



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Nuevos materiales para el análisis de aceites de oliva

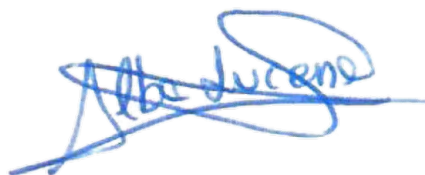
Alumno/a: Alba Lucena Pulido

Octubre, 2023



Trabajo Fin de Grado

Nuevos materiales para el análisis de aceites de oliva

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Alba Lucena Pulido', is centered on the page.

Alumno/a: Alba Lucena Pulido

Jaén, Octubre, 2023

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Aceite de Oliva. Importancia y propiedades	2
1.1.1. Compuestos intrínsecos de aceites de oliva	4
1.1.1.1. Ácidos grasos	7
1.1.1.2. Fosfolípidos.....	8
1.1.2. Contaminantes externos a los aceites de oliva	10
1.1.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	10
1.1.2.2. Micotoxinas	10
1.1.2.3. Plaguicidas	11
1.2. Nanomateriales para el análisis de aceites de oliva	13
1.2.1. Polímeros de Impronta Molecular (MIPs)	13
1.2.2. Nanopartículas de dióxido de titanio	14
1.2.3. Sílica mesoporosa	15
1.2.4. Redes metal-orgánica (MOFs)	16
1.2.5. Nanomateriales de carbono	17
2. OBJETIVOS	18
3. METODOLOGÍA	18
4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	22
4.1. Polímeros de Impronta Molecular (MIPs).....	30
4.2. Redes metal-orgánicas (MOFs)	32
4.3. Nanomateriales de carbono.....	33
4.3.1. Compuestos de óxido de grafeno	33
4.3.2. Nanotubos de carbono y derivados	35
4.3.3. Nanoláminas de MoS ₂ mesoporoso/grafito	35
4.4. Sílica mesoporosa	36
4.5. Nanopartículas de dióxido de titanio para extracción de fosfolípidos	36
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

El aceite de oliva es uno de los alimentos principales en la dieta mediterránea. Su valor de calidad y pureza se da gracias a que su elaboración no lleva ningún tratamiento químico, por lo que no se altera la composición original. Por este motivo es necesario un control del producto para garantizar su seguridad y los valores mencionados, y poder detectar contaminaciones y posibles fraudes por adulteración. Para ello es necesario realizar técnicas de análisis siguiendo los protocolos de la Unión Europea, los cuales van siendo actualizados para que dichas técnicas sean más rápidas, selectivas, sensibles y económicas.

En este trabajo de fin de grado se presenta la búsqueda en bases de datos, y sus resultados, de nanomateriales útiles como sorbentes para las extracciones de los analitos previas a los análisis del producto, además de sus correspondientes condiciones.

ABSTRACT

Olive oil is one of the main foods in the Mediterranean diet. Its value is attributed to the absence of chemical treatments during production, preserving its original composition. For this reason, it is necessary to control the product to guarantee its safety and the values mentioned, and to be able to detect contamination and possible fraud due to adulteration. To achieve this objective, comprehensive analysis techniques aligned with European Union protocols are imperative. These techniques are continuously evolving, aiming for increased efficiency, selectivity, sensitivity, and cost-effectiveness.

This end-of-degree project focuses on researching databases, and analyzing their results to identify nanomaterials suitable as sorbents for analyte extraction before product analysis. The project also encompasses determining the optimal conditions for utilizing these nanomaterials effectively.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Aceite de Oliva. Importancia y propiedades.*

El aceite de oliva es uno de los alimentos clave dentro de la dieta Mediterránea. Como definición, el aceite de oliva es aquel que se obtiene del prensado de la aceituna. Se clasifican en distintas categorías comerciales según su evaluación organoléptica como, por ejemplo, el índice de acidez, que dependen del cultivo de la aceituna (Comisión Europea, 2022):

- Aceite de oliva virgen extra: el producto de máxima calidad. Este tipo de aceites se elaboran con aceitunas recogidas directamente del olivo y que se encuentran en perfectas condiciones. El proceso de elaboración se realiza en tales condiciones que eviten la oxidación de la aceituna y asegurando su perfecta conservación.
- Aceite de oliva virgen: tiene el mismo proceso de elaboración que el aceite de oliva virgen extra, es decir ambos se denominan zumos de aceituna extraídos mediante procesos mecánicos. Sin embargo, debido a una mayor madurez de la aceituna, esta variedad presenta una mayor acidez.
- Aceite de oliva lampante: es el aceite de peor calidad y no es apto para el consumo humano. No obstante, aunque no sea apto para consumo *per se*, este pasa por procesos de refinado para poder comercializarlo y que no presente un riesgo para la salud del consumidor.
- Aceite de orujo de oliva: se obtiene mezclando aceite de orujo de oliva refinado con aceite de oliva virgen.

La riqueza del aceite de oliva se presenta en microcomponentes como carotenos, tocoferoles, fitoesteroles, compuestos fenólicos y compuestos terpénicos, los cuales hacen que se trate de uno de los alimentos clave dentro de la dieta Mediterránea. Su principal interés es el aporte a nuestro organismo de múltiples beneficios saludables como la prevención de cáncer, la reducción de enfermedades neurodegenerativas, la reducción de problemas cardiovasculares, etc. Éste último se debe a que el aceite de oliva tiene un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en forma de ácido oleico (Aparicio, Harwood; 2013).

El aceite de oliva virgen extra y el aceite de oliva virgen, al no ser sometidos a procesos de refinado, conservan una alta variedad de micronutrientes beneficiosos

como vitaminas, carotenoides, escualeno y compuestos fenólicos (Aparicio, Harwood; 2013).

Para poder atribuir dichas propiedades saludables, es de suma importancia conocer la calidad del producto, es decir, que cumpla con lo establecido en la Legislación y, por tanto, tenga las características necesarias para el consumo y la salud. Actualmente, las propiedades físico-químicas y organolépticas de los aceites de oliva están reguladas por la Unión Europea (UE), concretamente en el Reglamento 2019/1604 donde también son establecidos los métodos de análisis de los mismos. No obstante, a pesar de la legislación, existen fraudes, por lo que es necesaria la continua actualización de dichas reglas para evitarlos (Conte et al. 2020). De esta forma, se mantiene en línea la detección de adulteraciones con otros tipos de aceites; por lo que su análisis y determinación de ciertos compuestos es completamente necesario.

Por lo general, la autenticidad de un producto significa cumplir con las normas de legislación del país donde se vende y que esté descrito en su etiquetado (Tena et al. 2018). La razón principal detrás de los fraudes en la industria del aceite de oliva es el elevado costo de este producto. Los fraudes implican la adulteración del aceite de oliva con aceites de menor calidad para obtener ganancias económicas. Por ejemplo, uno de las actividades más comunes de fraude es la adulteración del aceite de oliva virgen extra con aceite de orujo de oliva. Para detectar dicho fraude se realiza la determinación de los compuestos intrínsecos del producto, ya que cada tipo de aceite contiene un determinado valor de estos compuestos. Uno de ellos son los ácidos grasos que pueden ser clave para su identificación.

Además de la monitorización de adulteraciones de aceites de oliva, es importante un seguimiento de las posibles contaminaciones que pueda adquirir el producto desde el cultivo hasta su venta. Por ejemplo, un mal almacenaje, recolecta de la aceituna en malas condiciones, falta de limpieza en las instalaciones de la almazara (Mafra, Coimbra 2004) o la migración de contaminantes desde el envase hasta el producto como los ftalatos (Pereira et al. 2019). También es posible una contaminación por la presencia de pesticidas, cuyo uso es frecuente para la cosecha de la aceituna, por lo que, al encontrarse en el fruto, está presente también en el aceite. Cabe destacar que la determinación de la calidad de este producto es fundamental debido al gran beneficio económico que aporta a las empresas, sobre todo en España, ya que es el país que, según el *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*: “España es el

principal actor en el mercado mundial del aceite de oliva que se caracteriza por una tendencia creciente del consumo gracias a sus propiedades beneficiosas desde el punto de vista nutritivo y de la salud”.

1.1.1. Compuestos intrínsecos de aceites de oliva.

Son numerosos los compuestos que contienen los aceites de oliva. Estos se dividen en componentes saponificables y componentes insaponificables. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos representativos de cada uno de los compuestos mencionados. La fracción saponificable constituye el 98% del peso total del aceite, en ella encontramos:

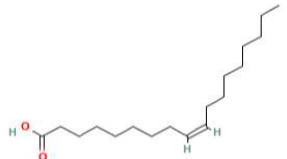
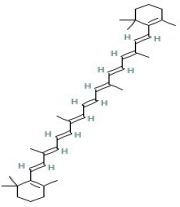
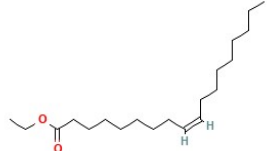
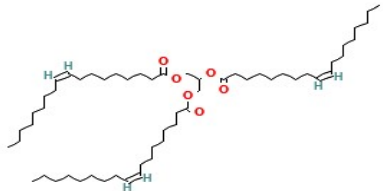
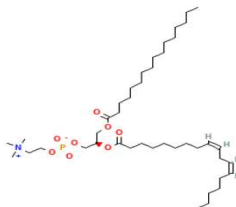
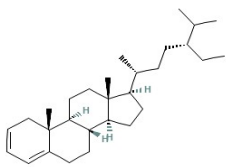
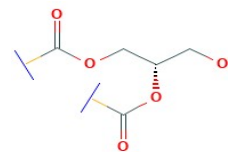
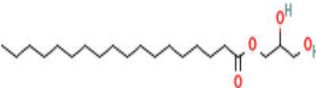
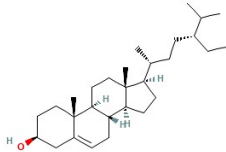
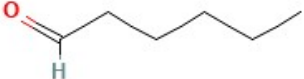
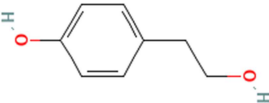
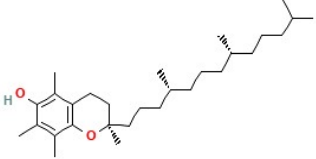
- Ácidos grasos libres: La cantidad de ácidos grasos depende de la variedad y madurez de la aceituna. Los más comunes son el ácido palmítico (C16:0), el ácido palmitoleico (C16:1), el ácido oleico (C18:1), y el ácido linoleico (C18:2) (Gunstone 2011). Su contenido determina el índice de calidad del aceite además de ser útil para su identificación, ya que cada tipo de aceite contiene un determinado valor de ácidos grasos.
- Triglicéridos: Constituyen la mayor parte del aceite. Su estructura se compone por una molécula de glicerol y tres ácidos grasos (Ramírez-Tortosa et al. 2006). Su determinación sirve para la identificación de adulteraciones del aceite de oliva con aceites de semillas.
- Diglicéridos: Su estructura se compone por una molécula de glicerol y dos ácidos grasos. Se encuentran en forma de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos y se forman por biosíntesis incompleta de triglicéridos o lipólisis. Su presencia en el aceite de oliva se considera un índice de calidad, ya que determina la frescura del producto (Gunstone 2011).
- Monoglicéridos: Aunque se encuentran en pequeñas cantidades, el índice de acidez depende de estas (Gunstone 2011).
- Ceras: Son ésteres de ácidos grasos en alcoholes. Cada categoría de aceite de oliva presenta una concentración específica, por lo que sirven para determinar el índice de calidad y pureza (Aparicio, Harwood; 2013).

- Fosfolípidos: Son moléculas anfipáticas constituidas por un glicerol, un grupo fosfato y dos ácidos grasos. Estas le atribuyen la propiedad antioxidante al aceite de oliva (Aparicio, Harwood; 2013).

La fracción insaponificable constituye un 2% del peso total del aceite, donde se encuentran:

- Hidrocarburos: No se encuentran de forma natural, sino que aparecen debido a la refinación. De esta forma, se pueden detectar adulteraciones de aceite de oliva virgen extra o aceite de oliva virgen con aceites refinados (Gunstone 2011).
- Compuestos fenólicos: La presencia de estos compuestos en los aceites de oliva dependen de la producción y el almacenamiento. Debido a sus propiedades antioxidantes, el aceite consigue ser un producto que contribuye en la prevención de enfermedades como el cáncer, por lo que su contenido es un parámetro de calidad. El aceite de oliva virgen extra es el que presenta un mayor contenido (Tuck, Hayball 2002).
- Pigmentos: Son los que les dan el color característico a los aceites debido a la presencia de compuestos como la clorofila y los carotenoides, cuyo contenido depende del cultivo de la aceituna y el proceso de producción del aceite, por lo que se considera un índice de calidad (Gunstone 2011).
- Tocoferoles: Además de los polifenoles, son compuestos antioxidantes naturales en el aceite de oliva. Su contenido depende del estado de maduración de la aceituna, por lo que cuanto mayor sea la maduración de la aceituna, menor será el contenido de estos compuestos (Aparicio, Harwood; 2013).
- Esteroles: Forman la mayor parte de la fracción insaponificable. Su contenido depende de las condiciones de cultivo y estado de maduración de la aceituna además del proceso de extracción, refinación y almacenamiento del aceite. Se considera un parámetro de calidad y pureza, ya que con estos compuestos pueden detectarse las adulteraciones (Kyçyk et al. 2016).

