	59
V.2.2. RESULTADO Y DISCUSIÓN	59
V.3. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	60
VI. CONCLUSIÓN FINAL.....	62
VII. BIBLIOGRAFIA.....	64
VIII. ANEXOS.....	73

ABREVIATURAS

- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- PF:** Peso Fresco
- PAL:** Fenilalanina amonioliasa
- C4H:** Cinamato-4 hidroxilasa
- TAL:** Tirosina-amino liasa
- CoA:** Coenzima A
- 4CL:** 4-cumarato CoA- ligasa
- 2S:** Flavanonas naringenina o pinocembrinas
- FLS:** Flavonol sintasa
- F3H:** Flavanona 3- β -hidroxilasa
- F3'5'H:** Flavonoide 3'5' hidroxilasa
- F3'H:** Flavonoide 3' hidroxilasa
- GT:** Flavonoide glucosil transferasa
- OMTs:** Flavonoide O-metiltransferasas
- OSCs:** Compuestos organoazufrados
- ACSOs:** S-alquenil cisteín sulfóxidos
- ROS:** Especies reactivas al oxígeno
- RNS:** Especies reactivas al nitrógeno
- RCIS:** Especies reactivas al cloro
- DMDS:** Dimetil-disulfuro
- MPDS:** Metilpropil-disulfuro
- MPTS:** Metrilpropil-trisulfuro
- LLE (del inglés Liquid Liquid Extraction):** Extracción líquido líquido
- SLE (del inglés Solid Liquid Extraction):** Extracción sólido líquido
- SPE (del inglés Solid Phase Extraction):** Extracción en fase sólida
- SFE (del inglés Supercritical Fluids Extraction):** Extracción con fluidos supercríticos
- SPME:** Microextracción en fase sólida
- DLLME (del inglés Liquid Liquid Dispersive Microextraction):** Microextracción Líquido Líquido Dispersiva
- EF:** factor de enriquecimiento
- GC (del inglés Gas Chromatography):** Cromatografía Gaseosa
- LC (del inglés Liquid Chromatography):** Cromatografía Líquida
- HPLC (del inglés High-Performance Liquid Chromatography):** Cromatografía Líquida de Alta Performance
- TLC (del inglés Thin Layer Chromatography):** Cromatografía en capa delgada
- CE (del inglés Capillary Electrophoresis):** Electroforesis capilar
- UV:** Espectrofotómetro de luz ultravioleta
- MS (del inglés Mass Spectrometer):** Espectrómetro de masas
- RMN (del inglés Resonance Magnetic Nuclear):** Espectrómetro de resonancia magnética nuclear
- RID (del inglés Refractive Index Detector RID):** Detector de índice de refracción
- RP (del inglés Reverse Phase):** Fase Reversa
- C18:** Columna octadecilsilano
- C8:** Columna octilsilano
- DAD (del inglés Diode Array Detector):** Detector de arreglo de diodos
- TMS:** Derivados Trimetilsililo

Freidora “rapid air”: Freidora que cocina alimentos con aire caliente en movimiento

MeOH: Metanol

ACN: Acetonitrilo

TA: temperatura ambiente

Cutoff: Longitud de onda de corte

λ : Longitudes de onda

AF: Ácido Fórmico

FDA: Administración de Drogas y Alimentos

HS GC–MS (del inglés Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry): Metodología basada en la determinación mediante Cromatografía Gaseosa de los compuestos volátiles del espacio de cabeza.

QuEChERS-UHPLC (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS)-Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography (UHPLC): Metodología basada en Extracción Sólido Líquido, seguida de una partición y una limpieza con Extracción en Fase Sólida Dispersiva acoplada a Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión.

SLE-RP-HPLC-UV: Metodología basada en Extracción Sólido Líquido acoplada a Cromatografía Líquida de Alta Performance en fase reversa con detector UV-Vis.

H₀: Hipótesis nula

SLE-DLLME: Extracción Sólido Líquido complementada con una Microextracción Líquido Líquido Dispersiva

Rebozador A: Rebozador para freír

Rebozador B: Rebozador para hornear

Rebozador C: Harina 0000

INDICE DE TABLAS

Tabla I-1. Principales constituyentes de cebolla [g% g de PF] y valor calórico [Kcal% g de PF].	3
Tabla I-2. Contenido de vitaminas y minerales de cebolla [mg% g de PF].	3
Tabla I-3. Clasificación estructural de flavonoles.	8
Tabla I-4. S- alquenil cisteín sulfóxidos (ACSOs) en el género Allium.	12
Tabla II-1. Gradiente de elución usado para la resolución de los compuestos organoazufrados y flavonoles	30
Tabla II-2. Condiciones óptimas de trabajo para el análisis de OSCs y flavonoles.	33
Tabla II-3. Tiempos de retención de los compuestos OSCs y flavonoles con las condiciones descritas en la sección II.2.4.3.	34
Tabla III-1. Concentraciones de flavonoles y OSCs en la mezcla de trabajo, tiempos de retención. Técnica descrita en la sección II.2.4.3.	38
Tabla III-2. Muestras para realizar curva de calibración	40
Tabla III-3. Estimadores de regresión para cada analito.	41
Tabla III-4. Resultado de las áreas de los estándares inyectados (n=6).	43
Tabla III-5. Áreas de los analitos en estudio	45
Tabla III-6. % de recuperación y desviación estándar para flavonoles y OSCs.	45
Tabla III-7. Límites de detección y límites de cuantificación utilizando la metodología propuesta para los flavonoles.	47
Tabla III-8. Límites de detección y límites de cuantificación utilizando la metodología propuesta para los OSCs.	48
Tabla III-9. Comparación de la metodología propuesta con otras reportadas en literatura.	50
Tabla IV-1. % de recuperación de los analitos en cebolla cruda	55
Tabla IV-2. % de recuperación de los analitos en cebolla cocida	56
Tabla V-1. Tratamientos aplicados a aros de cebolla.	59
Tabla V-2. Analitos presentes en aros de cebolla con diferentes tipos de tratamientos.	60
Tabla VIII-1. Prueba T para muestras Independientes de Rutina	73
Tabla VIII-2. Prueba T para muestras Independientes de Quercetina	73
TABLA VIII-3. Prueba T para muestras Independientes de Camferol	73
Tabla VIII-4. Prueba T para muestras Independientes de DMDS	74
Tabla VIII-5. Análisis de la varianza para Rutina	74
Tabla VIII-6. Análisis de la varianza para Quercetina.	74
Tabla VIII-7. Análisis de la varianza para camferol	75
Tabla VIII-8. Análisis de la varianza para DMDS.	75

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Principales familias de compuestos fenólicos encontrados en plantas.....	6
Figura I.2. Esqueleto básico de flavonoides.....	7
Figura I.3. Esqueleto básico de flavonoles.....	7
Figura I.4. Esquema de la síntesis de compuestos fenólicos.	9
Figura I.5. Biosíntesis de compuestos flavonoides.	11
Figura I.6. Biosíntesis de ACSOs en especies de <i>Allium</i>	13
Figura I.7. Principales compuestos volátiles identificados en aceite de cebolla.	15
Figura I.8. Procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva.	21
Figura II.1. Barrido espectral de quercetina en metanol.....	30
Figura II.2. Barrido espectral de camferol en metanol.....	31
Figura II.3. Barrido espectral de rutina en metanol.....	31
Figura II.4. Barrido espectral de DMDS en metanol.	32
Figura II.5. Barrido espectral de MPDS en metanol.....	32
Figura II.6. Barrido espectral de MPTS en metanol.....	33
Figura II.7. Cromatograma de una mezcla de los estándares estudiados: OSCs y flavonoles bajo las condiciones descritas en la sección II.2.4.3.	34
Figura III.1. Cromatograma de la mezcla de estándares: flavonoles y OSCs correspondiente a las condiciones establecidas en la sección II.2.4.3.	39

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ORIGEN E HISTORIA DE CEBOLLA: *Allium cepa*

La cebolla (*Allium cepa* L.) se considera uno de los cultivos más antiguos de la humanidad pero su origen no se conoce con claridad debido a que no se ha encontrado en estado silvestre. Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que su origen se ubicaría en las regiones montañosas de Turquía, Irán, Afganistán y Pakistán. Por otro lado, existen referencias de que 5 siglos A.C. los trabajadores en la construcción de las pirámides de Keops, consumían grandes cantidades de cebolla, rabanitos y ajo. Asimismo en la Biblia se cita el uso de cebolla como alimento durante el éxodo de los judíos que se estima 1500 años A.C. Su cultivo se expandió a varios continentes pero se desconocen los detalles y las fechas de introducción a las distintas áreas. Los centros secundarios de desarrollo y distribución, han sido Asia Occidental y países mediterráneos, hasta ser introducida a América por los primeros colonizadores e ir incorporándose a la dieta básica de distintos pueblos, constituyendo un ingrediente básico de varias comidas típicas.

En la actualidad existen cultivares adaptados a todas las regiones del mundo, siendo China, India, Estados Unidos y Rusia los principales países productores (Acosta, Gaviola, Galmarini, 2011).

I.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

Allium cepa se cultiva principalmente como planta bienal, pero algunos tipos son tratados como perennes. Se propaga por semillas, bulbos o bulbos pequeños. Esta especie presenta una amplia variación en forma, tamaño y color. La selección intensiva durante la domesticación y la hibridación natural podría haber creado variabilidad (Lawande, 2012).

La taxonomía del género *Alliums* es:

Clase: *Monocotiledónea*

Super orden: *Liliflorae*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Alliaceae*

Tribu: *Alliae*

Género: *Allium*

En la literatura más antigua *Alliaceae* estaba incluida en las familias *Lilliaceae* y en *Amaryllidaceae*, pero en la actualidad se considera una familia distinta (Block, 2010).

I.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA

De acuerdo a las estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la cebolla es la segunda hortaliza más cultivada en el mundo después del tomate (Ipinza, 2013) alcanzando una producción de más de 85 millones de toneladas. China e India son los responsables del 47 % de las mismas con un volumen de 25 y 16 millones de toneladas, respectivamente. Con un valor muy inferior a

éstos se ubica el tercer productor más importante, EEUU, que con 3,4 millones de toneladas, su participación implica un 3,9%. En el rango de 1,5 millones de toneladas se encuentran Países Bajos, Brasil y Corea. El 28% restante de la producción se distribuye entre unos 130 países, cuya participación mundial va disminuyendo gradualmente. En este contexto, Argentina se encuentra más allá del lugar 20 en el ranking con una producción estimada de 0,7 millones de toneladas, con lo cual su participación se ubica tan solo en el 0,8%. Destinando el 30% de esta, al mercado externo principalmente a Brasil (alrededor del 95%) y en menor medida Uruguay y Paraguay. Las principales regiones productoras son el sur de la provincia de Buenos Aires, el Valle del Río Colorado (Río Negro), Mendoza (16,9%), San Juan y Santiago del Estero. (Larocca, 2014).

I.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Como se muestra en la Tabla I.1. En general, la cebolla presenta aproximadamente un 90% de agua, un bajo contenido calórico y un contenido moderadamente alto de azúcar y fibras. Sin embargo, presenta un bajo nivel de lípidos y proteínas, siendo los aminoácidos más abundantes la arginina y el ácido glutámico.

Tabla I-1. Principales constituyentes de cebolla [g% g de PF] y valor calórico [Kcal% g de PF].

Componentes		Cantidad
Energía		23 - 38
Agua		88,6 – 92,8
Cenizas		0,6
Macro nutrientes	Carbohidratos	5,2 – 9
	Proteínas	0,9 – 1,6
	Grasas	0,2

Fuente: Fenwich, Hanley, 1990.

En cuanto al contenido de vitaminas y minerales (Tabla I.2.), la cebolla tiene bajos niveles de sodio y un alto contenido de ácido fólico, Ca, Mg, P y K.

Tabla I-2. Contenido de vitaminas y minerales de cebolla [mg% g de PF].

Componentes		Cantidad [mg% g PF]	
Micronutrientes	Minerales	P	200 - 430
		Ca	190 - 540
		Mg	81 - 150
		K	80 - 110
		S	50 - 51
		Na	31 - 50
		Fe	1,8 - 2,6
		Zn	1,5 - 2,8
		Sr	0,8 - 7
		Al	0,5 - 1
		Ba	0,1 - 1
B	0,6 - 1		

Vitaminas	Cu	0,05 - 0,64
	Mn	0,5 - 1
	C	10
	D	0,3
	B ₃	0,2
	B ₅	0,14
	B ₂	0,05
	B ₉	0,016
	B ₈	0,0009

Fuente: Fenwich, Hanley, 1990.

I.5. COMPUESTOS BIOACTIVOS

El concepto de alimentos funcionales fue desarrollado en Japón en los años '80. Las autoridades de ese país notaron que para controlar los gastos sanitarios, generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana, había que garantizar también una mejor calidad en ésta. Así se introdujo un nuevo concepto de alimentos, que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades (Ford, Dahl, 2012).

El proyecto *Functional Food Science in Europe* (Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa) definió alimento funcional como: "Un alimento que demuestre satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas" (Ashwell, 2004). Los alimentos funcionales son definidos en general como aquellos alimentos que además de proporcionar compuestos nutritivos, suministran beneficios fisiológicos para la salud del consumidor (Jones, 2002). Siguiendo este concepto, las frutas y hortalizas no sólo proporcionan a la dieta vitaminas y minerales sino también aportan compuestos químicos no nutritivos con propiedades bioactivas entre ellas principalmente, reducción de riesgo de cáncer y enfermedades crónicas (Williamson, 1996). Estos compuestos bioactivos se denominan fitoquímicos (Acosta-Estrada, Gutierrez-Urbe, Serna-Saldivar, 2014) y se clasifican en terpenos (carotenoides, limonoides); fitoesteroles; fenoles (flavonoides, antocianidinas, catequinas, ácidos gálicos e isoflavonas.); lignanos y tioles o compuestos azufrados (glucosinolatos, sulfidos alílicos e indoles); tocoferoles y tocotrienos (Chasquibol y col., 2003). Dentro de este amplio grupo de fitoquímicos con propiedades benéficas, la cebolla contiene mayoritariamente compuestos organoazufrados (del inglés Organosulphur Compounds (OSCs)) y flavonoides (Colina-Coca y col., 2013; Griffiths y col., 2002; Ko y col., 2015).

I.6. COMPUESTOS FENÓLICOS

Las plantas producen una amplia gama de metabolitos durante su crecimiento y a lo largo de toda su vida. Éstos a su vez, pueden clasificarse en primarios y secundarios.

Los metabolitos primarios son definidos como aquellos compuestos que tienen roles esenciales asociados a la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo de la planta.

Compuestos como carbohidratos, lípidos, nucleótidos, aminoácidos, y ácidos orgánicos se incluyen en este grupo.

Por otro lado, los metabolitos secundarios son productos naturales que no son esenciales para el desarrollo y crecimiento (Watson, 2014), pero estos componentes pueden continuamente modificarse y adaptarse a cambios ambientales (Hartmann, 2007). Como consecuencia a esta característica, frecuentemente están involucrados en la adaptación hacia el estrés producido por factores bióticos y abióticos (Watson, 2014) debido a que cumplen un rol clave tanto en la protección de la planta frente a herbívoros e infecciones microbiológicas, también funcionan como atrayentes para los animales polinizadores y diseminadores de semillas, como agente alelopático y protector frente a rayos UV. Ellos además, contribuyen con el olor, sabor, color específico de plantas (Bennett, Wallsgrove, 1994). Los compuestos fenólicos y terpenoides son dos de los más grandes grupos de metabolitos secundarios de plantas (Watson, 2014).

I.6.1. CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL

La familia de compuestos fenólicos incluye un largo número de productos secundarios de plantas que difieren en estructura química y reactividad, y que varía de simples compuestos a aquellos con alto grado de polimerización (Shahidi, Naczki, 1996). Las plantas contienen una amplia variedad de derivados fenólicos, siendo los más relevantes para la salud humana, ácidos fenólicos, flavonoides (flavonoles, flavanonas, flavanoles, flavonas, isoflavonas y antocianinas), lignanos y estilbenos (Figura I.1.) (Hooper, Cassidy, 2006). Estos metabolitos secundarios están caracterizados por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos ligados (Strack, 1997), por tratarse de compuestos no volátiles (Lanzotti, 2006). Estos fitoquímicos están divididos en varias clases de acuerdo al número de anillos fenólicos que ellos contienen y según los elementos estructurales que unen estos anillos el uno al otro (D'Archivio y col., 2007).

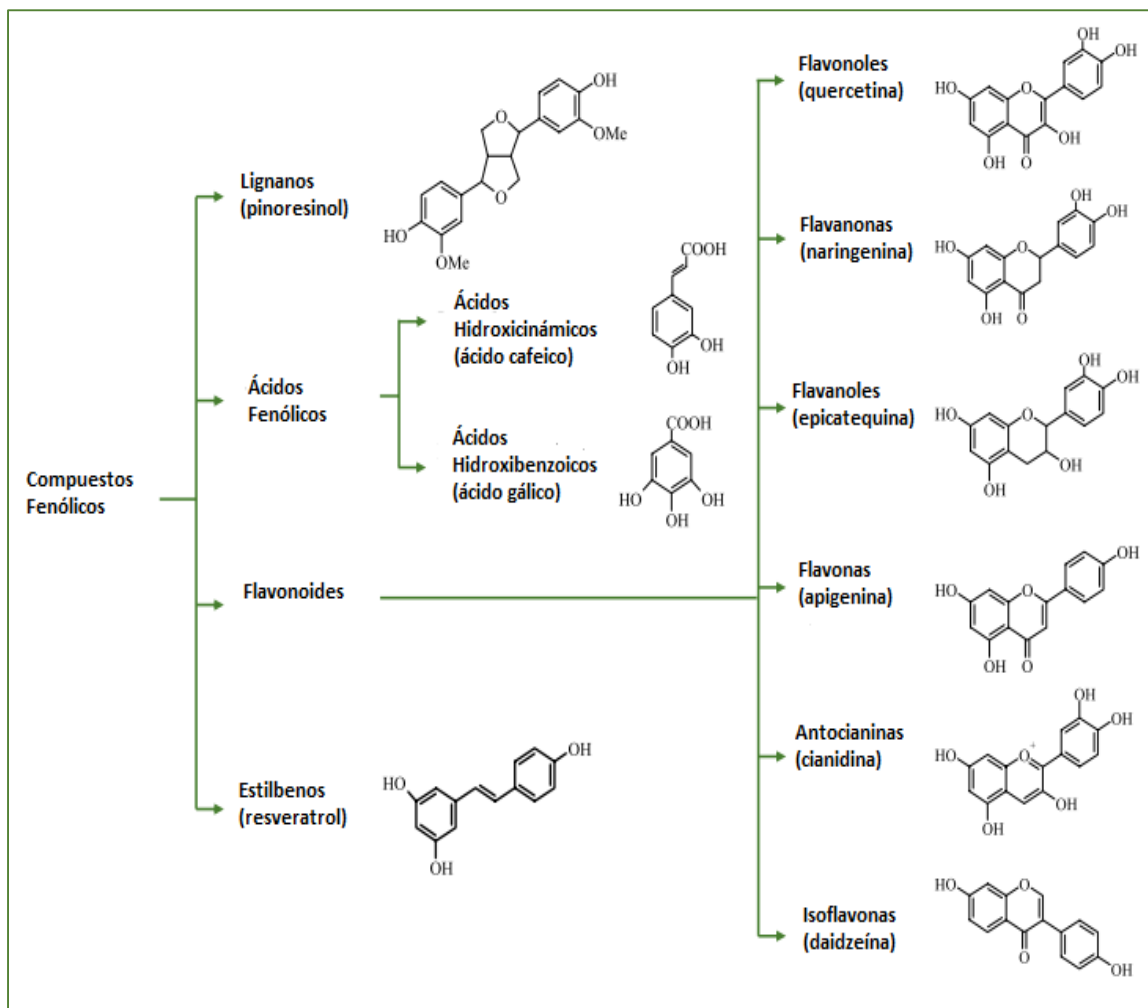


Figura I.1. Principales familias de compuestos fenólicos encontrados en plantas.

Fuente: Watson, 2014.

I.6.1.1. Compuestos flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular (Ignat, Volf, Popa, 2011) y su estructura consiste en 15 átomos de carbono (Crozier, Jaganath, Clifford, 2009; Ignat, Volf, Popa, 2011) Están formados de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual forma un esqueleto de difenilpirano: C₆-C₃-C₆. (Escamilla Jiménez, Cuevas Martínez, Guevara Fonseca, 2009). Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se enumeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Cartaya, Reynaldo, 2001) (Figura I.2.). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, siendo por lo tanto estructuras fenólicas.

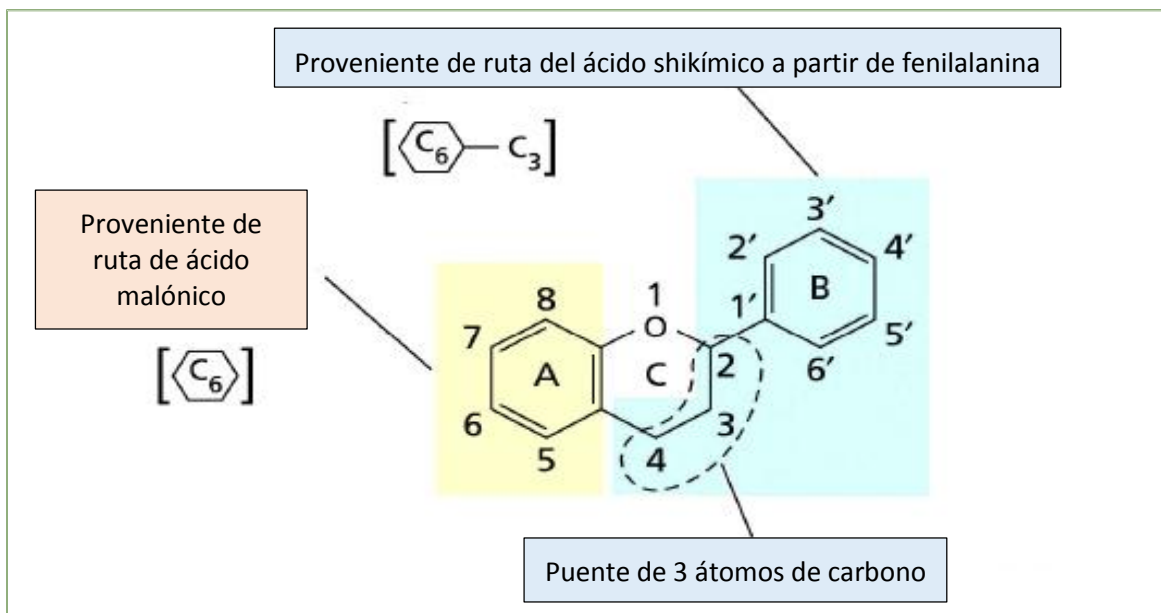


Figura I.2. Esqueleto básico de flavonoides.

