

Memoria de Investigación

Análisis del perfil de metabolitos primarios y secundarios mediante UHPLC-HRMS de la Cebolla Negra

UHPLC-HRMS Profiling of Primary and Secondary Metabolites of Black
Onion

Alumno: Alicia Moreno Ortega

Línea de Investigación NUTRICIÓN, CALIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA

2016/2017

Tutor de Investigación: Rafael Moreno Rojas y José Manuel Moreno Rojas

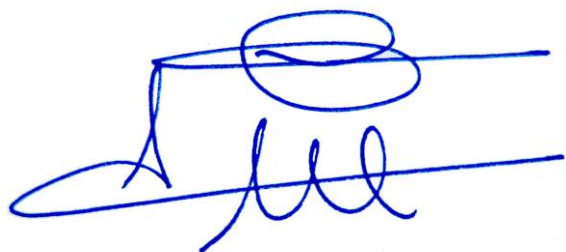
Palabras clave: Cebolla negra, polifenoles, aminoácidos, compuestos organosulfurados,
validación de métodos, análisis HPLC-HRMS



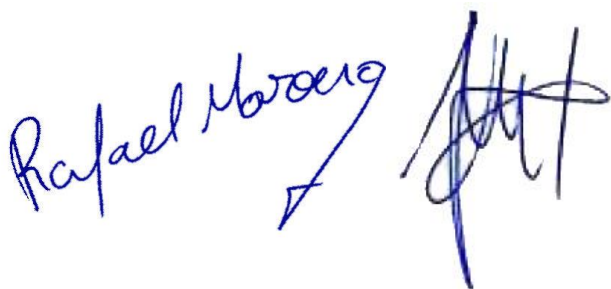
Máster en Nutrición Humana

Memoria de investigación titulada: "**Análisis del perfil de metabolitos primarios y secundarios mediante UHPLC-HRMS de la Cebolla Negra**" (UHPLC-HRMS Profiling of Primary and Secondary Metabolites of Black Onion) realizada por Alicia Moreno Ortega, tutelada por: Rafael Moreno Rojas y José Manuel Moreno Rojas

Córdoba, 11 de octubre de 2017



Fdo. el/a alumno/a:



VºBº Tutores de Investigación



Índice

Resumen.....	3
Abstract	4
Introducción	5
Valoración nutricional de la cebolla	5
Ajo negro y Cebolla negra	6
Objetivos	9
Material y métodos.....	9
Materiales y preparación de las muestras	10
Método de extracción	10
Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC-PDA-HRMS).....	10
Identificación de polifenoles, aminoácidos y compuestos organosulfurados	12
Validación del método	12
Análisis de la actividad antioxidante mediante ABTS	14
Análisis de la actividad antioxidante mediante ORAC	14
Análisis estadístico	15
Resultados y Discusión	15
Optimización del método de extracción	15
Validación del método	17
Identificación y cuantificación de flavonoides, aminoácidos y compuestos organosulfurados en cebolla fresca y cebolla negra.....	22
Capacidad antioxidante de la cebolla negra (ABTS y ORAC) comparada con la cebolla fresca (chalota).....	33
Conclusiones	33
Perspectivas futuras.....	34
Referencias.....	35

Análisis del perfil de metabolitos primarios y secundarios mediante UHPLC-HRMS de la Cebolla Negra / Alicia Moreno Ortega

Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes y ésta es utilizada como alimento, especia y como planta medicinal en casi todo el mundo. El bulbo de la cebolla es una fuente rica en fructooligosacáridos, así como de componentes promotores de la salud como los flavonoides y una gran variedad de compuestos organosulfurados que explican sus ya conocidas propiedades nutricionales. La cebolla negra, elaborada a partir de la cebolla fresca mediante un proceso industrial que implica temperatura y humedad controladas, es un nuevo producto derivado que puede ser utilizado como alimento biosaludable con propiedades organolépticas y nutricionales mejoradas. El objetivo de este trabajo ha sido identificar y cuantificar los compuestos fenólicos, aminoácidos y compuestos organosulfurados en cebolla fresca (chalota) y el producto derivado, cebolla negra, mediante el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-PDA-HRMS). Adicionalmente se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y ORAC. La cebolla fresca contiene altas concentraciones de 10 flavonoides, entre ellos glucósidos de quercetina e isorhamnetina, mientras que la cebolla negra presenta mayores concentraciones de quercetina libre, entre otros flavonoides. Se identificaron y cuantificaron un total de 21 aminoácidos y 22 compuestos organosulfurados, destacando derivados de la cisteína, en cebolla fresca y cebolla negra. Los aminoácidos encontrados en mayor proporción en cebolla fresca fueron la glutamina, ácido glutámico, asparraguina, arginina, prolina, leucina e isoleucina, y entre los compuestos organosulfurados la isoalliína (*S*-(*E*)-(1-propenil) cisteína sulfóxido), el γ -glutamyl-*S*-propil-L-cisteína-*S*-óxido y *S*-allil-cisteína sulfóxido. Los predominantes en cebolla negra fueron los aminoácidos arginina, leucina e isoleucina junto con los compuestos organosulfurados isoalliína y propiína (*S*-propil-L-cisteína sulfóxido). Además, la cebolla negra mostró una actividad antioxidante mayor que la cebolla fresca determinada a partir de pruebas de ABTS y ORAC. Por lo tanto, estos resultados nos ofrecen una base sobre la que inferir beneficios potenciales para la salud que puede tener este nuevo producto producido a partir de cebolla.

Abstract

Onions (*Allium cepa* L.) are one of the most important horticultural crops in the world and are used as food, spice and medicinal plant almost worldwide. Onion bulbs are a rich source of fructooligosaccharides as well as health-promoting constituents such as flavonoids and a huge variety of organosulfur compounds accounting to its well-known nutritional properties. Black onion, made from fresh onion with an industrial process involving controlled temperature and humidity, is a novel derived product potentially used as functional food with improved organoleptic and nutritional properties. The aim of this work was to identify and quantify the phenolic compounds, amino acids and organosulfur compounds of fresh shallot onion and black onion by UHPLC-PDA-HR-MS. Also, the antioxidant activity measured by ABTS and ORAC assays were carried out. Fresh onions contained high concentration of 10 flavonoids comprising quercetin, and isorhamnetin glycosides, while black onions presented higher quantities of free quercetin. A total of 21 amino acids and 22 organosulfur compounds, including S-substituted cysteine derivatives, were identified and quantified in fresh and black onions. Glutamine, glutamic acid, asparagin, arginine, proline, leucine and isoleucine and isoalliin (*S-(E)-(1-propenyl)cysteine sulfoxide*), γ -glutamyl-S-propyl-L-cysteine-S-oxide and S-allyl-cysteine sulfoxide were the predominant amino acids and organosulfur compounds presented in fresh onion, respectively; while arginine, leucine and isoleucine along with isoalliin and propiin (*S-propyl-L-cysteine sulfoxide*) are dominating in black onions. Besides, black onions showed higher antioxidant activity than fresh onion measured by ABTS and ORAC assays. Therefore, these results provide a basis for the potential health benefits of a novel product from fresh shallot onion, black onion, highlighting its use as functional food.

Introducción

El género *Allium* pertenece a la familia Liliaceae, de la que forman parte el ajo (*Allium sativum* L.), la cebolla (*Allium cepa* L.), el puerro (*Allium porrum* L.), la cebolleta (*Allium fistulosum* L.) y la chalota (*Allium ascalonicum* L.).¹

Los integrantes de este género se han cultivado y consumido durante siglos a lo largo de todo el mundo. Históricamente se han utilizado como plantas medicinales desde hace más de 4.000 años para curar un gran número de afecciones. En las últimas décadas, las hortalizas de este género han sido muy investigadas por la presencia de compuestos bioactivos. En concreto, el ajo y la cebolla han demostrado efectos hipocolesterolémico, hipolipidémico, antihipertensivo, antitrombótico, antidiabético y antihiperhomocisteinemia, así como otros efectos biológicos, como actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiasmática, inmunomoduladora y prebiótica.²

Hoy por hoy, la cebolla es una de las hortalizas más cultivadas en todo el mundo, con una producción global estimada de 1.3Mt por año.³

Valoración nutricional de la cebolla

Según la base de datos española de composición de alimentos (BEDCA), la cebolla contiene aproximadamente un 91,8% de agua, 1,2% de proteína, trazas de lípidos y 5.3% de hidratos de carbono, los cuáles son principalmente azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). El contenido de fibra es de 1.8%, que esta se caracteriza por el contenido de fructanos (fructooligosacáridos e inulina) es una de las principales fuentes de fructanos en la dieta europea.¹

La cebolla es rica en polifenoles y en compuestos organosulfurados, responsables principales de sus características sensoriales y nutricionales. Entre los polifenoles, encontramos los antocianos, que serán los responsables del color rosado o morado que poseen algunas variedades de cebolla, como la Chalota o la Echalion. Aunque entre los polifenoles, destaca principalmente la quercetina, que posee una importante función antioxidante. Se ha observado que este compuesto contribuye a la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Colesterol LDL), lo que previene el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. También se han relacionado los polifenoles presentes en la cebolla con un efecto antihipertensivo y antitrombótico.⁴

Por otro lado, se ha visto que los compuestos organosulfurados presentes en la cebolla ejercen un efecto protector en el inicio de la carcinogénesis, concretamente se ha observado un efecto protector frente al cáncer de esófago, estómago⁵ y de mama⁶.

La capacidad antiasmática y antiinflamatoria que se le atribuye a la cebolla es principalmente responsabilidad de la presencia de tiosulfatos (compuestos azufrados)⁷

Obviamente todas estas propiedades “medicinales” aún no han sido recogidas como alegación nutricional por la EFSA, por lo que estas afirmaciones no pueden utilizarse con fines comerciales, aunque existan evidencias científicas.

Ajo negro y Cebolla negra

Se han investigado multitud de beneficios para la salud que se le atribuyen tanto al ajo como a la cebolla, debido a los compuestos bioactivos presentes en su composición.

Debido a sus características organolépticas en fresco, se consume principalmente cocinados. Este proceso de transformación puede modificar en parte sus propiedades beneficiosas disminuyéndolas o hacerlas desaparecer. Por ello, en el caso del ajo, se planteó una forma más interesante de consumo, como ajo negro, que se obtiene a partir de ajo fresco tras un proceso de fermentación en el que no intervienen bacterias ni levaduras, sino condiciones controladas y adecuadas de temperatura. Un estudio reciente realizado en IFAPA ha descrito este proceso tecnológico consistente en un tratamiento térmico a altas temperaturas (70-80°C) y humedad controlada (85-90%) durante un periodo comprendido entre 20 y 45 días⁸. Durante este proceso tienen lugar cambios físico-químicos en el ajo fresco como cambio de color y textura, donde el característico flavor desagradable de éste se atenúa marcadamente o prácticamente desaparece. El resultado es ajo de color negro, sabor dulce, pero con una mayor concentración de compuestos con reconocida bioactividad como los derivados organosulfurados⁹. El ajo negro así preparado se tiende a consumir en forma de dientes de ajo o en forma de extractos de ajo negro, e incluso se usa como ingrediente en alimentos procesados como bebidas, golosinas y helados, debido a su sabor dulce¹⁰. Hasta la fecha, existen numerosos artículos científicos sobre las bondades del ajo negro en forma de extracto de ajo negro, mostrando sus efectos beneficiosos sobre la salud tanto en experimentaciones in vitro empleando cultivos celulares o animales de experimentación^{11, 12}.

Los cambios físicoquímicos que se producen en el ajo con este proceso no afectarán únicamente a aspectos sensoriales, sino que también se ha observado que sus componentes, principalmente la γ -glutamil-S-alk(en)il-L-cisteína (GSAC) y la aliina, sufren alteraciones, convirtiéndose en compuestos estables y de buen sabor. De esta forma, la aliina, compuestos inestable y con connotaciones desagradables al paladar, se transforma en otros compuestos organosulfurados volátiles tales como el sulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS) y trisulfuro de dialilo (DATS) entre otros (Figura 1).