Tabla 1. Estructuras de compuestos intrínsecos de los aceites de oliva (Estructuras obtenidas de PubChem)

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
Ácidos grasos libres		Pigmentos		Ceras	
Triglicéridos		Fosfolípidos		Hidrocarburos	
Diglicéridos		Monoglicéridos		Esteroles	
Compuestos volátiles		Compuestos fenólicos		Tocoferoles	

- **Compuestos volátiles:** Son compuestos como hidrocarburos, cetonas, ésteres, etc. Su presencia se debe a la descomposición de los hidroperóxidos por la temperatura, presión o presencia de antioxidantes, provocando así una alteración del sabor y olor de los aceites (Aparicio, Harwood; 2013).
- **Alcoholes grasos:** Son alcoholes lineales saturados en forma libre y esterificados. Su contenido depende por el cultivo de la aceituna y el procesamiento (Gunstone 2011).

1.1.1.1. *Ácidos grasos*

Los aceites y grasas se encuentran en forma de triglicéridos donde los grupos hidroxilo del alcohol son esterificados por ácidos grasos saturados e insaturados. (Christy, Egeberg 2006). Ambos son importantes para la actividad biológica tanto en alimentos como seres vivos, por lo que su presencia en el aceite determina la pureza de dicho producto y por esto se pueden detectar adulteraciones con otros tipos de aceite, ya que, además, cada tipo de aceite tiene una composición característica de ácidos grasos, lo que hace que su contenido sea también un índice de autenticidad (Wabaidur et al. 2016).

Su estructura es una cadena hidrocarbonada donde en cada extremo hay un grupo carboxilo y un metilo. Cada ácido graso se diferencia en el número de átomos de carbono e insaturaciones.

Otro índice que se puede evaluar gracias a la presencia de ácidos grasos libres es la acidez, ya que se encuentran en este estado debido a la hidrólisis de los triglicéridos que se puede dar durante la producción del aceite y el almacenamiento. Cuantos más ácidos grasos libres contenga el aceite, mayor será la acidez, por lo que su contenido es un factor de calidad a evaluar (Guo et al. 2019).

Dichos parámetros que se pueden conocer gracias al contenido de ácidos grasos libres, los aceites de oliva se pueden clasificar en función de ellos, por lo que el Reglamento Delegado (UE) 2022/2104 tiene establecidos los niveles de acidez que debe tener como máximo cada tipo de aceite y qué porcentaje de ácidos grasos. En la tabla 2 y en la tabla 3 aparecen el nivel acidez y composición de ácidos grasos libres, respectivamente, de cada categoría según el reglamento:

Tabla 2. Clasificación de los aceites de oliva en función de su acidez según *Reglamento Delegado (UE) 2022/2104*

Categoría	Acidez (%)
Aceite de oliva virgen extra	$\leq 0,80$
Aceite de oliva virgen	$\leq 2,0$
Aceite de oliva lampante	$> 2,0$
Aceite de oliva refinado	$\leq 0,30$
Aceite de oliva que contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes	$\leq 1,00$
Aceite de orujo de oliva crudo	-
Aceite de orujo de oliva refinado	$\leq 0,30$
Aceite de orujo de oliva	$\leq 1,00$

1.1.1.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son biomoléculas derivadas del glicerol beneficiosas para la digestión en los seres humanos. Aunque son componentes menores del aceite de oliva, y no existe una cantidad regulada para el aceite de oliva, son los principales responsables de las estructuras de las membranas biológicas, además de poseer propiedades nutricionales. Sirven también como biomarcadores de cáncer, diabetes, entre otras enfermedades, además de tener efectos antiinflamatorios (Shen et al. 2014).

Las materias insaponificables como los lípidos, pueden constituir hasta el 10% del aceite, por lo que se puede determinar el origen de la grasa y llegar a saber si hay fraude por adulteración (Gómez-Coca et al. 2015).

Tabla 3. Clasificación de los aceites de oliva según su composición en ácidos grasos según *Reglamento Delegado (UE) 2022/2104*

Categoría	Composición de ácidos grasos (%)					
	Mirístico	Linolénico	Araquídico	Eicosenoico	Behénico	Lignocérico
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.20	≤ 0.20
Aceite de oliva virgen	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.20	≤ 0.20
Aceite de oliva lampante	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.20	≤ 0.20
Aceite de oliva refinado	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.20	≤ 0.20
Aceite de oliva que contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.20	≤ 0.20
Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.30	≤ 0.20
Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0.03	≤ 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	≤ 0.30	≤ 0.20
Aceite de orujo de oliva	≤ 0.03	< 1.00	≤ 0.60	≤ 0.50	< 0.30	≤ 0.20

1.1.2. Contaminantes externos a los aceites de oliva

Además de los compuestos que presentan los aceites de oliva intrínsecamente, también pueden presentar contaminantes como los que aparecen en la tabla 4. Esto conlleva la alteración de su composición y pueda resultar perjudicial para la salud humana. Dichos contaminantes pueden ser debidos durante los procesos de producción y/o almacenamiento en malas condiciones, o bien, por el cultivo de la aceituna donde se pueden llegar a utilizar numerosos plaguicidas, haciendo así que queden restos en el fruto y, por ende, llegue al aceite y cause efectos nocivos en los consumidores.

1.1.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos formados por un mínimo de dos anillos de benceno en diferentes configuraciones. Son contaminantes altamente nocivos para la salud, ya que se tratan de moléculas muy estables (Lawal 2017) y, por tanto, presentan propiedades tóxicas, carcinógenas y mutagénicas, llegando así a la prioridad por su determinación (Zhang et al. 2017).

Su presencia en el aceite de oliva se debe principalmente al tipo de recolecta de la aceituna. La recolecta mecánica hace que tenga contacto con los gases que produce el motor, los cuales son una fuente de HAP, y de esta forma se produce la contaminación del fruto (Ekner et al. 2022). Aunque dicha contaminación también se puede deber a la extracción de solventes durante su producción o al envasado con el plástico (Zhang et al. 2017).

Según el Reglamento (UE) 835/2011, con el fin de minimizar el riesgo de la salud, se tiene establecido que un 2.0 µg/kg como nivel máximo PAH como el benzo(a)pireno y un nivel máximo de 10 µg/kg para la suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno para la mayoría de aceites (Comisión Europea, 2011).

1.1.2.2. Micotoxinas

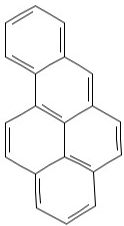
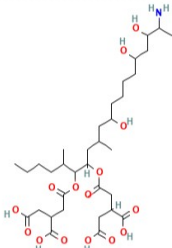
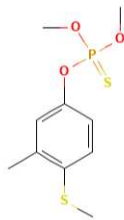
Las micotoxinas son contaminantes que se producen de forma natural por la presencia de moho. Su presencia en los aceites de oliva es debida al almacenamiento de la aceituna en condiciones favorables de temperatura para la formación de estos

hongos. Entre los numerosos tipos de micotoxinas se encuentran la aflatoxina B1, ocratoxina A (Ghitakou et al. 2006), y fumonisina B1.

Estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud. Las aflatoxinas son potencialmente tóxicas, carcinógenas, mutagénicas e inmunosupresores (Yu et al. 2015), las ocratoxinas A presentan toxicidad para el hígado, el sistema nervioso y el sistema inmunitario, incluso pueden provocar defectos congénitos (Dridi et al. 2015) y las fumonisinas B1 producen toxicidad hepática, renal y cardiovascular (Voss et al. 2007).

Aunque no hay establecido ningún valor máximo permitido para el caso del aceite de oliva, pero sí para otros alimentos, sus efectos perjudiciales para la salud, son motivo para su determinación en los análisis y así evitar los riesgos que conllevan.

Tabla 4. Estructuras de contaminantes de los aceites de oliva (Estructuras obtenidas de PubChem)

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
Hidrocarburo aromático policíclico		Micotoxina		Plaguicida	

1.1.2.3. Plaguicidas

Para obtener un cultivo fructífero es habitual que la agricultura tenga que depender del uso de plaguicidas para evitar los daños que producen ciertos insectos. Para el caso de los olivos, se utilizan plaguicidas para eliminar insectos como la mosca del olivo, barrenillos, etc. (Hakme et al. 2018). El problema de emplear este tipo de productos, es que quedan como residuo en la línea de producción del aceite. Por lo que son contaminantes del fruto y del producto final, pasando directamente al consumo humano provocando efectos nocivos para la salud. Por este motivo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) tiene

establecidos Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas en los alimentos, por lo que resulta indispensable la determinación de éstos en los aceites de oliva (López-Blanco et al. 2018).

Uno de los tipos de plaguicidas que se llegan a usar para los olivos son los organofosforados, los cuales son compuestos persistentes en el medio ambiente durante un largo periodo de tiempo dependiendo de sus propiedades y condiciones climáticas. De esta forma, los humanos o animales se ven perjudicados.

Los compuestos organofosforados que se determinan mayoritariamente en los aceites de oliva son:

- Deltametrina: Es un piretroide de tipo II artificial eficaz para eliminar plagas como la de la mosca del olivo. Si se utilizan grandes concentraciones, puede provocar intoxicaciones, daños hepáticos y edema pulmonar entre otras (Galadima et al. 2021). Sin embargo, si se usan las dosis adecuadas, los consumidores no tienen ningún riesgo y, además los parámetros físico-químicos del aceite no se ven alterados. (Kamoun et al. 2014)
- Dimetoato: Es un compuesto muy común para combatir plagas como las de la conocida mosca de la fruta (*Bactrocera oleae*), que provoca daños en la producción de los aceites de oliva, aunque tiene el inconveniente de provocar riesgos para la salud y el medio ambiente (Bakas et al. 2013) debido a sus características altamente mutagénicas y cancerígenas (Martins et al. 2015).
- Fentión: Es un plaguicida organofosforado potencialmente tóxico y contaminante para el medio ambiente, además de sus productos de oxidación. También es un disruptor endocrino, siendo así perjudicial para las funciones tiroideas. (Kitamura et al. 2003). Dentro del grupo de plaguicidas organofosforados, el fentión es el más utilizado para combatir plagas de mosquitos, y aunque ha sido eliminado de las listas de fitosanitarios, actualmente se sigue usando en varios países. Así, este compuesto llega a la aceituna y, por consiguiente, al aceite de oliva junto a sus metabolitos, ya que se degrada en la aceituna. La *FAO*, la *OMS* y la *Comisión del Código Alimentarius* han establecido como LMR 1 mg/kg para el fentión y sus metabolitos (Bakas et al. 2014).
- Malatión: Es un plaguicida organofosforado que, como otros de su mismo grupo, producen toxicidad para el medio ambiente y la salud. Provoca

enfermedades en el hígado, la sangre y el riñón, infertilidad (Selmi et al. 2018) entre otras.

- Metidación: Es uno de los compuestos que más se utilizan, por lo que su uso, al igual que el resto de los compuestos mencionados, es perjudicial para la salud (Altuntas et al. 2002). Tiene efectos perjudiciales en el sistema nervioso de los organismos provocando que no haya transmisión del impulso neural. (Gungordu 2013)

1.2. *Nanomateriales para el análisis de aceites de oliva.*

Para hacer uso de los nanomateriales para los análisis de aceites de oliva, se utilizan métodos convencionales y oficiales que sirven para la extracción de los diferentes analitos que se mencionan en este Trabajo Fin de Grado.

Según la Recomendación de la Comisión Europea de 10 de junio de 2022 relativa a la definición de nanomaterial: *“Por «nanomaterial» se entiende un material natural, accidental o fabricado, constituido por partículas sólidas que están presentes individualmente o como partículas constituyentes identificables en agregados o aglomerados, y en el que el 50 % o más de estas partículas en la granulometría numérica cumple al menos una de las condiciones siguientes:* (Comisión Europea, 2022)

“Una o más dimensiones externas de la partícula se hallan en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm”.

Los nanomateriales son habitualmente aplicados como sorbentes para extraer contaminantes en matrices muy variadas, debido una alta capacidad de adsorción y gran área superficial, además algunos de ellos pueden ser muy selectivos.

1.2.1. *Polímeros de Impronta Molecular (MIPs)*

Los polímeros de impronta molecular (MIPs) son aquellos que se forman a partir de un compuesto como plantilla. Esto les hace uno de los materiales sorbentes más selectivos hasta el momento. La impresión molecular es una técnica para crear un material. Tras su creación, dicho material tendrá espacios y puntos de interacción, donde puedan reconocer ligandos o grupos funcionales de una misma familia de

analitos selectivamente. Como se observa en la figura 1, es necesario tomar un analito representativo del grupo, que actuará como “molécula plantilla” para el resto de moléculas a determinar, ya que la plantilla es un elemento que dirige a los grupos funcionales. Dicha molécula se elige en función de sus propiedades físico-químicas (Chen et al. 2016). Además, no deben reaccionar durante el proceso (Almajed Asaad Abdullah Sfoog et al. 2022).

Los elementos principales durante una impresión molecular son: la molécula plantilla, un iniciador, reticulante y monómeros. Se realiza una polimerización por radicales libres entre un iniciador y monómeros, los cuales se agregarán excesivamente, creando así un complejo monómero-plantilla. Luego se selecciona un reticulante adecuado para formar una matriz de MIP porosa y estable (Shahar et al. 2016).