Fuente: Fisiología de plantas, tercera edición, Figura 13.12. 2002.

Las variaciones en el anillo C da diferentes clases de flavonoides principalmente: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (o catequinas), isoflavonas, flavanonoles y antocianinas. Las sustituciones presentes en los anillos A y B dan lugar a diferentes compuestos dentro de la misma clase de flavonoides (Ignat, Volf, Popa, 2011) . Por trabajos de Crozier, Jaganath, Clifford, 2009; se conoce que entre los sustitutos que se unen al esqueleto principal de los flavonoides se hallan los grupos hidroxilos y los azúcares (la mayoría se encuentran glicosilados en las plantas), que aumentan la solubilidad en el agua y de otros sustituyentes como los grupos metílicos y unidades de isopentilo que hacen a los flavonoides más lipofílicos Los flavonoles presentan un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (Escamilla Jiménez, Cuevas Martínez, Guevara Fonseca, 2009) (Figura I.3.).

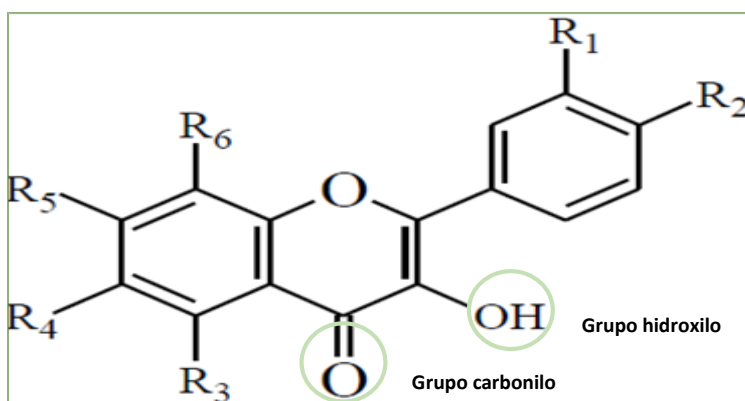
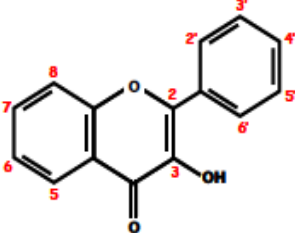


Figura I.3. Esqueleto básico de flavonoles.

Fuente: Escamilla Jiménez, Cuevas Martínez, Guevara Fonseca, 2009.

Diversos autores dan cuenta que en la cebolla los principales compuestos son flavonoides como la quercetina tanto en forma aglicona como glicosilada (Andlauer, Martena, Fürst, 1999; Bonaccorsi y col., 2008; Crozier, Jaganath, Clifford, 2009), pero también contiene otros flavonoles como rutina que es un tipo de quercetina glicosilada (quercetina- 3-rutinosido) (Ranjbari, Biparva, Hadjmohammadi, 2012) y camferol (Ewald y col.,1999). Estos compuestos se han relacionado con propiedades benéficas para la salud (Ko y col., 2015). Estructuralmente quercetina y camferol difieren en el número de grupos hidroxilos dentro de sus moléculas.

Tabla I-3. Clasificación estructural de flavonoles.

Flavonol	Estructura del anillo	Sustituyentes		
		OH		Posición glicosilada
		Posición	Cantidad	
Quercetina		3,5,7,3',4'	5	
Miricetina		3,5,7,3',4',5'	6	
Morina		3,5,7,2',4'	5	
Rutina		3,5,7,3',4'	4	3-rutinososa
camferol		3,5,7,4'	4	

Fuente: Sánchez-Gallego, 2009.

I.6.1.1.1. Biosíntesis de compuestos flavonoides

Los compuestos flavonoides se originan mediante la confluencia de dos rutas metabólicas distintas, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Ávalos, Pérez-Urria Carril, 2009) (Figura I.4.).

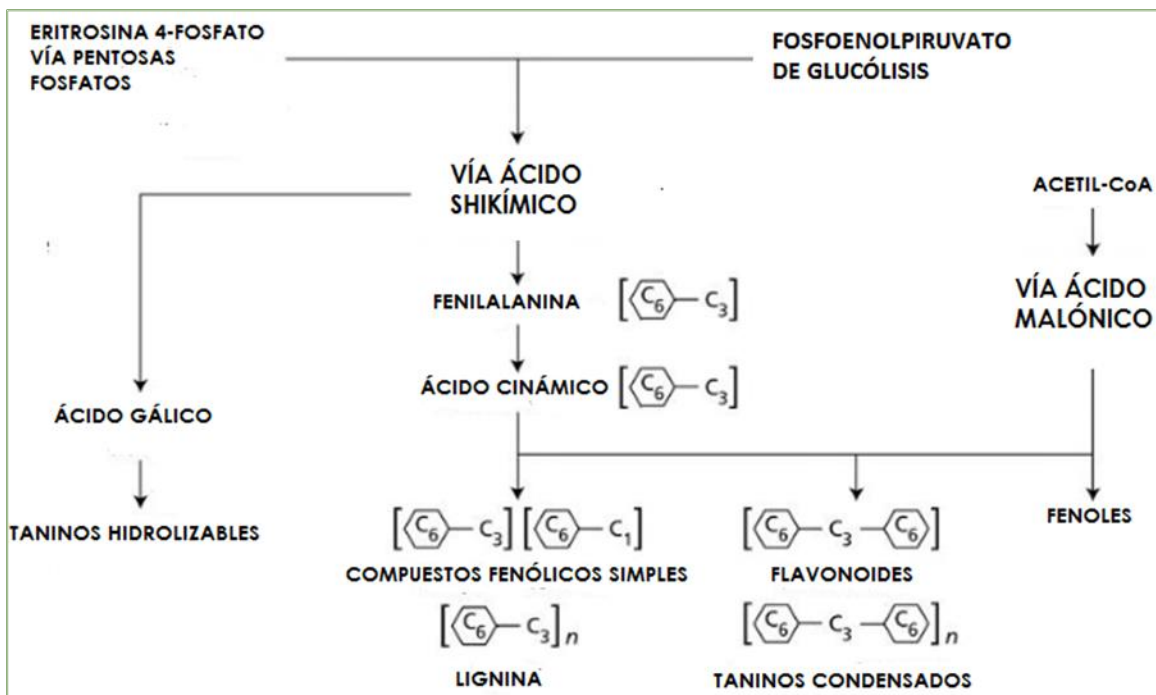


Figura I.4. Esquema de la síntesis de compuestos fenólicos.

Fuente: Fisiología de plantas, tercera edición, Figura13.9, 2002.

La ruta del ácido shikímico es dependiente de la luz, se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosina 4-fosfato, procedente de las pentosas fosfato y el fosfoenolpiruvato, de la glucólisis. Tras diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico del que pueden derivar algunos fenoles. La vía del ácido shikímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido aromático esencial propio del metabolismo primario de las plantas. .

Los precursores de los flavonoides proceden de una ruta común fenilpropanoide (Figura I.4.) que se inicia por la conversión de la fenilalanina a ácido cinámico. La fenilalanina (Figura I.5.), forma parte del metabolismo secundario por la acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL), que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en ácido cinámico. Posteriormente éste se transforma en ácido 4-cumárico (p-cumárico) por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático mediante la enzima cinamato-4 hidroxilasa (C4H). En algunas plantas la PAL exhibe también actividad de tirosina-amino liasa (TAL) sobre la tirosina para generar directamente ácido 4-cumárico. La acción de una coenzima A (CoA), la 4-cumarato CoA- ligasa (4CL), transforma el 4-cumárico en 4-cumaroil-CoA, que es el precursor activo de todos los fenoles de origen vegetal (Quiñones, Miguel, Aleixandre, 2012). Este precursor es condensado por tres moléculas de malonil CoA para formar naringenina-chalcona o pinocembrina- chalcona (de tirosina y fenilalanina respectivamente) por la 4-cumarato CoA- ligasa (4CL), cicliza a naringenina o pinocembrina chalcona mediante la isomerización esteroespecífica para formar las flavanonas naringenina o pinocembrinas (2S). Las flavanonas posteriormente son modificadas para generar una amplia variedad de derivados. Por lo que la biosíntesis de

flavonoles puede ocurrir por una vía directa que implica la reducción por insaturación de flavanonas por la flavonol sintasa (FLS) o una ruta indirecta con la hidroxilación de (2S) flavanonas en el carbono 3 del anillo C por una flavanona 3- β -hidroxilasa (F3H) para generar dihidroflavonoles que posteriormente son reducidos mediante insaturación por la FLS para generar flavonoles. También estos fitoquímicos pueden ser generados a partir de la hidroxilación del dihidroflavonol en los carbonos 3'5' o sólo en el carbono 3' del anillo B por la flavonoide 3'5' hidroxilasa (F3'5'H) o por la flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H) respectivamente. Otras enzimas como la flavonoide glucosil transferasa (GT) y las flavonoide O-metiltransferasas (OMTs) al llevar a cabo reacción de glicosilación o metilación respectivamente, contribuyen a la diversificación de flavonoles (Drago Serrano, López López, Saínz Espuñes, 2006).

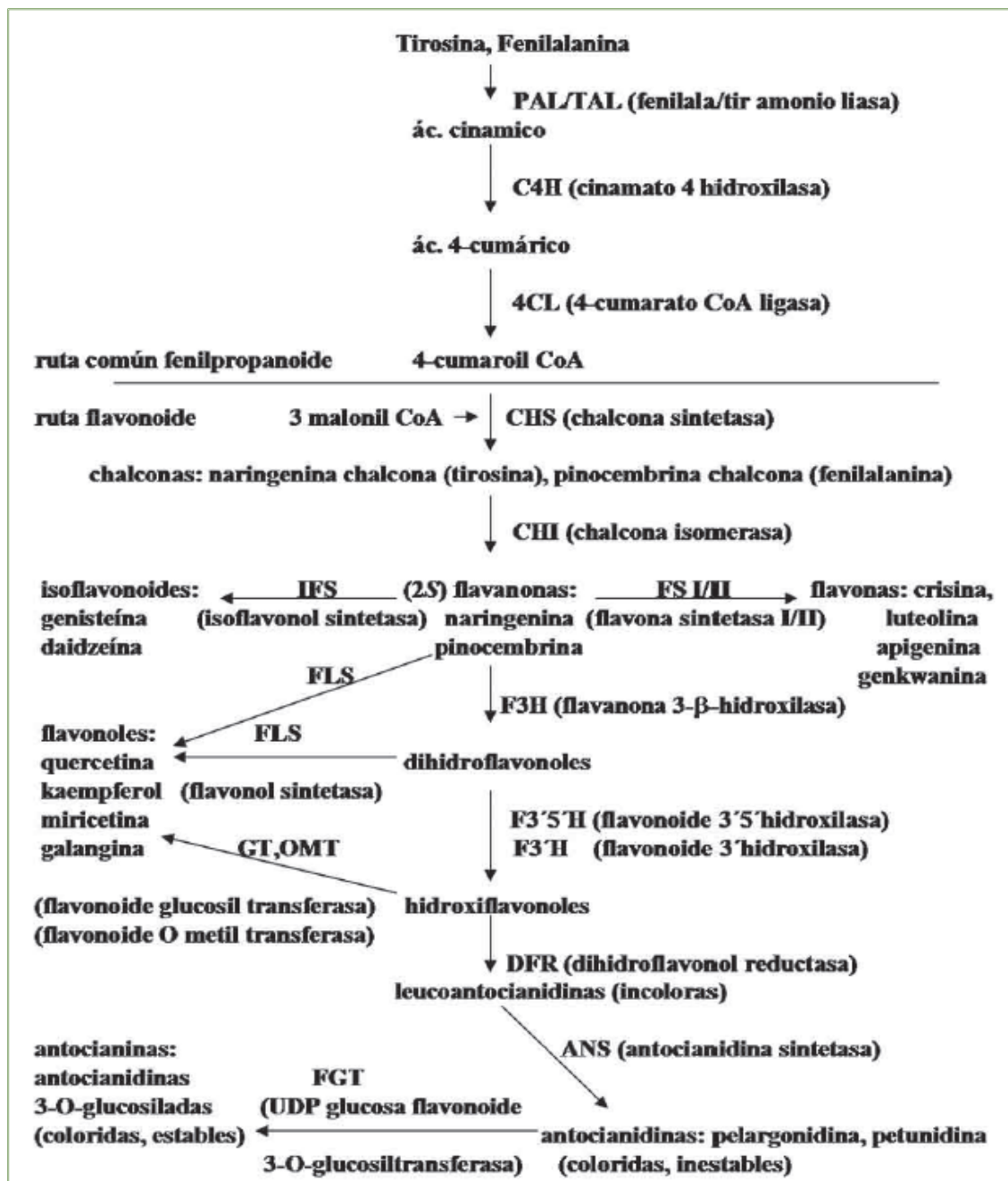


Figura I.5. Biosíntesis de compuestos flavonoides.

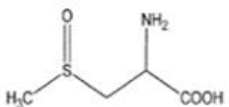
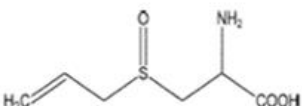
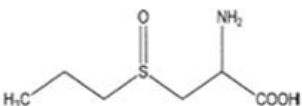
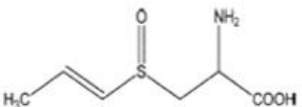
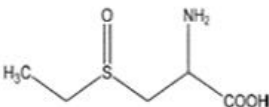
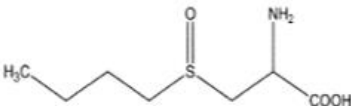
Fuente: Serrano Drago, López López, Saínez Espuñes ,2006.

1.7. COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS (OSCs)

El 1,5% del peso seco de la cebolla, el ajo y otros miembros del género *Allium* spp. corresponde a aminoácidos azufrados no proteicos llamados S-alquencil cisteín sulfóxidos (ACSOs), que forman parte de los mencionados anteriormente metabolitos secundarios de plantas (Block, 1992). Estos metabolitos son compuestos sin olor, no volátiles y precursores del aroma (Rose y col., 2005). En el género *Allium* hasta la fecha han sido identificados los

ACSOs señalados en la Tabla I.4. Entre ellos, Metiina, Propiina y Isoaliina, representando este último el mayoritario en cebolla (Griffiths y col., 2002; Rose y col., 2005).

Tabla I-4. S- alquenil cistein sulfóxidos (ACSOs) en el género *Allium*.

Nombre común	Nombre químico	Estructura química	Especies representativas
Metiina	S-Metil-L-cistein sulfóxido		<i>A. cepa</i> L. <i>A. sativum</i> L. <i>A. chinense</i> G. Don <i>A. longiscuspis</i> Rgl.
Aliina	S-Alil-L-cistein sulfóxido		<i>A. sativum</i> L. <i>A. ursinum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. longiscuspis</i> Rgl.
Propiina	S-Propil-L-cistein sulfóxido		<i>A. cepa</i> L. <i>A. porrum</i> L. <i>A. altaicum</i> Pall. <i>A. fistulosum</i> L.
Isoaliina	S-Propenil-L-cistein sulfóxido		<i>A. cepa</i> L. <i>A. nutans</i> L. <i>A. ascalonicum</i> auct. <i>A. schoenoprasum</i> L.
Eliina	S-Etil-L-cistein sulfóxido		<i>A. aflatumense</i> B. Fedt. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. ochotense</i> Prokh. <i>A. victorialis</i> L.
Butiina	S-n-Butil-L-cistein sulfóxido		<i>A. sicutum</i>

Fuente: Rose y col., 2005.

I.7.1.FORMACIÓN DE PRECURSORES DEL AROMA: ACSOs

Los compuestos ACSOs (Figura I.6.), tienen un origen común en el metabolismo del azufre. En la planta el anión sulfato (SO_4^{-2}) del suelo es asimilado por la membrana plasmática de las células del tejido radical, después de lo cual es acumulado en su interior. Posteriormente es reducido en los cloroplastos (Block, 1992) mediante una serie de reacciones para obtener primero anión sulfito (SO_3^{-2}) y posteriormente anión sulfuro S^{-2} . Este último reacciona con O-acetil serina (derivada del aminoácido serina) para formar cisteína (Leustek y col., 2000). Una vez formado este aminoácido puede ser canalizado en diferentes rutas metabólicas, implicadas tanto en la síntesis de proteínas como la de metabolitos secundarios. (Rose y col.,2005), en este último caso la cisteína entra al ciclo del glutatión para formar y glutamil cisteína que se une al ácido metacrílico y mediante decarboxilación, oxidación y acción de enzimas glutamil transpeptidasas forman los diferentes ACSOs.

Las plantas usan los y glutamil péptidos para almacenar nitrógeno y sulfuro que utiliza en la producción de compuestos químicos de defensa y para el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares (Block, 1992).

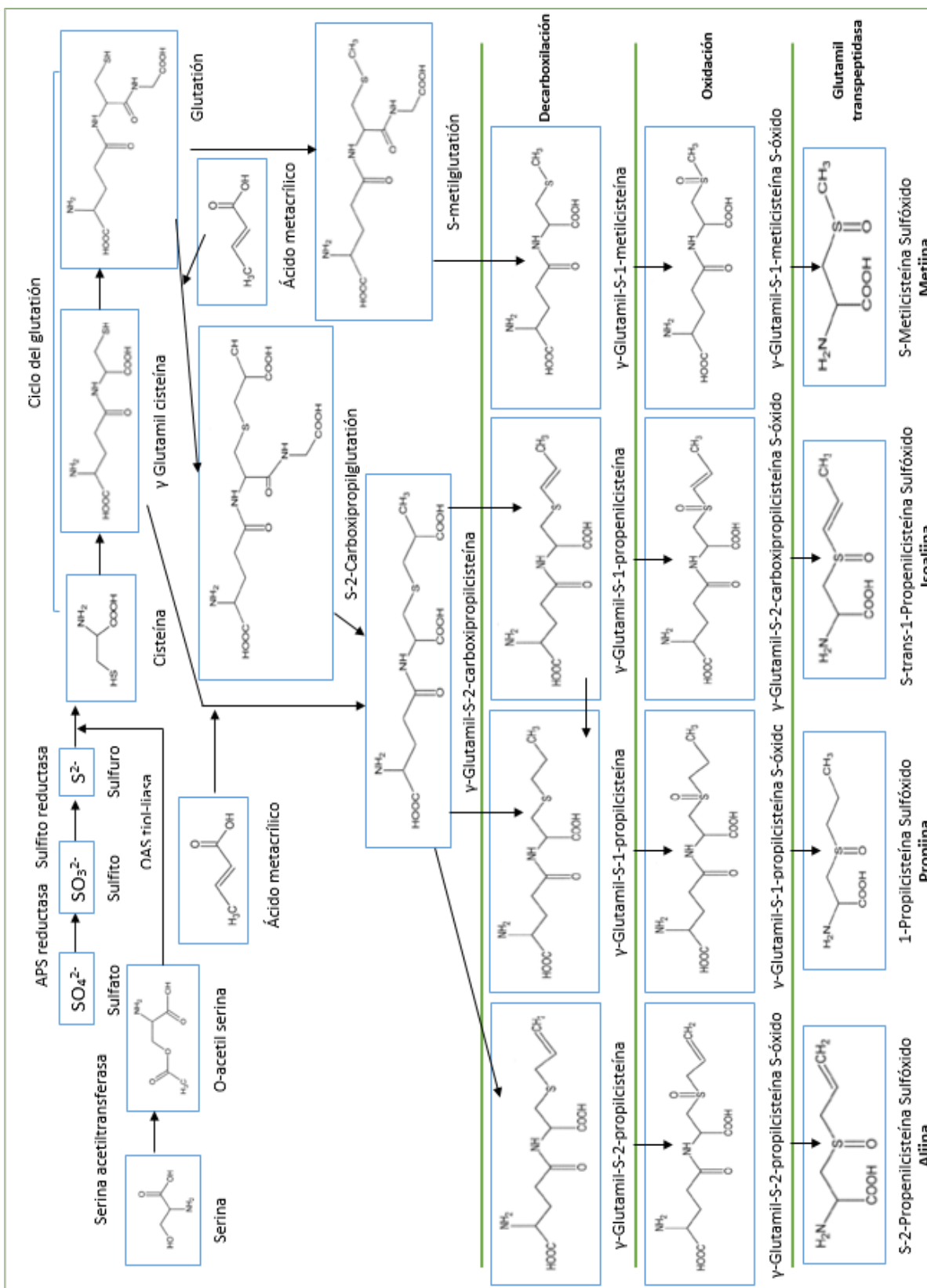


Figura I.6. Biosíntesis de ACSOs en especies de *Allium*

Fuente: Rose y col., 2005.

I.7.2.FORMACIÓN DE TIOSULFINATOS

Los compuestos ACSOs en un tejido sano se encuentran localizados en el citoplasma, mientras que la enzima alinasa, glicoproteína que cataliza la hidrólisis de los compuestos precursores del aroma, se encuentra compartimentada en la vacuola. Esta enzima es activa sólo en presencia de piridoxal 5'-fosfato como cofactor (Lancaster, Collin, 1981). Cuando se produce la disrupción de tejido (picado, aplastado, cortado, etc.) el contenido citoplasmático se mezcla con el de la vacuola produciendo la hidrólisis de los respectivos ACSOs. Esta reacción catalítica conduce a la generación de ácido sulfénico que condensa para formar tiosulfinatos. Uno de los intermediarios en esta reacción es el sulfuro propanotial S-óxido comúnmente llamado factor lacrimógeno (FL) que es el responsable de la producción de lágrimas, es sumamente volátil y presenta como ACSO precursor a la isoaliina (Rose y col., 2005). Estos compuestos son los responsables del flavor de la cebolla fresca, debido a su inestabilidad, participan de una serie de reacciones que generan nuevos reordenamientos para producir tiosulfinatos, sulfuros y un amplio rango de otros OSCs. Los tiosulfinatos que contienen el grupo 1-propenil son los más abundantes en la cebolla picada fresca. Si a extractos de cebolla picada cruda se le aplica calor, como ocurriría en la cocción doméstica, se generan polisulfuros (Randle, Lancaster, 2002). Los cuales se pueden determinar mediante destilación con vapor. El aceite obtenido contiene la fracción volátil de la cebolla (Figura I.7.) siendo estos compuestos insolubles en agua y biológicamente activos (Vazquez-Armenta, Cruz-Valenzuela, Ayala-Zavala, 2016).

Entre los factores bioquímicos y fisicoquímicos que promueven la reactividad y descomposición de los tiosulfinatos, se encuentran: pH, temperatura, preparación de la muestra y tiempo de almacenamiento (Rose y col., 2005).

