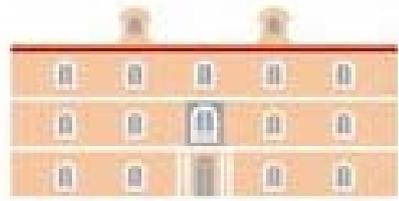




Universidad
Politécnica
de Cartagena



industriales
etsii UPCT

IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES EN ZUMOS DE FRUTAS ROJAS

Titulación:	Máster en Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos.
Intensificación:	Especialidad en Investigación
Alumna:	Jacinta Collado González
Directores de proyecto:	Mercedes Alacid Cárceles Jose María Obón de Castro

Cartagena, 9 de Diciembre de 2011.



Proyecto Fin de Máster

TÍTULO: Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas
PROYECTO INVESTIGADOR

ÍNDICE	Página
CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN	
1.- La importancia de los zumos de fruta	5
1.1.- La importancia de las frutas en nuestra dieta	5
1.2.- Beneficios de los zumos de frutas rojas para la salud	6
2.- Los zumos de frutas	9
2.1.-Definición y tipos	9
2.2.- La calidad y autenticidad de los zumos de frutas rojas	12
2.2.1.- Perfil de los polifenoles	13
2.2.1.1.- Ácidos fenólicos	14
2.2.1.2.- Flavonoides	15
2.2.1.3.- Estilbenos	20
2.2.1.4.- Lignanos	21
2.2.1.5.- Perfil de los antocianos	22
2.3.- Comercialización de los zumos	23
3.- Los zumos de frutas rojas	27
3.1.- Mirtilo (Blueberry)	28
3.2.- Arándano europeo (Cranberry)	29
3.3.- Grosella (Blackcurrant)	30
3.4.- Cereza (Cherry)	31
3.5.- Uva tinta (Black grape)	32
CAPÍTULO 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	
1.- Justificación y objetivos	33
2.- Estructura del trabajo	34
CAPÍTULO 3.- PLAN DE TRABAJO	
1.- Plan de trabajo	35
CAPÍTULO 4.- MATERIALES Y MÉTODOS	
1.- Materiales	38
1.1.- Reactivos empleados	38
1.2.- Patrones empleados	38
1.3.- Muestras de frutas rojas	39
2.- Métodos	40
2.1.- Métodos de análisis de polifenoles por HPLC	40
2.2.- Método de medida del detector de fotodiodos (PDA).	43
2.3.- Métodos de medida de espectros de masas	46
2.4.- Métodos de medida de preparación de patrones y de muestras	51
2.5.- Condiciones de análisis por HPLC con detector de fotodiodos y detector de masas	52

CAPÍTULO 5.- RESULTADOS

1.- Análisis por HPLC de los patrones estudiados	54
1.1.- Análisis por UV VISIBLE de los patrones estudiados	54
1.2.- Análisis por detector de masas de los patrones estudiados	57
2.- Análisis por HPLC de los zumos de frutas rojas	63
2.1.- Mirtilo (Blueberry)	63
2.2.- Arándano europeo (Cranberry)	84
2.3.- Grosella (Blackcurrant)	98
2.4.- Cereza (Cherry)	114
2.5.- Uva tinta (Black grape)	128
3.- Resumen de los polifenoles identificados en estas cinco frutas	141
3.1.- Antocianos identificados	141
3.2.- Flavonoles identificados	142
3.3.- Ácidos fenólicos identificados	143
3.4.- Flavanoles, estilbenos y ácido ascórbico identificados	144

CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES

1.- Conclusiones	145
------------------	-----

CAPÍTULO 7.- BIBLIOGRAFÍA

1.- Bibliografía	146
------------------	-----

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

1.- LA IMPORTANCIA DE LOS ZUMOS DE FRUTA

1.1.- La importancia de las frutas en nuestra dieta

Las plantas forman parte de la dieta humana y contienen componentes bioactivos que pueden ejercer efectos fisiológicos más allá de la nutrición, promoviendo la salud humana y siendo beneficiosos.

A pesar de que las frutas y hortalizas frescas han formado parte de la dieta humana desde siempre, su importancia nutricional ha sido demostrada recientemente. Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo regular de frutas y vegetales está asociado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, problemas cardiovasculares, Alzheimer, derrame cerebral, cataratas o el empeoramiento funcional asociado a la edad, así como también ayudan al control de un peso adecuado (Stintzing y Carle, 2004 y Schieber *et al.*, 2001). Muchas de estas enfermedades se han atribuido al consumo de dietas inadecuadas, debido al moderno estilo de vida urbana.

La imagen pública de las frutas y las hortalizas ha mejorado considerablemente debido a los avances de la Nutrición, y los profesionales de la salud, especialmente en los países desarrollados, recomiendan aumentar el consumo de frutas y hortalizas por ser pobres en grasas y ricas en fibras dietética y disminuir el consumo de los alimentos de origen animal. Así mismo, la fundación mundial de investigación contra el cáncer promueve durante todo el año el consumo de una variedad de verduras y frutas, la ingestión de un máximo de cinco o más porciones de fruta y verduras al día. Los zumos de fruta pueden ayudar a los consumidores a alcanzar este objetivo.