Las ventajas de los MIPs son sus propiedades de alta capacidad química y física, selectividad y reproducibilidad. También son resistentes a la alta presión y temperatura (Almajed Asaad Abdullah Sfoog et al. 2022).

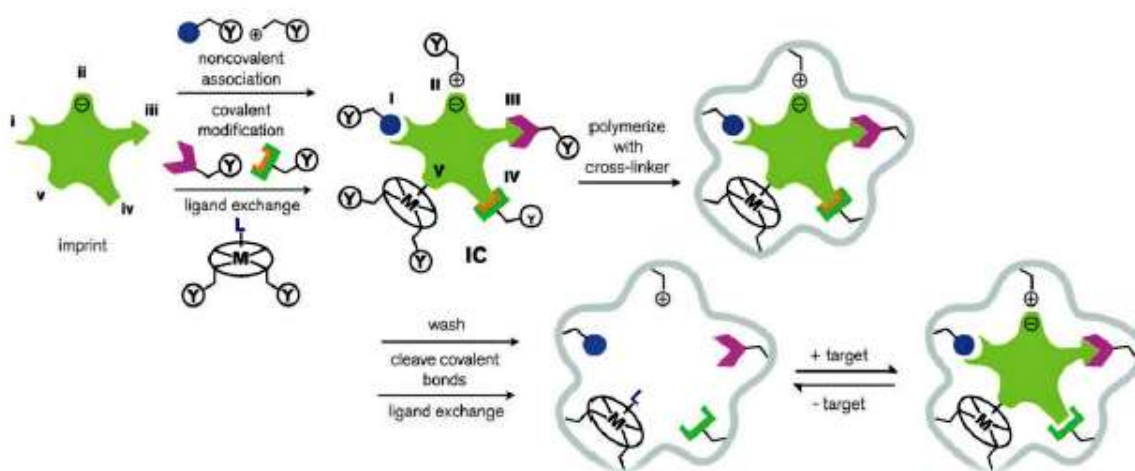


Figura 1. Formación de MIP (Chen et al. 2016)

1.2.2. Nanopartículas de dióxido de titanio

Dentro de la amplia variedad de nanopartículas descritas, el dióxido de titanio (TiO_2) presenta altas capacidades sorbentes debido a su tamaño, propiedad superficial y morfología. De entre sus numerosas ventajas se encuentran su bajo coste, su alta estabilidad química y su baja toxicidad (Bagheri et al. 2015).

Según las condiciones de reacción, las nanopartículas de TiO_2 pueden presentar distintos tamaños y porosidades (Liu et al. 2015, Wang et al. 2022).

1.2.3. *Sílica mesoporosa*

Los nanomateriales de sílice son potenciales sorbentes de contaminantes debido a que tienen una estructura estable, un área de superficie específica alta y porosidad variable, además de no ser perjudicial para el ambiente y fácil de sintetizar.

Los nanomateriales de sílice se clasifican en 5 tipos:

- 1) Nanomateriales de silicio.
- 2) Nanomateriales de óxidos de sílice.
- 3) Nanomateriales de organosílice.
- 4) Nanomateriales de silsesquioxano.
- 5) Nanomateriales de sílica mesoporosa.

Dentro de esta clasificación, en función de sus propiedades físico-químicas están los nanomateriales de sílica no porosas, mesoporosas, núcleo-capa y huecas. Cada uno de ellos tienen un método de síntesis diferente. Generalmente, tanto la sílica mesoporosa como el resto de nanomateriales de sílice, son sintetizados por hidrólisis y condensación de tetraalcoxisilanos. En el caso de que el interés del material sea más poroso, suelen añadirse también tensioactivos en el medio de reacción. Este tipo de material tienen una alta área superficial, alta porosidad, mesoporosidad uniforme, considerable biodegradación y elevada estabilidad térmica y mecánica (Li et al. 2021).

En algunas ocasiones y con el objetivo de aumentar las capacidades sorbentes de este tipo de materiales, estos suelen ser funcionalizados con grupos funcionales como: $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, etc. De este modo pueden aumentar las interacciones analito sorbente durante el proceso extractivo. En la figura 2 puede observarse un ejemplo de este proceso.

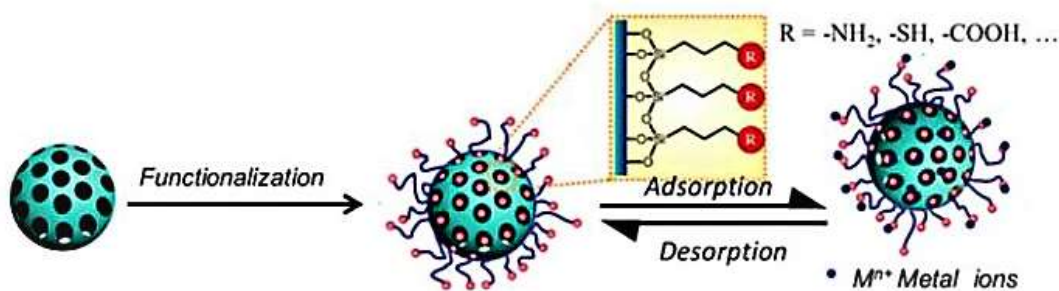


Figura 2. Ejemplo de funcionalización de sílica mesoporosa en adsorción de iones pesados (Li et al. 2021).

1.2.4. Redes metal-orgánicas (MOFs)

Las redes metal-orgánicas (MOF) son materiales compuestos por cluster metálicos y ligandos orgánicos por medio de enlaces de coordinación. Se caracterizan por ser los materiales con mayores áreas superficiales conocidas. Su alta porosidad puede alcanzar hasta un 90% de su propio volumen (Poole 2020). Además, presentan una buena estabilidad en condiciones de humedad y estabilidad térmica (Li et al. 2019).

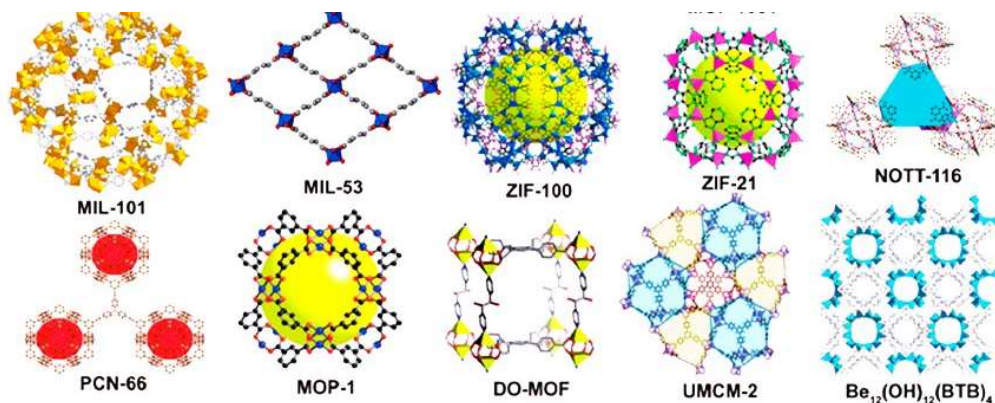


Figura 3. Estructuras de los MOF (Kampouraki et al. 2019)

En la figura 3 aparecen varios tipos de MOF, entre los que se encuentran el Material Institute Lavoisier (MIL), el cual es el más aplicado para el análisis de aceites de oliva. Los MILs son un tipo de MOF sintetizados con metales de transición y ligandos de ácido dicarboxílico. Dentro de este grupo, encontramos los MIL-53, MIL-68, MIL-88, MIL-96, MIL-100 y MIL-101. Éste último es el que más se utiliza por ser el más eficiente, ya que cuenta con una mayor porosidad. Pueden emplear cromo o hierro en su estructura, MIL-101(Cr) o MIL-101(Fe) (Poole 2020).

1.2.5. Nanomateriales de carbono

Existen multitud de estructuras basadas en únicamente carbono (Fig.4). Actualmente, se clasifican según su superficie, vía sintética y siendo las más comunes: nanofibras de carbono (CNF), tamiz molecular de carbono, carbono basado en plantilla, carbono amorfo, carbono poroso, carbón activado, fullereno, óxido de grafeno, puntos cuánticos de grafeno, óxido de grafeno reducido, nanotubo de carbono (CNT), nanodiamante de carbono, puntos de carbono, etc. (Ramar, Balraj 2022)

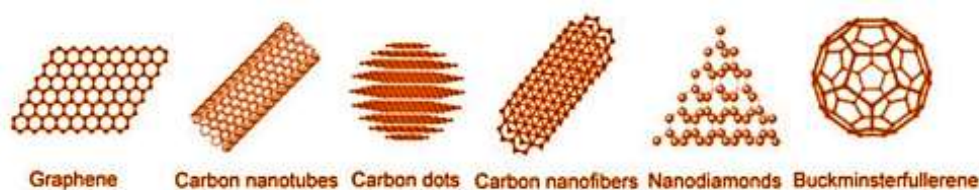


Figura 4. Algunos tipos de nanomateriales de carbono (Ramar, Balraj 2022).

Los sorbentes que se utilizan para el análisis de aceite de oliva son los nanotubos de carbono y nanocomposite de óxido de grafeno. Los nanotubos de carbono son láminas enrolladas en forma de cilindro de grafeno donde los átomos de carbono tienen enlaces sp^2 . Hay tres tipos: de pared simple (una hoja de grafeno), de pared doble (dos nanotubos de carbono) y de pared múltiple (varias capas de grafeno) (Ibrahim 2013). Su ventaja como sorbente se encuentra en su estructura, ya que tienen una alta estabilidad térmica, mecánica y química, además de una gran área superficial, siendo así útiles para compuestos polares y apolares (Liang et al. 2014). También poseen buenas conductividades eléctricas y térmicas (Ibrahim 2013).

Los óxidos de grafeno son compuestos amorfos de carbono, hidrógeno y oxígeno con una estructura bidimensional (Brisebois, Siaj 2020). Son derivados del grafeno ya que su formación se debe a la oxidación de éste gracias a agentes oxidantes. De esta forma el carbono cambia de hibridación sp^2 a sp^3 (Singh et al. 2023). Presenta un carácter hidrofílico y su interacción superficial es bastante alta (Brisebois, Siaj 2020), lo que hacen que sea ideal como material adsorbente.

2. OBJETIVOS

Este trabajo de fin de grado se centrará en la descripción objetiva, tras la síntesis de información, del uso de nuevos materiales en el análisis de compuestos intrínsecos y externos de aceites de oliva.

Para llevar a cabo este objetivo principal será necesario realizar una serie de objetivos secundarios:

- Realizar una investigación y análisis de las diferentes técnicas de extracción, con el fin de comprender su funcionamiento y aplicaciones, así como sus limitaciones y desafíos.
- Describir las propiedades y características de los nuevos materiales más utilizados en dichas técnicas, como composición, tamaño, forma, estructura y propiedades superficiales.
- Desarrollar la capacidad de seleccionar y filtrar la información necesaria encontrada. Así como integrar y defender los conocimientos adquiridos con criterio científico.

3. METODOLOGÍA

Para ampliar conocimientos sobre el aceite de oliva, su importancia para la salud humana y, sobre todo, el interés de monitorizar los mismos para garantizar su calidad y evitar fraudes, se ha hecho uso de reglamentos europeos como el Boletín Oficial del Estado (BOE) y la Comisión Europea, los cuales son:

- REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2022/2105 DE LA COMISIÓN de 29 de julio de 2022 por el que se establecen las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva.
- REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2019/1604 DE LA COMISIÓN de 27 de septiembre de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n.o 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- REGLAMENTO (UE) No 835/2011 DE LA COMISIÓN de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al

contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios.

- REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/2104 DE LA COMISIÓN de 29 de julio de 2022 por el que se completa el Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y el Consejo, en lo que respecta a las normas de comercialización del aceite de oliva.

Además, se ha recurrido a los organismos como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) donde se ha hecho uso de una base de datos para encontrar los tipos de plaguicidas en los aceites de oliva. Por otro lado, se ha hecho uso de las normativas recogidas en el *Códex Alimentarius*, concretamente de la norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva CXS 33-1981.

Estos recursos han sido de ayuda para conocer los niveles permitidos por la Legislación de los compuestos intrínsecos o ajenos que puede contener la muestra, así como su proporción para evaluar su calidad. Una vez identificados cuáles podrían ser esos compuestos intrínsecos o ajenos, se hizo uso de bases de datos para encontrar las estructuras y propiedades de dichos compuestos. Cabe destacar, que estas búsquedas se han realizado en inglés por ser el idioma principal en la ciencia.

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) es una web que proporciona todos los datos sobre los compuestos químicos, además de su estructura y nomenclatura.

Para la sección de resultados y discusión se han empleado bases de datos de tipo bibliográfico: Scopus, ScienceDirect y Google Académico. En cuanto a los nanomateriales, son diversos los que se utilizan como sorbentes en diferentes tipos de extracciones de los compuestos que pueden encontrarse en los aceites de oliva. Para conocer cuáles son dichos sorbentes, se ha realizado una búsqueda bibliográfica exhaustiva que ha permitido, no sólo conocer los materiales empleados para la monitorización de este producto, sino además obtener conocimiento sobre sus propiedades, síntesis y ventajas que presentan su aplicación.