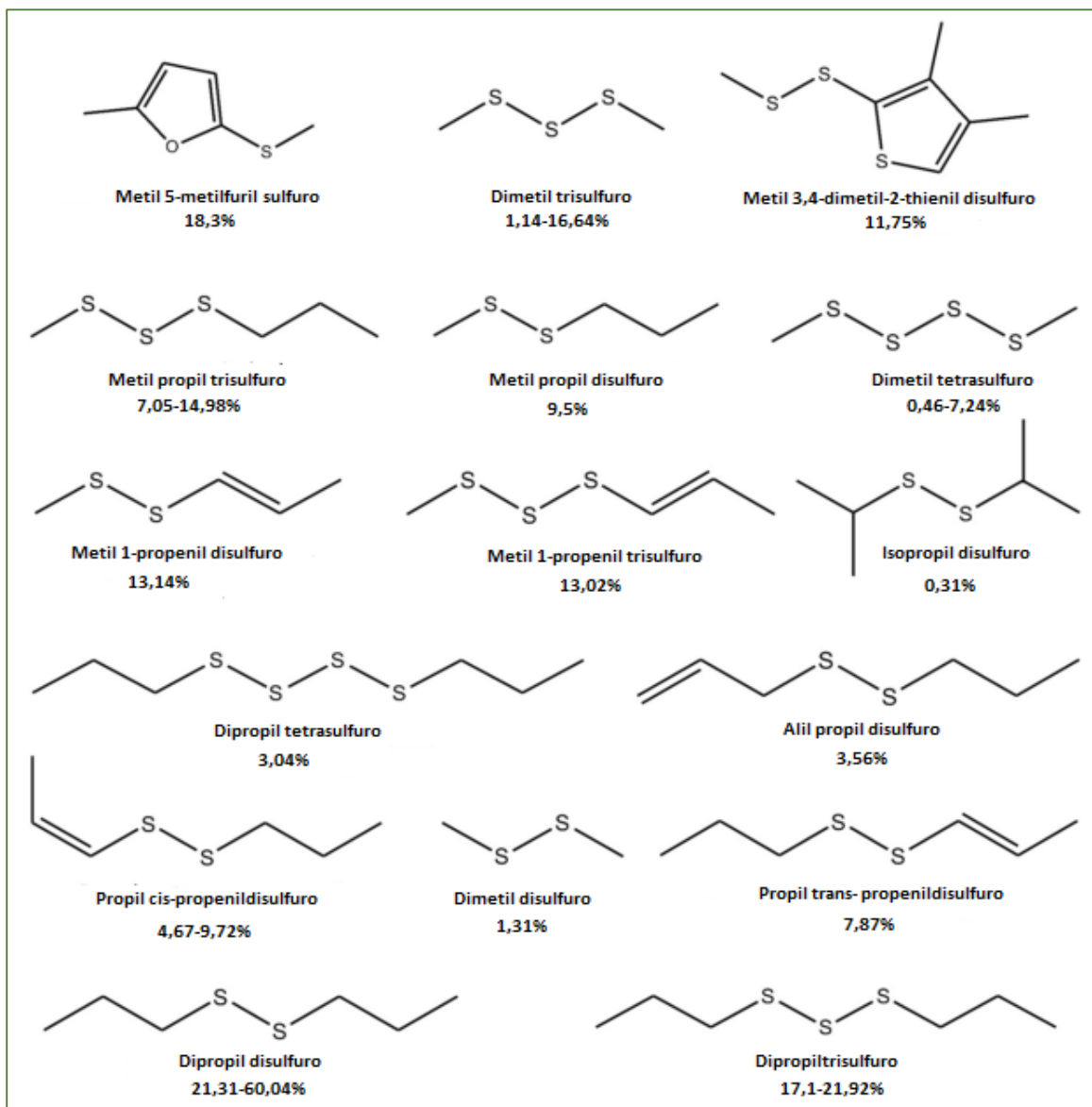


Figura I.7. Principales compuestos volátiles identificados en aceite de cebolla.

Fuente: Vázquez-Armenta, 2016.

I.8. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA CEBOLLA

Las cebollas y especies relacionadas han sido extensamente usadas desde tiempos ancestrales en muchas partes del mundo como condimento u hortalizas saborizantes así como en la medicina tradicional y popular con una amplia gama de beneficios para la salud (Nile, Park, 2013). En la actualidad, existen numerosos reportes demostrando las propiedades funcionales y medicinales de esta hortaliza, la mayoría de dichos efectos biológicos han sido asociados con la presencia de OSCs y los flavonoides (Griffiths y col.,2002). Dentro de las propiedades benéficas debido al consumo de cebolla se destacan:

I.8.1. PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFÚNGICAS

La caracterización química de los OSCs han permitido afirmar que son los principales agentes antimicrobianos de la cebolla (Rose y col.,2005). Sin embargo, los compuestos fenólicos pueden contribuir a esta actividad. Asimismo, los extractos de cebolla cruda y el aceite de cebolla han demostrado tener actividades contra bacterias Gram-positivas (+) y hongos (Griffiths y col.,2002). En este contexto, Kim, 1997; determinó que los extractos de cebolla inhibían bacterias bucales asociadas a la formación de caries y gingivitis, entre ellas, las más abundantes *Streptococcus mutans* y *sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Además, se determinó la actividad antimicrobiana del aceite de cebolla contra bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Salmomella enteritidis*, *Bacillus cereus* y *anthracis*, *Micrococcus luteus*); contra hongos (*Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum*, *Microsporium canis* y *gypseum*, *Trichophyton simii*) y contra bacterias Gram-negativas (-) como *Klebsiella pneumoniae* .También se asocia el aceite de cebolla con la reducción de producción de aflatoxinas (Benkeblia, 2004; Abdel-Nasser, Abdel-Gawad, Saber, 1995).

Los principios activos responsables de las actividades bactericidas y fungicidas de los aceites de cebolla son los polisulfuros. El número de átomos de azufre de sus moléculas influye en la actividad antimicrobiana de los OSCs. Mientras mayor sea su número, mayor actividad (Kim y col., 2004; Abdel-Nasser, Abdel-Gawad, Saber Zohri, 1995).

En cuanto a los flavonoles en cebolla cruda, se ha determinado que quercetina, sus derivados glucosilados y caemferol fueron eficientes inhibidores de bacterias Gram (+) como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes* (Santas, Almajano, Carbó, 2010).

I.8.2. PROPIEDADES ANTIPARASITARIAS

Abu, Khalil, Shaapan, 2011; determinaron el efecto antiparasitario *in vivo* de aceite de cebolla contra *Cryptosporidium parvum* (parásito asociado con diarrea en mamíferos). Estos autores afirman que esta propiedad era debido a compuestos flavonoides y a OSCs.

Extractos acuosos de cebolla cruda han demostrado tener *in vitro* actividad contra diferentes cepas de *Leishmania sp.*, los autores sugieren que esta propiedad es debida a los OSCs (Saleheen, Ali, Yasinzai, 2004). Por otro lado el aceite de cebolla tiene actividad antihelmíntica en ratas infectadas con *Trichinella spiralis* (Abu, 2005).

I.8.3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son compuestos de interés biológico porque son responsables de inhibir el daño causado por radicales libres incluyendo especies reactivas al oxígeno, nitrógeno y cloro (ROS, RNS y RCIS). Estos pueden alterar la integridad funcional y estructural de las células promoviendo cambios redox intracelulares incluyendo oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, daños oxidativos al ADN y formación de proteínas carbonilos (Rose y col.,2005). Estas alteraciones influirían o acentuarían el desarrollo de un amplio rango de enfermedades, entre ellas, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias , neurodegenerativas como el Alzheimer y algunos tumores malignos. A la fecha, numerosos trabajos muestran que el consumo de una dieta rica en frutas y hortalizas proporciona gran

cantidad de compuestos antioxidantes (Corzo-Martínez, Corzo, Villamiel, 2007). Entre ellos compuestos fenólicos y OSCs que se encuentran en la cebolla presentan capacidad antioxidante (Benkeblia, 2005). Asimismo, estudios *in vitro* establecen que la cebolla cortada cruda y el aceite de dicha matriz presenta capacidad antioxidante. Esto es debido a la capacidad de los flavonoides, principalmente quercetina y de los OSCs de captar radicales libres y proteger el ADN contra el daño de ROS. También al poder reductor y capacidad de quelar metales que catalizan la formación de compuestos oxidantes (Benkeblia, 2005; Prakash, Singh, Upadhyay, 2007; Ye, Dai, Hu, 2013).

Reportes de Helen y col. (2000); indicaron que el aceite de cebolla era un efectivo agente antioxidante contra el daño oxidativo causado por nicotina en ratas. El efecto antioxidante fue atribuido a los OSCs principalmente dimetil-disulfuro (DMDS) y tioles derivados que captan radicales libres previniendo la formación de superóxidos. Estos compuestos bioactivos también aumentan la actividad de enzimas de barrido (superóxido dismutasa y catalasa).

También McAnlis y col., (1999); determinaron que el contenido de quercetina presente en cebolla frita ingerida por el hombre aumentaba la actividad antioxidante del plasma sanguíneo.

I.8.4. PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS

La dieta juega un rol fundamental en la etiología de las enfermedades, en estudios realizados en humanos se demostró que el consumo de cebolla y ajo ejercía un efecto protector contra algunos tipos de tumores (Rose y col., 2005). Principalmente contra el desarrollo o la incidencia de cáncer de esófago, estómago (Gao y col., 1999), próstata (Hsing y col., 2002), cerebro (Dorant y col., 1996; Harris y col., 2015; Hu y col., 1999), mama (Challier, Perarnau, Viel, 1998) y pulmón (Le Marchand y col., 2000). Este efecto de la cebolla parece estar mediado por varios mecanismos que no son entendidos completamente pero que ejercerían acción anticarcinogénica, entre ellos podemos mencionar: alteración del metabolismo carcinogénico ya sea aumentando la actividad de los sistemas enzimáticos de desintoxicación o aumentando la polaridad del cancerígeno, lo cual facilita su excreción del cuerpo; inhibición de la activación de procarcinógenos; inhibición del daño oxidativo debido a su acción antioxidante; inhibición de la proliferación celular mediante la inducción de la apoptosis y la inhibición de la división celular; prevención del daño cromosómico; e inhibición de las actividades de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa.

Estas propiedades anticancerígenas han sido atribuidas en su mayoría a OSCs entre ellos el dimetil-disulfuro (DMDS), metilpropil-disulfuro (MPDS), metilpropil-trisulfuro (MPTS), como a los compuestos flavonoides principalmente caemferol, quercetina (Corzo-Martínez, Corzo, Villamiel, 2007) y sus derivados glicosilados (Griffiths y col., 2002). Quercetina también mejora la biodisponibilidad de algunas drogas para el tratamiento de tumores debido a que promueve una mejor absorción intestinal y enlentece su metabolismo (Shin, Choi, Li, 2006).

I.8.5. PROPIEDADES RELACIONADAS CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La arterioesclerosis es un síndrome caracterizado por el depósito y la infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias provocando inflamación, multiplicación y migración de las células musculares lisas condicionando el estrechamiento de la luz arterial (Camargo, Manucha, 2016). Tanto esta enfermedad como las cardiovasculares están asociadas con elevados niveles de triglicéridos y colesterol LDL en la sangre, elevada actividad antiplaquetaria, diabetes, hipertensión y obesidad (Corzo-Martínez, Corzo, Villamiel, 2007).

Algunas investigaciones han demostrado que metiina (S-metil cisteína sulfóxido) exhibe actividad hipolipemiente (Kumari, Mathew, Augusti, 2007) y quercetina inhibe la biosíntesis *in vitro* de colesterol por las células hepáticas en ratas (Gläber y col., 2002). Estos dos compuestos son mayoritarios en cebolla.

Estudios reportan efectos hipotensivos de extractos de cebolla, esta propiedad la atribuyen tanto a los compuestos tiosulfatos (Brankovic y col., 2011), como a la quercetina (Naseri y col., 2008). Sánchez y col., (2007); asociaron a este flavonol con el aumento de la biodisponibilidad del óxido nítrico (vasodilatador).

Estudios anteriores, han determinado el efecto hipoglucémico de extractos de cebolla en ratas y ha sido atribuido tanto a metiina como a los OSCs, principalmente alil propil disulfuro. Estos tienen este efecto debido a que pueden simular la liberación y la acción de insulina, mejorando la captación celular y la utilización de glucosa en ratas (Ozougwu, 2011; Srinivasan, 2005). Según un meta-análisis realizado por Kook, Kim, Chio, (2009); este efecto antidiabético era incluso mejor que el producido por el ajo.

Cuando los vasos sanguíneos normales están dañados, la agregación de plaquetas se produce rápidamente para formar trombos arteriales en los sitios de lesión de los vasos o en regiones en las que es perturbado el flujo de sangre. La adhesión plaquetaria a componentes subendoteliales, tales como colágeno, activa las vías metabólicas del ácido araquidónico, que conducen a la formación de tromboxano A₂ un potente inductor de la agregación plaquetaria y un vasoconstrictor (Moon y col., 2000). En muchas enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, accidente cerebrovascular y enfermedades vasculares periféricas, la activación excesiva de plaquetas es considerada como la causa de la trombosis. Por lo tanto, el desarrollo de un agente antiplaquetario podría ser un enfoque terapéutico fundamental para las enfermedades cardiovasculares (Ro y col., 2015). Se han desarrollado estudios que determinan las propiedades antitrombóticas *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, se ha determinado que extractos acuosos de cebolla inhibían la formación de tromboxano en estudios *in vitro* en plaquetas de ratas y humanos. Esta propiedad era debida a los OSCs (Moon y col., 2000).

Se determinó que los extractos de cebolla cruda presentaron mayor actividad que aquellos a los que se les aplicó un tratamiento térmico debido a la pérdida de OSCs (Bordia y col., 1996).

I.8.6. EFECTO ANTIHISTAMÍNICO

Tiosulfatos y cebaenos, muestran *in vitro* actividades antiinflamatorias y antiasmáticas debido a que inhiben enzimas (ciclooxigenasa y lipoxigenasa) reduciendo la biosíntesis de

mediadores activos de la inflamación que conducen a la restricción bronquial (Wagner y col, 1990). Por otro lado, Sato y col., (2015); observaron *in vitro* de que quercetina inhibe procesos de alergias tipo I, incluyendo alergias a determinados alimentos, dermatitis atópica y rinitis. Debido a que inhibe la β -hexosaminidasa que se relaciona con la producción de histamina.

1.9. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CEBOLLA

Debido a que los compuestos flavonoles y OSCs presentan propiedades benéficas para la salud, se han desarrollado métodos para identificarlos y cuantificarlos en cebolla ya sea cruda o luego de la aplicación de procesos culinarios, para identificar cada tipo de compuesto y así poder relacionarlos con sus propiedades biológicas.

1.9.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MATRICES VEGETALES

La etapa de preparación de la muestra en el proceso analítico consiste en un procedimiento de extracción que resulta en el aislamiento y enriquecimiento de componentes de interés a partir de una matriz de la muestra. La extracción puede variar en el grado de selectividad, la velocidad, conveniencia y depende no sólo de las condiciones usadas sino también de las características de la fase de extracción. En la investigación de preparación de muestras, el mayor interés ha sido generado por nuevas tecnologías de extracción. Las mismas abordan la necesidad de reducir el consumo de los disolventes, la automatización y miniaturización. Estos enfoques de extracción son frecuentemente más fáciles en la operación pero proporcionan desafíos en la optimización de los mismos (Pawliszyn, 2003). Dentro de las técnicas tradicionales de extracción se encuentra la líquido-líquido (del inglés Liquid Liquid Extraction, (LLE)) que es una de las más antiguas técnicas de aislamiento de analitos dentro de la química analítica. Esta requiere gran cantidad de disolventes orgánicos que son costosos, peligrosos, indeseables por razones de salud y de difícil eliminación, y que, además, requieren mucho tiempo de extracción. En el caso de la extracción en fase sólida (del inglés Solid Phase Extraction, (SPE)), muchos de los problemas asociados con la LLE, tales como separaciones de fase incompletas, menores recuperaciones cuantitativas, uso y eliminación de cantidades grandes y costosas de disolventes orgánicos, se pueden evitar, pero el costo del equipo necesario para SPE es mayor (García-Salas y col., 2010), además genera una gran cantidad de residuos, ya que después de su uso, los cartuchos SPE se envían a vertederos siendo una técnica no amigable con el medio ambiente (Zgola-Grzeńskowiak, Grzeńskowiak, 2011). La extracción con fluidos supercríticos (del inglés Supercritical Fluids Extraction, (SFE)) podría ser una alternativa ambientalmente más aceptable respecto a la extracción convencional con disolventes orgánicos. Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida, automatizable, selectiva y evitar el uso de grandes cantidades de disolventes tóxicos. Además, al efectuarse en ausencia de luz y oxígeno durante la extracción reduce la degradación que pudiera ocurrir con el uso de técnicas tradicionales (Ignat, Volf, Popa, 2011), sin embargo, la desventaja que presenta es su elevado costo (Rezaee y col. 2006). Las técnicas anteriormente mencionadas se han aplicado en cebolla tanto a compuestos fenólicos como OSCs (Ignat, Volf, Popa, 2011; Lanzotti, 2006; Naczek, Shahidi, 2004; Sinha y

col.,1992). Por otro lado, se han usado para la extracción de OSCs destilaciones mediante arrastre con vapor (Lanzotti, 2006).

Recientes investigaciones han sido orientadas hacia el desarrollo de métodos eficientes, económicos y miniaturizados de preparación de muestras. Entre ellos podemos mencionar la microextracción en fase sólida (del inglés Solid Phase Microextraction (SPME)) (Locatelli y col., 2014) y microextracción líquido-líquido dispersiva (del inglés Liquid Liquid Dispersive Microextraction (DLLME)) (Ramirezy col., 2017).

I.9.1.1. Microextracción en fase sólida (SPME)

Las técnicas de SPME fue desarrollada por el grupo de Pawliszyn en 1990, y es usada principalmente para extraer compuestos volátiles. Es una técnica de preparación de muestra libre de solventes y se basa en la partición del analito entre una fase estacionaria (polímero de sorción soportado en un capilar), y el espacio de cabeza de un vial sellado que contiene la muestra (Locatelli, Altamirano, Luco, Norlin, y Camargo, 2014). Esta técnica ha sido aplicada para determinar compuestos volátiles en cebolla entre ellos tiosulfatos y el FL (Mondy y col.,2001). A pesar de su extendido uso esta técnica tiene la limitación de ser costosa; frágil y con limitado tiempo de vida útil (Rezaee y col., 2006).

I.9.1.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Basado en el principio de LLE, la DLLME fue introducida por primera vez en 2006 por Rezaee y col. En esta técnica (Figura I.8.), un disolvente de extracción (solvente con baja solubilidad, diferente densidad que el agua y capacidad de extraer los analitos en estudio) y un disolvente dispersante (miscible tanto en agua y en la fase de extracción) se mezclan y se inyectan rápidamente usando una jeringa en la muestra acuosa, luego una nube dispersante se establece, esta provoca la formación de gotitas minúsculas que proporcionan una gran interfase de contacto y acelera la partición de los analitos. Luego de una centrifugación se logra sedimentar las partículas de la fase extractante que contiene los analitos de interés mediante su depósito en el fondo del tubo de ensayo cónico. La selección adecuada del disolvente de extracción y dispersión es importante para obtener un alto factor de enriquecimiento (EF), definido como la relación de la concentración de analito en la fase sedimentada a la concentración inicial de analito en la muestra.

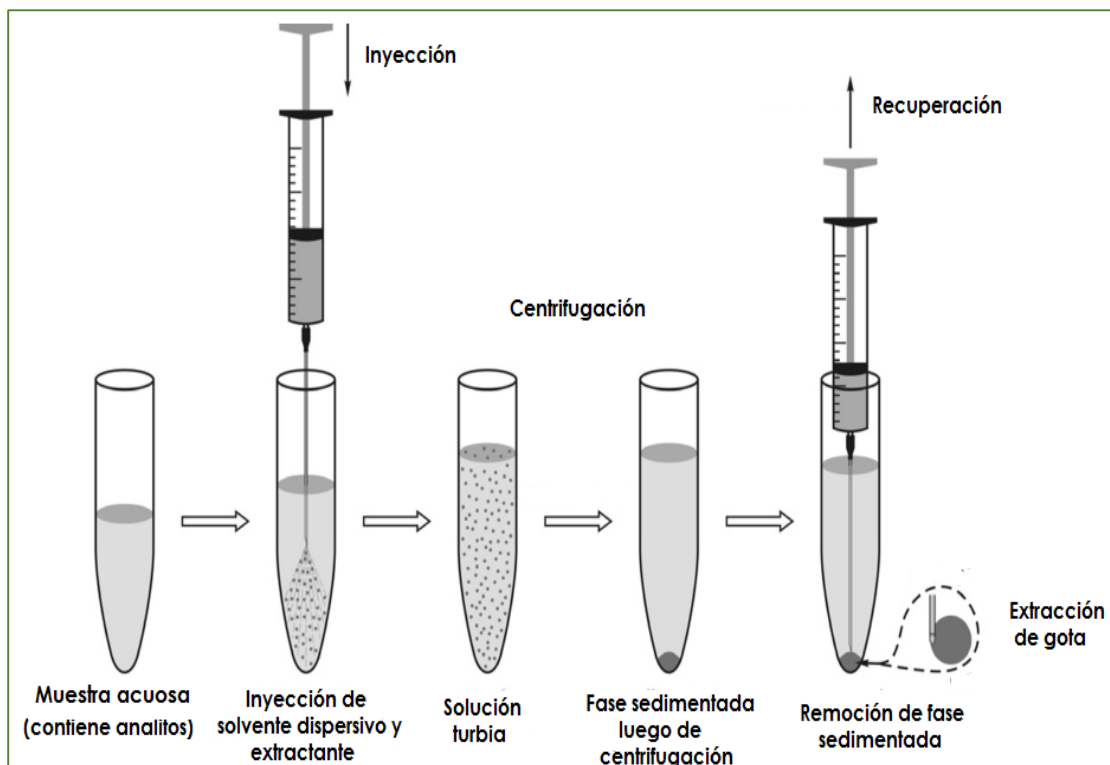


Figura I.8. Procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva.

Fuente: Zgola-Grze'skowiak, Grze'skowiak, 2011.

La DLLME sólo es adecuado para muestras líquidas, por lo tanto, se aplica principalmente en muestras acuosas. Para matrices sólidas tales como muestras de vegetales, los compuestos target en estudio deben ser transferidos a una fase acuosa a partir de su matriz para la purificación mediante DLLME. Hay muy pocos estudios describiendo el uso de DLLME en muestras de vegetales (Yang, Wang, Li, 2013).