En el estudio llevado a cabo sobre la dieta europea a petición de la Comisión Europea y que sirvió de base para el desarrollo de las directrices de la UE para las dietas saludables y estilos de vida, se hizo la siguiente recomendación:

“... El consumo de frutas y verduras en una población debe ser de un mínimo de 400g/día. Dentro de “Las frutas y hortalizas” quedan excluidas las patatas y las raíces de almidón, pero se incluye los zumos de frutas “(Fuente:” Nutrición y Salud Pública “, Informes y Memorias EURODIET, Volumen 4, 2001)..



Figura 1.1: Variedad de frutas en la dieta

1.2.- Beneficios de los zumos de frutas rojas para la salud

Los zumos se pueden considerar como una forma del aporte diario de frutas y hortalizas, dentro de las campañas de cinco vegetales al día en la mayoría de los países europeos: Francia, Reino Unido, Alemania, Suecia, Austria, Finlandia, Bélgica, Polonia, Noruega, Irlanda, Dinamarca, Italia y España.

Una estrategia nutricional surgida hace pocos años es la denominada **zumoterapia**. Básicamente se trata de consumir las frutas en forma de zumo y no crudas buscando la máxima asimilación o disponibilidad de la gran cantidad de vitaminas y minerales que aportan las frutas y verduras.

Los componentes que aporta el consumo de frutas en general y que son beneficiosos para la salud de los consumidores, se pueden clasificar en:

- Agua: en general todas las frutas tienen un alto porcentaje de agua, por ejemplo la grosella negra contiene un 90% de agua.
- Vitaminas: las frutas son ricas en vitaminas, la fresa es una buena fuente de vitamina C cuya acción es actuar como antioxidante, la uva tinta destaca por la presencia de ácido fólico y vitamina B6...
- Sales minerales: la frambuesa destaca por su riqueza en potasio, magnesio y calcio.
- Hidratos de carbono: la cereza destaca por su alto contenido en fructosa.
- Fibra: el arándano aporta mucha fibra que mejora el tránsito intestinal.
- Ácidos orgánicos: por ejemplo en la fresa destaca la presencia de ácido cítrico (acción desinfectante), málico, oxálico y salicílico (acción anticoagulante y antiinflamatoria).



Figura 1.2: Ejemplos de zumos de frutas rojas.

Además de todos estos componentes principales de las frutas en general, en las frutas rojas cabe destacar la presencia de **polifenoles** como los antocianos que contienen efectos beneficiosos por sus propiedades.

Según la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea, los jugos envasados son una fuente importante de vitaminas y minerales de la dieta total. Un estudio europeo resaltó el hecho de que el 100% jugos de frutas y verduras ayuda a reducir los factores de riesgo relacionados con ciertas enfermedades. La AIJN atribuye numerosos beneficios para la salud a los polifenoles presentes en las verduras y sobre todo en las frutas rojas. En principio, los polifenoles se absorben rápidamente tanto en el estómago como en el intestino delgado y son metabolizados en el organismo, conservando sus propiedades antioxidantes.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Los polifenoles son un grupo heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos fenólicos. Se pueden clasificar en grupos como los ácidos fenólicos (benzóicos y cinámicos), flavonoides (antocianinas, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas), estilbenos y lignanos. El interés en los compuestos fenólicos de los alimentos ha aumentado de forma importante debido a su alta capacidad antioxidante y su positivo efecto en la salud humana. De hecho, algunos estudios han demostrado que muchos flavonoles y ácidos fenólicos son antioxidantes considerablemente más potentes que la vitamina C y la vitamina E (Vinson et al., 2001). Por estudios realizados se ha demostrado que hay una correlación entre el contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides y la actividad antioxidante de un alimento (Middleton et al., 2002; Ehlenfeldt y Prior, 2001; Manach et al., 2004).

Según un informe del instituto Pasteur para la AIJN (Lecerf, J.M.; 2006) y un artículo De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008, algunas de las propiedades beneficiosas de los zumos para la salud humana son las siguientes:

- ❖ **Propiedades cardiovasculares:** La comunidad científica ha demostrado que la ingesta de una alta cantidad de polifenoles tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciándolo mejorando la circulación sanguínea e impidiendo la formación de trombos en los vasos sanguíneos. Estas propiedades se le atribuyen fundamentalmente al flavonoide quercetina.
- ❖ **Propiedades anticancerígenas:** Numerosos estudios han demostrado que muchos polifenoles, especialmente flavonoides, inhiben la iniciación, promoción y progresión de células cancerosas y por consiguiente de tumores.
- ❖ **Propiedades para reducir el colesterol:** La comunidad científica demuestra que la ingesta de zumo de uva tinta concentrado aumenta la capacidad antioxidante y protege de la oxidación del colesterol LDL produciendo beneficios.
- ❖ **Propiedades antioxidantes:** en las plantas los polifenoles pertenecientes al grupo de los flavonoides actúan como antioxidantes. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres.
- ❖ **Propiedades antiinflamatorias y analgésicas:** Polifenoles como la hesperidina, presente en la naranja, se emplean en el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos, son otro grupo de polifenoles que tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides.
- ❖ **Propiedades beneficiosas para la diabetes:** Los antocianos presentan efectos muy beneficiosos ante la diabetes. Por un lado intervienen en la absorción de la glucosa, y por otro ejercen protección a las células pancreáticas. Estudios demuestran que los antocianos pueden estimular la secreción de insulina, siendo la pelargonidina el más potente estimulante (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- ❖ **Propiedades gástricas:** Esta propiedad está relacionada con las propiedades antiinflamatorias, puesto que el grupo de los flavonoides tiene la capacidad de prevenir procesos de inflamación gástrica. Ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica. También se puede citar el caso de la cianidina (una antocianidina) que protege los daños gástricos de la mucosa causados por la ingesta de aspirina
- ❖ **Propiedades oculares:** Se ha observado que el consumo de la grosella tiene un efecto positivo sobre la visión nocturna facilitando la adaptación a la oscuridad. También se ha demostrado que en el caso de pacientes con miopía, los antocianos disminuyen los síntomas (Lee, 2005).
- ❖ **Previenen la fragilidad del sistema vascular capital y venoso:** Los polifenoles aumentan la resistencia y disminuyen la fragilidad capilar favoreciendo que estos vasos se rompan evitando de este modo el sangrado. Los polifenoles con mejores resultados ante el sistema vascular y venoso son los flavonoides como la rutina y la hesperidina (presentes en los cítricos) y la quercetina presente en muchas frutas.
- ❖ **Propiedades antimicrobianas:** La comunidad científica ha demostrado que polifenoles del tipo de los isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos tienen propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.
- ❖ **Propiedades de retrasar enfermedades neurodegenerativas:** Mediante un estudio se ha comprobado que el consumo de frutas y jugos de verduras, que contienen una alta concentración de polifenoles, disminuye el riesgo de incidencia de enfermedad de Alzheimer. Los zumos de frutas y hortalizas pueden desempeñar un papel importante en el retraso de la aparición de la enfermedad de Alzheimer.
- ❖ **Remedio tradicional ante las infecciones urinarias:** Mediante estudios aleatorios clínicos se ha demostrado que hay una disminución de la frecuencia de las infecciones urinarias en mujeres que consumen de zumo de arándano. Estudios sobre los mecanismos disponibles muestran que estos efectos beneficiosos son debidos a la inhibición de la adhesión de la E. coli a la mucosa urinaria. Esto parece estar asociado a la presencia de proantocianidinas en el zumo de arándano.

De todos los zumos que hoy en día se encuentran en el mercado caben destacar los zumos de frutas rojas debido a sus beneficios para la salud. Entre las frutas rojas conocidas se puede citar: mirtilo, arándano, grosella, uva tinta, cereza, fresa, frambuesa, ciruela, higo chumbo, baya de sauco, granada, etc.

Cada tipo de fruta roja presenta diferentes compuestos responsables de su coloración. El color rojo de estas frutas no sólo depende del tipo de fruta que sea sino también de la variedad de la fruta, por ejemplo el arándano europeo y el americano tienen distinta composición. Depende también del grado de maduración de los órganos vegetales, de una alteración en la fruta debida a algún microorganismo, del modo de procesar la fruta, de las condiciones de almacenamiento, etc. Los compuestos rojos solubles en agua pueden clasificarse en dos grandes grupos: las **antocianinas** y las **betacianinas**.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

El interés general que la industria alimentaria muestra por estos zumos se centra en los que contienen antocianinas. Como fuente mayoritaria de este tipo de compuestos se puede citar algunos frutos rojos como el mirtilo, la cereza, la grosella y la uva tinta. Así, 100gramos de estas frutas pueden aportar hasta 500 miligramos de antocianinas.

En estudios recientes se pone de manifiesto que las antocianinas son glucósidos producidos naturalmente durante el metabolismo de las plantas y se encuentran asociados a moléculas de azúcares como glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa o xilosa. En estos estudios se muestra que estas antocianinas están implicadas en muchas actividades biológicas que pueden reducir el riesgo de enfermedad coronaria, inhibir la agregación plaquetaria, reducir el riesgo de infarto y la insuficiencia vascular (Burns et al., 2000). Además, los extractos de antocianinas provenientes de varios tipos de frutas rojas pueden ejercer actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, incluso pueden mostrar efectos neuroprotectores. Otros efectos beneficiosos son la mejora de visión y prevención de la diabetes y que inducen la apoptosis (Katsube et al.,2003).

Con respecto a las betacianinas, también se han realizados estudios que demuestran su efecto antiviral y antimicrobiano (Strack et al.,2003). Además, se ha demostrado la actividad antioxidante de las betalainas y su papel en la quimiopreención de cánceres de pulmón y de piel, inhibiendo la proliferación de células tumorales humanas(Muntha et al.,2005 y Srekanth et al.,2007). Como fuentes importantes de betalainas están el higo chumbo o también la remolacha.