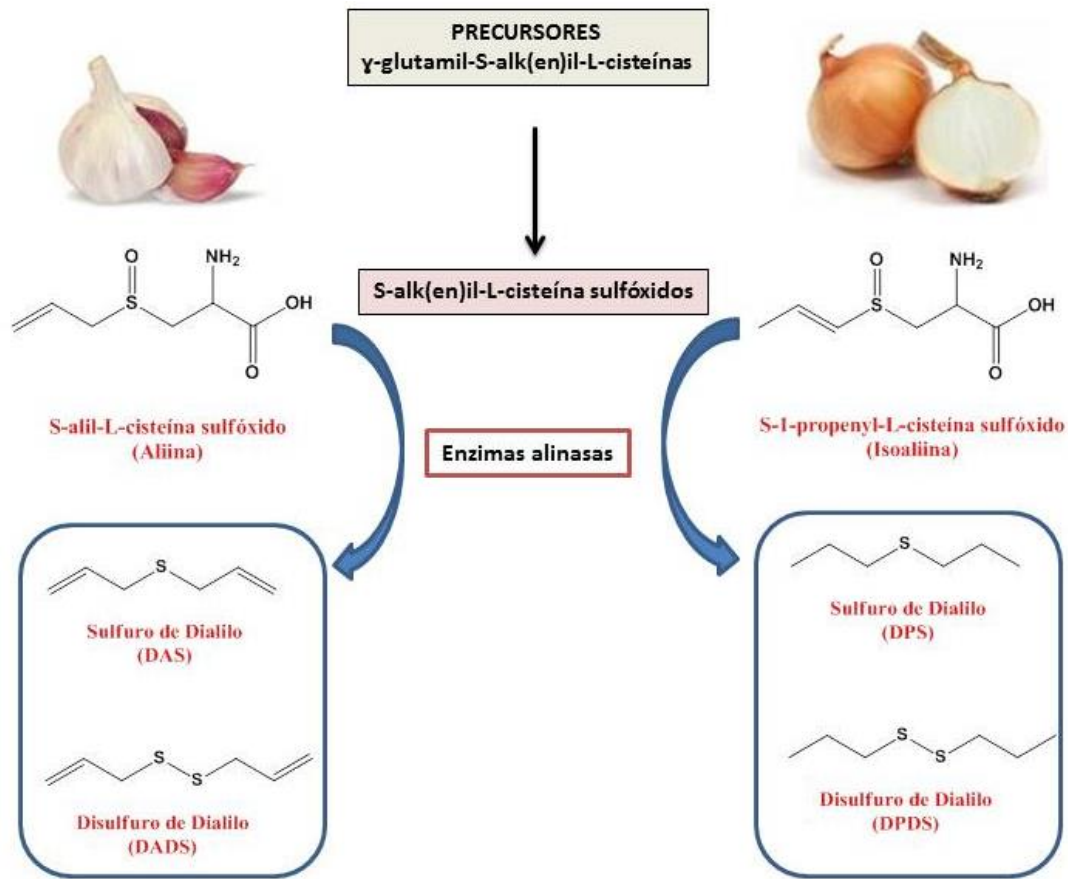


Figura 1.- Compuestos organosulfurados en ajo y cebolla.

De igual forma, el GSAC es transformado a S-alil-cisteína (SAC) por acción de la enzima la γ -glutamyl transpeptidasa (Figura 2).

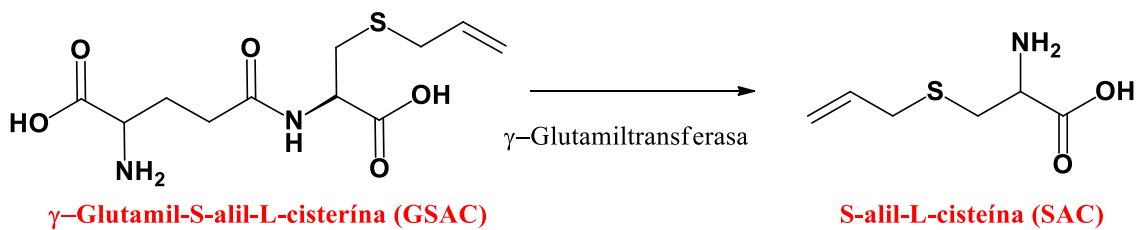


Figura 2.- Esquema de la transformación del GSAC a SAC por acción de la enzima γ -glutamyltransferasa.

Como consecuencia, la concentración de SAC en el ajo negro aumenta hasta 6 veces respecto al ajo fresco⁹ sobre todo si el proceso de elaboración de ajo negro se realiza a temperaturas no muy elevadas¹³. Como resultado de la transformación del GSAC en SAC, el ajo negro va a presentar otros compuestos organosulfurados tales como la S-methyl-L-cisteína (SMC), el trans-S-1-propenyl-L-cisteína(S1PC) y s-alilmercapto-L-cisteína (SAMC)¹⁴.

Actualmente, ha salido al mercado también un nuevo producto denominado cebolla negra, que empieza a comercializarse y a conocerse. Si bien, el ajo negro ha suscitado gran interés en los últimos años, prueba de ello es la tendencia creciente de aparición

en Internet como queda reflejado en la figura 1 obtenida de Google Trends, tanto por los términos ingleses (Fig 3.A), como españoles (Fig. 3.B). En esta figura (3 AyB) también se puede ver que el interés por la cebolla negra en inglés está creciendo más moderadamente, mientras que en español, prácticamente no despegaba. Esto evidencia el diferente interés entre países por estos productos (Figura 4) donde podemos comprobar que tan sólo en España hay interés por búsquedas de cebolla negra en español, en tanto que en Estados Unidos y Reino Unido se tiene por el término en inglés (además del interés por el ajo negro en ambos idiomas).

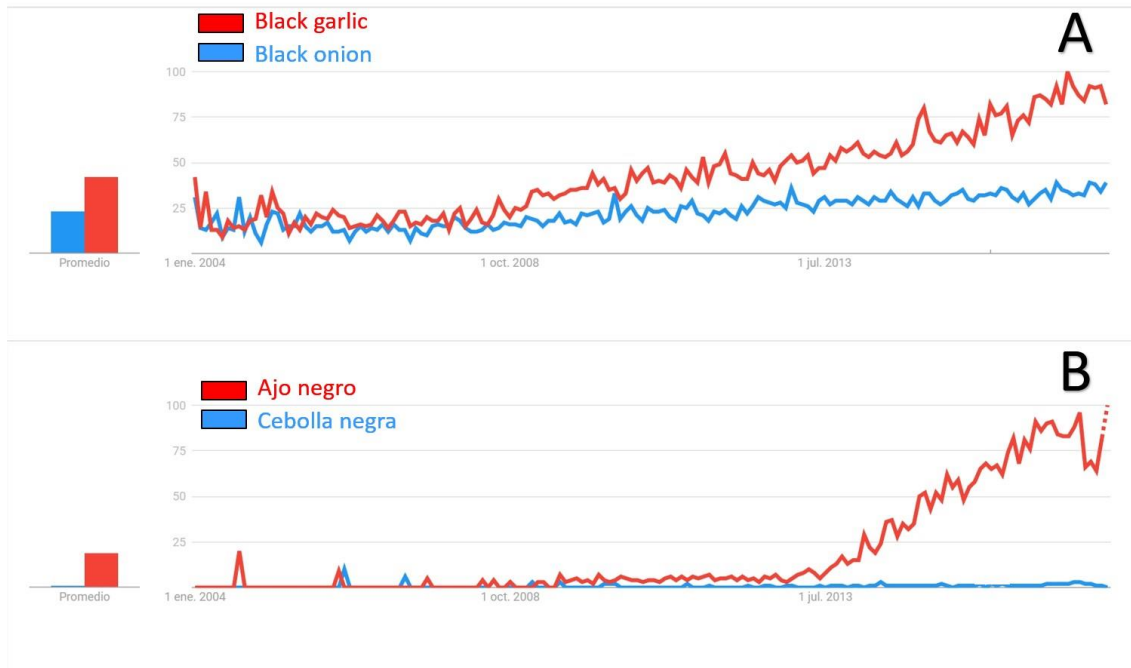


Figura 3.- Tendencia de búsqueda sobre los términos black garlic y black onion (A) y ajo negro y cebolla negra (B). Fuente Google Trends

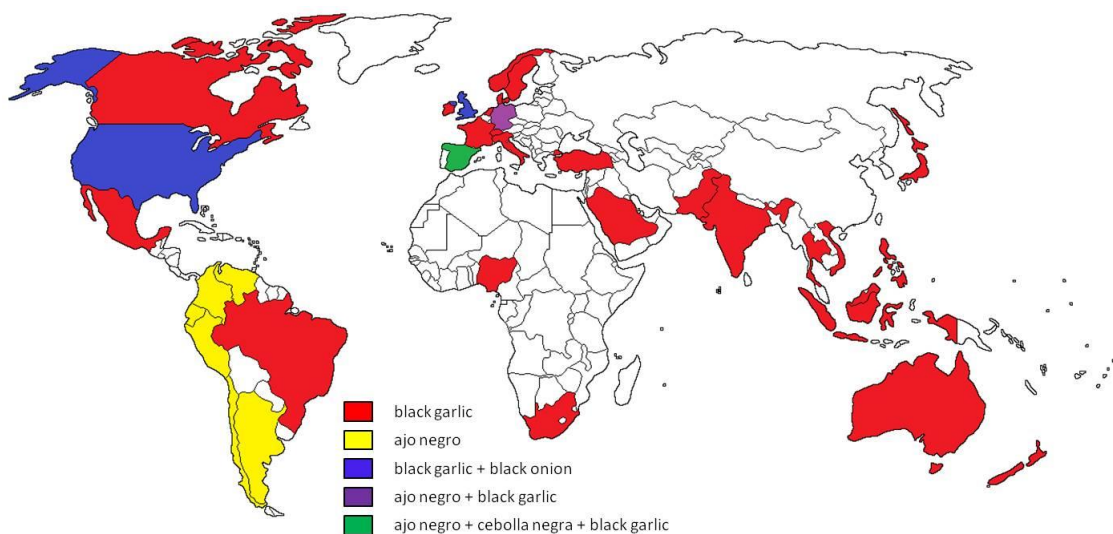


Figura 4.- Interés por la cebolla negra y ajo negro en diferentes países en sus términos ingleses y españoles. Fuente Google Trends

Este interés creciente a nivel popular está respaldado por una creciente bibliografía científica sobre el ajo negro con 217 artículos recogidos por WOS (Web of Science), de los cuales la mayoría (43) son de Corea del Sur y los españoles están en tercera posición con (7), de los cuales el 95% se han publicado a partir del 2009. Respecto a la cebolla negra, tan sólo existen 5 artículos recogidos por WOS, sobre extracto o semillas de cebolla negra y 2 patentes de elaboración de cebolla negra. Esto indica la necesidad de hacer una investigación rigurosa sobre la caracterización de la cebolla negra y sus posibles efectos sobre la salud. Por otra parte, la falta de bibliografía científica específica dificulta la discusión de los resultados respecto a otros autores.

Además es muy posible que la cebolla negra, aparte de tener un gran valor comercial por su uso culinario, podría ser utilizado como alimento biosaludable con un enriquecido valor nutricional en comparación con la cebolla fresca, como se ha visto anteriormente que ocurría con el ajo negro¹⁵.

El concepto de alimento funcional emitido en el documento de consenso Functional Food Science in Europe (FUFOSE) por el International Life Science Institute (ILSI) en el año 1999 es, hasta la fecha, uno de los que ha encontrado mayor aceptación. La definición del ILSI establece que un alimento puede ser considerado “funcional” si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermar.¹⁶

El desarrollo del presente trabajo ha sido el fruto de parte de la investigación realizada en el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de Producción Ecológica (IFAPA) de Alameda del Obispo entre los meses de noviembre de 2016 a octubre de 2017 y que se articula en los siguientes objetivos:

Objetivos

El objetivo general del proyecto es la caracterización de la cebolla negra, mediante métodos adaptados y validados para esta matriz.

Los objetivos específicos son:

1. Optimizar y validar los métodos de análisis a utilizar en la investigación.
2. Identificar los compuestos de interés funcional en la cebolla negra y cebolla fresca.
3. Cuantificar los compuestos identificados en la cebolla negra y cebolla fresca.
4. Medir actividad antioxidante mediante técnicas ABTS y ORAC

Material y métodos

Materiales y preparación de las muestras

La cebolla fresca y la cebolla negra la obtuvimos de mercados locales. Ambas fueron congeladas con nitrógeno líquido, con el fin de evitar que se desencadenara la actividad enzimática que pudiera dar lugar a la pérdida de compuestos de interés. Tras esto, se liofilizó y se molturó.

Método de extracción

Para la extracción se pesó 0.5g de muestra liofilizada (de cebolla fresca o de cebolla negra) a la que se le añadió 5mL del solvente A, B o C, se agitó durante 2 minutos y se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos. Tras esto, la mezcla se centrifugó a 4900 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se recogió. El pellet se volvió a extraer según se ha indicado anteriormente y se unificaron todos los sobrenadantes, almacenándolos a -80°C hasta su posterior análisis UHPLC-HRMS y su determinación de la actividad antioxidante.

Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC-PDA-HRMS)

La identificación y cuantificación de polifenoles, aminoácidos y compuestos organosulfurados en los extractos de cebolla fresca y cebolla negra se llevó a cabo por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC-PDA-MS) (Thermo Scientific, San José, CA, USA). El equipo consta de una bomba UHPLC, un detector PDA que mide desde 200 a 600 nm y un automuestreador mantenido a una temperatura de 10°C (Dionex Ultimate 3000 RS, Thermo Corporation).