Los mayores beneficios del uso de DLLME radica en: su alta velocidad de reacción; elevada recuperación y bajo costo. Además es una técnica recomendable por el escaso volumen de solventes tóxicos que se utilizan (Rezaee y col., 2006; Yang, Wang, Li, 2013). En un primer momento estas técnicas se usaron para extraer compuestos orgánicos en muestras acuosas pero con el tiempo se fue aplicando a matrices vegetales con resultados satisfactorios. En este contexto Campillo y col., (2015); determinaron flavonoides en miel mediante esta técnica usando acetonitrilo y cloroformo como solventes dispersantes y extractante respectivamente. Por otro lado (Ramirez y col., 2017) determinaron los compuestos organoazufrados presentes en muestras de ajo.

I.9.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

I.9.2.1. Principio básico de cromatografía

La cromatografía es un método físico-químico de separación en el cual los componentes de la muestra son distribuidos en dos fases, una de las cuales permanece inmóvil (fase estacionaria), mientras la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, mientras que la fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico (Quattrocchi; Andrizzi, Laba, 1992).

1.9.2.1.1. Cromatografía gaseosa (del inglés Gas Chromatography (GC))

La Cromatografía Gaseosa es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles o volatilizables. En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) que es sólo un simple transportador de soluto y casi no influye en la separación, la fase estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido "sostenido" en un sólido inerte (cromatografía gas-líquido).

1.9.2.1.2. Cromatografía líquida de alta performance (del inglés High-Performance Liquid Chromatography (HPLC))

Este tipo de cromatografía se encuadra dentro de la cromatografía de fase líquida. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de analitos en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Una vez separados los diferentes compuestos pasan por un detector, emitiendo una señal acorde a cada analito, finalmente como resultado se obtiene un cromatograma.

1.9.3.TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU RELACIÓN CON LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES

Luego de la aplicación de las técnicas de extracción, una amplia gama de métodos analíticos se han reportado para determinar flavonoides en matrices vegetales. Las técnicas de separación más utilizadas han sido técnicas cromatográficas entre ellas: cromatografía en capa delgada (del inglés Thin Layer Chromatography (TLC)), electroforesis capilar (del inglés Capillary Electrophoresis (CE)), cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cromatografía de gases (GC)), en combinación con métodos espectroscópicos (espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV)), espectrómetro de masa (del inglés Mass Spectrometer (MS)), espectrómetro de resonancia magnética nuclear (del inglés Nuclear Magnetic Resonance (RMN) e índice de refracción (del inglés Refractive Index Detector RID)). Actualmente, la primera opción para el análisis de flavonoides es típicamente HPLC usando fase reversa (del inglés Reverse Phase (RP)) con columna octadecilsilano (C18) acoplados a un detector de arreglo de diodos (del inglés Diode Array Detector (DAD)) o a un detector de espectro de masas (del inglés Mass Spectrometry (MS)). La técnica HPLC-MS (que combina una separación eficiente con la caracterización estructural de los compuestos respectivos) se utiliza con éxito para las matrices vegetales.

Por otro lado, la cromatografía de gases (GC) con derivatización ha sido utilizada para el análisis de flavonoides, especialmente antes de que el detector MS se acoplara con HPLC. La mayoría de los flavonoides y sus metabolitos son relativamente polares, debido a que contienen uno o más grupos funcionales (-OH, -COOH). La aplicación de técnicas de derivatización proporciona volatilidad y estabilidad en la fase gaseosa de los constituyentes polares de baja volatilidad. Normalmente, los derivados trimetilsililo (TMS) disminuyen su

polaridad y aumentan la volatilidad y estabilidad térmica de los flavonoides, antes del análisis por GC-MS (Gao y col., 2010). La etapa de derivatización está aparejada con mayores tiempos de preparación de muestras previo inyección al equipo de GC.

I.9.4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU RELACIÓN CON LOS OSCs

Para la cuantificación de OSCs se han desarrollado técnicas GC-MS y HPLC-UV con detector DAD (Lanzotti, 2006).

La técnica de GC, como se realiza normalmente con las altas temperaturas del inyector y columna, genera compuestos inusuales o artefactos que no están presentes originalmente en el tejido vegetal (Iranshahi, 2012). Por otro lado, HPLC proporciona una medida fiable, tanto cualitativa como cuantitativa de los compuestos volátiles presentes. (Lanzotti, 2006).

I.10. MÉTODOS DE COCCIÓN DE CEBOLLA Y SU RELACIÓN CON COMPUESTOS FITOQUÍMICOS

Se han realizado estudios para determinar cómo varían los compuestos flavonoles con respecto a los diferentes métodos de cocción en cebolla pelada y picada, en base a esto según la bibliografía consultada, la fritura no afectaría el contenido de flavonoides (Ioku y col., 2001; Lombard y col., 2005).

El grupo de Harris y col., (2015) determinaron que la cocción en horno y mediante vapor disminuía el contenido de quercetina. Caso contrario se observó con respecto a la fritura a 160 °C durante 5 minutos que no solo mantuvo los niveles sino aumentó su concentración inicial. Esto se debió al aumento de la extractabilidad de estos compuestos mediante el método de cocción aplicado. Como se mencionó anteriormente, en cebolla cortada los compuestos volátiles responsables del aroma son los tiosulfatos (principalmente los propil tiosulfatos). Los compuestos di y trisulfuro que poseen grupos propil y propenil son los responsables del flavor de cebolla cocida. (Boelens y col., 1971). Por otro lado, se han estudiado los compuestos azufrados que se generan por acción del calor en la cebolla y se ha encontrado entre otros metil propil disulfuro (MPDS), metil propil trisulfuro (MPTS) y dimetil disulfuro (DMDS) (Shaath, Flores, 1998).

Dentro de las diferentes formas de consumo de esta hortaliza, una maneras de presentación es como aros de cebolla frito (Ling y col., 1998).

I.11. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los compuestos flavonoles y OSCs presentan interés nutricional debido a que son fitoquímicos que al consumirlos nos aportan propiedades benéficas para la salud.

Se han reportado diferentes metodologías analíticas que permiten la extracción, detección y cuantificación de ambas familias de compuestos químicos por separado pero no en forma conjunta (Andlauer, Martena, Fürst; 1999; Colina-Coca y col., 2013).

Al resultar de interés evaluar los principales compuestos fitoquímicos de la cebolla es adecuada la determinación de ambos grupos de fitoquímicos.

Por lo expuesto surgió la necesidad de desarrollar una metodología analítica que permita cuantificar analitos de diferentes familias químicas, presentes en cebolla. Asimismo, evaluar

si la cocci3n por tecnologa "rapid air" de aros de cebolla y el uso de rebozadores permitan preservar los compuestos bioactivos.

Por las razones expuestas, se plantea la siguiente hip3tesis:

I.12. HIP3TESIS

- *El desarrollo y validaci3n de una metodologa analitica para la determinaci3n y cuantificaci3n de compuestos bioactivos en aros de cebolla mediante DLLME-HPLC-UV es posible.*
- *El uso de rebozadores y la fritura "rapid air" de aros de cebolla afecta el contenido de principios bioactivos.*

I.13. OBJETIVOS

I.13.1. OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar y validar una metodologa analitica para la determinaci3n y cuantificaci3n de compuestos bioactivos en aros de cebolla mediante DLLME-HPLC-UV.
- Evaluar el efecto de la fritura por "rapid air" y el uso de rebozadores sobre el contenido de principios bioactivos.

I.13.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar los parámetros operacionales para lograr la resoluci3n de los analitos de intere3 mediante HPLC-UV.
- Adecuar una metodologa analitica para la determinaci3n de compuestos flavonoles y OSCs en muestras de cebolla.
- Determinar las figuras analiticas de m3rito del m3todo analitico desarrollado.
- Aplicar una t3cnica de miniaturizaci3n para optimizar la extracci3n tanto en muestras crudas como cocidas de cebolla.
- Evaluar las consecuencias del tipo de rebozado y fritura sobre los niveles cualicuantitativos de compuestos flavonoles y OSCs.

CAPÍTULO II

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS OPERACIONALES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOLES Y OSCs

II. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS OPERACIONALES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOLES Y OSCs.

II.1. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el capítulo anterior, la técnica de HPLC es la seleccionada para el desarrollo de una metodología destinada al análisis de OSCs y flavonoles. Debido a que no se cuenta con un protocolo para cuantificar ambos grupos químicos, se decidió optimizar las variables involucradas en el proceso cromatográfico. Como se sabe, la optimización de las condiciones operacionales en cromatografía líquida (del inglés Liquid Chromatography (LC)) tiene por finalidad lograr la resolución de una mezcla compleja de analitos en el menor tiempo posible. Esta implica, la evaluación de las respuestas de determinadas variables al sistema analito-fase estacionaria/fase móvil, en estudio.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. REACTIVOS ANALÍTICOS, ESTÁNDARES Y DROGAS

II.2.1.1. Estándares analíticos

El criterio para elegir los compuestos a estudiar, de acuerdo con la bibliografía consultada, fue: analitos previamente identificados y cuantificados en muestras de cebolla, y que respondan al detector UV.

Los estándares seleccionados para realizar el análisis fueron:

- ~ Rutina (Sigma Aldrich, 94 %)
- ~ Quercetina (Sigma Aldrich, 99,7 %)
- ~ camferol (Sigma Aldrich, 90%).
- ~ Dimetil Disulfuro (DMDS) (Aldrich, 99%).
- ~ Metil Propil Disulfuro (MPDS) (Aldrich, 90%).
- ~ Metil Propil Trisulfuro (MPTS) (Aldrich, 50%).

II.2.1.2. Reactivos

- ~ Metanol (MeOH; Sintorgan grado HPLC).
- ~ Agua ultra pura (18 MΩcm) obtenida de un sistema de purificación de agua Mili-Q (Millipore, Molsherm, Francia).

II.2.1.3. Drogas

- ~ Ácido fórmico (AF; Cicarelli, 88 %).

II.2.2. EQUIPOS

- ~ Cromatógrafo líquido (PerkinElmer 200), acoplado a un detector UV-Vis.

- ~ Columna: ZORBAX SB C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) Phenomenex con guarda columna ZORBAX SB C8 (10 mm x 4,6 mm x 5 μ m).
- ~ Columna SPHERISORB ODS2 C18 (150 mm, 4, 6 mm, 5 μ m) Phenomenex con guarda columna WATERS SPHERISORB, (10 mm x 4, 6 mm x 5 μ m).
- ~ Espectrofotómetro Lambda 35 UV/Vis (PerkinElmer, Shelton, Conn., EE.UU.), equipado con cubeta de cuarzo de 1-cm.

II.2.3. MÉTODOS

II.2.3.1. Preparación de soluciones

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de estándares comerciales.

II.2.3.1.1. Preparación de soluciones madre

Los compuestos fenólicos se presentan comercialmente en estado sólido y los OSCs en forma de aceite o líquidos. Las soluciones madres de cada analito se prepararon de forma individual pesando cantidades de sólido o gota \pm 10 mg en matraces de 5 ml previamente tarados y se disolvieron con MeOH hasta enrazar el material volumétrico.

Para el cálculo de la concentración de cada solución madre se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{P_p (\mu\text{g}) \times \text{Pur}}{V_f (\text{ml}) \times 100}$$

Donde:

C = concentración de la solución patrón expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ppm)

Pp = peso del patrón en μg

Pur = pureza porcentual del patrón

Vf = volumen final de la solución preparada expresado en ml

II.2.3.1.2. Preparación de soluciones de trabajo

Se prepararon a partir de las soluciones madres de cada uno de los estándares: quercetina, camferol, rutina, DMDS, MPDS, MPTS. Para ello, se tomó un volumen correspondiente a 30 ppm de cada estándar y se colocó en un matraz de 25 ml el cual se enrazó con MeOH. Esta solución se denominó mezcla de los 6 estándares.

El cálculo para la preparación de la solución diluida fue el siguiente:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

C1 = Concentración de la solución madre expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ppm)

V1 = Volumen de solución madre tomado en ml

C2 = Concentración de la nueva solución expresada en ppm en este caso 30 ppm

V1 = Volumen final de la solución a preparar en ml

II.2.3.2. Optimización de parámetros cromatográficos

II.2.3.2.1. Elección de la fase estacionaria

La modalidad cromatográfica de elección para la cuantificación de flavonoles es la cromatografía RP, que consiste en el empleo de columnas con fases estacionarias apolares, como octadecilsilano (C18) u octilsilano (C8) (Watson, 2014). Mientras que, para la cuantificación de tiosulfatos en cebolla se emplean técnicas además de por fase reversa (con columna C18) por fase normal (columna de sílica)(Block, 1992).

En nuestro caso se evaluó la performance del empleo de columnas de fase reversa C18 y C8 para la separación de los analitos de interés.

II.2.3.2.2. Elección de fase móvil

Por lo general para identificar los flavonoles se emplean equipos de HPLC acoplados a detectores espectrofotométrico UV-visibles. En la separación se utiliza un sistema de solventes binarios conteniendo agua acidificada con ácidos orgánicos y un modificador orgánico.

Para la elección de los modificadores orgánicos hay que tener en cuenta la longitud de onda de trabajo para detectar los analitos y la longitud de onda de corte (del inglés Cutoff); longitud de onda UV a la que la absorbancia del disolvente en una celda de 1 cm es igual a la unidad) de los solventes a usar. Aquellos con altos puntos de corte, tales como acetona, acetato de etilo no son adecuados para el análisis a longitudes de onda (λ) bajas, tales como las del UV. Un disolvente con un punto de corte UV superior a la λ usada para el análisis, aumenta el ruido de base como consecuencia de la facilidad con que el disolvente absorbe (Guido, 2015). Debido a que el cutoff de ACN y MeOH son bajos (190 nm y 205 nm respectivamente) se emplean mayormente porque no absorben energía a la λ que se va a trabajar, es decir son transparentes a la λ usada para los analitos en estudio. Tanto el MeOH como el ACN se usan para determinar flavonoles y OSCs por RP, en nuestro caso se prefiere MeOH debido a su menor costo y a que ACN es difícil de adquirir.

Por otro lado, la acidificación de la fase móvil, utilizando ácido acético, fórmico, y fosfórico, es una estrategia común con el fin de suprimir la ionización de los grupos hidroxilos para favorecer la forma no iónica de los flavonoles. Esto se realiza debido a que la forma molecular, se retiene más favorablemente en fase reversa evitándose además el tailing en los picos cromatográficos mejorando la resolución y reproducibilidad de las características de retención (Watson, 2014).

Con respecto a los OSCs en cebolla se han desarrollado técnicas cromatográficas tanto por GC como por HPLC, este último emplea mediante fase reversa (C18) una mezcla de MeOH: Agua (Mondy y col., 2001).

Las separaciones isocráticas (composición constante de fase móvil) se utilizan cuando la mezcla a separar no es muy compleja o cuando los componentes de la mezcla tienen tiempos de retención muy diferentes (Esquivel, Leal, 2004). Por otro lado, la elución en gradiente, es decir cambiando la composición de la fase móvil en función del tiempo, se emplea para separar compuestos que mediante el modo isocrático no es posible resolver (Manch, 2015). En nuestro caso se evaluó el desempeño del empleo de mezclas de agua con

diferentes proporciones de modificador orgánico, acidificada con 0,6% de ácido fosfórico o acético siguiendo tanto técnicas por modalidad isocrática como en gradiente.

II.2.3.2.3. Selección de longitud de onda para detector

El detector UV opera en el rango de 190 nm a 350 nm y en la región visible entre 350 nm a 700 nm (Quattrocchi Andrizzi, Laba, 1992). Debido a que el detector UV-visible puede trabajar en el rango de 190 nm a 700 nm se prepararon soluciones diluidas en MeOH de cada analito y se sometieron a barrido espectral entre 190 nm y 290 nm para determinar los máximos de absorción de cada uno.

II.2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones óptimas de trabajo se seleccionaron en función de lograr una resolución adecuada de los 6 analitos de interés en el menor tiempo posible.

Se ensayaron soluciones de quercetina, camferol, rutina, DMDS, MPDS, MPTS.

II.2.4.1. Elección de fase estacionaria y fase móvil

Según la bibliografía consultada se intentó separar los analitos en primer lugar, mediante el empleo de una columna C18 trabajando en modalidad isocrática, basándonos en la bibliografía, se emplearon mezclas de MeOH (0,6 % AF)-H₂O (0,6% AF), variando de 80 a 40 % de modificador orgánico. Se comenzó con proporciones iniciales altas de MeOH procurando que los analitos eluyan con mayor rapidez para lograr su identificación, posteriormente, se probaron mezclas con menores porcentajes de modificador orgánico para facilitar la separación (Quattrocchi Andrizzi, Laba, 1992). Luego de estos ensayos no fue posible separar los analitos quercetina y camferol. Posteriormente se probó en modalidad de elución con gradiente, para ello se ensayaron las condiciones de Albishi y col., 2013; Andlauer, Martena, Fürst; 1999; Fontana, Bottini, 2014. Si bien mediante el empleo de estos gradientes mejoró la separación, ninguno resultó suficiente para la resolución deseada, razón por la cual se evaluó un nuevo gradiente mediante un modelo exploratorio. Este último consistió en variar las proporciones de MeOH (0,6 % AF)-H₂O (0,6% AF) en el tiempo, siempre disminuyendo la fuerza de elución de la fase móvil, es decir de 90 % de MeOH hasta 10% y en la zona que se detectan los analitos de interés ir prolongando la etapa hasta que se resuelvan completamente. Si bien con el gradiente exploratorio se consiguieron las mejores condiciones los tiempos de retención de los analitos fueron muy cercanos unos de otros, pudiendo acarrear inconvenientes a la hora de trabajar con muestras de interés.

Debido a que no se logró la resolución adecuada para todos los analitos bajo estudio (algunos de ellos coelúan), se reemplazó por una columna con fase estacionaria C8 la cual al disminuir la cadena hidrocarbonada, disminuye la retención y en consecuencia se logró una mejor resolución.

En la Tabla II.1, se detallan las condiciones con las cuales se logró la mejor separación.

Tabla II-1. Gradiente de elución usado para la resolución de los OSCs y flavonoles

Tiempo (min)	H ₂ O : AF 0,6%(v/v)	MeOH : AF 0,6% (v/v)
0,5-3,5	70	30
3,5-8,5	50	50
8,5-18,5	40	60
18,5-33,5	0	100

II.2.4.2. Elección de la longitud de onda de trabajo

Como se mencionó en el apartado anterior, el equipo a utilizar tiene un detector UV- visible. Según bibliografía y por su estructura química, tanto los compuestos flavonoides como OSCs pueden ser detectados. Con la finalidad de elegir una λ adecuada para revelar todos los analitos bajo estudio se realizó el barrido espectral de cada uno.

En las Figuras II.1., II.2., II.3., II.4., II.5., II.6. se observan los gráficos obtenidos correspondientes al barrido espectral de soluciones de cada analito. En las cuales es posible advertir que los picos máximos de absorción para cada uno de los analitos fueron: quercetina ($\lambda = 193$ nm y 255 nm); camferol ($\lambda = 195$ nm-266 nm); rutina ($\lambda = 206$ nm y 260 nm); DMDS ($\lambda = 209$ nm y 253nm); MPDS ($\lambda = 206$ y 235); MPTS ($\lambda = 206$ y 237).

Del análisis de los espectros obtenidos para cada compuesto, se eligió una λ de 260 nm ya que presentaba las mejores condiciones para todos los analitos bajo estudio.

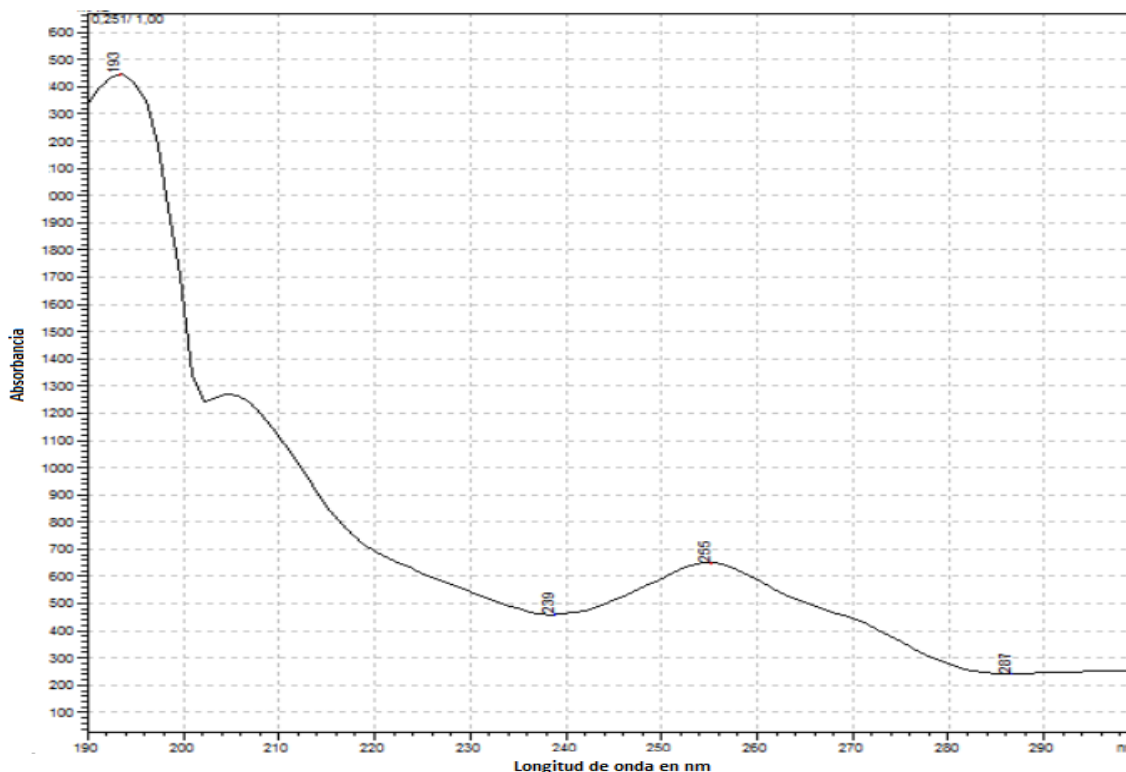


Figura II.1. Barrido espectral de quercetina en metanol.