2.- LOS ZUMOS DE FRUTAS

2.1.- Definición y tipos

La Comisión del Codex Alimentarius fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para facilitar el comercio internacional de alimentos y garantizar a los consumidores su calidad, seguridad e inocuidad. El código ampliamente aceptado y adoptado se ocupa de la protección del consumidor así como de la producción y comercio de los alimentos a escala mundial, regional, nacional y local. Uno de sus conceptos básicos es “un alimento no es nutritivo si no es inocuo”.

Las ventajas de su aplicación son:

Los beneficios de su aplicación son los siguientes:

- a) Ayuda a que se cumpla el derecho fundamental a tener acceso a alimentos que sean de buena calidad, inocuos y nutritivos
- b) Elimina barreras no arancelarias y artificiales al comercio, lo que permite el acceso a los mercados a quienes producen, elaboran y comercializan alimentos
- c) Protege la salud de los consumidores.
- d) Hace que las reglas sean claras para todos, con lo que:
 - d.1) Facilita la comercialización de los alimentos
 - d.2) Establece prácticas equitativas en el comercio de los alimentos.
 - d.3) Permite la normalización de conceptos y puntos de calidad.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Dentro de este codex alimentarius se encuentra el **CODEX STAN 247-2005**, que es un código específico para zumos. Conforme a las disposiciones pertinentes de la comisión del codex alimentarius, este código define como zumo (jugo) de fruta el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha.

La legislación de zumos vigente en España está regulada por:

- **Real Decreto 462/2011**, de 1 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana.
- **Real Decreto 1050/2003**, de 1 de Agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares destinados a la alimentación humana (B.O.E. 02.08.2003)
- **REAL DECRETO 1518/2007**, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables.

El Real Decreto 1050/2003, define un «zumo de frutas» como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. Se podrá reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las celdillas que haya perdido con la extracción.

El Real Decreto 1518/2007 establece determinados parámetros analíticos de autenticidad y calidad, que permitan evaluar la composición de los zumos de frutas, a fin de asegurar el control de su calidad comercial y evitar el fraude al consumidor y la competencia desleal.

El Real Decreto 462/2011 establece que: «El producto obtenido deberá presentar características organolépticas y analíticas por lo menos equivalentes a las del tipo medio de zumo obtenido, conforme a las disposiciones del reglamento, de frutas de la misma especie».

La elaboración de los zumos podrá realizarse junto con sus pepitas, semillas y pieles, que normalmente no se incorporan al zumo, aunque serán aceptables algunas partes o componentes de pepitas, semillas y pieles que no puedan ser eliminadas mediante las (BPF) buenas prácticas de fabricación.

Los zumos se preparan mediante procedimientos adecuados que mantienen las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de los zumos de la fruta de la que proceden. Podrán ser turbios o claros y podrán contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y proceder del mismo tipo de fruta. Podrán añadirse pulpa y células obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta (CODEX STAN 247-2005).

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Figura 1.3: distintos tipos de zumos de frutas

Según el Código alimentario de Zumos (CODEX STAN 247-2005) y el RD 1050/2003, los tipos de zumos que podemos encontrar en el mercado son:

- ❖ **Zumo de fruta:** líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados.
- ❖ **Zumo concentrado de fruta:** producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies, por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, dicha eliminación será de al menos un 50%.
- ❖ **Zumo de fruta a base de concentrado:** producto obtenido mediante la incorporación al zumo de frutas concentrado de la cantidad de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y la restitución de los aromas, y en su caso, la pulpa y las células perdidas del zumo, pero recuperados en el proceso de producción del zumo de frutas que se trate o de zumo de frutas de la misma especie. El agua añadida deberá presentar las características adecuadas, especialmente desde el punto de vista químico, microbiológico y organoléptico, con el fin de garantizar las propiedades esenciales del zumo.
- ❖ **Zumo de fruta deshidratado o en polvo:** producto obtenido a partir de frutas de, una o varias especies, por eliminación física de la totalidad del agua.
- ❖ **Néctar de fruta:** producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel a los productos de zumo definidos anteriormente y al puré de frutas o a una mezcla de estos productos. La adición de azúcares y/o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20% del peso total del producto acabado.
- ❖ **Puré de frutas utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas:** producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos como el tamizado, triturado o desmenuzado de la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el zumo. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles; y podrán añadirse pulpa y células obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.
- ❖ **Puré concentrado de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas:** producto obtenido mediante la eliminación física de agua del puré de fruta en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix en un 50% más que el valor Brix establecido para el zumo reconstituído de la misma fruta. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y proceder del mismo tipo de fruta.

2.2.- La calidad y la autenticidad de los zumos de frutas rojas

El código alimentario de zumos (CODEX STAN 247-2005), presenta los factores esenciales de composición, calidad y autenticidad de los zumos y néctares de frutas, indicando para cada caso los métodos de análisis que se deben seguir para la verificación de dichos factores. En este código, la autenticidad se define como el mantenimiento de las características físicas del producto, químicas, organolépticas y las características nutricionales de la(s) fruta(s) de la(s) que procede(n). Como criterio de calidad se establece que los zumos y néctares de frutas deberán tener el color, aroma y sabor característico del zumo del mismo tipo de fruta del que proceden.