Con dichas búsquedas se ha conseguido la obtención de distintos artículos y revistas científicas publicados hasta la fecha actual. En función de los intereses de búsqueda, se filtraron palabras clave. La principal en todas las bases de datos fue “olive oil” y, como se muestra en la figura 5, en Scopus se filtró como segunda palabra clave el nombre del nanomaterial: “metal organic framework”, “carbon nanotubes”,

“graphene oxide”, “molecular imprinted polymers” y “mesoporous silica”. Para el caso de “carbon nanotubes” fue necesario especificar el área de la química y, por tanto, no obtener resultados pertenecientes a otras áreas.

Para la selección de artículos se descartaron aquellos donde los estudios se realizaban para otras muestras como biodiesel u otros tipos de aceites que no eran de oliva.

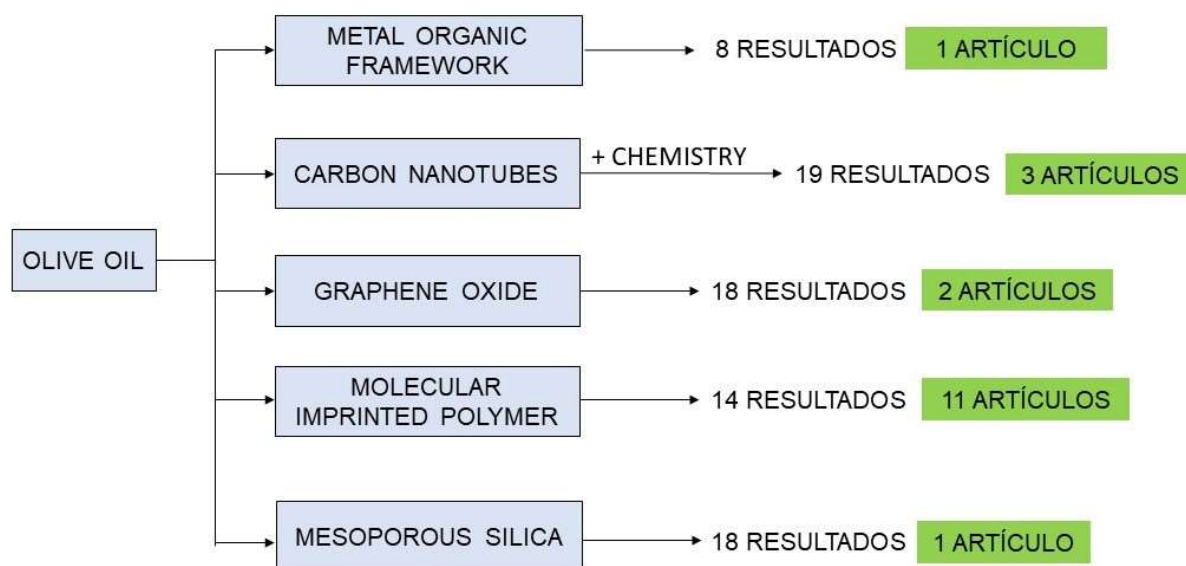


Figura 5. Referencias seleccionadas en Scopus

En Science Direct, como se muestra en la figura 5, se filtró como tercera palabra clave: “sorbent” debido a la necesidad de especificar la función del nanomaterial y descartar los artículos donde los nanomateriales tenían otra utilidad que no cumplía con los objetivos.

A diferencia de Scopus, en ScienceDirect la cantidad de resultados fue mayor por la variedad en áreas y tipos de artículos, por lo que fue necesario especificar el área de la química y artículos de investigación. Para obtener resultados actualizados, se filtró por fechas a partir del 2010.

Aunque estas filtraciones resultaron de utilidad, cabe destacar que en esta base de datos se realizó la segunda búsqueda, por lo que algunos resultados ya se habían obtenido previamente en Scopus y fue necesario descartarlos.

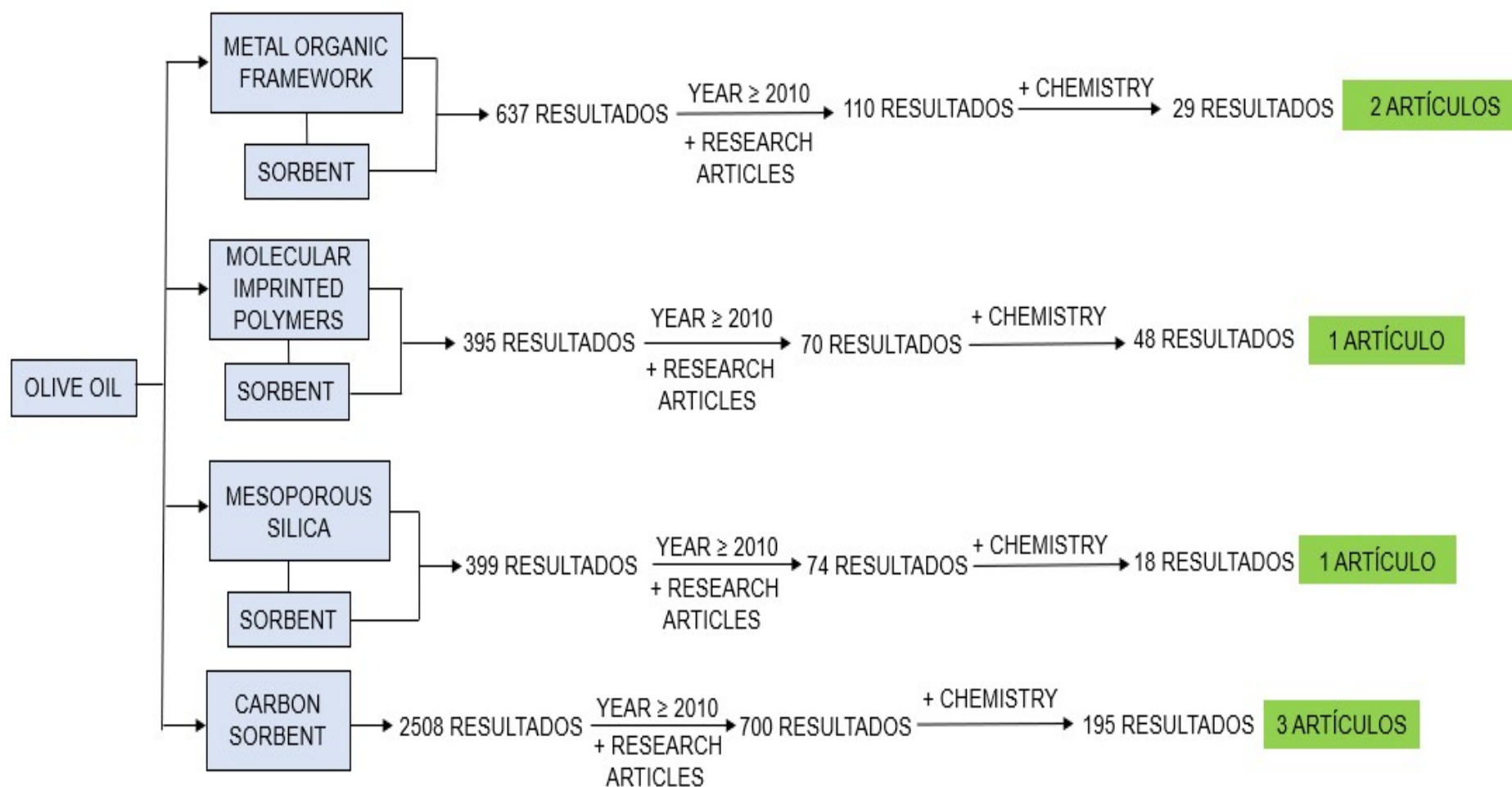


Figura 6. Referencias seleccionadas en Science Direct

La información sobre los nanomateriales de dióxido de titanio solo se ha obtenido con el buscador Google Académico debido a que en las otras no se encontró la información que se buscaba. De la misma forma, con las palabras clave: “olive oil”, “titanium dioxide” y “sorbent” se consiguió un resultado.

Por otro lado, a través de este buscador también se han hallado referencias sobre las propiedades de cada uno de los nanomateriales, así como los compuestos que se pueden determinar con ellos en los aceites de oliva.

Además, se ha utilizado la base de datos Refworks, un software de gestión bibliográfica que permite la creación de referencias para la inserción de citas y bibliografías que aparecen en este Trabajo de Fin de Grado.

Por último, para realizar las figuras que aparecen en este apartado indicando la búsqueda en cada base de datos, se ha hecho uso de Microsoft PowerPoint.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tras la búsqueda bibliográfica de materiales utilizados como sorbentes para la extracción de compuestos intrínsecos y contaminantes de los aceites de oliva, se encontraron 5 tipos de nanomateriales que se utilizaban para varios tipos de extracción previos a las técnicas de análisis correspondientes. En la tabla 5 se encuentran los parámetros más relevantes de la bibliografía seleccionada.

- Extracción en fase sólida (SPE). Consiste en un cartucho con un sorbente confinado. A través de este, se hace pasar una cierta cantidad de muestra líquida, de este modo los analitos quedarán retenidos en el sólido y posteriormente eluidos para su análisis. Dicha retención será fruto de la afinidad de estos por la fase sólida. Como norma general, la extracción lleva 4 pasos fundamentales: acondicionamiento para activar la fase sólida, de modo que sus poros y puntos de interacción se encuentren libres para poder interaccionar con los analitos en cuestión; carga de muestra, en el cual los analitos y alguna interferencia procedente de la matiz, queda retenido en el sorbente sólido; lavado, para eliminar interferencias que quedan retenidas en el cartucho; y la elución para extraer el analito separándolo del sorbente. En este último paso es crucial la selección del disolvente de elución. En la figura 8 se muestra un esquema de un procedimiento convencional de SPE. En este caso concreto es un ejemplo donde el MIP es el sorbente.

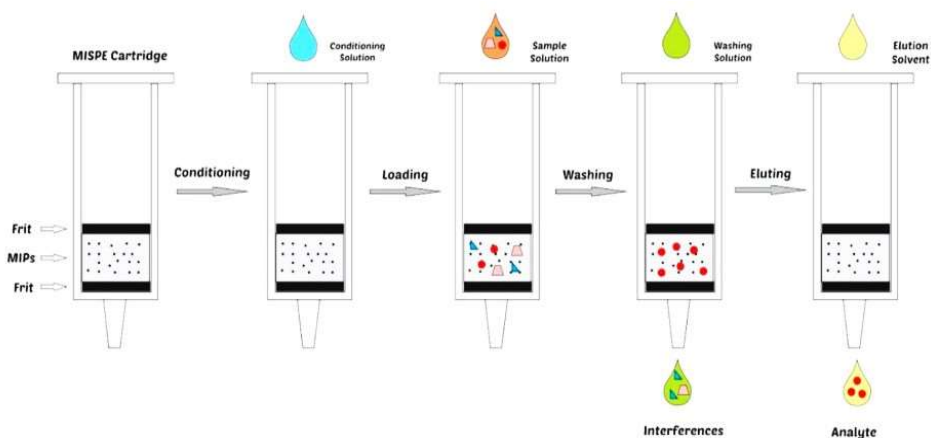


Figura 8. Ejemplo de extracción en fase sólida con MIP (Maranata et al. 2021)

- Extracción en fase sólida dispersiva (dSPE): Esta técnica consiste en la dispersión de un sorbente en la muestra con objeto de retener el analito mediante su interacción. Una vez que el sorbente es añadido a la muestra, este se somete a agitación externa, ya sea vórtex, ultrasonidos, agitación manual... de este modo se favorece la interacción “analito-sorbente” obteniendo mejores resultados extractivos. Con la centrifugación o filtración se consiguen separar ambas fases. A continuación, se procede a la elución de los analitos del sorbente para su análisis como se muestra en la figura 9. Al igual que en el caso de la SPE, es crucial elegir el disolvente extractante en este último paso, para garantizar que todos los analitos han sido extraídos de nuevo del sorbente. Sus principales ventajas son la rapidez y fácil utilización, y debido al bajo consumo de disolventes, es una técnica respetuosa con el medio ambiente (Islas et al. 2017).

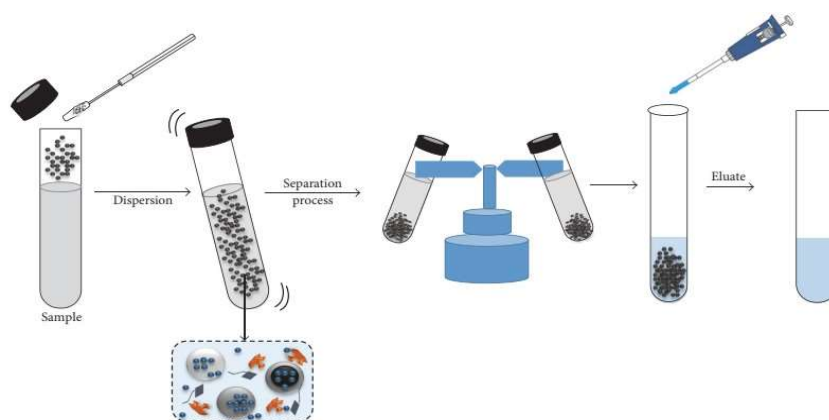


Figura 9. Ejemplo del proceso de dSPE (Islas et al. 2017)

- Extracción en fase sólida dispersiva asistida por imanes (MdSPE): La estrategia es la misma que el caso anterior, no obstante, en este caso en lugar de emplear centrifugación, decantación o filtración, aprovechamos las propiedades magnéticas del sorbente. Como se muestra en la figura 10, en este caso, se añade el sorbente con propiedades paramagnéticas a la muestra, se agita y una vez que el analito quede retenido, mediante un imán se separa del resto de la muestra. Finalmente, mediante una elución, el sorbente queda retenido en el imán y se libera el analito para determinarlo mediante la técnica de análisis correspondiente. Esta técnica aporta la ventaja de ser bastante sencilla y rápida, ya que no necesita de pasos como la filtración o centrifugación para tratar la muestra..