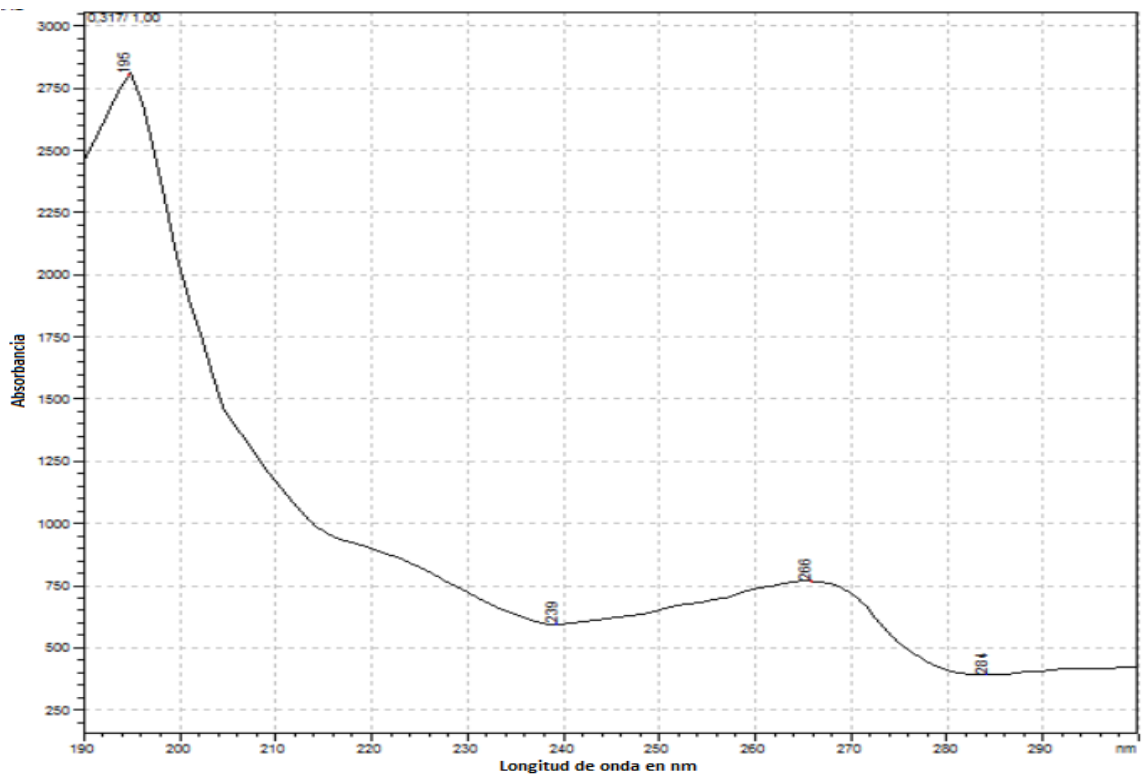


Figura II.2. Barrido espectral de camferol en metanol.

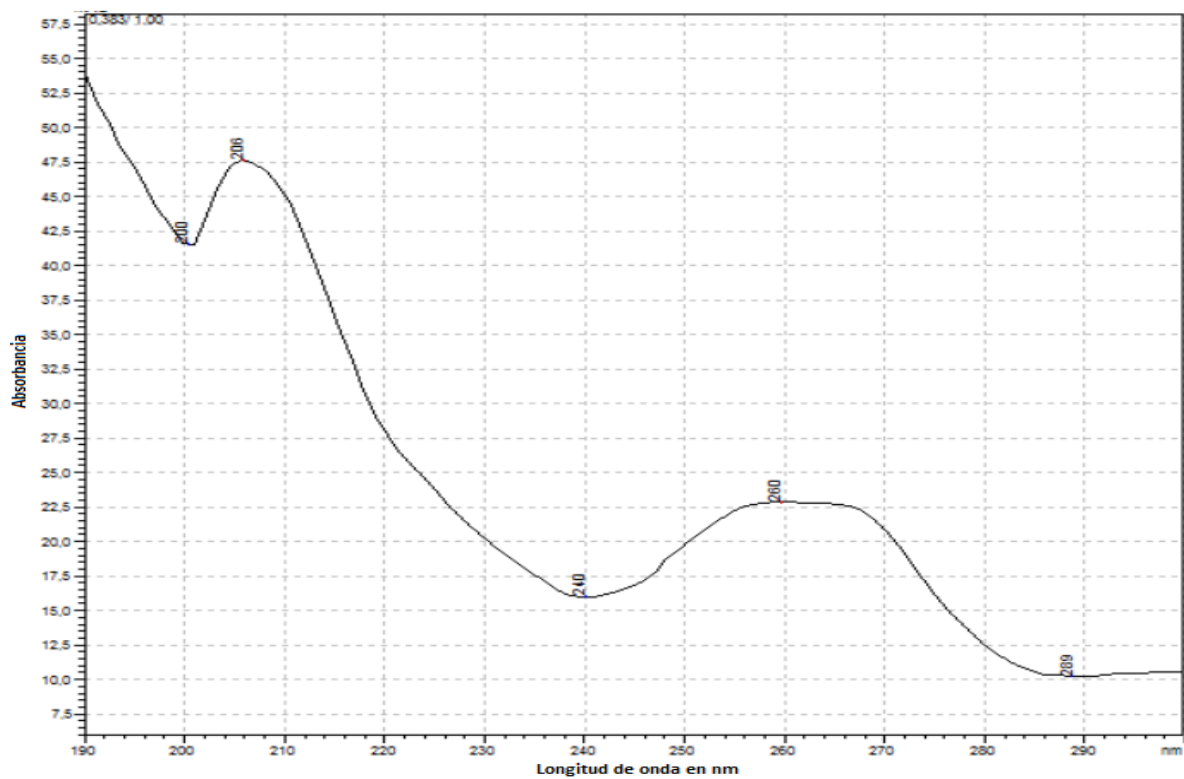


Figura II.3. Barrido espectral de rutina en metanol.

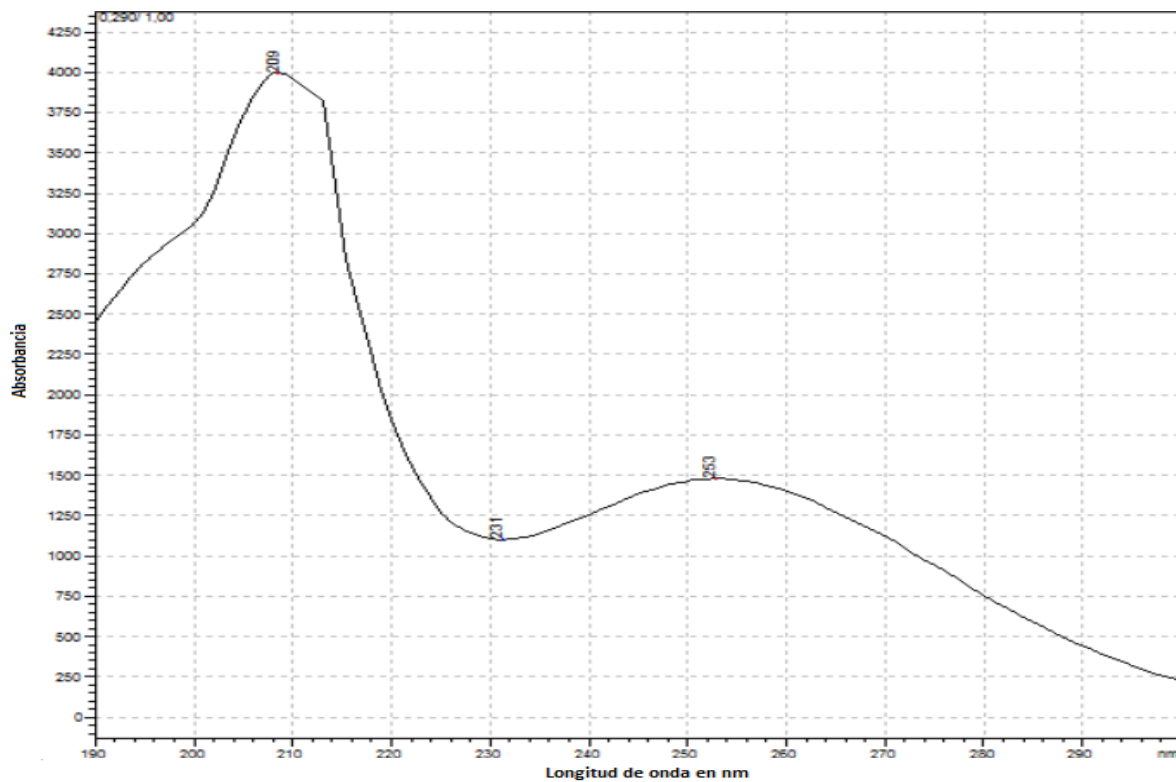


Figura II.4. Barrido espectral de DMDS en metanol.

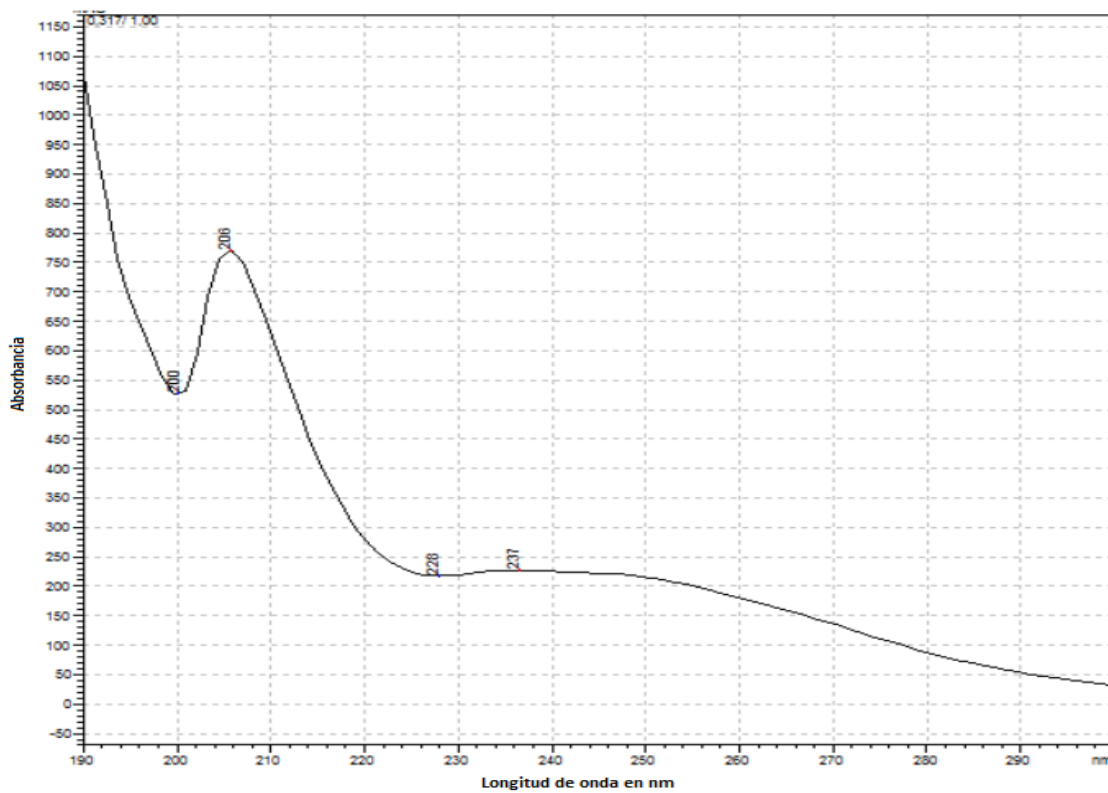


Figura II.5. Barrido espectral de MPDS en metanol.

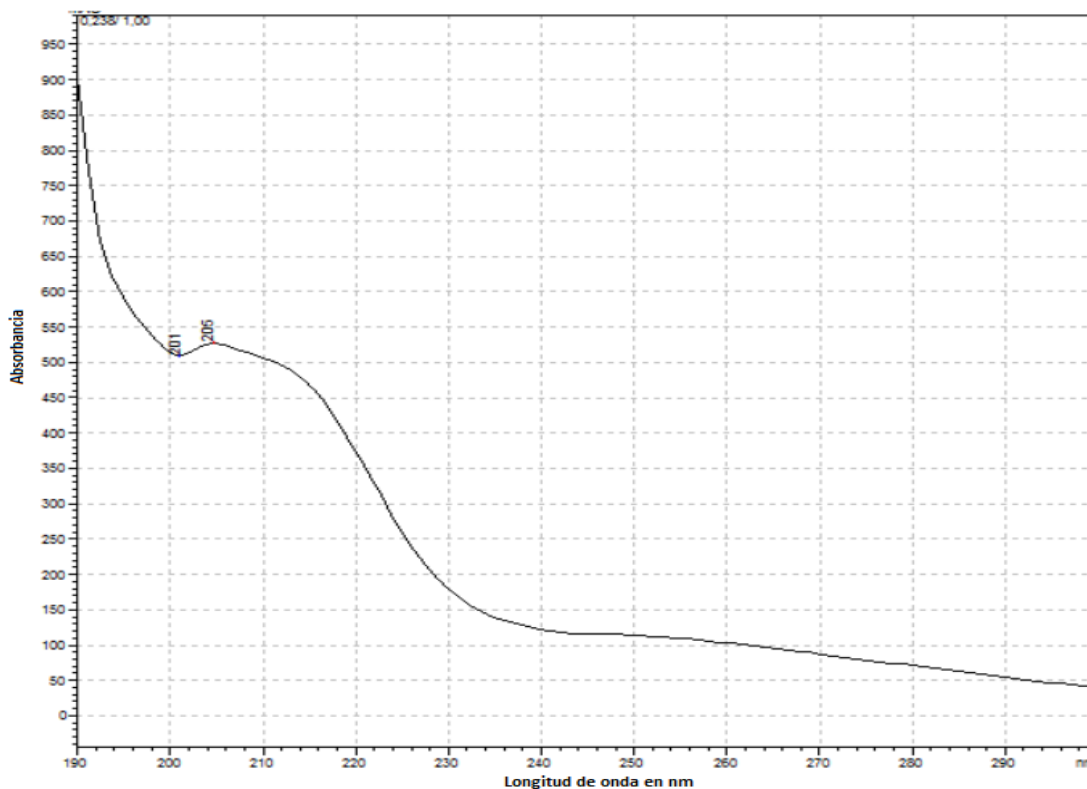


Figura II.6. Barrido espectral de MPTS en metanol.

II.2.4.3. Condiciones óptimas de trabajo

Por lo expuesto anteriormente y mediante ensayos realizados, las condiciones óptimas alcanzadas para los compuestos de interés fueron:

Tabla II-2. Condiciones óptimas de trabajo para el análisis de OSCs y flavonoles.

Variables	Condiciones
Columna	SB C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm)
Fase móvil	Gradiente: MeOH (0,6 % AF)-H ₂ O (0,6% AF) (Tabla II.1.)
Flujo	1 ml. min.
Detector	UV-Vis a 260 nm de λ
Alícuota	20 μl

El cromatograma de la Figura II.7. permite observar cómo se separan los analitos con las condiciones descritas y obtener sus tiempos de retención. Además se evidencia que los analitos a igualdad de concentraciones manifiestan diferentes alturas de picos cromatográficos como consecuencia de sus diferentes respuestas al detector.

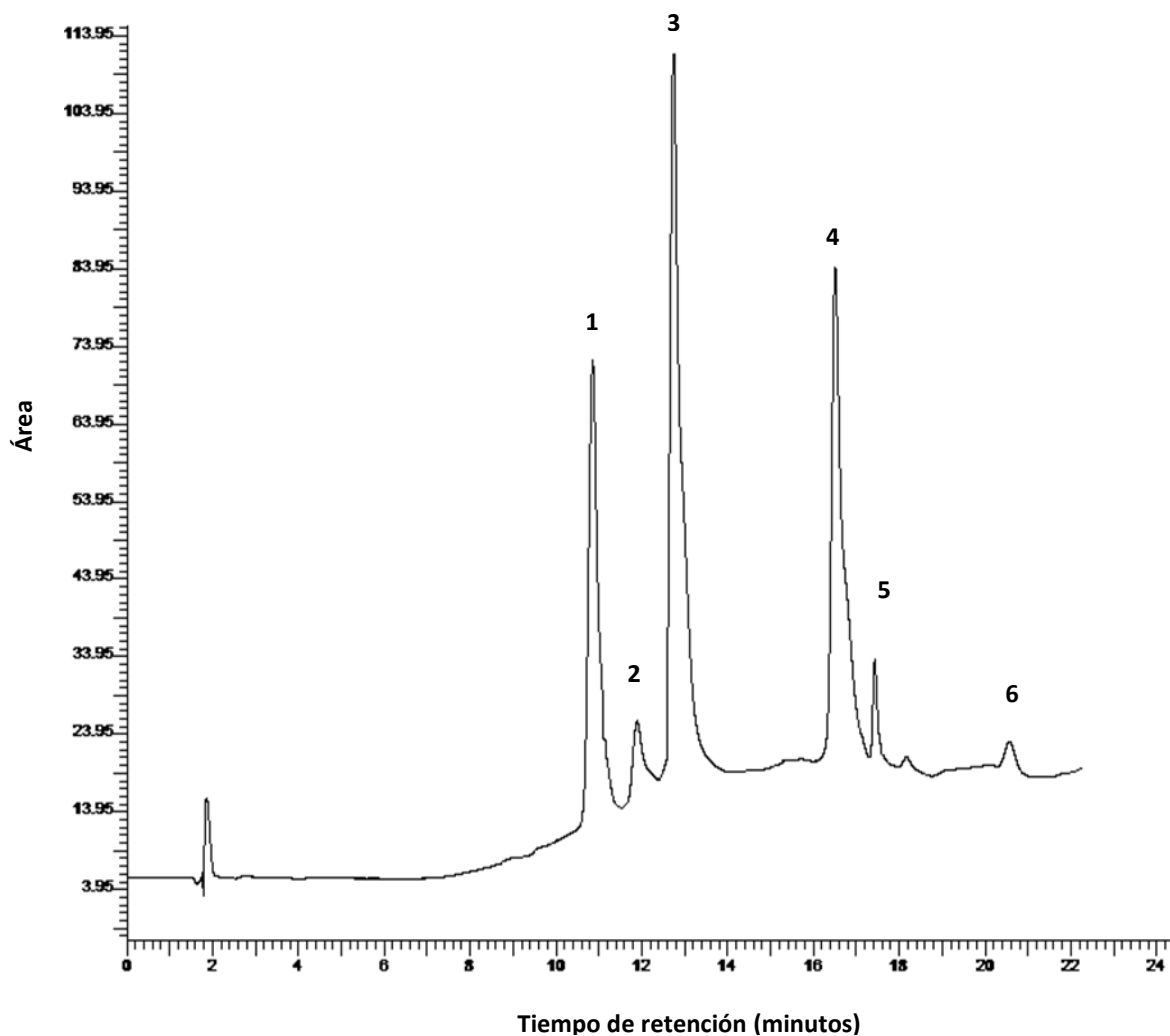


Figura II.7. Cromatograma de una mezcla de los estándares estudiados: OSCs y flavonoles bajo las condiciones descritas en la sección II.2.4.3. Referencia en Tabla II.3.

Tabla II-3. Tiempos de retención de los compuestos OSCs y flavonoles con las condiciones descritas en la sección II.2.4.3.

Analito	Número de pico	Tiempo de retención
Rutina	1	10,7
DMDS	2	11,8
Quercetina	3	12,7
Camferol	4	16,6
MPTS	5	17,49
MPDS	6	20,56

II.2.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

Fue posible optimizar las condiciones operacionales del HPLC-UV, con la finalidad de lograr una adecuada resolución para seis analitos de interés en el menor tiempo posible. En el siguiente capítulo se detallará la validación del método.

CAPÍTULO III

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MUESTRAS DE CEBOLLA MEDIANTE HPLC-UV

III. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MUESTRAS DE CEBOLLA MEDIANTE HPLC-UV

III.1. INTRODUCCIÓN

La validación de una metodología analítica es una etapa fundamental en su desarrollo y puesta a punto. Hay razones científicas y comerciales que justifican la validación de los métodos analíticos. Ésta incrementa de un modo sustancial la probabilidad de que la transferencia de un método entre laboratorios ocurra de la forma más homogénea posible (Locatelli, 2005). De hecho, la validación del método es el medio que los analistas tienen de demostrar que el método es apto para el propósito deseado, mostrando a los clientes que pueden confiar en los resultados reportados. (Boqué y col., 2007). La validación del método analítico implica demostrar que es adecuado para los fines previstos (*FDA Food and Drug Administration, 2015*; (ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005) También representa una etapa fundamental para asegurar que los resultados entregados por un determinado método sean confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se pretende es determinar con fundamento estadístico que el método es el adecuado para los fines previstos.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. A su vez, es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación. Es esencial, entonces conocer el método a validar y su aplicabilidad, es decir, el/los analito/s, su/s concentraciones y las matrices en las cuales se desea utilizar (Sandoval, 2010). Por lo tanto, el objetivo de cualquier determinación analítica es el de obtener datos coherentes, fiables y precisos. Los métodos analíticos validados juegan un papel importante en la obtención de este objetivo. Los resultados de la validación del método se pueden utilizar para juzgar la calidad, fiabilidad y consistencia de los resultados, que es una parte integral de cualquier buena práctica analítica. La validación de métodos analíticos también es requerida por la mayoría de los reglamentos y normas de calidad en laboratorios confiables y reconocidos (Huber, 2010). Asimismo, la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (“Norma Europea EN ISO/IEC 17025,” 2004).

En conclusión, una vez desarrollado un método de análisis, debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables. Para este propósito se deben considerar los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y de detección (Quattrocchi Andrizzi, Laba, 1992). Una vez obtenido cada parámetro, se evaluará si los resultados de las pruebas son satisfactorios, es decir, si cumplen con los criterios de aceptabilidad establecidos (Sandoval, 2010).

III.2. SELECTIVIDAD

La selectividad es la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencias debidas a componentes en la matriz de la muestra (Quattrocchi, Andrizzi, Laba, 1992). Un método al ser selectivo tiene la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes que pudieran estar presentes (incluir impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.) (Huber, 2010).

Para determinar si un método analítico es específico, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

- ~ **Tiempo de retención (t_R):** es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el analito alcance el detector. Sirve para la identificación del pico. En el caso de disponer de estándares, puede realizarse una co-cromatografía adicionando una cantidad medida del estándar a la muestra y posterior inyección en HPLC. De esta manera, si al comparar los cromatogramas obtenidos se observa un incremento en el área del pico correspondiente al estándar, confirmaría la identidad del analito (Quattrocchi, Andrizzi, Laba, 1992)
- ~ **Caracterización espectral:** se realiza un barrido espectrofotométrico el cual pone de manifiesto la presencia de ciertos grupos funcionales de la molécula del analito (Ramirez, 2016).

III.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1.1. Preparación de soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de cada solución madre preparada en el apartado II.2.3.1.1. Luego se preparó una mezcla de los 6 estándares en MeOH que consistió en 15 ppm de cada flavonol, más 50 ppm de cada OSCs utilizando la fórmula del apartado II.2.3.1.2.