Análisis de polifenoles,

La separación de los polifenoles se llevó a cabo en una columna de fase reversa Zorbax SB-C18 RRHD de 100 x 2.1 mm, 1.8 µm de tamaño de partícula, precedida de una precolumna de la misma fase estacionaria (Agilent, Santa Clara, CA), mantenida a una temperatura de 40 °C. La fase móvil consiste en una mezcla de agua acidificada al 1% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo (fase B). El flujo de trabajo fue de 0.15mL/min con un gradiente de 33 minutos (Tabla 1).

Tabla 1.- Gradiente de elución para el análisis de los polifenoles

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	97	3
1	97	3
25	40	60
28	40	60
33	30	70

Tras pasar el detector PDA, el flujo fue directamente al espectrómetro de masas Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, San José, CA), el cual opera con una fuente de ionización de electrospray (HESI) a presión atmosférica en modo de ionización negativa, trabajando con un voltaje capilar de 4kv, una temperatura de capilar de 275°C, una temperatura de secado de 100°C y con nitrógeno como gas nebulizador, gas de envoltura a 19 unidades y gas auxiliar a 15 unidades.

El espectro de masas es adquirido en full-scan y con fragmentación mediante CID (disociación inducida por colisión) en un rango de masas de 100 a 1000m/z con una resolución de 50.000 Hz usando dos microscan.

Para evaluar y garantizar el proceso analítico se aplicaron muestras de control de calidad. Estas muestras estuvieron formadas por una mezcla de muestras reales (cebolla fresca y cebolla negra) las cuales fueron inyectadas de forma regular a lo largo de la secuencia de trabajo. La adquisición y procesado de los datos se realizó usando el software Xcalibur 3.0.

Análisis de aminoácidos y compuestos organosulfurados

La separación de los aminoácidos y los compuestos organosulfurados se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el trabajo de Gokmen et al.¹⁷ con modificaciones. De forma resumida, la separación de estos compuestos se llevó a cabo en una columna ACQUITY UPLC 1.7 µm BEH amide de 150 x 2.1 mm, precedida de una precolumna de la misma fase estacionaria (Waters, Spain), mantenida a una temperatura de 35°C. La fase móvil consistió en una mezcla de agua desionizada acidificada con 1% de ácido fórmico y con 5mM de acetato de amonio y formiato de amonio (fase A) y acetonitrilo (fase B). El flujo de trabajo fue de 0.4mL/min con un gradiente de 20 minutos (Tabla 2).

Tabla 2.- Gradiente de elución para el análisis de aminoácidos y compuestos organosulfurados

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	5	95
0.5	10	90
8.5	30	70
13	46	54
16	5	95
20	5	95

Tras pasar por detector PDA, el flujo fue directamente al espectrómetro de masas Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, San José, CA), con una fuente de ionización de electrospray a presión atmosférica operando en modo de ionización positiva, trabajando con un voltaje capilar de 3.5kv, una temperatura de capilar de 300°C, una temperatura de secado de 150°C y con nitrógeno como gas nebulizador, gas de envoltura a 30 unidades y gas auxiliar a 25 unidades.

El espectro de masas fue adquirido en full-scan y con fragmentación mediante CID (disociación inducida por colisión) en un rango de masas de 100 a 1000m/z con una resolución de 50.000 Hz usando dos microscan.

Para evaluar y garantizar el proceso analítico de aminoácidos y compuestos organosulfurados también se aplicaron muestras de control de calidad, como se ha descrito anteriormente.

Identificación de polifenoles, aminoácidos y compuestos organosulfurados

La identificación de estos compuestos se llevó a cabo en primer lugar comparando la masa exacta y el tiempo de retención con estándares disponibles y en segundo lugar, en ausencia de estándares, los compuestos fueron identificados tentativamente mediante la comparación de la masa exacta del ion molecular obtenida con la masa exacta del ion molecular teórica encontrada en bases de datos de metabolitos tales como Metlin, Phenol Explorer y en base de datos químicas más generales como el PubChem y el ChemSpider. Para la búsqueda en bases de datos se fijó la tolerancia de masa en ≤ 5 ppm. La cuantificación de compuestos fenólicos, aminoácidos y compuestos organosulfurados se llevó a cabo seleccionando la masa exacta teórica del ion molecular comparándola con curvas de calibrado de estándares preparadas en extractos diluidos de cebolla fresca y cebolla negra. En ausencia de compuestos estándares, los compuestos fueron cuantificados en referencia a curvas de calibración de los compuestos estándares más similares.

Validación del método

El método fue completamente validado siguiendo las guías de la FDA¹⁸, para lo que determinamos la linealidad, los límites de detección y de cuantificación, repetibilidad, precisión intermedia y el efecto matriz.

La validación del método se evaluó sobre compuestos de referencia, en concreto 7 flavonoides, 20 aminoácidos y 2 compuestos organosulfurados, para lo que preparamos soluciones madre de todos ellos de forma individual en metanol o en agua desionizada acidificada. Estas soluciones madre se diluyeron y se fueron formando mezclas de los diferentes compuestos para obtener soluciones estándar a una concentración de 200mM en 1% de ácido fórmico en metanol o en agua desionizada acidificada. Finalmente estuvimos trabajando con 8 soluciones con concentraciones comprendidas entre 0.01 y 12.5 ng/ μ L, 0.09 a 50 ng/ μ L y 0.1 a 75 ng/ μ L para flavonoides, aminoácidos y compuestos organosulfurados, respectivamente. Se prepararon en metanol o en los extractos de cebolla fresca o negra diluidos, por triplicado.

Linealidad

La linealidad de un método analítico se define como su capacidad (dentro de un intervalo) para obtener resultados que sean directamente proporcionales (o mediante una operación matemática) a la concentración del analito en la muestra¹⁹. Esta se

determina analizando una serie de 5 a 6 medidas a distintas concentraciones de los estándares, dentro del intervalo esperable en las muestras. La respuesta debe ser directamente proporcional a las concentraciones de los analitos o proporcional por medio de transformaciones matemáticas.

Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de detección (LDD) la mínima concentración o cantidad de analito presente en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas, mientras que el límite de cuantificación (LDC) se entiende la mínima concentración o cantidad de analito en la muestra que se puede cuantificar, bajo dichas condiciones experimentales, con una adecuada exactitud y precisión¹⁹. Por lo tanto, el LDC es un término cuantitativo mientras que el LDD es un término cualitativo.

Para poder determinar los límites de detección y de cuantificación de cada compuesto en cada matriz (cebolla fresca y negra) se realizaron rectas patrón en la matriz. Para ello, una vez obtenido el extracto de las 2 matrices, enriquecíamos con una concentración conocida de la mezcla de los compuestos de interés cada matriz y después íbamos diluyendo. También manteníamos una muestra sin enriquecer para utilizarla como muestra control, nos permitiría restar a cada punto de la recta que habíamos elaborado previamente, la cantidad del compuesto endógeno de la matriz. De esta forma conseguimos una recta de calibrado de patrones en las 2 matrices, lo que nos permite determinar los límites de detección y de cuantificación.

Repetibilidad (intra-day precision) y Precisión intermedia (inter-day precision)

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas¹⁹. El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de estos errores, los análisis efectuados sobre las mismas muestras y circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo son variables y no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión¹⁹. Para cumplir los objetivos marcados en el presente trabajo, la precisión del método analítico fue evaluada a dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad es una medida del grado de dispersión de una serie de medidas realizadas en un espacio de tiempo corto (en un mismo día). La precisión intermedia es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos por un método analítico en un espacio de tiempo más amplio que la repetibilidad, modificando ciertas condiciones de operación: diferentes días, analistas, equipos, etc.

Análisis de la actividad antioxidante mediante ABTS

La capacidad de secuestro de radicales libres (free radical scavenging capacity) se determina espectrofotométricamente por el método de decoloración de Re et al.²⁰, conocido por ABTS. Se basa en la disminución de la absorbancia a 730 nm y 30°C del catión radical, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoln-6-sulfónico) (ABTS), un cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia de antioxidante, perdiendo color proporcionalmente.

Hemos llevado a cabo el análisis ABTS de Re et al. con algunas modificaciones. El radical ABTS se preparó añadiendo 10 mL de persulfato potásico 2.45mM a 38.6mg de ABTS. Esta solución se almacenaba en oscuridad y en agitación durante 12 a 16 h. Previamente a la realización del método, había que ajustar la solución de ABTS a una absorbancia de 0.9 ± 0.1 a 730nm con metanol. Se añadían 5 μ L de cada extracto de cebolla, previamente diluido, o de la recta de Trolox a los 96 pocillos de la microplaca. El lector de microplacas (Sinergy HTX multi-mode reader; BioTek, Winooski, VT, USA) se programó para que registrara cada 20 segundos durante 6 minutos a 37°C la absorbancia a 730nm tras la adición de 150 μ L de la solución de ABTS. Se determinó el porcentaje de inhibición de la absorbancia frente al tiempo y se calculó el área bajo la curva (0-360s). Las soluciones de Trolox de concentración conocida se utilizaron para la calibración y expresión de la actividad antioxidante como μ M de equivalente de Trolox por gramo de peso fresco, para ello se realiza una curva de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones conocido, comprendido entre 0.1 y 1 mM disuelto en metanol.

Análisis de la actividad antioxidante mediante ORAC

La capacidad de secuestro de radicales libres determinada mediante el ensayo ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)²¹ se basa en la pérdida de fluorescencia de una sustancia de referencia (fluoresceína) tras la adición de un radical peroxilo, 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidroclorhidrato (AAPH), que actúa como un iniciador de la reacción oxidativa. En presencia de un antioxidante, esta pérdida de fluorescencia es menor cuanto más capacidad antioxidante tenga el compuesto a evaluar.

El ensayo ORAC fue determinado de acuerdo al método previamente publicado por Huang et al.²¹ y modificado por Madrona et al.²². El análisis consiste en añadir 25 μ L de la recta de Trolox, de la muestra o del solvente (como blanco) en 96 pocillos de una microplaca. A estos pocillos se le añadirán 150 μ L de la solución de trabajo de fluoresceína (8.5×10^{-5} mM) preparada en tampón fosfato de concentración 75mM (pH 7.4). El lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek) se programó para que registrara cada 2 minutos, durante 120 minutos a 485 y 528nm de onda de excitación y emisión, respectivamente, la fluoresceína, después de la adición de 30 μ L de AAPH (153mM) también preparado en tampón fosfato 75mM.

Cada valor obtenido es la media de 4 determinaciones. Los resultados finales fueron calculados de acuerdo a Madrona et al., 2011. Los valores de ORAC fueron expresados como mM equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco (mM TE/g PF). Para ello, se realiza una curva de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones conocido, comprendido entre 25 y 250 μ M disuelto en tampón fosfato (75mM).

Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como la media \pm la desviación estándar (SD) de 3 medidas de la determinación analítica. Se realizó análisis de varianza de un factor (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre los tipos de muestras ($p < 0.05$), haciendo uso del programa de estadística SPSS (v.22).

Resultados y Discusión

Optimización del método de extracción

Se trabajó con 7 flavonoides, 21 aminoácidos y 2 compuestos organosulfurados para llevar a cabo la optimización del método de extracción de la cebolla chalota fresca y la cebolla negra y para la validación de este. Para seleccionar estos compuestos nos basamos en su posible aparición en cebolla fresca y en cebolla negra, y en que estuvieran comercialmente disponibles.

En la Tabla 3 se ve recogido el rendimiento de la extracción o de recuperación (%) de los compuestos seleccionados como componentes representativos de los flavonoides, aminoácidos y compuestos organosulfurados en cebolla fresca y negra, con los 3 solventes de extracción. El porcentaje de rendimiento se calculó a un nivel de concentración conocido de cada compuesto. Para ello, las muestras de cebolla fresca y cebolla negra fueron enriquecidas con una mezcla de los patrones a una determinada concentración próxima a la que hay en cebolla y se realizó la extracción por duplicado con los 3 solventes (enriquecido previamente). Por otro lado, las muestras de cebolla, fresca o negra, fueron sometidas también a extracción y, o bien se diluyeron (muestras control) o bien se enriquecieron posteriormente a la extracción con una mezcla de los patrones (enriquecidas posteriormente). La recuperación se calculó como el ratio entre las áreas de cada analito en las muestras previamente enriquecidas menos el área del analito endógeno de la matriz (muestra control), dividido por el área de cada analito posteriormente enriquecido menos el área del analito endógeno de la matriz (muestra control), multiplicado por 100.

Tabla 3.- Recuperación (%) de flavonoides, aminoácidos y compuestos organosulfurados de cebolla chalota fresca y cebolla negra utilizando los 3 solventes de extracción. Solvente A: agua desionizada:metanol (20:80, v/v) con 1% ácido fórmico; solvente B: agua desionizada:metanol (50:50, v/v) con 1% ácido fórmico and solvente C: agua desionizada:acetonitrilo (20:80, v/v) con 1% ácido fórmico.