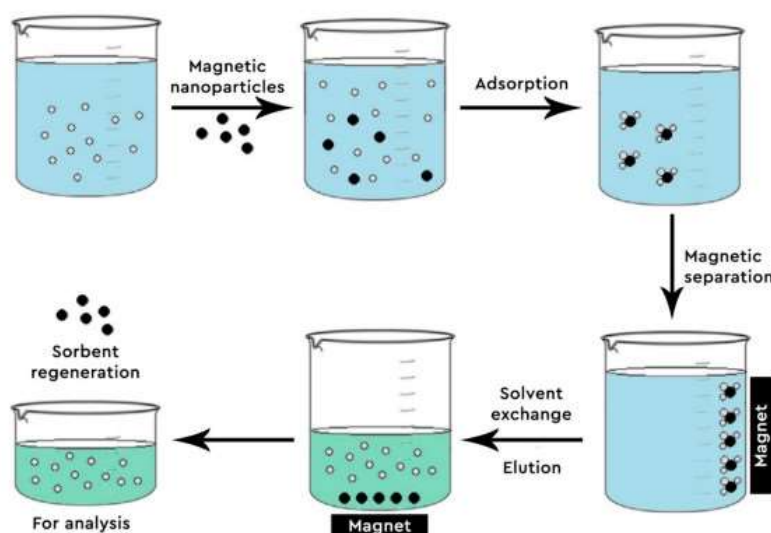


Figura 10. Ejemplo de extracción en fase sólida magnética (Plastiras et al. 2021)

- Extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD): al contrario de los casos descritos hasta ahora la MSPE se emplea para la determinación de muestras en estado sólido, no líquido. Consiste en aumentar el área superficial de una muestra sólida. Para ello se mezclan con el denominado agente dispersante que puede ser, entre los más usados, gel de sílice, C18 o incluso arena (Fig.11). Dicho material, tiene la función de aumentar la superficie de extracción de la muestra, dejando disponibles posibles puntos de interacción analito-eluyente. Además, facilita la adsorción y retención de los analitos ya que es capaz de estabilizar la fase sólida, asegurando así que los analitos queden capturados y se mantengan en la fase extractante

durante el proceso. Se homogenizan ambos sólidos y se colocan en un cartucho o una columna, para seguir un proceso similar a la SPE descrita durante esta sección (con todas sus etapas, carga, lavado y elución). En la figura 11 se muestra un ejemplo de esta técnica.

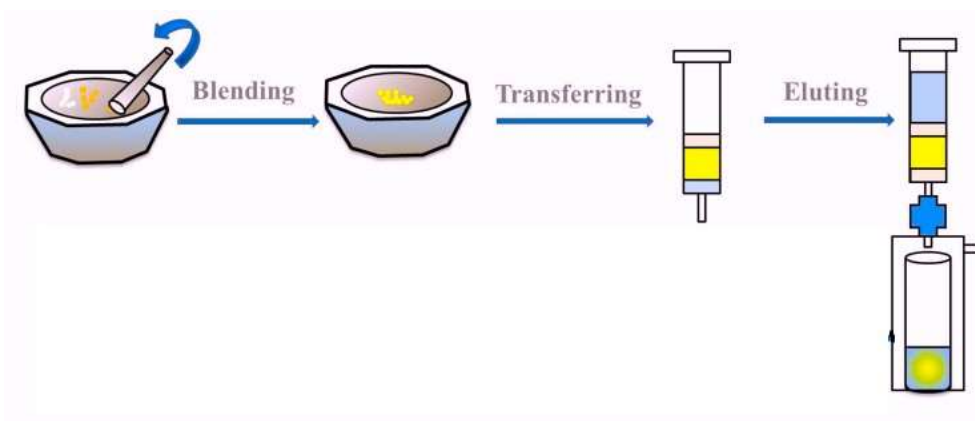


Figura 11. Proceso de MSPD (Ding et al. 2019)

- Microextracción en fase sólida (SPME): Esta técnica deriva de la SPE, pero en este tipo de estrategias, el sorbente se encuentra depositado sobre un soporte metálico de pequeño grosor, por lo tanto las cantidades de sorbentes son ínfimas en comparación con otras técnicas. Como se muestra en la figura 12, consiste en la adsorción de analitos en una fibra recubierta por un sorbente sólido sin necesidad de uso de grandes cantidades de disolventes, incluso con consumo nulo. Consta de dos etapas, la primera es la extracción de analitos de la muestra a la fibra y, posteriormente, su desorción para el análisis.

Respecto a la extracción, hay dos formas de realizarlas:

1. SPME en espacio de cabeza (HS-SPME): Es válida para compuestos volátiles en muestras líquidas o sólidas. El analito debe estar en forma gaseosa para su retención en la fibra.
2. SPME directa: Este modo sirve para muestras líquidas o sólidas. Consiste en la inmersión de la fibra en la muestra con objeto de que los analitos queden retenidos en ella, de forma que se podrá realizar la desorción.

En cuanto a la desorción, hay dos modos que dependen de la muestra a analizar. El primero es la desorción térmica, que no debe emplearse para

compuestos no volátiles o termolábiles, ya que se realiza en un inyector de un cromatógrafo de gases a alta temperatura. El segundo modo es la desorción con disolventes donde la fibra se sumerge en un eluyente a una temperatura no muy alta para llevar el objetivo. Mayoritariamente se inyecta en HPLC.

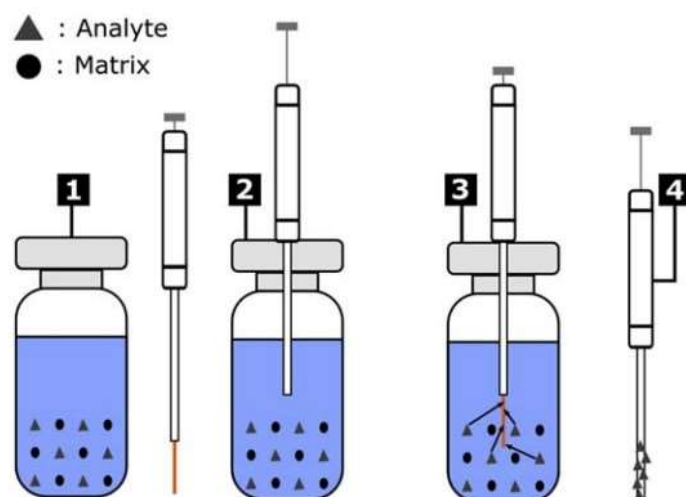


Figura 12. Ejemplo de proceso de SPME (Weggler et al. 2020)

Tabla 5. Nanomateriales para extracción de compuestos en aceites de oliva.

MATERIAL	ANALITO	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	CONDICIONES EXTRACTIVAS	TÉCNICA DE ANÁLISIS	REFERENCIAS
MIP					
DR-MIP	Dimetoato	MdSPE ¹	Tiempo irradiación: 90 minutos λ : 440 nm y 365 nm	HPLC-DAD ²	(Garcia et al. 2020)
MMIP	Dimetoato	MdSPE ¹	Tiempo agitación: 10 minutos Lavado: n-heptano Elución: MeOH ³		(Garcia et al. 2018 (a))
Inif-MIP	Dimetoato	SPE ⁴	Acondicionado: n-heptano Lavado: n-heptano:20% CH ₂ Cl ₂ Elución: MeOH ³		(Martins et al. 2015 (a))
DL-MIP	Terbutilazina + Dimetoato	SPE ⁴	Acondicionado: n-heptano Lavado: n-heptano:CH ₂ Cl ₂ Elución: MeOH ³		(Garcia et al. 2016)
MIP	Terbutilazina		Acondicionado: MeOH ³ + CH ₂ Cl ₂ Lavado: CH ₂ Cl ₂ Elución: MeOH ³		(Garcia et al. 2015)
MIP	Deltametrina	SPE ⁴	Acondicionado: MeOH ³ + n-heptano Lavado: heptano:10% CH ₂ Cl ₂ Elución: MeOH ³		(Martins et al. 2015 (b))
MIP	Fentión	SPE ⁴	Acondicionado MeOH ³ + Hexano Lavado: CH ₂ Cl ₂ :5% ACN ⁵ Elución: MeOH:2% TFA ⁶	HPLC-UV ⁷	(Bakas et al. 2014)
MIP	Metidación	SPE ⁴	Acondicionado: Hexano Lavado: Hexano 20% CH ₂ Cl ₂ Elución: MeOH ³ 2% TFA ⁶		(Bakas et al. 2012)
MIP	Dimetoato	SPE ⁴	Lavado: Hexano:CH ₂ Cl ₂ (85:15) Elución: MeOH ³		(Bakas et al. 2013)

MMIP	Feromona	MdSPE ¹	Tiempo agitación: 40 minutos Lavado: Hexano Elución: MeOH ³	GC-MS ⁸	(del Carmen Alcudia-León et al. 2016)
MOF					
MIL-101(Cr)	Fumonisin	dSPE ⁹	Disolvente: Ác. Fórmico 2% + ACN ⁵ 60% Tiempo agitación: 15 min Elución: ACN ⁵ :Ác. Fórmico 10%	HPLC-MS/MS ¹⁰	(Yang et al. 2023)
MIL-88(Fe)/GO	Ácido ftálico	SPME ¹¹	Temperatura extracción: 30°C Tiempo extracción: 40 min Temperatura desorción: 260°C Tiempo desorción: 10 min	GC-FID ¹²	(Zhang et al. 2018)
Nanomaterial de carbono					
GO-Cloruro de polivinilo	Ésteres ftálicos	SPME ¹¹	T desorción: 230°C	GC-FID ¹²	(Amanzadeh et al. 2016)
GO/Fe ₃ O ₄ -Ácido fítico	PAHs	MdSPE ¹	Tiempo agitación: 1 min Elución: Tolueno	HPLC ¹³	(Ji et al. 2017)
Fe ₃ O ₄ /GO-Dopamina	Benzo[a]pireno		Elución: MeOH ³ Tiempo elución: 0,5 – 2,5 min	HPLC-FLD ¹⁴	(Li et al. 2022)
GO/Fe ₃ O ₄	Monopalmitato 2-glicerilo	dSPE ⁹	Solventes: Hexano:Éter dietílico	GC-FID ¹² GC-MS ⁸	(Rashidi et al. 2022)
Nanotubo de carbono	Pesticidas	SPE ⁴	Acondicionado: Acetona Lavado: Hexano Elución: Acetato de etilo	GC-MS ⁸	(López-Feria et al. 2009 (a))
	Ftalatos	dLLME ¹⁵	Componente 1: MWCNT ¹⁶ + H ₂ O + NaDS ¹⁷ Componente 2: Aceite de oliva Tiempo agitación: 1 min	HS-GC/MS ¹⁸	(López-Feria et al. 2009 (b))
MoS ₂ -Grafito	PAHs	MdSPE ¹	Tiempo agitación: 1 min Elución: Tolueno	GC-MS ⁸	(Peng et al. 2022)

Sílica mesoporosa					
mSi	Aftaloxinas	SPE ⁴	Acondicionado: Acetona:H ₂ O + Hexano Lavado: Isopropanol Elución: Acetona:H ₂ O	HPLC-MS/MS ¹⁰	(Zhou et al. 2017)
Nanopartículas de dióxido de titanio					
TiO ₂	Fosfolípidos	MSPD ¹⁹	Lavado: H ₂ O acidificada Elución: CHCl ₃ :MeOH ³	MALDI- TOF/MS ²⁰	(Shen et al. 2013)
ABREVIATURAS					
¹ Extracción en fase sólida dispersiva asistida por imanes ² Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos ³ Metanol ⁴ Extracción en fase sólida ⁵ Acetonitrilo ⁶ Ácido trifluoroacético ⁷ Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta ⁸ Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ⁹ Extracción en fase sólida dispersiva ¹⁰ Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem			¹¹ Microextracción en fase sólida ¹² Cromatografía de gases con detector de ionización de llama ¹³ Cromatografía de líquidos de alta resolución ¹⁴ Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector de fluorescencia ¹⁵ Microextracción líquido-líquido dispersiva ¹⁶ Nanotubo de carbono de pared múltiple ¹⁷ Dodecilsulfato de sodio ¹⁸ Cromatografía de gases con espacio de cabeza acoplada a espectrometría de masas ¹⁹ Extracción por dispersión de matriz en fase sólida ²⁰ Desorción/ionización con láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas		