III.2.1.2. Reactivos analíticos, estándares y drogas

Los estándares, reactivos y drogas fueron los descriptos en el apartado II.2.1.

III.2.1.3. Equipos

- ~ Cromatógrafo líquido (Perkin Elmer 200), acoplado a un detector UV-Vis. Columna: ZORBAX SB C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m), Phenomenex. Guarda columna: ZORBAX SB C8 (10 mm x 4,6 mm x 5 μ m), Phenomenex
- ~ Trituradora manual (Braun 300 Watt).
- ~ Balanza analítica (DENVER APX-200).
- ~ Centrifuga (LUGUIMAC LC-15).

III.2.1.4. Material vegetal y acondicionamiento de la muestra

Para todos los ensayos de validación se utilizaron bulbos de cebolla (*Allium cepa*) comerciales. Se les quitó las catáfilas exteriores, luego su pulpa se cortó y trituró hasta obtener una pasta homogénea.

III.2.1.4.1. Preparación de la muestra

A continuación se pesó y se le adicionó la mezcla de estándares preparada en la sección III.2.1.1. Para la extracción de los analitos se eligió la metodología propuesta por Andlauer, Martena, Furst, 1999; que es una técnica de extracción sólido líquido (del inglés Solid Liquid Extraction (SLE)) y que consiste en la adición de 8 ml de MeOH: H₂O (40:60) (v/v) a ± 1 g de cebolla cruda. La mezcla se sometió a agitación a temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 20 min (Andlauer, Martena, Furst, 1999), el sobrenadante obtenido se filtró previo a la inyección al HPLC.

Las condiciones cromatográficas fueron las descritas en la sección II.2.4.3.

III.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones adicionadas de estándares a la muestra de cebolla cruda, y los tiempos de retención se muestran en la Tabla III.1

En la Figura III 1. se presenta el cromatograma obtenido, correspondiente a la muestra de cebolla cruda adicionada de estándar con los OSCs y flavonoles en estudio, inyectada en el HPLC.

En cuanto a la caracterización espectral, los espectros obtenidos para cada analito resultaron semejantes a los que se encuentran en las Figuras II.1, II.2, II.3., II.4., II.5., II.6.

A partir del análisis de los datos obtenidos se puede concluir que el método analítico es específico a los analitos en estudio, ya que no se observaron interferencias significativas en los cromatogramas resultantes. Mediante el análisis por espectrofotometría UV pudo comprobarse que los espectros obtenidos corresponden a las estructuras químicas de los estándares bajo estudio.

Tabla III-1. Concentraciones de flavonoles y OSCs en la mezcla de trabajo, tiempos de retención. Técnica descrita en la sección II.2.4.3.

Analito	Número de pico	Concentración de estándar adicionado	Tiempo de retención
Rutina	1	15	11,16
DMDS	2	50	12,28
Quercetina	3	15	14,2
camferol	4	15	16,6
MPTS	5	50	17,4
MPDS	6	50	20,1

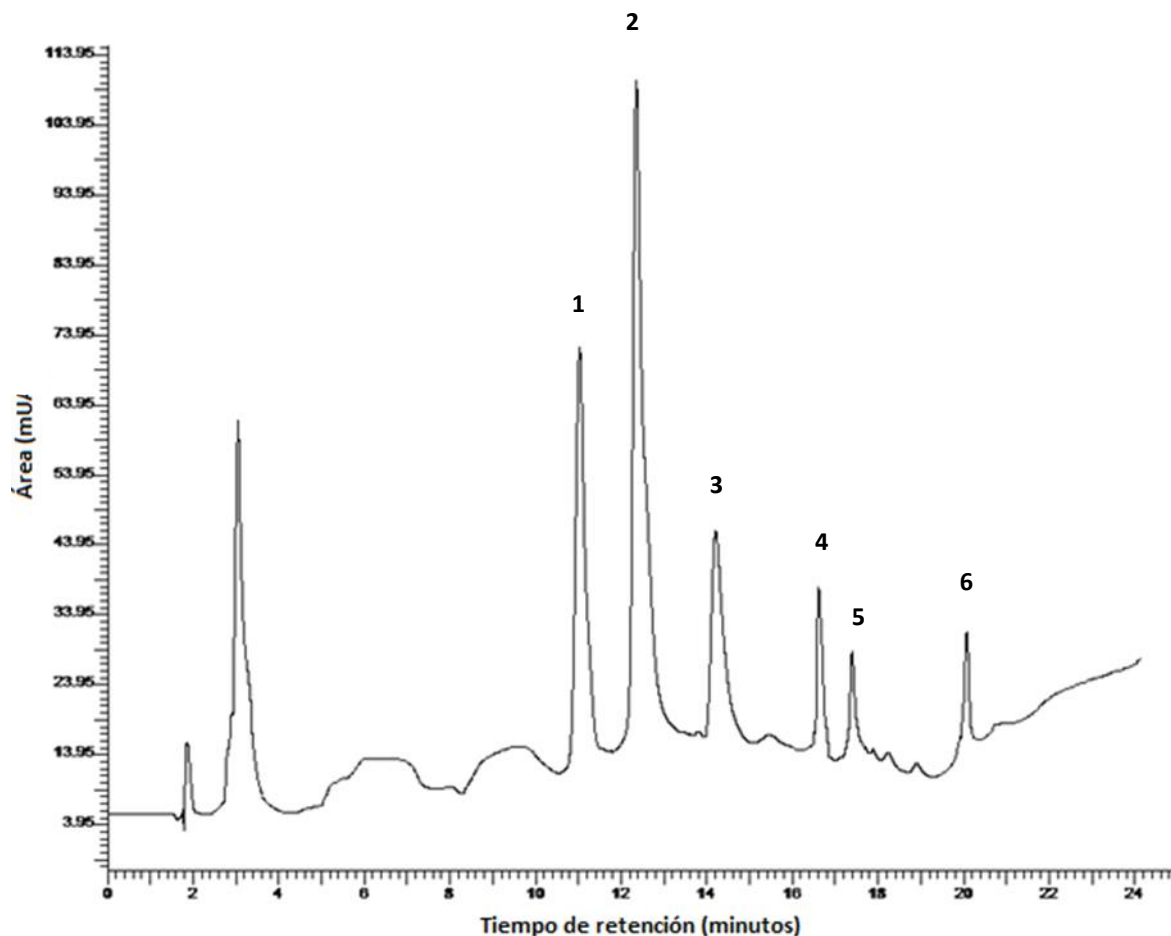


Figura III.1. Cromatograma de la mezcla de estándares: flavonoles y OSCs correspondiente a las condiciones establecidas en la sección II.2.4.3. Referencias Tabla III.1.

III.3. LINEALIDAD

La linealidad de un procedimiento analítico se define como la capacidad (dentro de un rango dado) para obtener respuestas que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. La linealidad está determinada por una serie de cinco a seis inyecciones de cinco o más estándares, la respuesta debe ser directamente proporcional a las concentraciones de los analitos o proporcional por medio de un cálculo matemático bien definido. Una ecuación de regresión lineal aplicada a los resultados debe tener una intersección no significativamente diferente de cero. Si se obtiene una intersección distinta de cero significativo, se debe demostrar que esto no tiene efecto en la precisión del método.

Con frecuencia, la linealidad se evalúa gráficamente, además de la evaluación matemática. La evaluación se realiza mediante la inspección visual del área del pico como una función de la concentración de analito (Huber, 2010).

La linealidad se evalúa en un determinado rango, que se define como el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha

sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.(Quattrocchi, Andrizzi , Laba, 1992).

III.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1.1. Preparación de soluciones de trabajo

Para de la determinación del rango lineal se preparó una serie de cinco diluciones de cada estándar comprendiendo los ámbitos estimados de trabajo, como se realizó en la sección III.2.1.1. El rango de concentraciones ensayadas fue para flavonoles de 5, 10, 15, 20, 25 ppm y para los OSCs de 20, 30, 50, 75, 100 ppm.

III.3.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los reactivos, estándares, drogas y equipos utilizados, al igual que las condiciones cromatográficas fueron los mismos que los utilizados en la sección III.2.

III.3.1.3. Muestra

Las muestras se prepararon a partir de cebolla cruda como se describió en la sección III.2.1.4. con la diferencia que se agregó a cada una los estándares preparados en la sección III.3.1.1. Las muestras utilizadas se describen en la Tabla III.2.

Tabla III-2. Muestras para realizar curva de calibración

Muestra	Componentes
Blanco	Cebolla cruda(CC)
1	CC + 5 ppm flavonol + 20 ppm de OSCs
2	CC + 10 ppm flavonol + 30 ppm de OSCs
3	CC + 15 ppm flavonol + 50 ppm de OSCs
4	CC + 20 ppm flavonol + 75 ppm de OSCs
5	CC + 25 ppm flavonol + 100 ppm de OSCs

III.3.1.4. Metodología

Las muestras se inyectaron por triplicado en el HPLC para construir la curva de calibración de los estándares.

III.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de obtener los datos, se construyó la curva de regresión $y = ax + b$ sobre los puntos individuales sin promediar, por el método de los mínimos cuadrados. A continuación se evaluaron los estimadores de regresión para un nivel de confianza de 95%, $\alpha = 0,05$:

- ~ **Coefficiente de correlación simple lineal muestral (r)**: mide el grado de asociación lineal entre variables: el valor de r puede tomar valores desde -1 (correlación lineal perfectamente negativa) a 1 (correlación lineal perfectamente positiva), si r toma valores de 0 o próximo a 0 hay ausencia de correlación lineal. Como criterio práctico se establece que una correlación es fuerte cuando toma valores mayores a 0,8 (Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría Facultad de Ciencias Agrarias-UNCuyo,

2001). Los estimadores de la regresión obtenidos a partir del análisis de los datos se observan en la Tabla III.3.

- ~ También se determina para evaluar el ajuste del modelo lineal propuesto a los datos (Quattrocchi, Andrizzi, Laba, 1992).

Tabla III-3. Estimadores de regresión para cada analito.

Analito	Ecuación de recta	r
DMDS	$y = 11823x - 237803$	0,99
MPDS	$y = 3050,7x - 34391$	0,97
MPTS	$Y = 1007x - 2796$	0,98
Rutina	$y = 56189x - 51453$	0,99
Quercetina	$y = 24474x - 136409$	0,95
Camferol	$y = 8095,6x - 18016$	0,98

En base al análisis de los estimadores los resultados obtenidos permiten demostrar la linealidad del detector en el rango de concentración estudiado, el cual para flavonoles va desde 5 a 25 ppm y para los OSCs abarca desde las 20 a las 100 ppm. También se determinó que las áreas son directamente proporcionales a las contracciones de flavonoles y OSCs presentes en la muestra. Es decir, que hay una relación fuerte entre las variable "X" e "Y". El valor de r de los analitos es mayor a 0,95 permitiendo un ajuste adecuado del modelo lineal propuesto a los datos.

III.4. PRECISIÓN

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescriptas (método cromatográfico desarrollado en el capítulo II) (Quattrocchi, 2014).

Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, " σ ", estimada analíticamente por " s " o más comúnmente como la desviación estándar relativa (**RSD**) o coeficiente de variación (**CV%**)

Para determinar la precisión se establece la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar y se determina el coeficiente de variación porcentual (CV%) o desviación estándar relativa. Para determinar si el sistema es preciso se tienen que obtener valores menores al 2,8 de CV%, para un rango de aceptación de 90-110% (Quattrocchi, Andrizzi, Laba, 1992).

Los estimadores se calculan de la siguiente manera:

~ **Desviación estándar:**

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

n = número de medidas

x_i = valor medio en el ensayo i

\bar{x} = valor promedio

~ **Desviación estándar relativa o coeficiente de variación porcentual (CV%):**

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

S = desviación estándar

\bar{x} = valor promedio

III.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.4.1.1. Preparación de soluciones de trabajo

Para de la determinación de la precisión del sistema se preparó una solución de trabajo con los 6 analitos en estudio como se realizó en la sección III.2.1.1. Las concentraciones ensayadas fueron para flavonoles de 25 ppm y para los OSCs de 100 ppm.

III.4.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los reactivos, estándares, drogas y equipos utilizados, al igual que las condiciones cromatográficas fueron los mismos que los utilizados en la sección III.2.

III.4.1.3. Metodología

La mezcla de estándares de la sección III.4.1.1. se inyectó seis veces en el HPLC para determinar el coeficiente de variación porcentual CV%.

III.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del ensayo de precisión (n=6 inyecciones) de cada uno de los estándares de OSCs y flavonoles, se observan en la Tabla III.4.

Tabla III-4. Resultado de las áreas de los estándares inyectados (n=6).

Repetición	Flavonoles			OSCs		
	Rutina	Quercetina	Camferol	DMDS	MPTS	MPDS
1	1326199	581097	187727	980126	105431	293473
2	1407822	579874	194319	979729	100071	284310
3	1314197	580032	190317	979928	102751	288892
4	1368958	6032112	189877	988452	105235	287943
5	1341577	591622	190097	984190	103993	288417
6	1355268	597417	189987	986321	104614	288180
Media	1352337	588875	190387	983124	103683	288536
SD	33517	10058	2147	3754	2017	2927
CV%	2,48	1,71	1,13	0,38	1,95	1,01

Los valores obtenidos de coeficiente de variación porcentual indican que el sistema es preciso ya que se obtuvieron valores inferiores al 2,8 para un rango de aceptación de 90 – 110%.

III.5. EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero o el valor de referencia aceptado y el valor hallado (Quattrocchi, 2014). Matemáticamente, la exactitud, se expresa como el porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra y se calcula como:

$$R = \frac{x_i}{x} \times 100$$

Donde:

R = % recuperación.

x_i = valor obtenido.

x = valor verdadero.

La “inexactitud “debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100 %.

III.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.5.1.1. Preparación de soluciones de trabajo

Para determinar la exactitud del método se preparó una solución de trabajo con los 6 analitos en estudio como se realizó en la sección III.2.1.1. Las concentraciones ensayadas fueron para flavonoles de 10 ppm y para los OSCs de 30 ppm.

III.5.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los reactivos, estándares, drogas y equipos utilizados, al igual que las condiciones cromatográficas fueron los mismos que los utilizados en la sección III.2.

III.5.1.3. Muestra

La muestra se preparó a partir de cebolla cruda como se describió en la sección III.2.1.4. con la diferencia que se agregaron los estándares preparados en la sección III.5.1.1. y se dejó una muestra de cebolla cruda sin estándares (blanco).

III.5.1.4. Metodología

Como se mencionó anteriormente se utilizó para medir exactitud la determinación del porcentaje de recuperación el cual consiste en inyectar dos muestras para realizar el análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia (muestra enriquecida).

La muestra de la sección III.5.1.3. se inyectó por triplicado para determinar:

- ~ **El valor obtenido**= El área de la muestra enriquecida - blanco
- ~ **El valor verdadero**= El área de los analitos obtenido reemplazando la concentración de analito en la ecuación de la recta de la curva de calibración (Tabla III.4).= **Área estimada**

III.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas III.5 -III.6 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos para determinar la exactitud del método.

Tabla III-5. Áreas de los analitos en estudio

Analito		Área	
		Obtenida	Estimada
FLAVONOLES 10 ppm	Rutina	505563	510437
		497105	510437
		488631	510437
	Quercetina	75547	108331
		78110	108331
		76865	108331
	Camferol	62356	62940
		61638	62940
		61999	62940
OSCs 30 ppm	DMDS	127267	116887
		147068	116887
		136035	116887
	MPTS	27350	27414
		27328	27414
		27339	27414
	MPDS	56104	57130
		56095	57130
		56099	57130

Área obtenida = cebolla cruda enriquecida – cebolla cruda

Área estimada =valor verdadero

Tabla III-6. % de recuperación y desviación estándar para flavonoles y OSCs.

Analito		Concentración	%Recuperación medio	Desviación estándar
Flavonoles	Rutina	10 ppm	97,4	1,66
	Quercetina		70,9	1,18
	Camferol		98,5	0,57
OSCs	DMDS	30 ppm	117	8,49
	MPTS		99,7	0,04
	MPDS		98,2	0,01

Los porcentajes de recuperaci3n obtenidos oscilaron entre 71 y 117%, siendo el menor valor para quercetina y el mayor para DMDS. Esto indica que los valores de recuperaci3n obtenidos resultaron satisfactorios.

III.6. SENSIBILIDAD: LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

- ~ **Límite de Detección:** Es la menor concentraci3n de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales establecidas; se expresa en unidades de concentraci3n (ppm). Matemáticamente, el límite de detección se calcula como:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = 3S$$

Donde:

S = Desviaci3n estándar

- ~ **Límite de Cuantificaci3n:** Es la menor concentraci3n de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisi3n y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentraci3n (ppm). Matemáticamente, el límite de cuantificaci3n se calcula como:

$$\text{Límite de cuantificaci3n (LOQ)} = 10S$$

Donde:

S = Desviaci3n estándar

III.6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.6.1.1. Preparaci3n de soluciones de trabajo

Para la determinaci3n de los LOD y LOQ se prepararon soluciones de trabajo con los 6 analitos en estudio como se realiz3 en la secci3n III.2.1.1. Las concentraciones ensayadas fueron para flavonoles de 5, 10 Y 15 ppm y para los OSCs de 25, 30, 45 ppm.

III.6.1.2. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los reactivos, estándares, drogas y equipos utilizados, al igual que las condiciones cromatográficas fueron los mismos que los utilizados en la secci3n III.2.

III.6.1.3. Muestra

Las muestras se prepararon a partir de cebolla cruda como se describió en la sección III.2.1.4. con la diferencia que se agregaron los estándares preparados en la sección III.6.1.1.

III.6.1.4. Metodología

Las muestras de la sección III.6.1.3. se inyectaron por triplicado para determinar:

- a) Las áreas de los analitos bajo estudio.
- b) Luego de obtener las áreas de cada analito, se reemplazaron en la ecuación de la recta de las curvas de calibración (Tabla III.3.) y se determinó la concentración de cada analito adicionado.
- c) Se determinó la desviación estándar de cada analito.
- d) Se determinó el LOD (3S) y LOQ (10S).

III.6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tabla III.7 -III.8 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos para determinar la sensibilidad del método.

Tabla III-7. Límites de detección y límites de cuantificación utilizando la metodología propuesta para los flavonoles.

Flavonoles	Área	ppm	Desviación estándar (S)	Desviación estándar media	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Rutina	229322	5,00	0,227	0,126	0,378	1,259
	203856	4,54				
	216589	4,77				
	488640	9,61	0,151			
	505559	9,91				
	497099	9,76	0,001			
	852642	16,09				
	852716	16,09				
	852679	16,09				
Quercetina	32319	1,49	0,027	0,017	0,050	0,166
	35344	1,54				
	33832	1,52				
	75606	2,26	0,022			
	78075	2,31				
	76840	2,28	0,001			
	172345	3,98				
	172442	3,98				
	172394	3,98				
Camferol	17352	1,22	0,001	0,004	0,012	0,039
	17473	1,23				
	17413	1,23				

	62357	2,03	0,006			
	61639	2,01				
	61998	2,02				
	118062	3,02	0,004			
	118545	3,03				
	118303	3,02				

Tabla III-8. Límites de detección y límites de cuantificación utilizando la metodología propuesta para los OSCs.

OSCs	Área	ppm	Desviación estándar (S)	Desviación estándar promedio	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
DMDS	25697	22,29	0,277	0,653	1,959	6,529
	32255	22,84				
	28976	22,56				
	127215	30,87	0,810			
	146365	32,49				
	136790	31,68	0,871			
	275960	43,45				
	296565	45,20				
	286262	44,33				
MPDS	42130	25,08	0,002	0,007	0,020	0,065
	42140	25,09				
	42135	25,08				
	56104	29,66	0,002			
	56095	29,66				
	56099	29,66				
	104132	45,41	0,016			
	104031	45,37				
	104081	45,39				
MPTS	20391	23,03	0,001	0,101	0,304	1,013
	20393	23,03				
	20392	23,03				
	27350	29,94	0,011			
	27328	29,91				
	27339	29,93				
	45535	48,00	0,292			
	46123	48,58				
	45829	48,29				

Se puede observar que en todos los casos los límites de detección y cuantificación se encuentran dentro de parámetros aceptables conforme a los valores esperados de análisis, determinando que el método es sensible.

III.7. COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA CON OTRAS REPORTADAS EN LA LITERATURA

La búsqueda de nuevas formas de optimizar el método de análisis para mejorar los resultados de los parámetros asociados con la validación es una importante fuerza motriz en la investigación moderna de la química analítica, donde la sensibilidad del método ocupa uno de los lugares destacados entre estas figuras. Si el propósito es la comparación del desempeño de diferentes procedimientos o la optimización de una metodología dada en diversas condiciones experimentales, se requiere parámetros numéricos consistentes que den información objetiva de la precisión, exactitud, sensibilidad y la comparabilidad de las distintas mediciones con el fin de juzgar acerca de la mejora real obtenida de diversas estrategias experimentales (Olivieri, 2014).

A la hora de comparar dos o más metodologías analíticas suelen considerarse los siguientes parámetros:

- ~ - Linealidad
- ~ - Precisión
- ~ - Exactitud
- ~ - Sensibilidad

A su vez debe considerarse que la comparación tenga en cuenta que se estén analizando los mismos analitos dentro de las mismas matrices (Ramirez, 2016) En nuestro caso, si bien existe abundante bibliografía sobre metodologías analíticas para determinar OSCs y flavonoles en cebolla, no existe un protocolo desarrollado y validado para la determinación conjunta de ambos grupos de fitoquímicos

Consecuentemente a la búsqueda bibliográfica realizada, nuestra metodología basada en la extracción de los analitos (flavonoles y OSCs) según la técnica de Andlauer, Martena, Furst 1999; acoplada a cromatografía líquida de alta performance con detector UV-Vis, se comparó con otros métodos analíticos que determinan OSCs y flavonoles en cebolla.

III.7.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla III.9. indica el rango lineal, coeficiente de correlación lineal (r), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión (como CV%) y las recuperaciones (%R) de tres metodologías diferentes para la extracción y determinación de OSCs y/o flavonoles en muestras cebolla. Dos de estos métodos fueron encontrados en bibliografía, y se compararon con la metodología presentada en el trabajo propuesto.

Tabla III-9. Comparación de la metodología propuesta con otras reportadas en literatura.