El RD 1518/2007, de 16 de noviembre, establece los parámetros mínimos de calidad y autenticidad en zumos y los métodos de análisis aplicables a cada tipo de fruta. Este Real Decreto pone de manifiesto los parámetros para los tipos de frutas siguientes: naranja, piña, mandarina, albaricoque, pera, manzana y melocotón. Así mismo, se indican los métodos aplicables a cada fruta. El cumplimiento de estos parámetros mínimos, no implica que no tengan que ajustarse también a otros que afecten a su autenticidad y calidad, y especialmente los recogidos en la Norma del Codex Alimentarius y en el Código de Prácticas para evaluación de zumos de frutas y vegetales de la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN). Esta asociación presenta una guía de referencia para cada tipo de fruta como criterio de evaluación de calidad y autenticidad de los zumos de las diferentes frutas.

A modo general en todos los zumos, los parámetros: grados brix, maltosa e isomaltosa, deben considerarse como parámetros absolutos de autenticidad y calidad para los que no deben admitirse tolerancias. Específicamente en el caso de los zumos de frutas rojas, el parámetro de **perfil de antocianos** se considera un parámetro crítico para evaluar la calidad y la autenticidad de los zumos. Para este caso, el método empleado es una modificación del **Método IFU nº 71** de 1998.

El color es uno de los factores críticos dentro de las propiedades organolépticas que influyen en la aceptación de los alimentos, en este caso el zumo, por el consumidor. Por ello, a veces se influyen subjetivamente otras propiedades como son el olor y/o el sabor. Pero hay que decir que estas modificaciones hechas de forma fraudulenta con el fin de enmascarar la menor calidad o el deterioro del zumo no están permitidas. Un ejemplo de esto sería un zumo de arándano grosella y baya de saúco al cual sin mencionarlo en la etiqueta se le ha añadido cereza, frambuesa, fresa, uva tinta, etc.

El análisis de los antocianos es útil no sólo para descubrir adulteraciones, sino también aquellos errores que hayan tenido lugar en el procesado y de los que no se sea consciente de ellos, como por ejemplo, fallos en la clasificación de la frutas, (mezcla de cereza dulce y amarga).

2.2.1.- Perfil de los polifenoles

Los polifenoles son producto del metabolismo secundario de las plantas. Químicamente son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que están unidos uno o más grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos se encuentran en una gran variedad de plantas comestibles, frutos, hortalizas, bebidas como té, café, cerveza y vino tinto, en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas como las de leguminosas. Los frutos contienen concentraciones relativamente altas de derivados de quercetina, kaempferol, hesperetina, etc. y ácidos fenólicos entre ellos los derivados cinámicos.

Hortalizas como el tomate, cebolla, ajos, pimientos, etc. contienen sobre todo altas concentraciones de derivados de quercetina y de miricetina. El aporte de polifenoles en la dieta puede estar entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes, se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas.

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, que se pueden clasificar en diferentes grupos atendiendo al número de anillos fenólicos que contienen.