	Compuestos	Cebolla Chalota Fresca ^a			Cebolla Negra ^a		
		Solvente A	Solvente B	Solvente C	Solvente A	Solvente B	Solvente C
Flavonoides	Quercetina	90.2a	91.7a	80.8a	109.5a	103.0a	80.0b
	Rutina	80.0a	83.7a	62.4b	83.7a	57.5b	64.1c
	Isorhamnetina	96.8a	86.5a	75.7a	88.2a	64.8b	52.7c
	Luteolina	83.9a	82.8a	76.8a	90.7a	108.6a	88.3a
	Apigenina	93.3a	81.7a	83.5a	94.2a	83.0a	94.3a
Aminoácidos	Leucina	95.2a	97.6a	65.3b	101.3a	101.0a	65.5b
	Isoleucina	92.1a	96.1a	68.9b	110.6a	98.8b	46.9c
	Fenilalanina	96.6a	100.7a	67.3b	101.6a	103a	80.2b
	Triptófano	89.1a	89.4a	55.4b	73.2a	73.4a	<20b
	Metionina	98.3a	90.0a	65.1b	78.2a	79.0a	<20
	Valina	93.8a	95.1a	66.6b	108.2a	98.7b	30.4c
	Prolina	94.0a	93.2a	63.8b	107.2	98.0a	<20b
	Tirosina	94.2a	97.4a	64.2b	103.7a	97.2a	<20b
	Alanina	89.7a	102.0a	77.5b	103.4a	98.3b	77.6c
	Threonina	94.9a	97.3a	65.5b	106.6a	99.2a	<20b
	Glicina	92.1a	92.2a	<20b	106.7a	98.6a	<20b
	Ácido Glutámico	93.5a	96.7a	57.3b	105.8a	95.9b	<20c
	Glutamina	94.6a	97.4a	52.2b	104.8a	108.9a	<20b
	Serina	96.8a	98.1a	48.5b	104.5a	99.2b	<20c
	Asparragina	95.1a	96.3a	56.7b	103.1a	100.5b	<20c
	Lisina	99.7a	97.9a	<20b	105.0a	83.9b	<20c
	Histidina	110.9a	106.9a	<20b	105.9a	89.4b	<20c
	Ornitina	93.4a	80.0a	<20b	104.5a	74.5b	<20c
	Ácido Aspártico	95.3a	96.3a	65.5b	100.6a	90.9a	<20b
Arginina	97.1a	98.7a	<20b	103.3a	91.2b	<20c	
GABA	99.1a	96.7a	75.6b	107.7a	101.4b	84.7c	
Compuestos organosulfurados	Alliina	98.2a	99a	<20b	96.0a	103a	<20b
	SAC	97.1a	101a	<20b	70.8a	74.7a	40.0b

^a Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los 3 solventes en el extracto de la misma matriz.

En cuanto a flavonoides, el solvente A y el solvente B ofrecieron un rendimiento de entre un 80.0 y un 109.5% sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos solventes salvo la excepción de rutina e isorhamnetina (Tabla 3). En el caso de los aminoácidos y los organosulfurados, podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la utilización del solvente A o el B, obteniéndose rendimientos entre el 80.0 y el 110.9% en la matriz de la cebolla fresca. Sin embargo, algunos aminoácidos cuando utilizamos el solvente B obtienen unos valores de rendimiento por debajo del 80% como es el caso del triptófano (73.4%), ornitina (74.5%) y metionina (79.0%) (Tabla 3). El solvente C fue el peor solvente que utilizamos para la

extracción ya que la mayoría de los compuestos de interés han obtenido un porcentaje de recuperación por debajo del 80% (Tabla 3). En base a estos resultados, para las siguientes etapas de validación y cuantificación del método se utilizó como solvente de extracción el A, que era una mezcla de agua desionizada y metanol (20:80, v/v) acidificada con un 1% de ácido fórmico para polifenoles, aminoácidos y compuestos organosulfurados tanto en cebolla fresca como en cebolla negra.

Validación del método

Linealidad

Los resultados del análisis de regresión y de correlación (R^2) de los 7 flavonoides, los 21 aminoácidos y los 2 compuestos organosulfurados se muestran en las Tabla 4 y Tabla 5. Para todos los compuestos el coeficiente de correlación R^2 era superior a 0.9907, observándose linealidad entre el rango de concentraciones evaluado y la respuesta del detector.

Límite de detección (LDD) y cuantificación (LDC)

Los límites de detección para flavonoides, en ambas matrices, se encuentran en un rango entre 0.0036 y 0.0007 ng/ μ L y el límite de cuantificación se encuentra en un rango entre 0.012 y 0.024 ng/ μ L (Tabla 4). Mientras que para aminoácidos y compuestos organosulfurados, el límite de detección va desde 0.012 a 3.12 ng/ μ L y el límite de cuantificación va desde 0.039 a 6.25 ng/ μ L (Tabla 5).

Repetibilidad (Intra-day precision) y Precisión intermedia (Inter-day precision)

La repetibilidad se evaluó midiendo dos concentraciones diferentes, una cercana al límite de cuantificación (L1) y otra a una concentración más elevada (5xLDQ(L2)) en los extractos diluidos de cebolla fresca y cebolla negra. Estas muestras se analizaron 5 veces seguidas. La desviación estándar relativa (RSD) para flavonoides en la cebolla fresca estaba entre 0.7 y 3.7% para el nivel de concentración L1 y entre 1.5 y 3.8% para el nivel de concentración L2 (Tabla 4), mientras que en la matriz de cebolla negra, la RSD para flavonoides se encontraba entre 0.4 y 1.5 para L1 y entre 0.5 y 2.7 para L2. Para aminoácidos y compuestos organosulfurados, la RSD para la concentración L1 está entre 0.7 y 12.1 y para L2 entre 0.4 y 13.6, en cebolla fresca; mientras que en cebolla negra, la RSD se encuentra entre 0.9 y 13.8 y entre 1.0 y 13.8 para L1 y L2, respectivamente (Tabla 5).

La precisión intermedia se evaluó siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito para la repetibilidad, solo que las muestras se analizaron 5 veces en 5 días diferentes en el periodo de una semana. Los valores obtenidos en cebolla fresca para flavonoides se encontraban entre 1.9 y 13.1% para el nivel de concentración L1 y entre 2.2 y 11.1% para el nivel de concentración L2, mientras que en el extracto de cebolla negra, los valores oscilaban entre 4.8 y 9.5% para L1 y entre 2.7 y 7.7% para L2 (Tabla 4). En el caso de aminoácidos y compuestos organosulfurados, los valores del RSD estaban entre 1.8 y 17.2% para L1 y entre 2.2 y 13.9% para L2 en cebolla fresca, mientras que para cebolla

negra, los valores de RSD se encontraban entre 1.0 y 14.2 y entre 2.7 y 15.6 para L1 y L2, respectivamente (Tabla 5).

Efecto matriz

El efecto matriz se determinó comparando la pendiente de las curvas de calibración preparadas en los extractos de cebolla fresca y cebolla negra con la curva estándar preparada en metanol con un 1% de ácido fórmico para flavonoides o en agua acidificada para aminoácidos y compuestos organosulfurados. En cuanto a los flavonoides (Tabla 4), el efecto matriz se encontraba entre el 93 y el 110% in cebolla fresca y entre 85 y 111% en cebolla negra. Con respecto a aminoácidos y compuestos organosulfurados (Tabla 5), se obtuvieron unos valores entre 83 y 106% para cebolla fresca y entre 80 y 111% para cebolla negra. Aunque para algunos compuestos obtengamos un efecto matriz elevado, la mayoría de ellos presentan un efecto matriz \pm 20%, lo cual se considera aceptable para la detección y la cuantificación de estos compuestos mediante UHPLC-HRMS^{23, 24}.

La estabilidad del tiempo de retención de todos los compuestos también se estuvo observando. La desviación estándar relativa (RSD) estuvo en todos los casos por debajo de 0.5% para 50 análisis consecutivos.

Tabla 4.- Resumen de los parámetros de validación de los 7 flavonoides en Cebolla Chalota Fresca y Cebolla Negra.

Compuestos	Rango lineal (ng/μL)	Pendiente	Intersección	R ²	LDD (ng/μL) ^a	LDC (ng/μL) ^a	Repetibilidad ^b		Precision intermedia ^b		Efecto Matriz ^c
							L1	L2	L1	L2	
<i>Cebolla Chalota Fresca</i>											
Quercetina	0.012-12.5	25402373	22555261	0.9923	0.004	0.012	1.7	2.5	8.5	5.5	93.1
Rutina	0.012-12.5	18055622	3113609	0.9975	0.004	0.012	1.2	2.5	1.9	2.2	97.9
Isorhamnetina	0.012-12.5	62416301	17835161	0.9942	0.004	0.012	1.3	1.6	9.3	5.6	109.6
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0.024-12.5	12372182	5040922	0.9909	0.007	0.024	0.7	1.5	7.6	7.1	98.4
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	0.012-6.3	43785782	5867651	0.9927	0.004	0.012	0.8	3.2	5.5	5.8	104.4
Luteolina	0.012-12.5	53512956	5382539	0.9972	0.004	0.012	3.7	3.8	13.1	11.1	100.2
Apigenina	0.012-12.5	44384929	7064976	0.9838	0.004	0.012	1.0	1.8	8.5	4.6	106.1
<i>Cebolla Negra</i>											
Quercetina	0.012-6.3	30312758	7307594	0.9936	0.0036	0.012	1.0	0.5	5.7	2.7	111.1
Rutina	0.012-12.5	16459260	1921621	0.9942	0.0036	0.012	1.0	2.0	4.9	6.3	89.3
Isorhamnetina	0.012-12.5	55821170	13023749	0.9936	0.0036	0.012	0.4	0.8	4.8	4.7	98.4
Quercetin-3- <i>O</i> -glucósido	0.012-12.5	10673405	81671	0.9985	0.0036	0.012	1.0	0.5	8.1	4.1	84.9
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	0.012-6.3	37877605	2631519	0.9960	0.0036	0.012	0.8	1.0	5.5	5.8	90.4
Luteoliana	0.012-12.5	49094166	4207330	0.9956	0.0036	0.012	1.5	2.7	9.5	7.7	91.9
Apigenina	0.012-12.5	44197434	14094745	0.9907	0.0036	0.012	0.7	0.8	7.4	5.4	105.7

^aLDD: límite de detección. LOC: límite de cuantificación. ^bRepetibilidad y Precisión Intermedia corresponden al RSD (%) del análisis de los extractos de cebolla fresca y cebolla negra enriquecidos con los patrones con una concentración final de L1 (0.78 ng/μL) and L2 (6.25 ng/μL). ^cEl Efecto Matriz está expresado en porcentaje.

Tabla 5.- Resumen de los parámetros de validación de los 21 aminoácidos y los 2 compuestos organosulfurados en cebolla chalota fresca y en cebolla negra.

Compuestos	Rango lineal (ng/μL)	Pendiente	Intersección	R ²	LDD (ng/μL) ^a	LDC (ng/μL) ^a	Repetibilidad ^b		Precisión intermedia ^b		Efecto Matriz ^c
							L1	L2	L1	L2	
<u>Aminoácidos</u>						<i>Cebolla Chalota Fresca</i>					
Leucina	0.098-50	3245297	1434703	0.9971	0.029	0.098	1.7	2.4	5.6	8.2	83
Isoleucina	0.098-50	4537671	1065457	0.9988	0.029	0.098	2.2	0.4	5.8	7.7	88
Fenilalanina	0.098-50	1663641	691526	0.9980	0.029	0.098	2.6	2.5	13.9	8.7	105
Triptófano	0.098-50	572486	-544643	0.9922	0.029	0.098	5.3	2.3	17.2	13.9	85
Metionina	0.098-50	1867736	-694741	0.9991	0.029	0.098	12.1	3.2	6.5	12.8	86
Valina	0.098-50	1993399	1066633	0.9966	0.029	0.098	4.8	2.2	5.6	8.1	94
Prolina	0.098-20	9080102	-530778	0.9997	0.012	0.039	11.5	3.0	11.4	12.9	106
Tirosina	0.098-50	377503	-76068	0.9994	0.029	0.098	3.7	1.7	7.6	12.5	87
GABA ^d	0.098-50	3175583	-953869	0.9993	0.029	0.098	6.9	2.9	11.0	9.2	92
Alanina	0.098-50	1077476	-369036	0.9986	0.029	0.098	3.9	2.5	8.9	7.1	92
Treonina	0.098-50	820067	-158642	0.9996	0.029	0.098	2.9	0.6	4.3	7.9	93
Glicina	0.195-50	271977	-109487	0.9984	0.059	0.195	8.0	7.9	7.6	11.9	93
Ácido glutámico	0.098-50	542528	303417	0.9991	0.029	0.098	1.9	2.1	5.5	10.0	87
Glutamina	0.098-50	496591	24948	0.9976	0.029	0.098	1.8	2.0	5.4	13.3	89
Serina	0.098-50	378872	99659	0.9981	0.029	0.098	1.9	2.6	5.3	9.9	91
Aspargina	0.098-50	605553	11650	0.9995	0.029	0.098	1.1	1.8	2.0	9.5	84
Ácido aspártico	0.098-50	200135	-136497	0.9936	0.029	0.098	6.4	13.6	11.9	8.4	90
Lisina	0.098-12.5	592527	-69029	0.9943	0.029	0.098	2.0	2.3	1.4	9.4	90
Histidina	1.563-25	536300	-675110	0.9900	0.029	0.098	6.1	0.7	1.8	2.2	88
Ornitina	0.781-12.5	233713	-89535	0.9973	0.029	0.098	1.6	3.9	11.8	10.0	101
Arginina	0.391-50	1787725	326578	0.9995	0.029	0.098	0.7	1.5	6.8	7.2	106
<u>Compuestos</u>											
<u>Organosulfurados</u>											
Alliína	0.5-75	460250	-418104	0.9992	0.030	0.100	5.2	3.5	6.6	5.7	106
SAC	0.1-75	966119	47217	0.9999	1.500	5.00	1.5	4.5	13.4	11.4	102

Tabla 5 cont.