Metodología	HS GC-MS	QuEChERS-UHPLC	RP-HPLC-UV
Analito	MPDS, MPTS (entre otros compuestos de la fracción volátil)	rutina y camferol (entre otros compuestos fenólicos)	DMDS, MDTS, MPTS rutina, quercetina, kaempferol
Rango Lineal (ppm)	-----	0,1-25	OSCs: 20-100 Flavonoles: 5 a 25.
r	0,99	0,93-0,95	0,95-0,99
LOD (ppm)	0.01-0.10	rutina: 0,042 camferol: 0,027	0,012-1,95
LOQ (ppm)	0.02- 3.83	rutina:0,14 camferol: 0,088	0,039-6,529
%CV	-----	<2,9	<2,8
%R	86-114	78,4- 99	71-117
Referencia	(Colina-Coca y col., 2013)	(Silva, Haesen, Câmara, 2012)	Metodología propuesta SLE-RP-HPLC-UV

HS GC-MS (del inglés Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry): Metodología basada en la determinación mediante cromatografía gaseosa de los compuestos volátiles del espacio de cabeza.

QuEChERS-UHPLC (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS)-Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography (UHPLC)): Metodología basada en extracción sólido-líquido, seguida de una partición y una limpieza con extracción en fase sólida dispersiva acoplada a cromatografía líquida de ultra alta presión.

SLE-RP-HPLC-UV: Metodología basada en extracción sólido-líquido acoplada a cromatografía líquida de alta performance en fase reversa con detector UV-Vis.

De la Tabla III. 9. se puede observar que la metodología propuesta en el presente trabajo tiene la ventaja de permitir extraer y cuantificar flavonoles y OSCs con un solo procedimiento analítico. Además el método demostró ser preciso, simple y exacto, sin presentar diferencias entre los valores encontrados entre los distintos métodos.

III.8. CONCLUSIÓN PARCIAL

Debido a la validación del método en muestra de cebolla cruda se pudo determinar que las muestras no contenían ni DMDS ni MPTS por encima del límite de cuantificación. Este resultado puede deberse a que las mismas no contenían los analitos, ya que el tipo de OSCs presente depende de pH, de condiciones de T, preparación de muestra, etc. Por consiguiente se trabajará para seguir el desarrollo de la tesis sólo con el OSCs DMDS.

Por otro lado, mediante el análisis de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la bibliografía consultada en el ámbito de desarrollo de metodologías para determinar flavonoles y OSCs se puede señalar que el método es selectivo (permitiendo adecuada resolución de los analitos de interés), exacto, preciso, lineal y sensible bajo las condiciones de ensayo. En conclusión, podemos decir que el método fue validado presentando resultados satisfactorios para detectar y cuantificar OSCs y flavonoles en cebolla cruda.

CAPÍTULO IV

MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) APLICADA A LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANALITOS A PARTIR DE CEBOLLA COCIDA

IV. APLICACIÓN DE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) A CEBOLLA COCIDA

IV.1. INTRODUCCIÓN

Existe abundante bibliografía enfocada en el estudio de fitoquímicos en cebollas crudas, mientras que en cebollas cocidas los estudios son escasos. Por esta razón en el presente trabajo se desea conocer los impactos de la cocción sobre el nivel de fitoquímicos en cebolla.

Entre los métodos de cocción más usuales en cebolla se pueden mencionar la fritura. La popularidad de esta técnica culinaria, está relacionada con la facilidad y rapidez de preparación de los alimentos y las agradables características sensoriales. El proceso se basa en la interacción entre aceite y un alimento a altas temperaturas (150-200°C) durante algunos minutos dependiendo de la matriz vegetal. En el caso particular de la cebolla se producen cambios físicos, químicos y nutricionales:

- ~ gelatinización del almidón.
- ~ desnaturalización de proteínas.
- ~ producción de color debido a la reacción de Maillard.
- ~ destrucción térmica de los microorganismos, las enzimas y la reducción de la actividad de agua en la superficie.
- ~ formación de poros (cambio estructural importante) debido a evaporación del agua y la formación de capilares. El calor intenso conduce a la explosión durante la evaporación del agua, creando amplios poros que luego se transforman en la corteza superficial (Bordin y col. 2013).
- ~ pérdida de compuestos volátiles (entre ellos vitaminas) y agua.
- ~ pérdida de sólidos solubles por lixiviación.
- ~ disminución del contenido de fitoquímicos (Harris y col., 2015).

De lo expuesto, se presume que el procesado de los alimentos, en este caso la cocción, además de afectar la matriz e influir en la liberación y posterior aprovechamiento de los fitoquímicos, puede influir en la estabilidad y niveles cuali-cuantitativos de los fitoquímicos de interés (Sensoy, 2013).

El segundo objetivo principal del trabajo de tesis fue evaluar el efecto de la fritura por tecnología "rapid air" y el uso de rebozadores sobre el contenido de principios bioactivos presentes en cebolla fresca, con esta finalidad es menester contar con una herramienta analítica válida a tal fin. En el capítulo anterior se obtuvieron las figuras analíticas de mérito para los analitos de interés, pero cuando fue necesario aplicar esta metodología a muestras cocidas, se evidenció la presencia de nuevos concomitantes, por esta razón se consideró la aplicación de una DLLME.

IV.2. APLICACIÓN DE DLLME

IV.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Con la finalidad de mejorar la etapa de extracción se empleó una técnica de microextracción Líquido-líquido dispersiva (DLLME) para optimizar la extracción de los analitos de interés minimizando el gasto de solventes orgánicos. Como se mencionó en el I capítulo la técnica de DLLME consiste en un sistema ternario de disolventes formado por una muestra acuosa que contiene los analitos, un disolvente de extracción insoluble en agua y un disolvente dispersante soluble en agua. En esta técnica se inyecta la mezcla apropiada de disolvente de extracción y disolvente dispersor en la muestra acuosa rápidamente mediante jeringa. De esta manera, se forma una nube dispersante. Esta nube está formada por gotitas del extractante, que se dispersan a través de la muestra acuosa. Los solutos más hidrófobos, se enriquecen en el disolvente de extracción. Después de la extracción, la mezcla turbia se centrifuga, luego de esta etapa, se forman dos fases, la inferior (clorofórmica) contiene los analitos más lipofílicos, mientras que la superior (hidroalcohólica) contiene los analitos más hidrofílicos de la muestra inicial.

Los solventes usados para la DLLME tienen que cumplir las siguientes características:

Solvente extractante:

- ~ Baja solubilidad en agua
- ~ Mayor densidad que el agua
- ~ Afinidad por los analitos target

Solvente dispersante:

- ~ Miscible con la fase orgánica (solvente de extracción) como con la fase acuosa.

Mediante la bibliografía consultada se pudo determinar que tanto para extraer compuestos flavonoles como OSCs se utiliza como solvente extractante cloroformo, este solvente cumple con las características requeridas para DLLME (Campillo y col., 2015; Ramirez, 2016). Por otro lado, los solventes dispersantes más utilizados son ACN, acetona, MeOH (Rezaee y col., 2006). En nuestro caso se usará MeOH debido a su bajo costo, disponibilidad.

IV.2.2. EVALUACIÓN DE LA PERFORMANCE DEL EMPLEO DE LA DLLME.

IV.2.2.1. Ensayo de exactitud

Con la finalidad de comparar las técnicas de extracción, muestras de cebolla fueron sometidas a SLE (validada en el capítulo III) y SLE-DLLME, cada una de las técnicas fueron realizadas por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una prueba estadística de comparación de medias entre dos muestras (prueba de t; $p < 0,05$), empleando el software Estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2015).

IV.2.2.1.1. Materiales y métodos**IV.2.2.1.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo****IV.2.2.1.1.1.1. Estándares y drogas**

Las drogas y los estándares son los mismos utilizados en la sección III.2.1.2.

IV.2.2.1.1.1.2. Reactivos

- ~ Metanol (MeOH; Sintorgan grado HPLC).
- ~ Agua ultra pura (18 MΩcm) obtenida de un sistema de purificación de agua Mili-Q (Millipore, Molsherm, Francia).
- ~ Cloroformo, grado HPLC, Merck (EEUU).

IV.2.2.1.1.1.3. Equipos

Los equipos son los mismos que en la sección III.2.1.3.

IV.2.2.1.1.2. Diseño del experimento

Se trabajó con muestras de cebolla cruda, una parte de ellas fue sometida SLE mientras que la otra fue sometida a SLE-DLLME. Previo a la extracción, a las muestras se le adicionó la mezcla de estándares correspondientes a los 4 analitos bajo estudio, con finalidad de evaluar el porcentaje de recuperación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.2.2.1.1.2.1. Preparación de soluciones de trabajo

Para de la determinación del % de recuperación se preparó una solución de trabajo con los 4 analitos en estudio a partir de las soluciones madres utilizando las fórmulas de la sección II.2.3.1.2. Las concentraciones ensayadas fueron para flavonoles de 10 ppm y para DMDS de 30 ppm, se selecciona sólo este OSCs debido a que es el único presente en muestras de cebollas detectado en una concentración por encima de los límites de cuantificación (capítulo III).

IV.2.2.1.1.2.2. Muestra y preparación

Se utilizaron bulbos de cebolla (*Allium cepa*) adquiridas del comercio local, cada muestra se formó por ± 1.00 g de cebolla. Para su procesado se les quitaron las catáfilas exteriores y se cortaron en aros de 1 cm de espesor. A continuación se homogeneizó con una trituradora manual. De la pasta obtenida se pesó $1 \pm 0,01$ g de muestra. Posteriormente, se le adicionó la mezcla de estándares obtenido en la sección IV.2.2.1.1.2.1.

IV.2.2.1.1.2.3. Detalles de la SLE

Las muestras crudas fueron extraídas siguiendo el método de extracción de Andlauer y col., 1999 (SLE), el sobrenadante se inyectó por triplicado al HPLC.

IV.2.2.1.1.2.4. Detalles de SLE-DLLME

Las muestras crudas fueron extraídas siguiendo el método de extracción de Andlauer y col., 1999 (SLE), al sobrenadante se le aplicó la técnica DLLME. Para su realización se utilizó como solvente extractante y dispersante a cloroformo y MeOH respectivamente. Para la DLLME se tomaron 7,5 ml del sobrenadante de la muestra cruda luego de la SLE se colocó en un tubo Falcon de 15 ml, luego se les adicionó la mezcla de solventes dispersante-extractante (1000 μ l de MeOH y 600 μ l de cloroformo) (Ramirez y col., 2017). Posteriormente, se sometió a centrifugación (3000 rpm durante 20 minutos), luego el extracto clorofórmico

fue separado con una jeringa y se reservó el extracto hidroalcohólico. Ambos fueron filtrados e inyectaron al HPLC por triplicado.

Previo a la inyección en el HPLC se eliminó del extracto clorofórmico el solvente mediante corriente de nitrógeno y el residuo se re disolvió en 200 µl de MeOH.

IV.2.2.1.1.3. Determinación de la recuperación de los analitos

La determinación del % de recuperación se realizó como se describe en la sección III.5.

Con la diferencia que calculamos dos % de recuperación:

- ~ **R1=** % de recuperación en cebolla cruda con SLE.
- ~ **R2=** % de recuperación en cebolla cruda con la aplicación de SLE + DLLME

IV.2.2.1.2. Resultados y discusión

En las Tabla. IV.1 se presentan los resultados obtenidos de los ensayos para determinar los % de recuperación de los analitos en las muestras crudas y los p valor para las dos metodologías aplicadas.

Lo que se puede discernir es que en todos los casos los p valor son > a α, es decir que en todos los casos se aceptó la hipótesis nula, estableciendo que no hay diferencias entre los % de recuperación de los analitos aplicando SLE o aplicando SLE-DLLME.

Tabla IV-1. % de recuperación de los analitos en cebolla cruda

Analito	CEBOLLA CRUDA			
	%R1	%R2	p valor	α
Rutina	102	100,1	0,35	0,05
Quercetina	104,5	101,8	0,17	
Camferol	98,5	96,1	0,67	
DMDS	100	92,6	0,19	

$$H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

Nota: Si p valor es < a α se rechaza la hipótesis nula.

IV.2.2.2. Aplicación de SLE-DLLME a muestras de cebolla cocida

Debido a que no hay diferencia de recuperación de analito entre la aplicación de SLE o SLE-DLLME, se aplicó la metodología SLE-DLLME a muestras de cebolla cocida para determinar si se podían eliminar los concomitantes formados durante la cocción y luego evaluar la exactitud del método mediante el cálculo de los % de recuperación de los analitos luego de la SLE-DLLME en muestras cocidas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.2.2.2.1. Materiales y métodos

IV.2.2.2.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo son los mismos que en la sección IV.2.2.1.1.1., además se utilizó una freidora “rapid air” Philips HD 9220/40 adquirida del comercio local.

IV.2.2.2.1.2. Diseño del experimento

Se trabajó con muestras de cebolla cocida, las cuales fue sometida a SLE-DLLME. Previo a la extracción a las muestras se le adicionó la mezcla de estándares correspondientes a los 4

analitos bajo estudio, con finalidad de evaluar el porcentaje de recuperación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.2.2.2.1.2.1. Preparación de soluciones de trabajo.

Las soluciones de trabajo fueron las mismas que en la sección IV.2.2.1.1.2.1.

IV.2.2.2.1.2.2. Muestra y preparación

Se utilizaron bulbos de cebolla (*Allium cepa*) adquiridas del comercio local. Cada muestra se formó por ± 100 g. A las cebollas se les quitaron las catáfilas exteriores y se cortaron en aros de 1 cm de espesor. Posteriormente, se sometieron a cocción en una freidora con tecnología "rapid air", a 180°C durante 8 minutos (condiciones de cocción determinadas mediante evaluación sensorial de muestras cocinadas a diferentes tiempos y temperaturas) con la adición de 15 ml de aceite.

Luego, los aros fritos se homogeneizaron con una trituradora manual. De la pasta obtenida se pesó $1 \pm 0,01$ g de muestra. A cada una se le adicionó la mezcla de estándares obtenido en la sección IV.2.2.2.1.2.1.

IV.2.2.2.1.2.3. SLE-DLLME.

Las muestras cocidas fueron extraídas siguiendo el método de extracción de Andlauer y col., 1999 (SLE). Posteriormente se trabajó siguiendo los pasos de la sección IV.2.2.1.1.2.4.

IV.2.2.2.1.2.4. Determinación de la recuperación de los analitos

La determinación del % de recuperación se realizó como se describe en la sección III.5.

IV.2.2.2.2. Resultados y discusión

En la Tabla IV.2. se establecen los % de recuperación de los analitos en muestras cocidas luego de SLE-DLLME. Esta nos indica que acoplado DLLME a SLE en muestras cocidas se pueden cuantificar los analitos manteniendo altos % de recuperación.

Tabla IV-2. % de recuperación de los analitos en cebolla cocida

Analito	Cebolla cocida
	%R3
Rutina	99,6
Quercetina	98,9
Camferol	101,4
DMDS	103,1

IV.3. CONCLUSIÓN PARCIAL

La metodología de SLE-DLLME demostró tener la misma exactitud que la metodología validada (SLE), con la ventaja que permite eliminar los concomitantes generados por la cocción de la cebolla mediante tecnología "rapid air".

CAPÍTULO V

CONSECUENCIA DEL REBOZADO Y COCCIÓN, MEDIANTE FRITURA, EN LOS NIVELES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CEBOLLA

V. CONSECUENCIA DEL REBOZADO Y FRITURA, EN LOS NIVELES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CEBOLLA.

V.1. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó previamente el contenido cuali-cuantitativo de los compuestos OSCs pueden variar según las formas de presentación de la cebolla ya sea cruda, picada, cocida, etc.

Por otro lado, en base a estudios previos y como se mencionó en el capítulo I, el tratamiento culinario que mejor conserva los compuestos flavonoles y en algunos ensayos los aumenta es la fritura (Harris y col., 2015).

Una de las técnicas de frituras más novedosas es la tecnología “rapid air” que consiste en cocción de alimentos con aire caliente en movimiento, este fenómeno se genera ya que se establece un contacto directo entre pequeñas gotitas de aceite emulsionadas con aire caliente en movimiento y el alimento en una cámara para freír. De esta manera el alimento se deshidrata y la corteza típica de los productos fritos aparece gradualmente.

La tecnología “rapid air” presentan la ventaja de ser rápida, utilizar poco contenido de aceite sin afectar su atractivo nivel sensorial convirtiéndose en una alternativa más saludable que la fritura convencional (Arafat, 2014).

Entre las formas de presentación de cebolla una de las más populares aceptadas a nivel sensorial es la de aros de cebolla fritos (Gennadios, Hanna, Ling, 1997).

V.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOLES Y OSCs EN AROS DE CEBOLLA REBOZADOS Y FRITOS

El objetivo de este capítulo fue evaluar las consecuencias del uso de diferentes rebozadores y cocción mediante la tecnología “rapid air” sobre los niveles cuali-cuantitativos de flavonoles y OSCs.

V.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1.1. Reactivos analíticos, estándares, drogas y equipo

Los reactivos, estándares, drogas y equipos utilizados, al igual que las condiciones cromatográficas fueron los mismos que los utilizados en la sección IV.2.2.2.1.1

V.2.1.2. Muestra y diseño experimental

Se utilizaron bulbos de cebolla (*Allium cepa*) adquiridas del comercio local, cada muestra se formó por ± 100 g de cebolla, posteriormente se les quitó las catáfilas exteriores y se cortaron en aros de 1 cm de espesor. A continuación se homogeneizó con una trituradora manual. De la pasta obtenida se pesó $1 \pm 0,01$ g de muestra.

La Tabla V.1. expresa los diferentes tratamientos aplicados a las muestras, cada uno de los cuales se realizó por triplicado

Tabla V-1. Tratamientos aplicados a aros de cebolla.

Muestra	Tipo de rebozador	Composición del rebozador	Condiciones de fritura
Cebolla cruda	Sin rebozador	-	Sin cocción
Cebolla cocida	Sin rebozador	-	180°C 8 min
Rebozador A	Rebozador para freír	Pan rallado, glucosa	180°C 12 min
Rebozador B	Rebozador para hornear	Pan rallado, glucosa, grasa vacuna refinada, colorantes naturales, resaltador de sabor (glutamato mono sódico).	180°C 12 min
Rebozador C	Harina 0000	trigo	180°C 10 min

Nota: a las muestras previo empanado se pasaron por clara de huevo para favorecer la adhesión del rebozador.

V.2.1.3. Metodología

V.2.1.3.1. Identificación y cuantificación de los analitos de interés en las muestras bajo estudio

Todas las muestras de la sección V.2.1.2 fueron extraídas mediante las técnicas descriptas en la sección IV.2.2.2.1.2.3. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante HPLC-UV, por triplicado, empleando las condiciones operacionales descriptas en la sección II.2.4.3. La identificación y cuantificación de los analitos fue realizada mediante comparación de los tiempos de retención con soluciones estándares de los analitos y comparación de áreas bajo pico cromatográfico de cada uno.

V.2.1.3.2. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test ADEVA y luego comparaciones múltiples (Tukey) con un $p < 0,05$ para diferencia de medias mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2015).

V.2.2. RESULTADO Y DISCUSIÓN

En la Tabla V.2. se presenta el contenido de flavonoles y OSCs en cebollas con distintos tratamientos culinarios.

Las muestras crudas analizadas presentaron un contenido promedio de quercetina de 107 ppm y camferol de 16,7 ppm, este contenido de flavonoles se comparó con el trabajo previo de (Gorinstein y col., 2008) que estableció para cebolla blanca un contenido promedio de quercetina de 480 ppm y de camferol de 5 ppm. Esta variabilidad en los resultados puede deberse a que el contenido promedio de flavonoles se modifica según variedad de cebolla, técnicas de cosecha, tamaño del bulbo, el destino de la cebolla, etc. Pero en general la cebolla blanca presenta el menor contenido entre las diferentes variedades (Bonaccorsi y col., 2008). Lo que si se respeta es que tanto en la bibliografía consultada como en el trabajo realizado el contenido de quercetina es mayor al de camferol.

En la Tabla V.2 también se representa el contenido promedio de OSCs, esta indica que en las muestras analizadas no contenían MPTS ni MPDS por encima de su límite de cuantificación.

Por otro lado, enfocándonos en los tratamientos culinarios, lo que se puede observar es que el proceso de cocción por fritura de las cebollas sin el uso de rebozadores disminuyó significativamente el contenido promedio de principios bioactivos tanto flavonoles como DMDS con excepción de rutina que su contenido se mantuvo luego de la cocción sin rebozador.

Los resultados dan cuenta que el empleo de los rebozadores disminuye significativamente el contenido promedio de DMDS comparado con la muestra cruda y muestra frita sin rebozador. Con respecto a los flavonoles se produce variabilidad según el tipo de rebozador aplicado, del analito y si se compara con muestra cruda o cocida.

Además entre los diferentes rebozadores los que evidenciaron mejores resultados fueron: el que utiliza harina (C) tanto para el contenido promedio de quercetina como para camferol manifestaron menores pérdidas durante la cocción con respecto a la muestra frita sin rebozador y el rebozador con pan para freír (A) que mantuvo los mayores niveles de rutina presentando diferencia significativa incluso comparando con la muestra crudas.

Tabla V-2. Analitos presentes en aros de cebolla con diferentes tipos de tratamientos.

Muestra	ppm (μg de analito/ g de sustancia seca) \pm Desviación estándar					
	Rutina	Quercetina	camferol	DMDS	MPDS	MPTS
Cebolla cruda	7,1 \pm 0,4 ^b	107 \pm 2,8 ^c	16,7 \pm 1,3 ^c	12227 \pm 665 ^c	nd*	nd*
Cebolla cocida	7,5 \pm 0,3 ^b	72,6 \pm 1,6 ^a	10,4 \pm 1 ^{ab}	2796 \pm 235 ^b	nd*	nd*
Rebozador A	10,3 \pm 0,7 ^c	72,4 \pm 2,1 ^a	10,7 \pm 0,5 ^{ab}	1449, \pm 43 ^a	nd*	nd*
Rebozador B	1,9 \pm 0,1 ^a	88,2 \pm 5,7 ^b	8,8 \pm 1,8 ^a	1353 \pm 122 ^a	nd*	nd*
Rebozador C	2,3 \pm 0,1 ^a	107,7 \pm 2,1 ^c	12,8 \pm 1,8 ^b	1830 \pm 81 ^a	nd*	nd*

Nota: Valores seguidos por la misma letra no presentan diferencia significativa según test de Tukey ($p < 0,05$).
*nd: para un LOQ de 0,065 ppm para MPDS y de 1,013 ppm para MPTS.

V.3. CONCLUSIÓN PARCIAL

Por lo mencionado en párrafos anteriores se puede decir que de las alternativas presentadas, la cebolla cruda presenta los mayores contenidos de principios bioactivos, (DMDS y flavonoles). Asimismo, la fritura de la cebolla sin rebozador disminuyó los niveles todos los analitos significativamente.

DMDS disminuye con todos los rebozadores respecto a muestra frita sin rebozador como respecto a muestra cruda. También lo que se puede observar es que el rebozador con pan para horno disminuyó significativamente todos los compuestos bioactivos respecto a la cebolla cruda. Con respecto a los flavonoles se produce variabilidad según el tipo de rebozador aplicado, del analito y si se compara con muestra cruda o cocida.