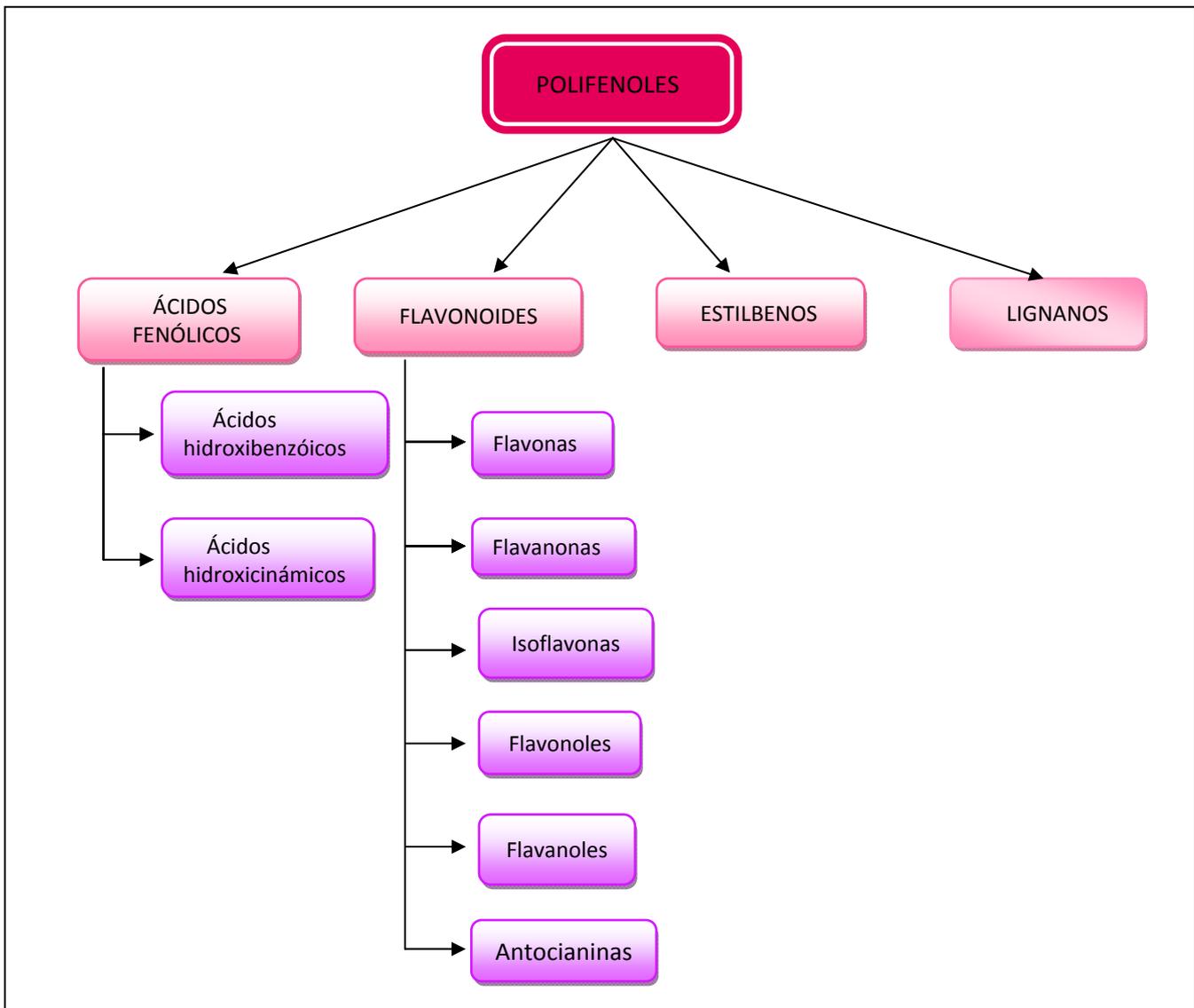


Figura 1.4: Esquema de los polifenoles

A continuación se explican los distintos polifenoles:

2.2.1.1.- Ácidos fenólicos:

❖ Ácidos hidroxibenzóicos

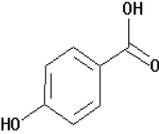
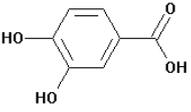
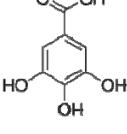
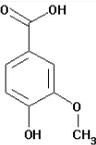
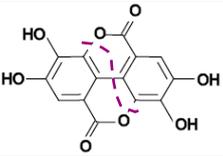
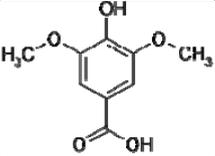
Los ácidos hidroxibenzóicos tienen una estructura básica C₆-C₁, se encuentran libres y ligados como los ésteres de ácido benzoico en muchas especies vegetales y animales. Los principales son los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecúlico, vanílico y siríngico. Su contenido en plantas comestibles por lo general es bajo salvo en ciertas frutas rojas, las cebollas o el rábano negro (Manach et al., 2004).

Químicamente se trata de derivados del ácido hidroxibenzóico cuya estructura está formada por un anillo aromático unido a un carbono a partir de fenilpropanoides a los que se les deleccionan dos carbonos de la cadena propánica.

Los ácidos hidroxibenzóicos son componentes de estructuras complejas como los taninos hidrolizables (gallotaninos en mangos y elagitaninas en frutas rojas como las granadas, fresas y moras).

En la tabla 1.1 se muestran los ácidos hidroxibenzóicos estudiados en este proyecto.

Tabla 1.1: Estructura de los ácidos hidroxibenzóicos

Ácido 4- hidroxibenzóico	Ácido 3,4- dihidroxibenzóico	Ácido gálico
C ₇ H ₆ O ₃	C ₇ H ₆ O ₄	C ₇ H ₆ O ₅
		
Ácido vanílico	Ácido elágico	Ácido siríngico
C ₈ H ₈ O ₄	C ₁₄ H ₆ O ₈	C ₉ H ₁₀ O ₅
		

❖ Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal, cuyos principales representantes son el clorogénico, ácido ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinápico, de los cuales el ácido ferúlico y *p*-cumárico son los de mayor abundancia en la naturaleza.

Químicamente su esqueleto está formado por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados ácidos hidroxicinámicos por la sustitución del grupo -OH en el anillo aromático.

Por lo general, este tipo de compuestos se encuentran esterificados en la pared celular vegetal, por lo tanto, poseen una baja solubilidad. Destacan por ser unos buenos agentes antioxidantes.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

La estructura de los ácidos cinámicos más representativos de este grupo se muestran en la figura 1.5 y en la tabla 1.2 quedan recogidos los ácidos hidroxicinámicos estudiados en este proyecto.