4.1. *Polímeros de Impronta Molecular (MIPs)*

Dando un vistazo a la Tabla 5, se observa como los MIPs son los sorbentes más utilizados en el análisis de aceites de oliva. Concretamente, en la literatura se describen como potenciales sorbentes de plaguicidas, aunque también se ha descrito para la determinación de feromonas, las cuales pueden presentarse en el aceite como consecuencia de plagas en el olivar durante el cultivo. Como se indica en la introducción, este nanomaterial se sintetiza a partir de una polimerización entre monómeros y un iniciador en presencia de una plantilla para la formación de un complejo monómero-plantilla; y con un reticulante se forma la matriz del MIP. De entre los iniciadores más empleados, se encuentra el 1,1-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) y como reticulante, el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) es el más empleado (Garcia et al. 2018 (a); Garcia et al. 2015; Bakas et al. 2013; Bakas et al. 2014; Bakas et al. 2012; Martins et al. 2015 (a); Martins et al. 2015 (b); del Carmen Alcudia-León et al. 2016), debido a que facilita la unión del analito a los grupos funcionales gracias a la flexibilidad que proporciona (Shaipulizan et al. 2020). Por otro lado, en algunos casos se emplean trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) (Garcia et al. 2020; Garcia et al. 2018 (b)), ya que su estructura ramificada por tres grupos vinilo facilita alta resistencia y sitios de unión efectivos en los polímeros (Hasanah et al. 2021). Otro elemento importante para la obtención de un MIP es su composición polimérica, los monómeros más empleados son aquellos metacrílicos, siendo los más utilizados la acrilamida (Bakas et al. 2014; Martins et al. 2015 (b)) o el ácido metacrílico (Garcia et al. 2015; Martins et al. 2015 (a)), debido a que es donador y aceptor de enlaces de hidrógeno, y, por tanto, es compatible con múltiples moléculas que actúan como plantilla para la formación del complejo (Vasapollo et al. 2011; Nishchaya et al. 2023). No obstante, esto depende de la afinidad entre el monómero y la molécula plantilla que debe ser bastante alta. Es por ello que otros estudios hacen uso de derivados de la misma. La adición de ciertos grupos funcionales al monómero implica que la relación monómero-plantilla sea más estable, como es el caso de la metacrilamida (Garcia et al. 2018 (a); Martins et al. 2015 (b)), ácido itacónico (Bakas et al. 2013), N,N'-metilenobisacrilamida (Bakas et al. 2012), ácido 4-[(4-metacriloiloxi)fenilazo]benzoico (MPABA) (Garcia et al. 2020; Garcia et al. 2018 (b)), o 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) (del Carmen Alcudia-León et al. 2016). Garcia et al, con el objetivo de abarcar la determinación de analitos de distinta naturaleza, sintetiza el denominado MIP de doble capa (DL-MIP),

el cual hibrida dos MIPs obtenidos a través de plantillas de analitos distintas, lo que le confiere una cierta versatilidad a la hora de extraer ciertas familias de compuestos (García et al. 2016).

Una vez obtenido el MIP, es necesario el diseño del proceso extractivo. El más empleado en este tipo de materiales es la SPE, debido a la comodidad de confinar el mismo en un cartucho (Bakas et al. 2014; García et al. 2015; Bakas et al. 2012; Martins et al. 2015 (a)). No obstante, algunos autores realizan algunas modificaciones del MIP en función de la técnica extractiva mediante el cual va a ser empleado para el análisis de aceites de oliva. Es el caso de la MdSPE, en la cual es necesario añadir un material con propiedades magnéticas que confiera al MIP la posibilidad de recolectarse por medio de un imán de neodimio. Es el caso de García et al. y del Carmen Alcudia-León et al. (García et al. 2020, García et al. 2018 (a), del Carmen Alcudia-León et al. 2016). Dichos autores, agregan nanopartículas de Fe_3O_4 durante la síntesis del MIP, aportando así ciertas características paramagnéticas al material sorbente.

Cabe destacar que la utilidad de los MIPs no solo se encuentra en las técnicas de SPE y esquemas similares, sino que también se pueden utilizar en técnicas de separación donde únicamente se irradia luz UV en la muestra en disolución y en presencia del sorbente denominado “photo-MIP”, formado a partir de un monómero fotosensible para la extracción (García et al. 2018 (b)). Un caso particular es la extracción de dimetoato haciendo uso de DR-MIP, un sorbente con capacidad de respuesta “doble”, ya que con él se consigue un resultado fotónico y magnético en la extracción. Esto es resultado de su formación a partir de un monómero fotosensible y nanopartículas de Fe_3O_4 que le proporciona el magnetismo. Como se muestra en la figura 13, se realiza una MdSPE, y para ello, primero hay que irradiar con luz visible la muestra con el sorbente añadido, y así poder separar de la matriz el sorbente con el analito retenido mediante un imán. Para conseguir separar el analito del sorbente hay que irradiar con luz UV, y de esta forma se consigue extraer el sorbente, de nuevo, por un imán, dejando libre el analito para la técnica de análisis (García et al. 2020).

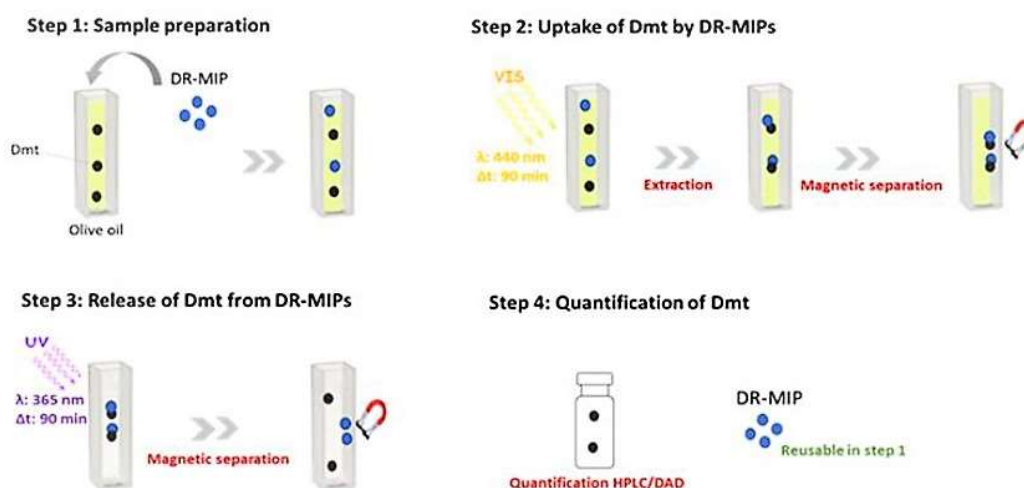


Figura 13. Proceso de extracción con DR-MIP (Garcia et al. 2020)

4.2. Redes metal-orgánicas (MOFs)

Los MOFs, han despertado gran interés en la comunidad científica por sus propiedades únicas. Entre ellas, la elevada área superficial y su estabilidad térmica y química, los hacen idóneos como sorbentes en estrategias de SPE. Es por ello que algunos autores han empleado MOFs para la determinación de contaminantes externos procedentes de unas inadecuadas condiciones de almacenamiento del aceite de oliva, como son las fumonisinas y ácido ftálico.

Yang et al., describen la extracción de fumonisinas de forma exitosa, haciendo uso de MIL-101(Cr) en estrategias de dSPE. Debido a su estructura flexible resulta ser un sorbente muy versátil para extracción en general. Además, los autores indican que se obtienen unos resultados altamente selectivos, rápidos y precisos en comparación con las técnicas convencionales como el uso de columna de SPE o cromatografía de cambio iónico, las cuales son procesos más largos y costosos. Hay que tener en cuenta que este sorbente no adsorbe directamente en el aceite debido a que puede afectar al metal, por lo que es necesario hacer un tratamiento previo a la muestra con una solución acuosa de ACN y ácido fórmico para llevar a cabo la extracción. Además, resulta ser un nanomaterial reutilizable y con una alta repetibilidad (Yang et al. 2023).

Por otro lado, Zhang et al. emplean el composite MIL-88(Fe)/GO para la extracción de ácido ftálico a través de una estrategia de SPME. En este caso, no sólo se emplea el MOF como sorbente, sino que se crea un composite junto con GO. Esta combinación, potencia una elevada estabilidad al material ante una alta temperatura

durante la extracción. Una de las ventajas principales de este trabajo, es que el recubrimiento en la fibra se realiza a través de enlaces covalente con acero inoxidable que actúa como soporte del sorbete. De este modo, ésta puede ser reutilizada hasta en un centenar de ciclos, sin perder precisión ni eficacia extractiva (Zhang et al. 2018).

No obstante, en el análisis de aceites de oliva, también se han empleado los MOFs, pero esta vez no como sorbente en procedimientos extractivos. Wang et al., emplean el MIL-101(Fe) como matriz para la determinación de benzo(a)pireno en la técnica MALDI-TOF aportando así la ventaja de una buena reproducibilidad en la medida, así como una excelente ionización del hidrocarburo en cuestión (Wang et al. 2018). La técnica de análisis “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization” (MALDI) consiste en estudiar una matriz que lleva incorporada una muestra con el fin de determinar compuestos de alto peso molecular. Tras la unión muestra-matriz, se le irradia láser UV con una longitud de onda de 337 nm, por lo que la matriz le transfiere energía al compuesto que es desorbido e ionizado y, de esta forma, el analito pasa de estado sólido a gaseoso con carga. Por otro lado, esta técnica va acoplado al analizador de tiempo de vuelo, que en inglés se conoce como “Time Of Flight” (TOF). Una vez que se obtiene el analito ionizado, se determina con este analizador midiendo el tiempo que tardan los iones generados en alcanzar un electrodo colector situado a una distancia fijada. El tiempo que alcanza cada ion depende de las masas moleculares, ya que cuanto más masa o carga tenga, más tardará su alcance.

4.3. Nanomateriales de carbono

Los nanomateriales basados en carbono, son el segundo grupo más empleado en el análisis de aceites de oliva. DE entre ellos podemos definir 3 grupos bien diferenciados: los GO, los CNT y grafito.

4.3.1. Compuestos de óxido de grafeno

Los sorbentes formados con GO son los más empleados en MdSPE, como se observa en la tabla 5. Esto se debe a que el nanomaterial está sintetizado junto con un compuesto magnético, Fe_3O_4 , el cual otorga paramagnetismo al sorbente. Dichos materiales magnéticos basados en GO, presentan elevada capacidad de adsorción. No obstante, presentan una cierta inestabilidad química. Son altamente oxidables, por tanto, en el caso de determinaciones en medios hidrófobos, es conveniente funcionalizarlo con el objetivo de proteger la estructura del material, con algún

compuesto de origen anfipático. Como casos concretos, en la literatura se encuentran varios ejemplos para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Se han desarrollado sorbentes con mayor especificidad al ser funcionalizados o combinados con otros materiales específicos, como el GO/Fe₃O₄-Ácido fólico para la extracción (Ji et al. 2017), cuyos autores realizan un estudio de recuperación de hasta 20 ciclos, y el Fe₃O₄/GO-dopamina para la extracción de benzo[a]pireno (Li et al. 2022), con prometedores resultados y bajos límites de detección.

Este último sorbente con dopamina presenta las mismas ventajas que el resto de composites basados en GO, pero con la excepción de requerir de menor cantidad reactivos y un tiempo más corto de extracción. Esto es debido a que su estructura, donde existe una unión con dopamina, la cual aporta la ventaja de aumentar la adsorción ya que la presencia de triglicéridos en el aceite puede interferir en la detección del analito y ralentizar el proceso (Li et al. 2022).

La HS-SPME también hace uso de nanomateriales basados en GO para el análisis de aceite. En este caso Amanzadeh et al. emplean un material de GO-Cloruro de polivinilo para extraer ésteres ftálicos del aceite. Al ser una determinación de compuestos semi-volátiles, la desorción de los analitos se realiza en el mismo inyector de GC, lo que elimina por completo el uso de disolventes orgánicos en el proceso extractivo. Esto deriva en un tratamiento de muestra más simple y respetuoso con el medio ambiente en comparación con otras. El GO, el cual tiene una alta afinidad por los compuestos orgánicos, unido a un polímero como el cloruro de polivinilo en este caso, presenta propiedades físico-químicas aventajadas con respecto a sorbentes convencionales. Además, presenta una mayor robustez y se ha demostrado una buena reproducibilidad y repetibilidad, así como la capacidad de reutilización en varios ciclos y elevadas recuperaciones (Amanzadeh et al. 2016).

El GO no solo se ha descrito para la extracción de analitos en matrices de aceites de oliva, sino que también se emplea como técnica de limpieza de la matriz. Un estudio llevado a cabo por Rashidi y colaboradores emplea un nanomaterial de carbono en el paso de limpieza de una dSPE para la posterior determinación de monopalmitato de 2-glicerilo, siendo el único compuesto intrínseco del aceite que se ha determinado mediante nuevos nanomateriales. En este caso concreto, se emplea un nanocomposite magnético de GO para eliminar compuestos interferentes. Así, la técnica resulta ser rápida y elimina efectos matriz que puedan interferir en la señal de la instrumentación analítica (Rashidi et al. 2022).