Compuestos	Rango lineal (ng/μL)	Pendiente	Intersección	R ²	LDD (ng/μL) ^a	LDC (ng/μL) ^a	Repetibilidad ^b	Precisión intermedia ^b	Efecto Matriz ^c		
<i>Cebolla Negra</i>											
<u>Aminoácidos</u>											
Leucina	0.098-12.5	3157625	490523	0.9980	0.029	0.098	1.2	2.0	12.1	6.6	81
Isoleucina	0.098-50	4389002	1466016	0.9994	0.029	0.098	0.9	1.9	4.1	5.3	85
Fenilalanina	0.098-50	1587579	1316871	0.9946	0.029	0.098	2.9	2.5	7.0	8.3	100
Triptófano	0.098-50	678836	-286383	0.9992	0.098	0.196	13.4	6.5	13.1	13.9	101
Metionina	0.098-50	1734599	-557069	0.9987	0.029	0.098	13.8	10.1	9.0	15.6	80
Valina	0.098-25	2348189	701542	0.9982	0.029	0.098	2.6	1.6	8.2	7.8	111
Prolina	0.039-20	9510223	100806	0.9995	0.012	0.039	3.2	2.5	4.2	13.5	111
Tirosina	0.098-50	348298	-17300	0.9999	0.029	0.098	1.3	1.2	9.0	10.3	80
GABA ^d	0.098-50	3264382	-1618886	0.9983	0.029	0.098	0.9	2.5	2.9	8.2	95
Alanina	0.098-50	1205573	-458759	0.9985	0.029	0.098	1.9	1.5	6.7	7.9	103
Treonina	0.098-50	876703	-244956	0.9989	0.029	0.098	2.3	1.2	4.7	7.3	99
Glicina	0.098-50	261732	-84802	0.9991	0.029	0.098	3.5	1.1	4.7	6.8	89
Ácido glutámico	0.098-50	544661	73654	0.9994	0.029	0.098	1.7	2.4	1.0	11.2	87
Glutamina	0.098-25	438271	-63229	0.9996	0.029	0.098	6.0	9.7	10.9	4.2	92
Serina	0.098-50	415478	36839	0.9993	0.029	0.098	1.7	1.4	3.3	9.3	100
Aspargina	0.098-50	671316	-46139	0.9994	0.029	0.098	2.8	1.0	6.1	8.6	94
Ácido aspártico	0.098-50	226205	-145560	0.9929	0.029	0.098	3.0	8.5	14.2	5.8	102
Lisina	0.098-25	516008	-61100	0.9986	0.029	0.098	1.2	1.5	1.9	9.8	85
Histidina	6.25-25	586845	-1905888	0.9934	0.098	0.196	7.3	2.4	10.8	4.0	97
Ornitina	0.781-12.5	235670	-92026	0.9982	0.098	0.196	5.2	5.4	9.2	11.1	102
Arginina	0.391-25	1487466	-832105	0.9922	0.029	0.098	2.3	1.0	10.9	8.0	88
<u>Compuestos</u>											
<u>Organosulfurados</u>											
Alliína	0.1-100	427961	-169143	0.9972	0.030	0.100	3.8	4.6	2.5	2.7	95
SAC	0.1-100	869774	-232084	0.9981	0.150	0.500	2.0	13.8	7.3	6.6	114

^aLDD: límite de detección. LDC: límite de cuantificación. ^bRepetibilidad y Precisión Intermedia corresponden al RSD (%) del análisis de los extractos de cebolla fresca y cebolla negra enriquecidos con los patrones con una concentración final de L1 (0.1 ng/μL) and L2 (0.5 ng/μL). ^cEl Efecto Matriz está expresado en porcentaje. ^d GABA: ácido gamma aminobutirico

Identificación y cuantificación de flavonoides, aminoácidos y compuestos organosulfurados en cebolla fresca y cebolla negra

Flavonoides

Identificación de flavonoides

Se identificaron un total de 10 flavonoides en la cebolla fresca y en negra. Las características cromatográficas empleadas para la identificación de los flavonoides se encuentran recogidas en la Tabla 6. Además se muestra un perfil de estos compuestos en la Figura 5.

Los picos 1 y 2 con masas exactas negativas de m/z 625.1410 (-0.68 ppm), presentaron a baja energía de disociación un fragmento de m/z 301.0360 (0.75 ppm) (correspondiente a un patrón de quercetina). La pérdida de 324.1050 Da es equivalente a un ion diglucósido, por lo que se identificó estos compuestos como dos isómeros de quercetina. Teniendo en cuenta el orden de elución y basándonos en datos de anteriores publicaciones^{25, 26}, los picos 1 y 2 han sido identificados como quercetina-7,4'-*O*-diglucósido y quercetina-3,4'-*O*-diglucósido, respectivamente.

Lo picos 3 y 5 presentaron masas exactas de m/z 609.1460 (0.42ppm) y m/z 463.0880 (-0.39 ppm), respectivamente. La comparación de esas masas exactas y los tiempos de retención con patrones comerciales identificaron estos compuestos como rutina y quercetina-3-*O*-glucósido, respectivamente.

El pico 4 tiene una masa exacta negativa de m/z 639.1570 (-0.78ppm), el cuál a baja energía de colisión produce un fragmento a m/z 315.0510 (-0.99 ppm) (correspondiente al patrón de isorhamnetina). La pérdida de 324.106 Da (equivalente a un ion diglucósido) permitió identificar tentativamente este compuesto como isorhamnetina-diglucósido. Basándonos en un trabajo anterior que estudió el contenido de polifenoles en la cebolla chalota^{26, 27}, este compuesto fue identificado como isorhamnetina-3,4'-*O*-diglucósido.

Los picos 6 y 7 presentan una masa exacta negativa a m/z 463.0880 (1.08 ppm) y 477.1040 (0.85 ppm), respectivamente, los cuáles a baja energía de colisión mostraron fragmentos a m/z 301.0360 (0.75 ppm) (que corresponde al patrón de la quercetina) y a 315.0510 (0.-99 ppm) (que corresponde al patrón de la isorhamnetina), respectivamente. La pérdida de 162.052 Da, que indica la escisión de un grupo glucósido, permitió la identificación de estos dos compuestos como quercetina-*O*-glucósido e isorhamnetina-*O*-glucósido, respectivamente. En función de datos ya publicados sobre cebolla chalota^{26, 27}, el pico 6 puede identificarse como quercetina-4-*O*-glucósido y el pico 7 como isorhamnetina-4'-*O*-glucósido.

Cuantificación de flavonoides

En la tabla 7 encontramos toda la información sobre la cuantificación de los 10 flavonoides identificados en cebolla chalota fresca y en cebolla negra. Quercetina libre (144 $\mu\text{g/g}$ PF) fue el flavonoide principal que encontramos, representando el 89.6%

del total de flavonoides detectados en la cebolla negra, siendo el 10.4% restante constituido por cuatro componentes: quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-4-*O*-glucósido, luteolina e isorhamnetina. Por otro lado, en la cebolla chalota fresca la quercetina libre (87 µg/g PF), quercetina-4-*O*-glucósido (39.4 µg/g PF) y dos isómeros de la quercetina-diglucósido (63 µg/g PF) conformaban el 94.6% del total de flavonoides. Como componentes minoritarios fueron la rutina, la isorhamnetina-3,4'-diglucósido, la quercetina-3-*O*-glucósido, la luteolina y la isorhamnetina.

Los valores obtenidos de quercetina libre en cebolla chalota fresca están en consonancia con estudios previos en los que obtenían concentraciones de quercetina en cebolla comercial entre 185 y 634 µg / g de PF²⁸ y entre 284 y 486 µg/g PF²⁹. Además, Fattorusso et al.²⁶, han observado la presencia de altas concentraciones de quercetina libre e isorhamnetina y sus glucósidos: quercetina-4-glucósido y quercetina-diglucósido en cebolla chalota fresca.

Por lo general, el contenido de flavonoides no varía significativamente entre la cebolla negra (153 µg/g PF) y la cebolla chalota fresca (200 µg/g PF), lo que nos indica que las pérdidas de flavonoides durante la elaboración de la cebolla negra no son muy elevadas. Aunque sí debemos prestar atención a los compuestos individuales como la quercetina libre, que se encuentra en una cantidad significativamente mayor en cebolla negra (144 µg/g PF) en comparación con la cebolla chalota fresca (87 µg/g PF), probablemente por la degradación térmica de los diglucósidos de la quercetina presentes en la cebolla fresca y que no detectamos en la cebolla negra.

Tabla 6.- . Identificaciones de flavonoides basadas en HPLC-HRMS en Cebolla chalota fresca y Cebolla negra

Pico	RT	Compuesto	Fórmula química [m/z]-	Masa Experimental [m/z]-	δ (ppm)	Nivel MSI MI ^a
1	14.9	Quercetina diglucósido I	C27H29O17	625.141	-0.68	2
2	15.2	Quercetina diglucósido II	C27H29O17	625.141	-0.66	2
3	15.3	Rutina	C27H30O16	609.146	0.42	1
4	15.6	Isorhamnetina-3,4'-diglucósido	C28H31O17	639.157	-0.78	2
5	16.8	Quercetina-3-O-glucósido	C21H19O12	463.088	-0.39	1
6	18.1	Quercetina-4-O-glucósido	C21H19O12	463.088	1.08	2
7	18.7	Isorhamnetina-4'-O-glucósido	C22H21O12	477.104	0.85	2
8	21.2	Quercetina	C15H10O7	301.036	0.75	1
9	23.4	Luteolina	C15H10O6	285.040	0.58	1
10	23.9	Isorhamnetina	C16H12O7	315.051	-0.99	1

^aIniciativa de normas sobre metabolitos (Metabolite standards initiative; MSI). Niveles de identificación de metabolitos (metabolite identification, MI)⁴³. Los compuestos de referencia estaban disponibles para todos los compuestos identificados en MSI MI nivel 1.

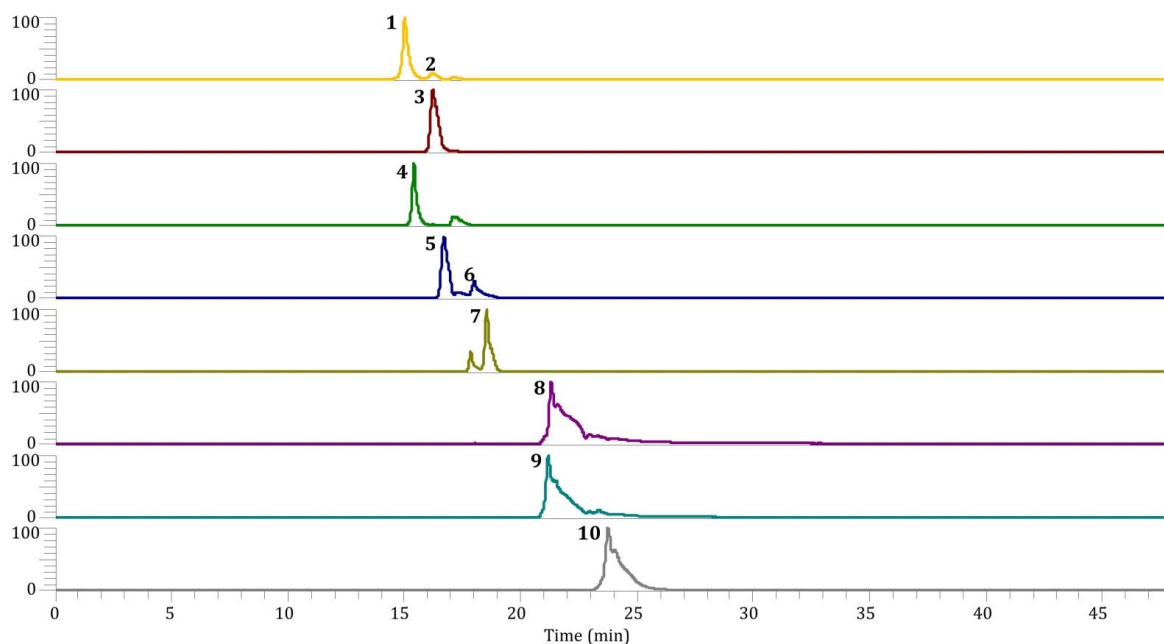


Figura 5.- . Cromatogramas de HPLC-HRMS de los metabolitos 1 a 10. Para conocer la identificación de los picos, ver la Tabla 6.