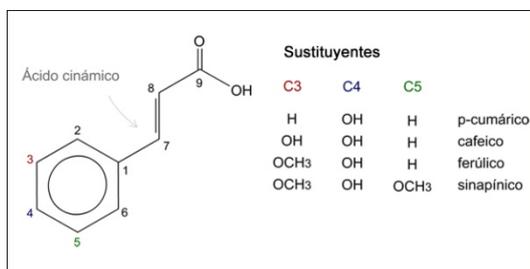
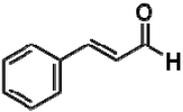
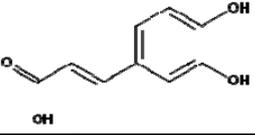
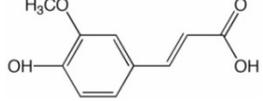
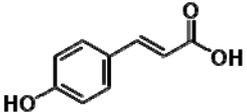
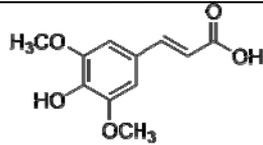
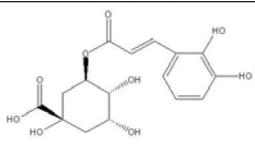


Figura 1.5: Imagen de las estructuras de los ácidos cinámicos más representativos.

Tabla 1.2: Estructura de los ácidos hidroxicinámicos

Ácido cinámico	Ácido caféico	Ácido ferúlico
$C_9H_8O_2$	$C_9H_8O_4$	$C_{10}H_{10}O_4$
		
Ácido p-cumárico	Ácido sinápico	Ácido clorogénico
$C_9H_8O_3$	$C_{11}H_{12}O_5$	$C_{16}H_{18}O_9$
		

2.2.1.2.- Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien les denominó como “vitamina P”. El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren colores amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente.

Los flavonoides son un grupo de moléculas que son producidas por el metabolismo secundario que, al igual que otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de la malonilcoenzima A) (Martínez M(2005)). Son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales. En la tabla 1.3 se exponen las estructuras generales de los flavonoides.

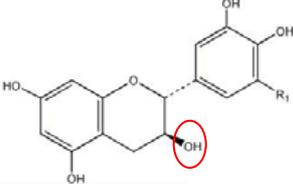
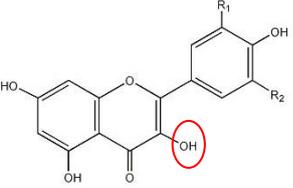
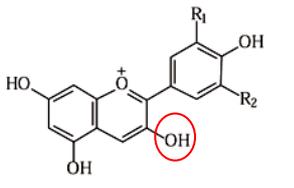
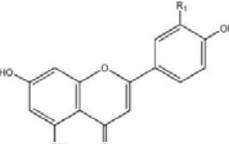
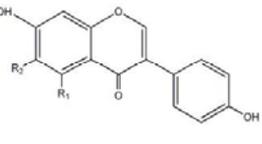
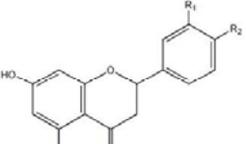
Son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 átomos de carbono que forman un anillo heterocíclico oxigenado.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La principal clasificación de los flavonoides se consigue atendiendo a la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3:

- 1.- Los flavonoides 3-hidroxi (flavanoles, flavonoles, flavanoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados).
 - 2.- Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas).
- (García-Alonso, 2005).

Tabla 1.3: Estructuras generales de los flavonoides

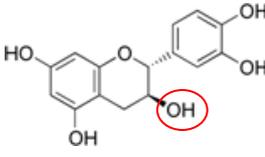
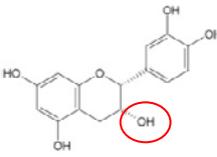
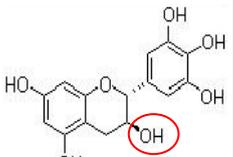
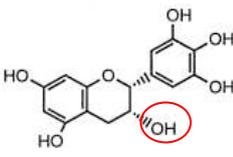
Flavanoles	Flavonoles	Antocianinas
		
Flavonas	Isoflavonas	Flavanonas
		

Por lo general, dentro de las plantas los estudios han mostrado que los flavonoides se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina GLICÓSIDOS, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina AGLICONAS FLAVONOIDES.

➤ Flavanoles

Los flavanoles predominantes son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina. Los flavanoles glicosilados son poco frecuentes. En la tabla 1.4 se presentan las estructuras de los flavanoles estudiados en este proyecto.