Comparando con el trabajo de Harris y col., 2015, que determinaron que el contenido de quercetina aumenta con la fritura convencional se puede observar que con la fritura con tecnología "rapid air" los principios bioactivos disminuyen significativamente respecto a muestra cruda, manteniéndose sólo los niveles de rutina.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN FINAL

VI. CONCLUSIÓN FINAL

En base a los resultados obtenidos frente a los objetivos planteados en el trabajo de investigación propuesto se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ~ Se logró desarrollar un método analítico optimizando los parámetros operacionales para identificar y cuantificar los compuestos flavonoles y OSCs evitando coelusión de picos mediante HPLC-UV.
- ~ Podemos afirmar que el método fue validado presentando resultados satisfactorios para detectar y cuantificar OSCs y flavonoles en cebolla cruda.

Se determinó mediante el análisis de las figuras analíticas de mérito que el método es:

- ✓ **Selectivo** ya que tiene la capacidad de evaluar de manera inequívoca los analitos en presencia de interferentes que se pueden esperar a estar presente debido a que son muestras reales.
- ✓ **Lineal** en el rango de concentración estudiado, las áreas obtenidas de los analitos son directamente proporcionales a las concentraciones estableciendo una asociación lineal fuerte entre las variables.
- ✓ **Preciso** debido a que los valores obtenidos de repetibilidad se encuentran dentro del rango de aceptación.
- ✓ **Exacto** ya que los valores de recuperación de analitos son próximos al de referencia.
- ✓ **Sensible** se observa que en todos los casos los límites de detección y cuantificación se encuentran dentro de parámetros aceptables.

La comparación con otras metodologías mostró que el método propuesto en este trabajo presenta como ventaja la determinación de dos grupos de compuestos funcionales OSCs y flavonoles de manera conjunta.

Se resolvió el inconveniente de los interferentes presentados en las muestras cocidas por fritura mediante la aplicación de la técnica de DLLME acoplada al método de extracción de SLE y cuantificación por HPLC-UV.

La metodología DLLME-HPLC-UV se pudo utilizar para evaluar las consecuencias de los tipos de rebozado y cocción sobre los niveles cuali-cuantitativos de compuestos flavonoles y DMDS.

Los ensayos propuestos y los resultados obtenidos permitieron cumplir con los objetivos iniciales y afirmar las hipótesis planteadas:

- ✓ ***El desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación y cuantificación de compuestos bioactivos en aros de cebolla mediante DLLME-HPLC-UV es posible.***
- ✓ ***El uso de rebozadores y la fritura “rapid air” de aros de cebolla afecta el contenido de principios bioactivos.***

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Gawad Z, Abdel-Gawad K., Saber, S. (1995). Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiological Research*, 150(2), 167–172.
- Abu N. (2005). Effect of *Nigella sativa* and *Allium cepa* oils on *Trichinella spiralis* in experimentally infected rats. *Egyptian Society of Parasitology*, 35, 511–523.
- Abu N., Khalil F. Shaapan R. (2011). Therapeutic effect of onion (*Allium cepa*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils on cryptosporidiosis in experimentally infected mice. *Global Veterinaria*, 7(2), 179–183.
- Acosta A., Gaviola J., Galmarini, C. (2011). Manual de producción de semillas hortícolas. J. Crnko (Ed.), *Manual de Producción de Semillas Hortícolas Cebolla*. p 1–3.
- Acosta-Estrada B., Gutiérrez-Urbe J., Serna-Saldivar, O. (2014). Bound phenolic in food, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Albishi T., John A., Al-Khalifa A, Shahidi F. (2013). Antioxidant, anti-inflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 930–939.
- Andlauer W., Martena M., Fürst P. (1999). Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography. A*, 849(2), 341–8.
- Arafat M. (2014). Air frying a new technique for produce of healthy fried potato strips. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2(4), 200–206.
- Ashwell M. (2004). Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe concise Monograph series. Consultado Marzo, 14, 2016 de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Conceptos+sobre+los+alimentos+funcionales#0>
- Ávalos A., Pérez-Urria Carril E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Benkeblia N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263–268.
- Benkeblia N. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected Onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 753–759.
- Bennett R., Wallsgrave R. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617–633.
- Block E. (1992). The Organosulphur Chemistry of the Genus. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 31, 1135–1178.
- Block E. (2010). *Garlic and Other Alliums. The Lore and the Science*. RSC. Publishing.

- Boelens M., Valois P., Wobben H., Gen A. (1971). Volatile flavor compounds from onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(5), 984–991.
- Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi, U. (2008). Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry*, 107(4), 1668–1673.
- Boqué R., Maroto A., Riu J., Rius, X. (2007). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites*, 53(1), 128–143.
- Bordia T., Mohammed N., Thomson M., Ali M. (1996). An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 54(3), 183–186.
- Bordin K., Kunitake M., Aracava K. Trindade C. (2013). Changes in food caused by deep fat frying. A review. Consultado Junio, 4 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222013000100001
- Brankovic S., Radenkovic M., Kitic D., Veljkovic S., Ivetic V., Pavlovic D., Miladinovic, B. (2011). Comparison of the hypotensive and bradycardic activity of ginkgo, garlic, and onion extracts. *Clinical and Experimental Hypertension* 33(2), 95–9.
- Camargo A., Manucha W. (2016). Potencial rol protector del óxido nítrico y Hsp70 asociado a alimentos funcionales en la aterosclerosis. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis*, 370, 1-10.
- Campillo N., Viñas P., Férez-Melgarejo G., Hernández-Córdoba M. (2015). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 131, 185–191.
- Cartaya O., Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5 – 14.
- Regresión lineal y correlación (2001). Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría, Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza.
- Challier B., Perarnau J., Viel J. (1998). Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: A French case-control study. *European Journal of Epidemiology*, 14(8), 737–747.
- Chasquibol N., Lengua L., Delmás I., Rivera D., Bazán D., Aguirre R. (2003). Alimentos funcionales o Fitoquímicos, Clasificación e Importancia. *Revista Peruana de Química E Ingeniería Química*, (5), 9-20.
- Colina-Coca C., González-Peña D., Vega E., De Ancos B., Sánchez-Moreno C. (2013). Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS GC-MS). *Talanta*, 103, 137–144.
- Corzo-Martínez M., Corzo N., Villamiel M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 609–625.
- Crozier A., Jaganath I., Clifford M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.

- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 348–361.
- Di Rienzo J, Casanoves F., Balzarini M., González L, Tablada M., Robledo C. (2015). InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba. Consultado Agoto, 10 de <http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>
- Dorant E., Van den Brandt P., Goldbohm R., Sturmans F. (1996). Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma. *Gastroenterology*, 110(1), 12–20.
- Serrano Drago M., López López M., Saínz Espuñes T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58–68.
- Escamilla Jiménez C., Cuevas Martínez E., Guevara Fonseca, J. (2009). Artemisa Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73–75.
- Esquivel E., Leal L. (2004). Cromatografía de fase reversa. *Métodos Fisicoquímicos En Biotecnología*, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, 1–50.
- Ewald C., Fjelkner-Modig S., Johansson K., Sjöholm I., Åkesson B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64(2), 231–235.
- FDA Food and Drug Administration. (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. *Guidance for Industry*, 1–15.
- Fenwick G, Hanley A. 1990. Chemical composition. Chapter 2 of *Onions and Allied Crops*, Vol. III (eds J.L. Brewster and H.D. Rabinowitch). CRC Press, Boca Raton, Florida
- Fontana A., Bottini R. (2014). High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1342, 44–53.
- Ford A., Dahl W. (2012). Alimentos funcionales. University of Florida, IFAS Extension, 1–4. Consultado Marzo 15, 2016 de <http://edis.ifas.ufl.edu/fs210>
- Gao C., Takezaki T., Ding J., Li M., Tajima K. (1999). Protective Effect of Allium Vegetables against Both Esophageal and Stomach Cancer : A Simultaneous Case-referent Study of a High-epidemic Area in Jiangsu Province, China, (June), 614–621.
- Gao X., Williams S., Woodman O., Marriott P. (2010). Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time-of-flight mass spectra of flavonoids and chalcones. *Journal of Chromatography A*, 1217(52), 8317–8326.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826.
- Gennadios A., Hanna M., Ling D. (1997). Effect of frozen storage on deep-fat fried breaded onion rings. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(2), 121–125.

Gläber G., Graefe E., Struck F., Veit M., Gebhardt R. (2002). Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9(1), 33–40.

Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Namiesnik J., Najman K., Drzewiecki J., Cvikrová, M., Martincová, O., Katrich E., Trakhtenberg S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4418–4426.

Griffiths G., Trueman L., Crowther T.; Thomas B., Smith B. (2002). Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Research*, 16(7), 603–615.

Guido F. (2015). Determination of Phenolic Content in Different Barley Varieties and Corresponding Malts by Liquid Chromatography-diode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, 563–576.

Harris S., Brunton N., Tiwari U., Cummins E. (2015). Human exposure modelling of quercetin in onions (*Allium cepa* L.) following thermal processing. *Food Chemistry*, 187, 135–139.

Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831–2846.

Helen A., Krishnakumar K., Vijayammal P., Augusti K. (2000). Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicology Letters*, 116(1-2), 61–68.

Hooper L., Cassidy A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Revista de Fitoterapia*, 86, 1805–1813.

Hsing A., Chokkalingam A., Gao Y., Madigan M., Deng J., Gridley G., Fraumeni J. (2002). *Allium* Vegetables and Risk of Prostate Cancer : A Population-Based Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(21), 1648–1651.

Hu J., La Vecchia C., Negri E., Chatenoud L., Bosetti C., Jia X., Liu Ruizhang, Huang G., Bi D., Wang C. (1999). Diet and brain cancer in adults: A case-control study in northeast China. *International Journal of Cancer*, 81(1), 20–23.

Huber L. (2010). Validation of Analytical Methods. Consultado Mayo, 17 de <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>

ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2005). Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1) Current. International Conference on Harmonization, 17.

Ignat I., Volf I., Popa V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables Ioana. *Food Chemistry Journal*, 126, 1821–1835.

Ioku K., Aoyama Y., Tokuno A. Terao J., Nakatani N. Takei Y. (2001). Various Cooking Methods and the Flavonoid Content in Onion. *Journal of Nutrition*, 47, 78–83.

- Ipinza A. (2013). Situación del mercado de la cebolla. Oficina de Estudios Y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Consultado Marzo 11, 2016, de http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1388506931mercadoCebolla2013.pdf
- Iranshahi M. (2012). A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 393–434.
- Jones P. (2002). Clinical nutrition: 7. Functional foods - More than just nutrition. 166(12), 1555–1563.
- Kim J. (1997). Anti-bacterial action of onion (*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 39(3), 136–141.
- Kim J., Huh J., Kyung S., Kyung K. (2004). Antimicrobial Activity of Alk(en)yl Sulfides Found in Essential Oils of Garlic and Onion, 13(2), 235–239.
- Ko E., Nile S., Sharma K., Li G., Park S. (2015). Effect of different exposed lights on quercetin and quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 398–403.
- Kook S., Kim G., Choi K. (2009). The antidiabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), 552–60.
- Kumari K, Mathew B., Augusti K. (2007). Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 367–371.
- Lancaster J., Collin H. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*, 22(2), 169–176.
- Lanzotti V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 3–22.
- Larocca C. (2014). Situación de cebolla. Consultado Marzo 10, 2016, de http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro78/nl_cebollas.php.
- Lawande K. (2012). Onion. *Handbook of Herbs and Spices*, 417–429.
- Le Marchand L., Murphy S., Hankin J., Wilkens L., Kolonel L. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 154–160.
- Leustek T., Martin M., Bick J., Davies, J. (2000). Pathways and Regulation of Sulfur Metabolism Revealed Throughmolecular and Genetic Studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (51), 141-165.
- Ling D., Gennadios A., Hanna M., Cuppett S. (1998). Quality evaluation of deep-fat fried onion rings. *Journal of Food Quality*, 21(2), 95–105.
- Locatelli D. (2005). Desarrollo y Validación de una Metodología Analítica para la Cuantificación de Organoazufrados Volátiles en Ajo (*Allium Sativum*. L) mediante Cromatografía Gaseosa con Detector Fotométrico de Llama y Microextracción en Fase Sólida. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. p 70.

- Locatelli D., Altamirano J., Luco J., Norlin R., Camargo, A. (2014). Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. Analysis of organosulphur compounds avoiding artifacts formation. *Food Chemistry*, 157, 199–204.
- Lombard K., Peffley E., Geoffriau E., Thompson L., Herring A. (2005). Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 571–581.
- Manch N. (2015). Métodos Avanzados para el Análisis, Conservación y Extracción De Compuestos Fenólicos en Alimentos. Universidad de Valladolid. España.
- McAnlis G., McEneny J., Pearce J., Young I. (1999). Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 92–96.
- Mondy N., Naudin A., Christides J., Mandon N., Auger, J. (2001). Comparison of GC-MS and HPLC for the analysis of *Allium* volatiles. *Chromatographia*, 53(S1), S356–S360.
- Moon C., Jung Y., Kim M., Lee S., Baik E., Park S. (2000). Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A₂ synthase inhibition and TXA₂/PGH₂ receptor blockade. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 62(5), 277–283.
- Naczka M., Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111.
- Naseri M.; Arabian M.; Badavi M., Akram A. (2008). Vasorelaxant and Hipotensive Effects of *Allium cepa* Peel Hydroalcoholic Extract in Rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(12), 1569–1575.
- Nile S., Park, S. (2013). Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Life Science*, 7(3-4), 224–228.
- Norma Europea EN ISO/IEC 17025. (2004). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración Consultado Mayo, 18 de <http://www.dbestudiosacusticos.com/pdf.usr/20120809085604-243.pdf>
- Olivieri A., (2014). Analytical Figures of Merit : From Univariate to Multiway Calibration. *Chemical Reviews*, 4 5358–537(2), 5358–5377.
- Ozougwu J. (2011). Anti-Diabetic effects of *Allium cepa* (ONIONS) aqueous extracts on alloxan-Induced diabetic *Rattus Novergicus*. *Pharmacologyonline*, 1(7), 270–281.
- Pawliszyn J. (2003). Sample preparation: Quo vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543–2558.
- Prakash D., Singh B., Upadhyay G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102(4), 1389–1393.
- Quattrocchi O.; Andrizzi S., Laba R. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y Practica (Ed Arte Gráfico Farro SA). Buenos Aires.
- Quattrocchi O. (2014). Curso intensivo HPLC .Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) y D'Amico Sistemas S.A.

- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria : Órgano Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral Y Enteral*, 27(1), 76–89.
- Ramirez D. (2016). Diseño Experimental Multivariado y Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva acoplada a Cromatografía Líquida de Alta Performance, para la Extracción y determinación de Compuestos Organoazufrados en Muestras de Ajo y Fluidos Biológicos. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Mendoza.
- Ramirez D., Locatelli D., Torres-Palazzolo C.; Altamirano J., Camargo A. (2017). Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis : Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry*, 215, 493–500.
- Randle W., Lancaster J. (2002). Sulphur compounds in alliums in relation to flavour quality. RABUNOWITCH and Currah (Ed.), *Allium crop science*, 329–356.
- Ranjbari E., Biparva P., Hadjmohammadi, M. (2012). Utilization of inverted dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples. *Talanta*, 89, 117–123.
- Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.-R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography. A*, 1116(1-2), 1–9.
- Ro J.-Y., Ryu J.-H., Park H.-J., Cho H.-J. (2015). Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has antiplatelet effects in rat platelets. *SpringerPlus*, 4, 17.
- Rose P., Whiteman M., Moore P., Zhun, Y. (2005). Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Allium : the chemistry of potential therapeutic agents*, 351–368.
- Saleheen D., Ali S., Yasinzi M. (2004). Antileishmanial activity of aqueous onion extract in vitro. *Fitoterapia*, 75(1), 9–13.
- Sanchez M., Lodi F., Vera R., Villar I., Cogolludo A., Jimenez R., Moreno L., Romero M., Tamargo J., Perez-Vizcaino F., Duarte, J. (2007). Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *The Journal of Nutrition*, 137, 910–915.
- Sánchez-Gallego J. (2009). Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. p 34
- Sandoval S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. 66. Consultado Mayo, 16 de [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1_validación_de_Métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_1.pdf)
- Santas J., Almajano M., Carbó R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(2), 403–409.

- Sato A., Zhang T., Yonekura L., Tamura H. (2015). Antiallergic activities of eleven onions (*Allium cepa*) were attributed to quercetin 4'-glucoside using QuEChERS method and Pearson's correlation coefficient. *Journal of Functional Foods*, 14, 581–589.
- Sensoy I. (2013). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition processing and bioavailability*, 37–41.
- Shaath N., Flores F. (1998). Egyptian onion oil. *Developments in Food Science*, 40(C), 443–453.
- Shahidi F., Naczki, M. (1996). *Food Phenolics : Sources, Chemistry, Effects, Applications Fouling and Cleaning in Pressure Driven Membrane Processes*, 71, 1996.
- Shin S., Choi, J., Li, X. (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1-2), 144–149.
- Silva C., Haesen N., Câmara J. (2012). A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra-high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1260, 154–163.
- Sinha N., Guyer D., Gage D., Lira, C. (1992). Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 842–845.
- Srinivasan K. (2005). Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(6), 399–414.
- Strack D. (1997). Phenolic metabolism. (Ed H. J.B.), *Plant Biochemistry*, p 387–416.
- Vazquez-Armenta F., Cruz-Valenzuela M., Ayala-Zavala J. (2016). Onion (*Allium cepa*) Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 663-667.
- Wagner H., Dorsch W., Bayer T., Breu W., Willer F. (1990). Antiasthmatic effects of onions: Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and "Cepaenes." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 39(1), 59–62.
- Watson R. (2014). *Polyphenols in Plants : Isolation, Purification and Extract Preparation*. (Ed Elsevier Inc)
- Williamson G. (1996). Protective effect of fruit and vegetables in the diet. *Nutritional and Food Science*, 1, 6–10.
- Yang C., Wang J., Li D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8–22.
- Ye C., Dai D., Hu W. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa L.*). *Food Control*, 30(1), 48–53.
- Zgola-Grze'skowiak A., Grze'skowiak T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1382–1399.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

VIII. ANEXOS

Tabla VIII-1. Prueba T para muestras Independientes de Rutina

Prueba: Bilateral

Variable: rutina cebolla cruda	Grupo 1	Grupo 2
Criterio de clasificación: Muestras	CON DLLME	SIN DLLME
n	3	3
Media	100,17	102,00
Media (1) –Media (2)		-1,83
LI(95)		-6,72
LS (95)		3,07
pHomVar		0,2854
T		-1,04
p-valor		0,3586

$\alpha = 0,05$

Tabla VIII-2. Prueba T para muestras Independientes de Quercetina

Prueba: Bilateral

Variable: quercetina cebolla cruda	Grupo 1	Grupo 2
Criterio de clasificación: Muestras	CON DLLME	SIN DLLME
n	3	3
Media	101,85	104,50
Media (1) –Media (2)		-2,65
LI(95)		-7,14
LS (95)		1,84
pHomVar		0,1742
T		-1,64
p-valor		0,1769

$\alpha = 0,05$

TABLA VIII-3. Prueba T para muestras Independientes de Camferol

Prueba: Bilateral

Variable: camferol cebolla cruda	Grupo 1	Grupo 2
Criterio de clasificación: Muestras	CON DLLME	SIN DLLME
n	3	3
Media	96,14	98,50
Media (1) –Media (2)		-2,36
LI(95)		-23,04
LS (95)		18,32
pHomVar		0,0094
T		-0,49
p-valor		0,6722

$\alpha = 0,05$

Tabla VIII-4. Prueba T para muestras Independientes de DMDS

Prueba: Bilateral

Variable: DMDS cebolla cruda)	Grupo 1	Grupo 2
Criterio de clasificación: Muestras	CON DLLME	SIN DLLME
n	3	3
Media	92,64	99,99
Media (1) –Media (2)		-7,35
LI(95)		-23,55
LS (95)		8,85
pHomVar		0,0126
T		-1,95
p-valor		0,1901

$\alpha = 0,05$

Tabla VIII-5. Análisis de la varianza para Rutina

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rutina µg/ g ss	15	0,99	0,99	6,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	156,48	4	39,12	253,41	<0,0001
Muestra	156,48	4	39,12	253,41	<0,0001
Error	1,54	10	0,15		
Total	158,03	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,05581

Error: 0,1544 gl: 10

Muestra	Medias	n	E.F.			
Cebolla P Horno	1,92	3	0,23	A		
Cebolla Harina	2,25	3	0,23	A		
Cebolla Cruda	7,08	3	0,23		B	
Cebolla Cocida	7,47	3	0,23		B	
Cebolla P Frito	10,28	3	0,23			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla VIII-6. Análisis de la varianza para Quercetina

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quercetina µg/ g ss	15	0,97	0,96	3,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3643,77	4	910,94	88,92	<0,0001
Muestra	3643,77	4	910,94	88,92	<0,0001
Error	102,44	10	10,24		
Total	3746,21	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,60057

Error: 10,2440 gl: 10

Muestra	Medias	n	E.F.			
Cebolla P Frito	72,36	3	1,85	A		
Cebolla Cocida	72,64	3	1,85	A		
Cebolla P Horno	88,18	3	1,85		B	
Cebolla Cruda	106,89	3	1,85			C
Cebolla Harina	107,74	3	1,85			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla VIII-7. Análisis de la varianza para camferol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Camferol µg/ g ss	15	0,85	0,80	11,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	111,50	4	27,88	14,65	<0,0003
Muestra	111,50	4	27,88	14,65	<0,0003
Error	19,03	10	1,90		
Total	130,53	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,70683

Error: 1,9029 gl: 10

Muestra	Medias	n	E.F.			
Cebolla P Horno	8,82	3	0,80	A		
Cebolla Cocida	10,40	3	0,80	A	B	
Cebolla P Frito	10,67	3	0,80	A	B	
Cebolla Harina	12,85	3	0,80		B	
Cebolla Cruda	16,70	3	0,80			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla VIII-8. Análisis de la varianza para DMDS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMDS µg/ g ss	15	1,00	0,99	8,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	261977958,36	4	65494489,59	627,83	<0,0001
Muestra	261977958,36	4	65494489,59	627,83	<0,0001
Error	1043186,29	10	104318,63		
Total	263021144,65	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=867,90869

Error: 104318,6290 gl: 10

Muestra	Medias	n	E.F.			
Cebolla P Horno	1353,14	3	186,47	A		
Cebolla P Frito	1449,25	3	186,47	A		
Cebolla Harina	1829,78	3	186,47	A		
Cebolla Cocida	2796,35	3	186,47		B	
Cebolla Cruda	12226,72	3	186,47			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