Tabla 7.- Cantidad ($\mu\text{g/g}$ PF) de cada uno de los flavonoides presentes en cebolla fresca y negra. Los datos están expresado como media \pm SDV ($n=3$).

Compuesto	Chalota Fresca ($\mu\text{g/g}$ PF)	Cebolla Negra ($\mu\text{g/g}$ PF)
Quercetina-7,4'-O-diglucósido	42 \pm 4	nd
Quercetina-3,4'-O-diglucósido	21 \pm 1	nd
Rutina	0.8 \pm 0.1	nd
Isorhamnetina-3,4-diglucósido	1.7 \pm 0.2	nd
Quercetina-3-O-glucósido	2.2 \pm 0.3 ^a	1.3 \pm 0.1 ^b
Quercetina-4-O-glucósido	39 \pm 1 ^a	6.4 \pm 0.3 ^b
Isorhamnetina-4'-O-glucósido	3.7 \pm 0.3	nd
Quercetina	87 \pm 6 ^b	144 \pm 2 ^a
Luteolina	1.3 \pm 0.2 ^a	1.0 \pm 0.1 ^a
Isorhamnetina	1.0 \pm 0.2 ^a	0.6 \pm 0.1 ^b
Total Flavonoides	200 \pm 13^a	153 \pm 3^b

^a Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los 3 solventes para la misma matriz

Aminoácidos libres y compuestos organosulfurados

El análisis por UHPLC-HRMS de cada uno de los aminoácidos y compuestos organosulfurados se ha llevado a cabo mediante la adaptación de una metodología previamente empleada por Gokmen et al., 2012, que utilizó la interacción hidrofílica UHPLC-HRMS en el análisis de metabolitos primarios polares en alimentos y bebidas con una eficiencia de separación mejorada, un consumo mínimo de disolvente y un tiempo de análisis más corto^{17, 30-32}. Esta metodología ha tenido éxito en el análisis individual de aminoácidos^{17, 30} y de compuestos organosulfurados³³ en matriz de cebolla mostrando una buena separación entre los compuestos y unos elevados límites de detección y de cuantificación para los patrones de referencia utilizados sin perder tiempo en las técnicas de pretratamiento que complican los métodos de extracción, pasos de limpieza y procesos de derivatización, que terminan conduciendo hacia la inestabilidad derivada, la reacción lateral y las interferencias de reactivos previo al análisis³⁴. Además, la adición de un reactivo de emparejamiento de iones (acetato de amonio 5mM y formiato amónico 5mM) a las fases móviles mejora la resolución de aminoácidos no derivatizados usando una columna HILIC. Esto también aumenta la señal del MS y la forma del pico, sin afectar la sensibilidad del detecto de MS.^{17, 30-32}.

Identificación de aminoácidos y compuestos organosulfurados

Se han identificado un total de 21 aminoácidos libres y 22 compuestos organosulfurados en la cebolla negra y en la cebolla chalota fresca. La base de la identificación de los aminoácidos se consiguió por cromatografía con compuestos de referencia y sus perfiles de fragmentación con una energía de colisión baja y por referencia a las propiedades que habían sido publicadas por investigaciones anteriores relacionadas. Las características cromatográficas empleadas para la identificación de los aminoácidos y los compuestos organosulfurados, así como el perfil cromatográfico de estos compuestos se encuentra recogida en la Tabla 8 y Tabla 9, Figura 6 y Figura 7.

Los picos del 11 al 31 corresponden a todos los aminoácidos libres y han sido identificados comparando con los patrones. Por otro lado, los picos del 32 al 53 corresponden con los compuestos organosulfurados los cuales han sido identificados en base a los datos de publicaciones anteriores relacionadas, como ya habíamos comentado³⁵⁻³⁸

Cuantificación de aminoácidos y compuestos organosulfurados

Un total de 21 aminoácidos y 22 compuestos organosulfurados, incluyendo derivados de la cisteína, han sido identificados y cuantificados en cebolla chalota fresca y en cebolla negra (Tabla 10). La cebolla fresca muestra una concentración significativamente mayor de aminoácidos y compuestos organosulfurados (3.6 mg/g PF y 2.5 mg/g PF, respectivamente) en comparación con la cebolla negra (2.1 mg/g PF y 1.7 mg/g PF, respectivamente).

Arginina, glutamina, ácido glutámico, lisina, tirosina, asparragina y leucina, junto con γ -glutamil-cisteína(propen-enil)S-óxido y γ -glutamil -cisteína(propen-1-enil) fueron los aminoácido y compuestos organosulfurados predominantes en la cebolla fresca, de acuerdo con los datos previamente publicados³⁷; mientras que arginina, leucina, isoleucina, tirosina, alanina y asparragina, junto con isoaliína son lo predominante en la cebolla negra. La abundancia de isoaliína en cebolla negra se puede deber a la actividad enzimática de la cisteína-sulfoxidasa que se produce cuando la cebolla fresca se calienta durante la elaboración de la cebolla negra³³ y podría ser un precursor de una amplia gama de compuestos sensoriales y beneficiosos para la salud de la cebolla negra.

Tabla 8.- Identificación de aminoácidos basada en UHPLC-HRMS en Chalota fresca y Cebolla negra.

Pico	RT	Compuesto	Fórmula química [m/z]-	Masa Experimental [m/z]-	δ (ppm)	Nivel MSI MI ^a
11	6.18	Fenilalanina	C9H11NO2	166.0862	-2.24	1
12	6.20	Leucina	C6H13NO2	132.1029	0.06	1
13	6.29	Triptófano	C11H12N2O2	205.0971	-1.86	1
14	6.41	Isoleucina	C6H13NO2	132.0102	0.13	1
15	6.75	Metionina	C5H11NO2S	150.0583	-0.87	1
16	6.81	GABA (ácido gamma-aminobutírico)	C4H9NO2	104.0706	1.61	1
17	7.07	Valina	C5H11NO2	118.0862	0.10	1
18	7.10	Prolina	C5H9NO2	116.0706	-0.11	1
19	7.27	Tirosina	C9H11NO3	182.0811	-2.14	1
20	8.20	Alanina	C3H7NO2	90.0549	3.97	1
21	8.54	Treonina	C4H9NO3	120.0655	0.26	1
22	8.74	Glycina	C2H5NO2	76.0396	6.04	1
23	8.98	Ácido glutámico	C5H9NO4	148.0604	-1.67	1
24	9.21	Glutamina	C5H10N2O3	147.0764	-2.12	1
25	9.27	Serina	C3H7NO3	106.0498	1.73	1
26	9.41	Asparragina	C4H8N2O3	133.0607	0.43	1
27	9.76	Ácido aspártico	C4H7NO4	134.0447	-0.33	1
28	11.38	Arginina	C6H14N4O2	175.1189	-2.93	1
29	11.81	Lisina	C6H14N2O2	147.1128	-1.77	1
30	11.92	Ornitina	C5H12N2O2	133.0972	-0.89	1
31	11.93	Histidina	C6H9N3O2	156.0767	-1.93	1

^aIniciativa de normas sobre metabolitos (Metabolite standards initiative; MSI). Niveles de identificación de metabolitos (metabolite identification, MI)⁴³. Los compuestos de referencia estaban disponibles para todos los compuestos identificados en MSI MI nivel 1.

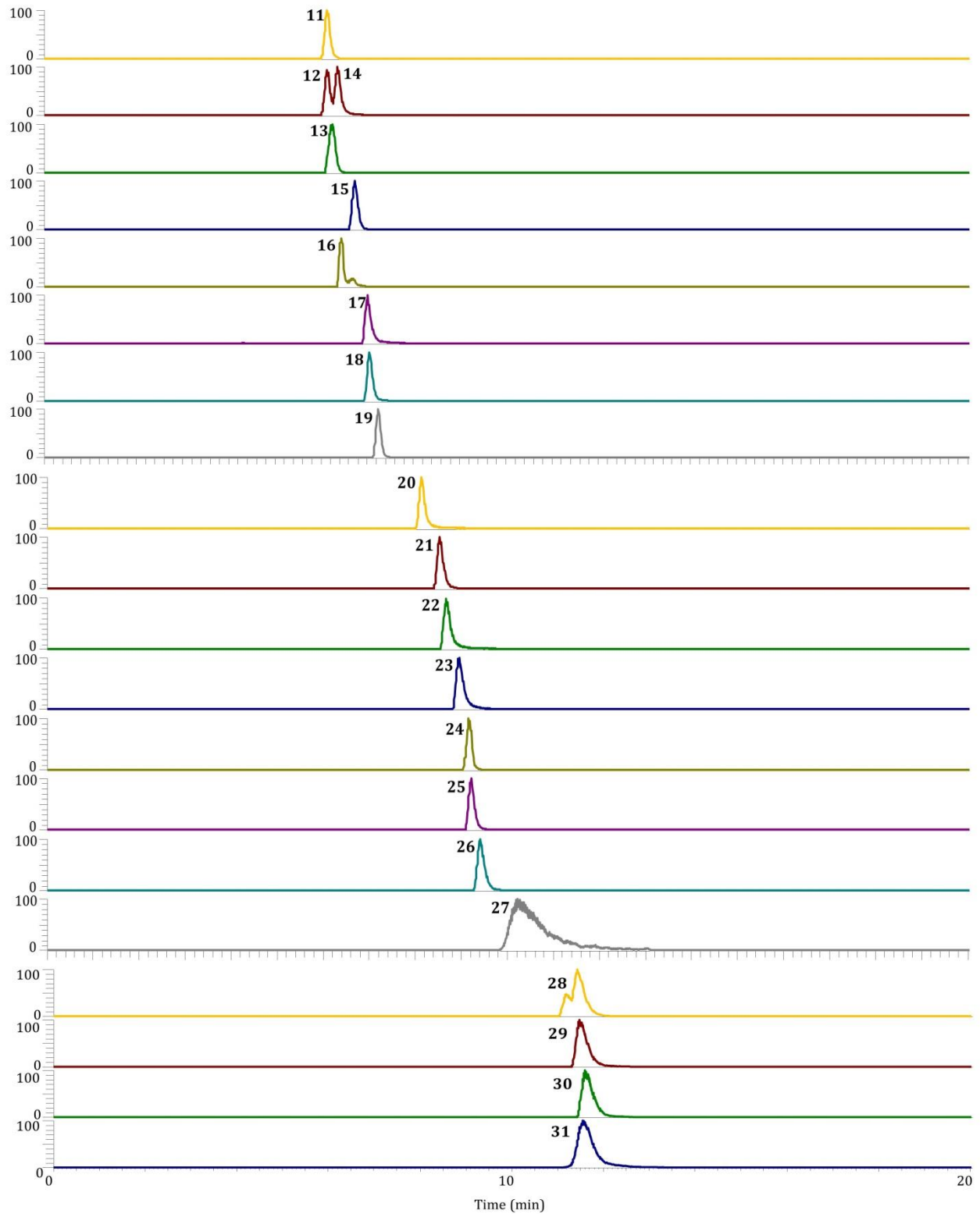


Figura 6.- Cromatograma del HPLC- HRMS de los metabolitos 11 a 31. Para l identificación de los picos, ver Tabla 8.

Tabla 9.- Identificación de compuestos organosulfurados basada en UHPLC-HRMS en Chalota fresca y Cebolla negra.