4.3.2. Nanotubos de carbono y derivados

Los CNT son sorbentes que se pueden utilizar para la extracción de contaminantes en el aceite de oliva como son los pesticidas y ésteres ftálicos. En el caso de los pesticidas se emplean CNT de pared simple, los cuales han demostrado una sensibilidad superior a materiales convencionales como C18. Se emplea principalmente la SPE, con la ventaja de poder reutilizar el sorbente hasta en 100 ciclos (López-Feria et al. 2009 (a)).

En el caso de los ésteres ftálicos se ha descrito un material más peculiar. Se realiza una dSPE, con MWCNTs, sin embargo, estos se encuentran recubiertos por un material líquido sorbente. López-Feria et al. describen este procedimiento como una ventaja para la eliminación de efecto matriz junto con una elevada selectividad. (López-Feria et al. 2009 (b)). En este caso, no es exactamente una extracción en fase sólida ya que la fase extractante es líquida (surfactante), pero el procedimiento a seguir es una dSPE al estar soportado en un sólido (MWCNTs) (López-Feria et al. 2009 (b)).

Aparte de los CNT, existen nanomateriales similares, como los nanohorns de carbono. La diferencia entre ellos radica en su morfología y, por ende, su función. En este caso, los nanohorns no actúan como sorbentes sino como matriz con una alta capacidad de ionización para la determinación de triglicéridos en SALDI-MS sin la necesidad de un tratamiento de muestra (Roverso et al. 2022). Esta técnica cuyas siglas viene de “Desorción/Ionización Láser Asistida por Superficie” acoplado a espectrometría de masas (MS), sirve para la determinación de moléculas de bajo peso molecular, al contrario que MALDI, aunque su procedimiento es bastante similar. En este caso, la muestra se incorpora a la matriz para aumentar el área de superficie y ésta absorbe la energía del láser que se le irradia para transferírsela a los compuestos de la muestra. Tras esta transferencia de energía, se produce la desorción e ionización, y luego se analiza por MS. Durante este proceso, las moléculas, además de ionizarse, se fragmentan, lo que permite determinar su relación masa/carga.

4.3.3. Nanoláminas de MoS₂ mesoporoso/grafito

Las nanoláminas de MoS₂ mesoporoso/grafito es un nanomaterial que se MdSPE debido a sus propiedades magnéticas. Hasta ahora, se ha destacado que las propiedades magnéticas de los nanomateriales incluidos en este TFG las aporta, de modo general, el Fe₃O₄. Sin embargo, en este caso es el MoS₂. Este sorbente es

anfipático, es decir, el MoS₂ es hidrofílico y el grafito es hidrofóbico, lo que ha permitido la extracción efectiva hasta 13 PAHs. (Peng et al. 2022).

4.4. *Sílica mesoporosa*

La sílica mesoporosa es un nanomaterial utilizado en la extracción de aflatoxinas presentes en los aceites de oliva. Su característica distintiva es que permite llevar a cabo una SPE en combinación con un ácido húmico, el cual le confiere propiedades anfipáticas para la extracción del analito. Esto resulta en una técnica reproducible, precisa y con una elevada capacidad de recuperación (Zhou et al. 2017).

Otro artículo interesante, es el propuesto por Ahn y Kwak. En este caso, se realiza isoterma de Langmuir y Freundlich para diseñar este tipo de nanomaterial con el objetivo de determinar ácidos grasos y clorofila en el aceite de oliva y así investigar la capacidad de adsorción, selectividad y estabilidad en la muestra (Ahn, Kwak 2020).

4.5. *Nanopartículas de dióxido de titanio para extracción de fosfolípidos*

Las nanopartículas de TiO₂ son empleadas en el trabajo de Shen et al. para realizar una MSPD para la extracción de fosfolípidos. Este trabajo ha resultado ser el único encontrado donde se extrae un compuesto intrínseco. No obstante, dicha técnica solo se emplea para muestras sólidas, es decir, el aceite no es una muestra adecuada para la extracción; en su lugar, la muestra ha sido aceituna en este trabajo. Además, se hace un estudio comparativo con el método Bligh & Dyer, el cual sí es adecuado para muestras de aceite tratándolo con disolventes.

Tras la extracción con ambas técnicas, se utiliza MALDI-TOF/MS para determinar el analito extraído. En el caso de Bligh & Dyer se obtienen resultados con interferencias, los cuales son totalmente opuestos a los obtenidos con MSPD. En este caso, los picos obtenidos en MS son limpios demostrando ser un método selectivo, económico, rápido y con alto porcentaje de recuperación, además de ser respetuoso con el medio ambiente por el menor consumo de disolventes (Shen et al. 2013).

5. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se han abordado diferentes tipos de sorbentes basados en materiales para la extracción de contaminantes y compuestos intrínsecos del aceite de oliva. Se observa que un amplio número de trabajos están enfocados en la extracción de contaminantes, específicamente plaguicidas, debido a la notable selectividad. Entre materiales más utilizados en la literatura destacan los MIPs, los cuales han demostrado ser los más efectivos en comparación con los CNT que también son ampliamente empleados. Los GO magnético han sido también empleados para la extracción de otros contaminantes externos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, demostrando selectividad y especificidad. Estos sorbentes de carbono han resultado ser efectivos debido a la unión con un compuesto anfipático que han presentado cada uno de ellos. En menor medida, escasos estudios han empleado estos materiales en técnicas para la extracción de micotoxinas y compuestos ftálicos.

La mayor limitación del empleo de este tipo de materiales en técnicas extractivas se debe a la complejidad de la matriz del aceite de oliva. Es por ello que se han encontrado un número limitado de trabajos que aborden la extracción de compuestos intrínsecos. Sin embargo, el dióxido de titanio se ha empleado puntualmente para la extracción de fosfolípidos en aceituna, aunque este tipo de extracción escogido solo es válido para muestras sólidas y, por tanto, no se puede aplicar para la extracción de aceite de oliva.

Por otro lado, sería interesante ampliar el campo de conocimiento para el uso de nanomateriales capaces de extraer compuestos intrínsecos del aceite de oliva, como los triglicéridos, ácidos grasos o estigmastadienos. De esta forma, sería posible detectar fraudes de forma rápida y fiable, aprovechando las ventajas de selectividad que ofrecen estas técnicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y., Kwak, S.-Y. (2020) "Functional Mesoporous Silica with Controlled Pore Size for Selective Adsorption of Free Fatty Acid and Chlorophyll", *Microporous and Mesoporous Materials*, 306, pp. 110410.
- Altuntas, I., Delibas, N., Demirci, M., Kilinc, I., Tamer, N. (2002), "The Effects of Methidathion on Lipid Peroxidation and some Liver Enzymes: Role of Vitamins E and C". *Archives of Toxicology*, 76:8, pp. 470-473.
- Amanzadeh, H., Yamini, Y., Moradi, M., Asl, Y.A. (2016), "Determination of phthalate esters in drinking water and edible vegetable oil samples by headspace solid phase microextraction using graphene/polyvinylchloride nanocomposite coated fiber coupled to gas chromatography-flame ionization detector", *Journal of Chromatography A*, 1465, pp. 38-46.
- Aparicio, R., Harwood, J. (2013), *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*, Second Edition, Springer. Chapter 1. Pg 10. ISBN 978-1-4614-7776-1
- Bagheri, S., Mohd Hir, Z.A., Yousefi, A.T., Abdul Hamid, S.B. (2015), "Progress on mesoporous titanium dioxide: Synthesis, modification and applications", *Microporous and mesoporous materials*, 218, pp. 206-222.
- Bakas, I., Oujji, N.B., Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T., Rouillon, R. (2013), "Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil", *Journal of Chromatography A*, 1274, pp. 13-18.
- Bakas, I., Ben Oujji, N., Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Noguer, T., Rouillon, R. (2012), "Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil", *Analytica Chimica Acta; Anal Chim Acta*, 734, pp. 99-105.
- Bakas, I., Ben Oujji, N., Istamboulié, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T., Rouillon, R. (2014), "Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil", *Talanta (Oxford)*, 125, pp. 313-318.

- Brisebois, P.P., Siaj, M. (2020), "Harvesting graphene oxide - years 1859 to 2019: a review of its structure, synthesis, properties and exfoliation", *Journal of materials chemistry. C, Materials for optical and electronic devices*, 8:5, pp. 1517-1547.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., Li, J. (2016), "Molecular imprinting: perspectives and applications", *Chemical Society reviews*, 45:8, pp. 2137-2211.
- Christy, A.A., Egeberg, P.K. (2006), "Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics", *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 82:1, pp. 130-136.
- Conte, L., Bendini, A., Valli, E., Lucci, P., Moret, S., Maquet, A., Lacoste, F., Brereton, P., García-González, D. L., Moreda, W., Toschi, T. G. (2020). "Olive Oil Quality and Authenticity: A Review of Current EU Legislation, Standards, Relevant Methods of Analyses, their Drawbacks and Recommendations for the Future". *Trends in Food Science & Technology*, 105, pp. 483-493.
- Del Carmen Alcudia-León, M., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2016), "Selective Extraction of Bactrocera Oleae Sexual Pheromone from Olive Oil by Dispersive Magnetic Microsolid Phase Extraction using a Molecularly Imprinted Nanocomposite". *Journal of Chromatography A*, 1455, pp. 57-64.
- Ding, M., Bai, Y., Li, Y., Yang, X., Wang, H., Gao, X., Chang, Y.-X., (2019). "A Diol-Based-Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Simultaneous Extraction and Determination of 13 Compounds from Angelicae Pubescentis Radix by Ultra High-Performance Liquid Chromatography". *Frontiers Media SA*, 10, pp. 227.
- Dridi, F., Marrakchi, M., Gargouri, M., Garcia-Cruz, A., Dzyadevych, S., Vocanson, F., Saulnier, J., Jaffrezic-Renault, N., Lagarde, F. (2015). "Thermolysin Entrapped in a Gold Nanoparticles/Polymer Composite for Direct and Sensitive Conductometric Biosensing of Ochratoxin A in Olive Oil". *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 221, pp. 480-490.
- Ekner, H., Dreij, K., Sadiktsis, I. (2022). "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Commercial Olive Oils by HPLC/GC/MS – Occurrence, Composition and Sources". *Food Control*, 132, pp. 108528.

- Galadima, M., Singh, S., Pawar, A., Khasnabis, S., Dhanjal, D.S., Anil, A.G., Rai, P., Ramamurthy, P.C., Singh, J. (2021), "Toxicity, microbial degradation and analytical detection of pyrethroids: A review", *Environmental advances*, 5, pp. 100105.
- Garcia, R., Carreiro, E.P., Prates Ramalho, J.P., Mirão, J., Burke, A.J., Gomes da Silva, M.D.R., Freitas, A.M.C., Cabrita, M.J. (2018), "A magnetic controllable tool for the selective enrichment of dimethoate from olive oil samples: A responsive molecular imprinting-based approach", *Food chemistry*, 254:C, pp. 309-316.
- Garcia, R., Carreiro, E.P., Lima, J.C., Gomes Da Silva, M., Costa Freitas, A.M., Cabrita, M.J. (2020), *Assessment of Dimethoate in Olive Oil Samples Using a Dual Responsive Molecularly Imprinting-Based Approach*, MDPI AG, 9:5, pp. 618
- Garcia, R., Carreiro, E.P., Prates Ramalho, J.P., Burke, A.J., Lima, J.C., Gomes da Silva, M.D.R., Costa Freitas, A.M. & Cabrita, M.J. (2018), "A photoswitchable "host-guest" approach for the selective enrichment of dimethoate from olive oil", *Analytica chimica acta*, 1035, pp. 60-69.
- Garcia, R., Martins, N., Carreiro, E.P., Simões, M., Carrott, M.M.L.R., Carrott, P.J.M., Burke, A.J. & Cabrita, M.J. (2015), "Development of a selective sorbent for the solid-phase extraction of terbuthylazine in olive oil samples: A molecular imprinting strategy", *Journal of separation science*, 38:7, pp. 1204-1212.
- Garcia, R., Carreiro, E.P., Nunes, J., da Silva, M.G., Freitas, A.M.C., Burke, A.J., Cabrita, M.J. (2016), "Dual-layer solid-phase extraction based on molecular imprinting technology: Seeking a route to enhance selectivity for trace analysis of pesticide residues in olive oil", *Electrophoresis*, 37:13, pp. 1916-1922.
- Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E. & Markaki, P. (2006), "Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin", *Food microbiology*, 23:7, pp. 612-621.
- Gómez-Coca, R.B., Pérez-Camino, M.C., Moreda, W. (2015), "Handbook of Food Analysis-Two Volume Set", 3rd Edition, Chapter 22, pp. 460
- Gungordu, A. (2013), "Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*", *Aquatic toxicology*, 140-141, pp. 220-228.