Pico	RT	Compuesto	Fórmula química [m/z]-	Masa Experimental [m/z]-	δ (ppm)	Nivel MSI MI _a
32	5.45	<i>Cys(SPropil)</i>	C6H13NO2S2	196.04605	0.62	2
33	5.48	<i>Cys(SProp-1-enil)</i>	C6H11NO2S2	194.03040	-0.70	2
34	7.59	<i>Cys(Propil) S-óxido (Propiína)</i>	C6H13NO3S	180.06889	2.46	2
35	7.59	<i>Cys(2-carboxipropil)c</i>	C7H13NO4S	208.06381	1.32	2
36	7.68	<i>Cys(Prop-2-enil) S-óxido (Aliína)</i>	C6H11NO3S	178.05324	2.63	1
37	7.68	<i>γ-Glu-Cys(SPropil)-Gly</i>	C13H23N3O6S2	382.11010	0.76	2
38	7.71	<i>γ-Glu-Cys(SProp-1-enil)</i>	C11H18N2O5S2	323.07299	-0.25	2
39	7.76	<i>γ-Glu-Cys(SProp-1-enil)-Gly</i>	C13H21N3O6S2	380.09445	0.35	2
40	8.11	<i>γ-Glu-Cys(Propil)</i>	C11H20N2O5S	293.11657	-0.11	2
41	8.14	<i>γ-Glu-Cys(Prop-1-enil)</i>	C11H18N2O5S	291.10092	0.01	2
42	8.37	<i>Cys(2-carboxipropil)-Glyc</i>	C9H16N2O5S	265.08527	-0.01	2
43	8.40	<i>Cys(Prop-1-enil) S-óxido (Isoaliína)</i>	C6H11NO3S	178.05324	2.57	2
44	8.58	<i>γ-Glu-Cys(SMe)-Gly</i>	C11H19N3O6S2	354.07880	0.17	2
45	9.04	<i>Cys(Me) S-Oxide (Methiin)</i>	C4H9NO3S	152.03759	4.55	2
46	9.29	<i>Cys(Me) (Deoximethiin)</i>	C4H9NO2S	136.04268	0.11	2
47	9.30	<i>γ-Glu-Cys(2-carboxipropil)-Glyc</i>	C14H23N3O8S	394.12786	0.37	2
48	10.20	<i>γ-Glu-Cys(2-carboxipropil)-Gly Hexosidec</i>	C20H33N3O13S	556.18069	-0.29	2
49	10.46	<i>γ-Glu-Cys(Propil) S-óxido</i>	C11H20N2O6S	309.11148	0.36	2
50	10.58	<i>γ-Glu-Cys(Prop-1-enil) S-óxido</i>	C11H18N2O6S	307.09583	-0.12	2
51	10.58	<i>3-Methyl-1,4-tiazano-5-ácido carboxílico S-Óxido (Cycloaliína)</i>	C6H11NO3S	178.05324	3.12	2
52	11.65	<i>γ-Glu-Cys(Me) S-Óxido</i>	C9H16N2O6S	281.08018	0.56	2
53	11.65	<i>γ-Glu-Cys(Me)</i>	C9H16N2O6S	281.08018	0.56	2

^aIniciativa de normas sobre metabolitos (Metabolite standards initiative; MSI). Niveles de identificación de metabolitos (metabolite identification, MI)⁴³. Los compuestos de referencia estaban disponibles para todos los compuestos identificados en MSI MI nivel 1.

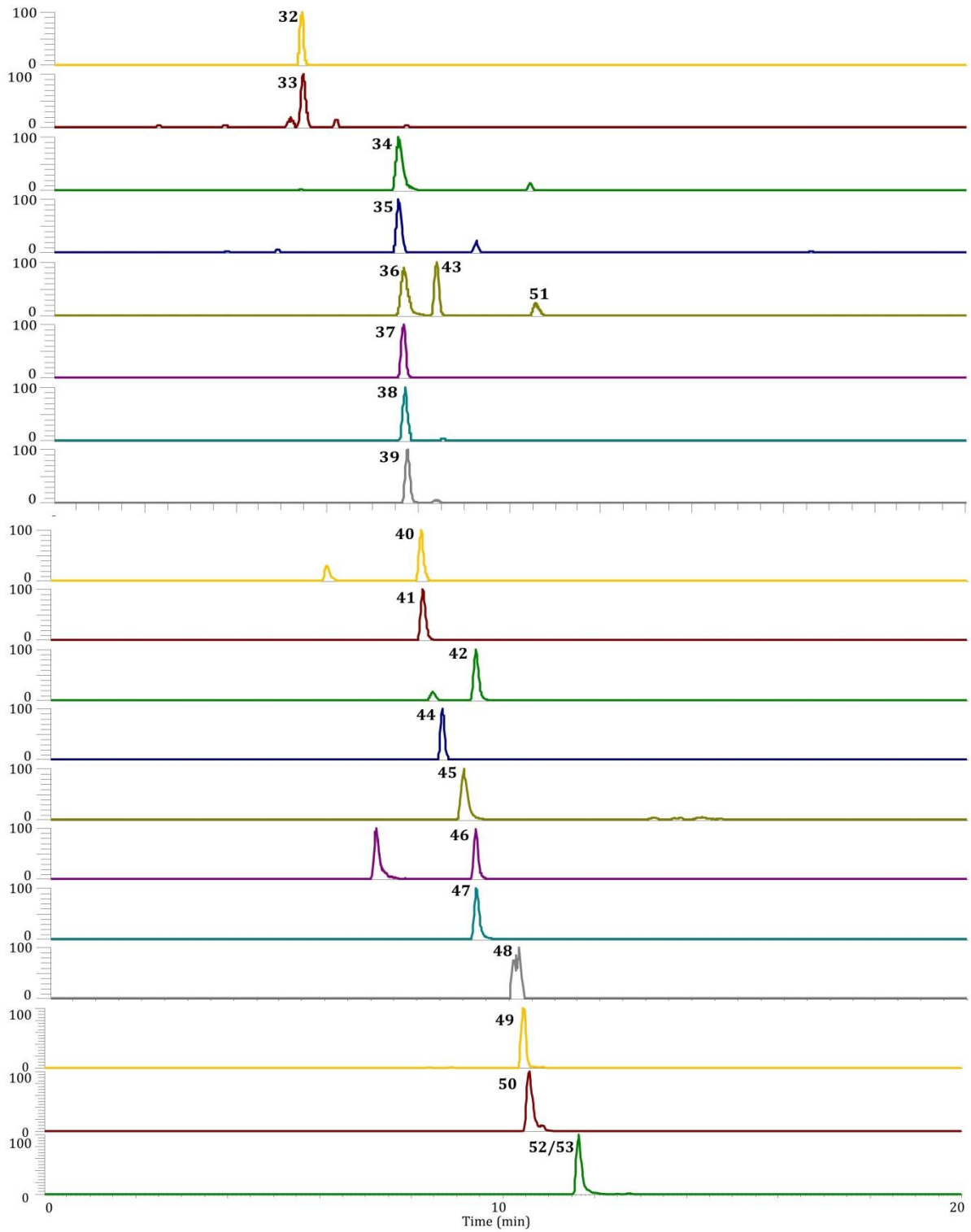


Figura 7.- Cromatograma de HPLC-HRMS de los metabolitos 32 a 53. Para la identificación de los picos, ver Tabla 9.

Tabla 10.- Cantidad ($\mu\text{g/g}$ PF) de cada uno de los aminoácidos y compuestos organosulfurados presentes en cebolla fresca y negra. Los datos están expresado como media \pm SDV (n=3).

Compuestos	Chalota Fresca ($\mu\text{g/g}$ PF)	Cebolla Negra ($\mu\text{g/g}$ PF)
Aminoácidos		
Leucina	100 \pm 11 ^b	148 \pm 5 ^a
Isoleucina	25 \pm 2 ^b	92 \pm 10 ^a
Fenilalanina	28 \pm 3 ^b	85 \pm 3 ^a
Tritófano	87 \pm 8 ^a	2.2 \pm 0.2 ^b
Metionina	7 \pm 1	nd
Valina	53 \pm 6 ^b	83 \pm 6 ^a
Prolina	17 \pm 2 ^a	13 \pm 1 ^a
Tirosina	151 \pm 16 ^b	193 \pm 13 ^a
GABA	15 \pm 1 ^a	10 \pm 1 ^b
Alanina	28 \pm 2 ^b	180 \pm 12 ^a
Treonina	39 \pm 4 ^b	64 \pm 5 ^a
Glicina	12 \pm 2 ^b	89 \pm 3 ^a
Ácido glutámico	313 \pm 31 ^a	106 \pm 9 ^b
Glutamina	504 \pm 45 ^a	3.1 \pm 0.6 ^b
Serina	29 \pm 1 ^b	49 \pm 3 ^a
Aspargina	331 \pm 24 ^a	142 \pm 8 ^b
Ácido aspártico	50 \pm 2 ^b	102 \pm 10 ^a
Lisina	403 \pm 31 ^a	128 \pm 8 ^b
Histidina	75 \pm 3 ^a	24 \pm 1 ^b
Ornitina	36 \pm 3 ^a	26 \pm 1 ^b
Arginina	1299 \pm 40 ^a	630 \pm 40 ^b
Total Aminoácidos	3602 \pm 238^a	2169 \pm 140^b
Compuestos organosulfurados		
Cys(SPropil)	6.6 \pm 2.2 ^a	5.5 \pm 0.3 ^a
Cys(SProp-1-enil)	4.1 \pm 0.2 ^a	2.4 \pm 0.1 ^b
Cys(Propyl) S-Óxido (Propiin)	9.6 \pm 0.6 ^b	12 \pm 0.9 ^a
Cys(2-CP)c	4.2 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.2 ^b
Cys(Prop-2-enil) S-Óxido (Alliin)	184 \pm 20	nd
γ -Glu-Cys(SPropil)-Gly	9.6 \pm 0.6	nd
γ -Glu-Cys(SProp-1-enil)	4.1 \pm 0.1 ^b	6.2 \pm 0.6 ^a
γ -Glu-Cys(SProp-1-enil)-Gly	6.6 \pm 0.5 ^a	2.5 \pm 0.1 ^b
γ -Glu-Cys(Propil)	8.8 \pm 0.8	nd
γ -Glu-Cys(Prop-1-enil)	311 \pm 24	nd
Cys(2-CP)-Glyc	102 \pm 11 ^a	3 \pm 1 ^b
Cys(Prop-1-enil) S-Óxido (Isoalliin)	131 \pm 20 ^b	1584 \pm 66 ^a
γ -Glu-Cys(SMe)-Gly	4.0 \pm 0.2 ^a	3.1 \pm 0.2 ^b
Cys(Me) S-Óxido (Methiin)	29 \pm 4 ^a	5.6 \pm 0.4 ^b
Cys(Me) (Deoxymethiin)	7.6 \pm 0.6	nd
γ -Glu-Cys(2-CP)-Glyc	221 \pm 21	nd
γ -Glu-Cys(2-CP)-Gly Hexosidéc	3.6 \pm 0.1	nd
γ -Glu-Cys(Propil) S-Óxido	34 \pm 5	nd
γ -Glu-Cys(Prop-1-enil) S-Óxido o γ -Glu-Cys(Prop-2-enil) S-Óxido	1387 \pm 115 ^a	120 \pm 12 ^b
3-Methyl-1,4-tiazano-5-ácido carboxílico S-Óxido (Cycloalliin)	43 \pm 4 ^a	8 \pm 1 ^b
γ -Glu-Cys(Me) S-Óxido	14 \pm 0.8 ^a	7.9 \pm 0.3 ^b
γ -Glu-Cys(Me)	17 \pm 0.8 ^a	8.1 \pm 0.6 ^b
Total Compuestos Organosulfurados	2544 \pm 232^a	1764 \pm 89^b

^a Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los 3 solventes para la misma matriz

Capacidad antioxidante de la cebolla negra (ABTS y ORAC) comparada con la cebolla fresca (chalota)

Con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante de la cebolla negra en comparación con la cebolla fresca, realizamos dos ensayos de actividad antioxidante, ABTS y ORAC. El extracto de cebolla negra mostró una actividad antioxidante significativamente mayor tanto en el procedimiento de ABTS como en el de ORAC, frente al extracto de cebolla fresca (Figura 8).

La actividad antioxidante de las especies del género *Allium* se ha explicado por la existencia tanto de polifenoles como de compuestos organosulfurados^{39, 40}. Se ha investigado y la actividad antioxidante depende en gran medida de las condiciones de cultivo, ubicación y época de cosecha, y esta va a variar de forma considerable entre una variedad y otra⁴¹ debido principalmente a la diferente concentración de antioxidantes.

Además, cabe destacar que la diferencia entre los resultados de los dos ensayos (ABTS y ORAC) para la misma muestra se podría explicar si tenemos en cuenta los principios químicos en los que se basan los ensayos antioxidantes⁴¹. Por ejemplo, el ensayo ORAC mide la eliminación de radicales peróxido con un significado más relevante, mientras que ABTS involucra radicales nitro-derivados, un compuesto muy grande con problemas estéricos⁴². Sin embargo, estos ensayos proporcionan valiosos datos in vitro que son buenos para estimar la capacidad potencial del antioxidante in vivo.

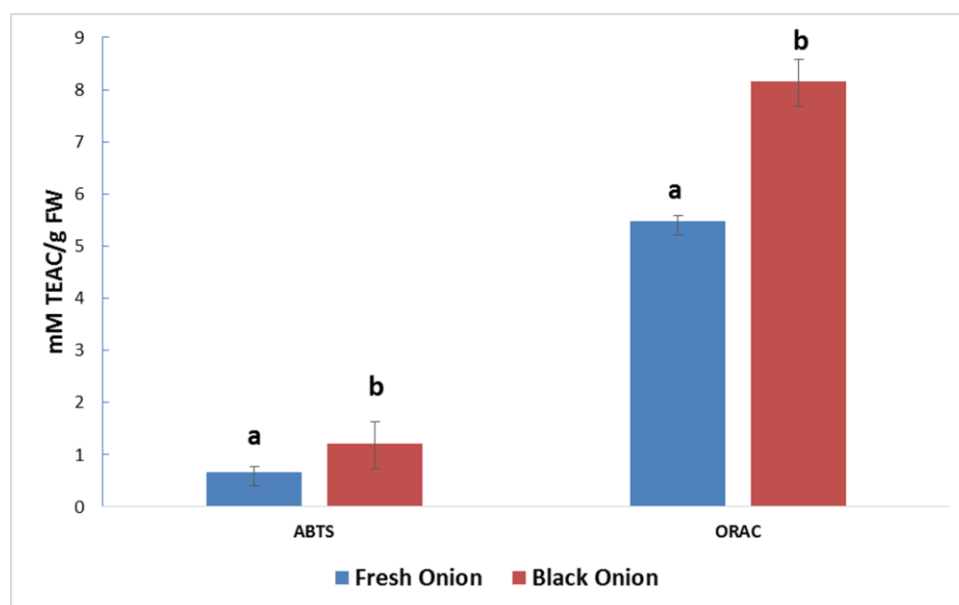


Figura 8. Comparación actividad antioxidante entre cebolla chalota fresca y cebolla negra determinada a partir de ABTS y ORAC

Conclusiones

La conclusión general es que la cebolla negra es rica en compuestos de interés funcional, presentando quercetina y e isoaliína como principales componentes activos y mayor actividad antioxidante que la cebolla fresca.

Las conclusiones específicas son:

1. Se han optimizado y validado dos métodos de análisis mediante linealidad, precisión intermedia, repetitividad, efecto matriz y porcentaje de recuperación para 21 aminoácidos, 7 flavonoides y 2 compuestos organosulfurados.
2. Se han identificado 51 compuestos primarios y secundarios de interés en ambas cebollas.
3. De los 10 flavonoides identificados el más abundante es la quercetina libre en cebolla negra. De los 21 aminoácidos, en cebolla negra abundan argnina, leucina, isoleucina, tirosina, alanina y asparragina. La Isoaliina es el organosufurado más abundante en cebolla negra de los 22 identificados.
4. La cebolla negra presenta una mayor actividad antioxidante que la fresca tanto por ABTS, como por ORAC.

Perspectivas futuras

Esta investigación se engloba dentro del proyecto “Caracterización de alimentos y nuevos productos elaborados: potencial saludable, organoléptico y trazabilidad alimentaria”, convocatoria de proyectos cofinanciada mediante fondos FEDER e IFAPA.

Actualmente, tras haber realizado la validación de los métodos de identificación y cuantificación para polifenoles, aminoácidos y compuestos organosulfurados, se ha enviado dicho contenido a la revista Food Chemistry (decil 1 de SCR) y estamos a la espera de resolución (<https://goo.gl/F3ymd6>).

Para continuar la investigación, estamos llevando a cabo la caracterización del perfil de compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante de la cebolla blanca de partida y del producto elaborado (cebolla negra) en tres variedades distintas de cebolla. De esta forma podemos observar y evaluar la evolución del perfil de estos compuestos durante el proceso de elaboración de la cebolla negra.

El diseño experimental se basa en un diseño factorial de dos niveles: variedad y tiempo.

- Variedades a evaluar: Chata, Echalion y Chalota

- Tiempos de muestreo durante el proceso (45 días): 0, 7, 14, 30 y 45 (final).

De esta forma se tendrán bien definidas las variables fisicoquímicas del proceso de obtención de la cebolla negra. Las muestras obtenidas han sido trituradas, pulverizadas con nitrógeno líquido y se conservan a -80°C hasta su análisis. La determinación de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, aminoácidos y compuestos

organosulfurados) se ha realizado mediante la técnica UHPLC-HR-MS, con las condiciones cromatográficas óptimas establecidas previamente por la validación de los métodos.

Los datos serán tratados estadísticamente mediante análisis univariante y multivariante para evaluar la influencia de la variedad y del procesado en los perfiles de los compuestos bioactivos y la optimización del proceso.

La determinación de la actividad antioxidante se llevará a cabo mediante los métodos ABTS y ORAC.

Además, estamos realizando el análisis de las muestras para la identificación y cuantificación de ácidos orgánicos presente, así como se realizará para azúcares, una vez optimizado el método para nuestra matriz.

Mediante la concesión de la ayuda para la formación de profesorado universitario (FPU 2016) se podrá continuar la investigación y cumplir el resto de objetivos planteados en la memoria del proyecto de tesis doctoral presentado para esta convocatoria. Los objetivos planteados son los siguientes:

1. Estimar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de la cebolla negra mediante el estudio de su estabilidad gastrointestinal in vitro.
2. Evaluar la biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos bioactivos de la cebolla negra en líneas celulares Caco-2 como modelo de absorción intestinal humano.
3. Estudiar el efecto quimiopreventivo de los compuestos bioactivos de la cebolla negra en líneas celulares Caco-2 y HT29.
4. Determinar el potencial saludable de un nuevo producto, cebolla negra, mediante el estudio de su metabolismo y biodisponibilidad en voluntarios sanos. Estudio post-prandial.

Referencias

1. Fundación Española de Nutrición. <http://www.fen.org.es/> (Consultado el 09/10/17)
2. Corzo-Martinez M, Corzo N and Villamiel M, Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* 18:609-625 (2007).
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>, year 2014. (Consultado el 07/10/17)
4. Bahadoran Z, Mirmiran P, Momenan AA and Azizi F, Allium vegetable intakes and the incidence of cardiovascular disease, hypertension, chronic kidney disease, and type 2 diabetes in adults: a longitudinal follow-up study. *Journal of Hypertension* 35:1909-1916 (2017).
5. Nicastro HL, Ross SA and Milner JA, Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer Prevention Research* 8:181-189 (2015).
6. Pourzand A, Tajaddini A, Pirouzpanah S, Asghari-Jafarabadi M, Samadi N, Ostadrahimi AR and Sanaat Z, Associations between Dietary Allium Vegetables and Risk of Breast Cancer: A Hospital-Based Matched Case-Control Study. *Journal of Breast Cancer* 19:292-300 (2016).
7. Wagner H, Dorsch W, Bayer T, Breu W and Willer F, ANTI-ASTHMATIC EFFECTS OF ONIONS - INHIBITION OF 5-LIPOXYGENASE AND CYCLOOXYGENASE INVITRO BY THIOSULFINATES AND CEPAENES. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 39:59-62 (1990).
8. Angeles TMM, Jesus PA, Rafael MR and Tania MA, Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *Food Chemistry* 199:135-139 (2016).
9. Bae SE, Cho SY, Won YD, Lee SH and Park HJ, A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC. *Lwt-Food Science and Technology* 46:532-535 (2012).
10. 신정혜, 최덕주, 이수정, 차지영, JeongGyun K and SungNakJu, Changes of Physicochemical Components and Antioxidant Activity of Garlic During its Processing. *Journal of Life Science* 18:1123-1131 (2008).
11. Lee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im J, Kang MJ, Kim MJ and Kim JI, Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* 3:156-161 (2009).
12. Kim I, Kim JY, Hwang YJ, Hwang KA, Om AS, Kim JH and Cho KJ, The beneficial effects of aged black garlic extract on obesity and hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:3159-3168 (2011).
13. Bae SE, Cho SY, Won YD, Lee SH and Park HJ, Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *Lwt-Food Science and Technology* 55:397-402 (2014).

14. Amano H, Kazamori D and Itoh K, Pharmacokinetics and N-acetylation metabolism of S-methyl-l-cysteine and trans-S-1-propenyl-l-cysteine in rats and dogs. *Xenobiotica* 46:1017-1025 (2016).
15. Jung ES, Park SH, Choi EK, Ryu BH, Park BH, Kim DS, Kim YG and Chae SW, Reduction of blood lipid parameters by a 12-wk supplementation of aged black garlic: A randomized controlled trial. *Nutrition* 30:1034-1039 (2014).
16. International Life Sciences Institute. ILSI Europe. FUFUSE: scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus Document. *Br J Nutr* 1999; 81:1-27
17. Gokmen V, Serpen A and Mogol BA, Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403:2915-2922 (2012).
18. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration guidance for industry bioanalytical methods validation.
19. International Conference on Harmonization (ICH), 1996. Technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures, Geneva.
20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237 (1999).
21. Huang DJ, Ou BX, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA and Prior RL, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4437-4444 (2002).
22. Madrona A, Pereira-Caro G, Bravo L, Mateos R and Espartero JL, Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. *Food Chemistry* 129:1169-1178 (2011).
23. Gasperotti M, Masuero D, Guella G, Mattivi F and Vrhovsek U, Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta* 128:221-230 (2014).
24. Feliciano RP, Mecha E, Bronze MR and Rodriguez-Mateos A, Development and validation of a high-throughput micro solid-phase extraction method coupled with ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid identification and quantification of phenolic metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography A* 1464:21-31 (2016).
25. Soininen TH, Jukarainen N, Auriola SOK, Julkunen-Tiitto R, Karjalainen R and Vepsäläinen JJ, Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC-MS. *Food Chemistry* 165:499-505 (2014).

26. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V and Tagliatalata-Scafati O, Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5686-5690 (2002).
27. Bonaccorsi P, Caristi C, Gargiulli C and Leuzzi U, Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry* 107:1668-1673 (2008).
28. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS and Black C, Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:590-595 (1997).
29. Hertog MGL, Hollman PCH and Katan MB, CONTENT OF POTENTIALLY ANTICARCINOGENIC FLAVONOIDS OF 28 VEGETABLES AND 9 FRUITS COMMONLY CONSUMED IN THE NETHERLANDS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:2379-2383 (1992).
30. Gika HG, Theodoridis GA, Vrhovsek U and Mattivi F, Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1259:121-127 (2012).
31. Zhou GS, Pang HQ, Tang YP, Yao X, Mo X, Zhu SQ, Guo S, Qian DW, Qian YF, Su SL, Zhang L, Jin C, Qin Y and Duan JA, Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole tandem mass spectrometry for highly rapid and sensitive analysis of underivatized amino acids in functional foods. *Amino Acids* 44:1293-1305 (2013).
32. Troise AD, Ferracane R, Palermo M and Fogliano V, Targeted metabolite profile of food bioactive compounds by Orbitrap high resolution mass spectrometry: The "FancyTiles" approach. *Food Research International* 63:139-146 (2014).
33. Starkenmann C, Niclass Y and Troccaz M, Nonvolatile S-Alk(en)ylthio-L-cysteine Derivatives in Fresh Onion (*Allium cepa* L. Cultivar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:9457-9465 (2011).
34. Pena-Gallego A, Hernandez-Orte P, Cacho J and Ferreira V, High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines in Must and Wine: A Review. *Food Reviews International* 28:71-96 (2012).
35. Bottcher C, Krahmer A, Sturtz M, Widder S and Schulz H, Comprehensive metabolite profiling of onion bulbs (*Allium cepa*) using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* 13 (2017).
36. Nakabayashi R, Sawada Y, Yamada Y, Suzuki M, Hirai MY, Sakurai T and Saito K, Combination of Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry with C-13-Labeling for Chemical Assignment of Sulfur-Containing Metabolites in Onion Bulbs. *Analytical Chemistry* 85:1310-1315 (2013).

37. Kubec R and Dadakova E, Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal of Chromatography A* 1216:6957-6963 (2009).
38. Arnault I, Christides JP, Mandon N, Haffner T, Kahane R and Auger J, High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of Chromatography A* 991:69-75 (2003).
39. Benkeblia N, 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* 48:753-759 (2005).
40. Miller, H.E., Rogelhof, F., Marguart, L., Prakash, A. & Kanter, M. (2008). Antioxidant content of whole grain breakfastcereals, fruits and vegetables. *J. Am. Coll. Nutr*, 19, 1-8.
41. Ou BX, Huang DJ, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA and Deemer EK, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3122-3128 (2002).
42. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R and Pegg RB, Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11:148-173 (2012).
43. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TWM, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ and Viant MR, Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3:211-221 (2007).