- Gunstone, F. 2011, "*Olive Oil in Vegetable Oils in Food Technology*" Wiley, United Kingdom, pp. 243-271.
- Guo, Y., Liang, X., Bi, J., Ling, R., Jiang, Y., Mou, Z., Huang, F., Qin, W. (2019), "A polyamidoamine-mediated competitive colorimetric assay based on gold nanoparticles for determining acid values in edible sunflower seed, corn and extra virgin olive oils", *Food chemistry*, 285, pp. 450-457.
- Hakme, E., Lozano, A., Ferrer, C., Díaz-Galiano, F.J., Fernández-Alba, A.R. (2018), "Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils", *TrAC, Trends in analytical chemistry (Regular ed.)*, 100, pp. 167-179.
- Ibrahim, K.S. (2013), "Carbon nanotubes-properties and applications: a review", *Carbon Letters*, 143, pp. 131-144.
- Islas, G., Ibarra, I.S., Hernandez, P., Miranda, J.M., Cepeda, A. (2017), "Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review", *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, pp. 8215271-16.
- Ji, W., Zhang, M., Duan, W., Wang, X., Zhao, H., Guo, L. (2017), "Phytic acid-stabilized super-amphiphilic Fe₃O₄-graphene oxide for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from vegetable oils", *Food chemistry*, 235, pp. 104-110.
- Kamoun, I.J., Belhaj, D., Turki, N., Kallel, M., Ayadi, H., Ksantini, M., Bouzid, J., Gargouri, R. (2014), "Persistence of pyrethroid Deltamethrin and its effects on extra virgin olive oil quality", *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8:6, pp. 10-15.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N. (2003), "Antiandrogenic Activity and Metabolism of the Organophosphorus Pesticide Fenthion and Related Compounds", *Environmental Health Perspectives*, 111:4, pp. 503-508.
- Kyçyk, O., Aguilera, M.P., Gaforio, J.J., Jiménez, A., Beltrán, G. (2016), "Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba", *Journal of the science of food and agriculture*, 96:12, pp. 4143-4150.
- Lawal, A.T. (2017), "Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review", *Cogent environmental science*, 3:1, pp. 1339841.
- Liang, X., Liu, S., Wang, S., Guo, Y., Jiang, S. (2014), "Carbon-based sorbents: Carbon nanotubes", *Journal of Chromatography A*, 1357, pp. 53-67.

- Li, H., Chen, X., Shen, D., Wu, F., Pleixats, R., Pan, J. (2021), "Functionalized silica nanoparticles: classification, synthetic approaches and recent advances in adsorption applications", *Nanoscale*, 13:38, pp. 15998-1616.
- Li, X., Sun, C., Xu, Y., Shan, S., Zheng, H., Guo, X., Hu, J. (2022), "Construction of novel magnetic nanoparticles for enrichment of benzo(α)pyrene from edible oils followed by HPLC determination", *Food chemistry*, 386, pp. 132838.
- Li, X., Ma, W., Li, H., Bai, Y., Liu, H. (2019), "Metal-organic frameworks as advanced sorbents in sample preparation for small organic analytes", *Coordination chemistry reviews*, 397, pp. 1-13.
- Liu, S., Xie, L., Zheng, J., Jiang, R., Zhu, F., Luan, T., Ouyang, G. (2015), "Mesoporous TiO₂ nanoparticles for highly sensitive solid-phase microextraction of organochlorine pesticides", *Analytica chimica acta*, 878, pp. 109-117.
- López-Blanco, R., Moreno-González, D., Nortes-Méndez, R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., Gilbert-López, B. (2018), "Experimental and theoretical determination of pesticide processing factors to model their behavior during virgin olive oil production", *Food chemistry*, 239, pp. 9-16.
- López-Feria, S., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2009), "One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic–mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils", *Journal of Chromatography A*, 1216:43, pp. 7346-7350.
- López-Feria, S., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2009), "Surfactant-coated carbon nanotubes for the liquid–liquid extraction of phthalates and other migrants in virgin olive oils", *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395:3, pp. 737-746.
- Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M., Yuan, Z., Wang, X., Martínez, M. (2019), "Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism", *Environmental research*, 170, pp. 260-281.
- Mafra, I., Coimbra, M.A. (2004), "17 - Improving the texture of processed fruit: the case of olives" in *Texture in Food* Elsevier Ltd, pp. 410-431.
- Maranata, G.J., Surya, N.O., Hasanah, A.N. (2021), "Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique", *Heliyon*, 7:1, pp. e05934.

- Martins, N., Carreiro, E.P., Simões, M., Cabrita, M.J., Burke, A.J., Garcia, R. (2015), "An emerging approach for the targeting analysis of dimethoate in olive oil: The role of molecularly imprinted polymers based on photo-iniferter induced "living" radical polymerization", *Reactive & functional polymers*, 86, pp. 37-46.
- Martins, N., Carreiro, E.P., Locati, A., Ramalho, J.P.P., Cabrita, M.J., Burke, A.J., Garcia, R. (2015), "Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: An integrated computational-assisted approach", *Journal of Chromatography A*, 1409, pp. 1-10.
- Nishchaya, K., Rai, V.K., Bansode, H. (2023), "Methacrylic acid as a potential monomer for molecular imprinting: A review of recent advances", *Results in materials*, 18, pp. 100379.
- Peng, Y., He, S., Wang, F., Zheng, H., Meng, Z. (2022), "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by magnetic solid phase extraction based on a mesoporous molybdenum disulfide/graphite prior to gas chromatography-mass spectrometry", *Microchemical journal*, 183, pp. 108146.
- Pereira, J., Selbourne, M.d.C., Poças, F. (2019), "Determination of phthalates in olive oil from European market", *Food control*, 98, pp. 54-60.
- Plastiras, O., Deliyanni, E., Samanidou, V. (2021), "Applications of Graphene-Based Nanomaterials in Environmental Analysis", *Applied sciences*, 11:7, pp. 3028.
- Poole, C.F. (2020), "Metal-Organic Frameworks" in *Solid-Phase Extraction* Elsevier, United States, pp. 1.
- Ramar, V., Balraj, A. (2022), "Critical Review on Carbon-Based Nanomaterial for Carbon Capture: Technical Challenges, Opportunities, and Future Perspectives", *Energy & fuels*, 36:22, pp. 13479-13505.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., Quiles, J.L. (2006), "Chemical composition, types and characteristics of olive oil" in *Olive Oil and Health* CABI, Wallingford, UK, pp. 45-62.
- Rashidi, L., Faraji Sarabmirza, R., Joolaei Ahranjani, P., Hadi Jume, B., Gholami, Z., Rashid Nodeh, H. (2022), "Dispersive clean-up process based on a magnetic graphene oxide nanocomposite for determination of 2-glycerol monopalmitate in

olive oil prior to GC-FID and GC-MS analysis", *Journal of the science of food and agriculture*, 102:3, pp. 995-1001.

- Recomendación de la Comisión de 10 de junio de 2022 relativa a la definición de nanomaterial (Texto pertinente a efectos del EEE) (2022/C 229/01)
- Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1604 de la Comisión de 27 de septiembre de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n.º 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis
- Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2105 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se establecen las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva
- Reglamento (UE) No 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios
- Reglamento Delegado (UE) 2022/2104 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se completa el Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y el Consejo, en lo que respecta a las normas de comercialización del aceite de oliva, y por el que se derogan el Reglamento (CEE) n.º 2568/91 de la Comisión y el Reglamento de Ejecución (UE) n.º 29/2012 de la Comisión
- Roverso, M., Seraglia, R., Dogra, R., Badocco, D., Pettenuzzo, S., Cappellin, L., Pastore, P., Bogialli, S. (2022), *Single-Walled Carbon Nanohorns as Boosting Surface for the Analysis of Low-Molecular-Weight Compounds by SALDI-MS*, MDPI AG, pp. 5027
- Sarafray-Yazdi, A., Razavi, N. (2015), "Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques", *TrAC, Trends in analytical chemistry (Regular ed.)*, 73, pp. 81-90.
- Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., Marzouki, L. (2018), "Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice", *Toxicology Reports*, 5, pp. 189-195.
- Sfoog, A.A.A., Bakar, A.B., Rahim, N.A., Mahamod, W.R.W., Hashim, H., Soh, S.K.C (2022) "Recent Advances and Future Prospects of Molecular Imprinting

Polymers as a Recognition Sensing System for Food Analysis: A Review” *Indonesian Journal of Chemistry*, 22:6, pp. 1737-1758.

- Shahr, T., Tal, N., Mandler, D. (2016), "Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application", *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, 495, pp. 11-19.
- Shaipulizan, N.S., Md Jamil, S.N.A., Kamaruzaman, S., Subri, N.N.S., Adeyi, A.A., Abdullah, A.H., Abdullah, L.C. (2020), "Preparation of Ethylene Glycol Dimethacrylate (EGDMA)-Based Terpolymer as Potential Sorbents for Pharmaceuticals Adsorption", *MDPI AG*, 12:2, pp.423
- Shen, Q., Yang, M., Li, L., Cheung, H. (2014), "Graphene/TiO₂ nanocomposite based solid-phase extraction and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for lipidomic profiling of avocado (*Persea americana* Mill.)", *Analytica Chimica Acta*, 852, pp. 153-161.
- Shen, Q., Dong, W., Yang, M., Baibado, J.T., Wang, Y., Alqouqa, I. Cheung, H. (2013), "Lipidomic study of olive fruit and oil using TiO₂ nanoparticle based matrix solid-phase dispersion and MALDI-TOF/MS", *Food research international*, 54:2, pp. 2054-2061.
- Singh, J., Jindal, N., Kumar, V., Singh, K. (2023), "Role of green chemistry in synthesis and modification of graphene oxide and its application: A review study", *Chemical physics impact*, 6, pp.100185.
- Targuma, S., Njobeh, P.B., Ndungu, P.G. (2021), "Current Applications of Magnetic Nanomaterials for Extraction of Mycotoxins, Pesticides, and Pharmaceuticals in Food Commodities", *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26:14, pp. 4284.
- Tena, N., Aparicio-Ruiz, R., Koidis, A., García-González, D.L. (2018), "Analytical Tools in Authenticity and Traceability of Olive Oil" in *Food Traceability and Authenticity*, 1st edn, CRC Press, pp. 232-260.
- Tuck, K.L., Hayball, P.J. (2002), "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Elsevier BV, 13:11, pp. 636-644
- Vasapollo, G., Sole, R.D., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G. (2011), "Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective", *International Journal of Molecular Sciences*, 12:9, pp. 5908-5945.

- Voss, K.A., Smith, G.W., Haschek, W.M. (2007), "Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity", *Animal feed science and technology*, 137:3, pp. 299-325.
- Wabaidur, S.M., AlAmmari, A., Aqel, A., AL-Tamrah, S.A., Allothman, Z.A., Ahmed, A.Y.B.H. (2016), "Determination of free fatty acids in olive oils by UPHLC–MS", *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1031, pp. 109-115.
- Wang, J., Wang, Z., Wang, W., Wang, Y., Hu, X., Liu, J., Gong, X., Miao, W., Ding, L., Li, X., Tang, J. (2022), "Synthesis, modification and application of titanium dioxide nanoparticles: a review", *Nanoscale*, 14:18, pp. 679-6734.
- Wang, J., Wang, Y., Guo, X., Wang, P., Zhao, T., Wang, J. (2018), "Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric determination of benzo[a]pyrene using a MIL-101(Fe) matrix", *Mikrochimica acta (1966)*, 185:3, pp. 175-6.
- Weggler, B.A., Gruber, B., Teehan, P., Jaramillo, R., Dorman, F.L. (2020), "Inlets and sampling" in *Basic Multidimensional Gas Chromatography* Elsevier Science & Technology, United States, pp. 141-203.
- Wu, J., Zhang, H., Peng, X. (2020), "Rapid determination of organophosphorus pesticides in edible vegetable oils by direct microextraction using magnetic mesoporous silica microspheres", *Separation science plus*, 3:5, pp. 158-166.
- Yang, M., Yi, J., Wei, C., Peng, X., Yang, Z., Zhao, L., Jiang, X., Tu, F. (2023), "Determination of fumonisins in edible vegetable oil by MIL-101(Cr) based dispersive solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of food composition and analysis*, 117, pp. 105099.
- Yu, L., Zhang, Y., Hu, C., Wu, H., Yang, Y., Huang, C., Jia, N. (2015), "Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy immunosensor for the detection of AFB1 in olive oil", *Food chemistry*, 176, pp. 22-26.
- Zhang, S., Yang, Q., Li, Z., Wang, W., Zang, X., Wang, C., Wang, Z. (2018), "Solid phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oils using iron (III)-based metal-organic framework/graphene oxide coating", *Food chemistry*, 263, pp. 258-264.

- Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, Z., Wu, X., Chen, W., Zhu, Y., Fang, C., Zhao, Y. (2017), "Three-dimensional ionic liquid functionalized magnetic graphene oxide nanocomposite for the magnetic dispersive solid phase extraction of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils", *Journal of Chromatography A*, 1489, pp. 29-38.
- Zhao, Q., Wei, F., Luo, Y., Ding, J., Xiao, N., Feng, Y. (2011), "Rapid Magnetic Solid-Phase Extraction Based on Magnetic Multiwalled Carbon Nanotubes for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oils", *Journal of agricultural and food chemistry*, 59:24, pp. 12794-12800.
- Zhou, N., Liu, P., Su, X., Liao, Y., Lei, N., Liang, Y., Zhou, S., Lin, W., Chen, J., Feng, Y., Tang, Y. (2017), "Low-cost humic acid-bonded silica as an effective solid-phase extraction sorbent for convenient determination of aflatoxins in edible oils", *Analytica chimica acta*, 970, pp. 38-46.