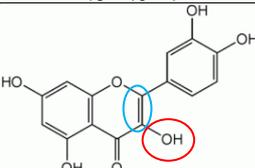
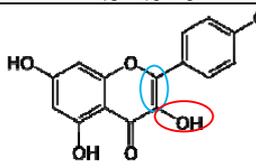
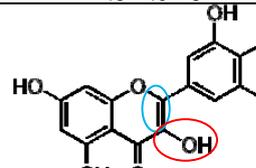
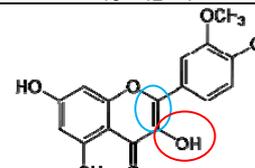
Tabla 1.4: estructura de los flavanoles

Catequina	Epicatequina	Galocatequina	Epigalocatequina
$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{14}O_7$	$C_{15}H_{14}O_7$
			

➤ **Flavonoles**

Los flavonoles se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Se conocen 450 tipos de agliconas y 900 tipos de glucósidos aproximadamente (Iwashina 2000), de los cuales la gran mayoría se presentan como O-glucósidos unidos en las posiciones 3 y/o 7. En la tabla 1.5 se muestran ejemplos importantes de agliconas: el **quercetina**, **kaempferol**, **Miricetina** e **isorhamnetina**.

Tabla 1.5: Estructura de ejemplos de los ácidos flavonoles

Quercetina	Kaempferol	Miricetina	Isorhamnetina
$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{15}H_{10}O_6$	$C_{15}H_{10}O_8$	$C_{16}H_{12}O_7$
			

➤ **Antocianinas**

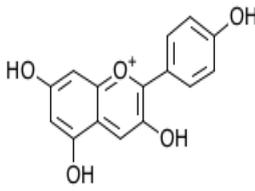
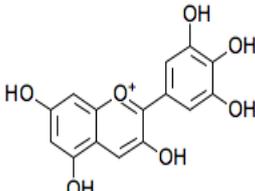
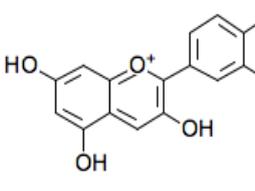
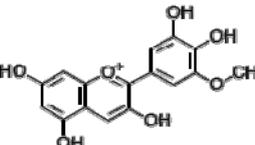
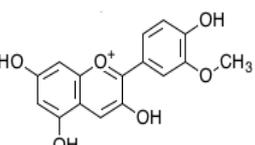
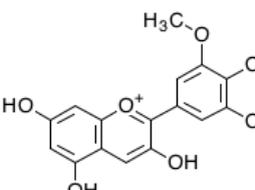
Químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión.

Las agliconas libres raramente existen en los alimentos, excepto posiblemente como componentes traza de las reacciones de degradación. De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la **pelargonidina**, la **delfinidina**, la **cianidina**, la **petunidina**, la **peonidina** y la **malvidina**, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa y la arabinosa y, ocasionalmente, la gentiobiosa, la rutinosa y la soforosa. Habitualmente unidos en las posiciones 3 y también 5, formando 3-O-glucósidos y 3,5-di-O-glucósidos. Las estructuras de las antocianidinas estudiadas son expuestas en la figura 1.11.

Las antocianidinas se caracterizan por la presencia de dos dobles enlaces, uno en la posición 1 y otro en el C3 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Las estructuras de las antocianidinas más importantes quedan plasmadas en la tabla 1.6.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 1.6: Estructura de las antocianidinas

Pelargonidina	Delfinidina	Cianidina
$[C_{15}H_{11}O_5^+]$	$[C_{15}H_{11}O_7^+]$	$[C_{15}H_{11}O_6^+]$
		
Petunidina	Peonidina	Malvidina
$[C_{16}H_{13}O_7^+]$	$[C_{16}H_{13}O_6^+]$	$[C_{17}H_{15}O_7^+]$
		

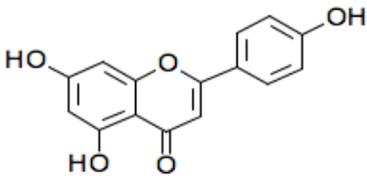
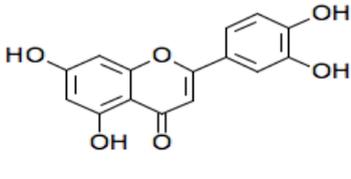
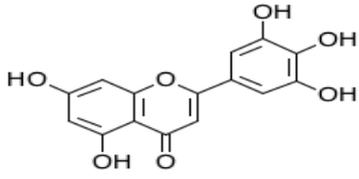
➤ Flavonas

Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos.

Se caracterizan porque tienen un doble enlace en el heterociclo en la posición 2-3 y el carbono 4 es un grupo carbonilo. El grupo hidroxilo del C3 de los grupos anteriores no se presenta en estas moléculas.

Hay tres flavonas importantes: la **trictina**, presente en el polen de algunas plantas, la **apigenina**, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y la **luteolina**, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos. En la tabla 1.7 se muestran las estructuras de estas tres flavonas.

Tabla 1.7: Estructuras de tres flavonas importantes

Apigenina	Luteolina	Trictina
$C_{15}H_{10}O_5$	$C_{15}H_{10}O_6$	$C_{15}H_{10}O_7$
		

➤ Isoflavonas

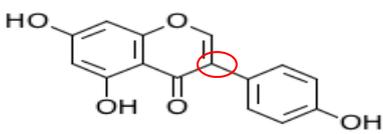
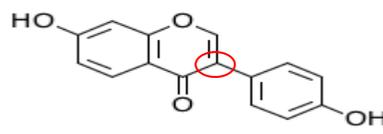
Las isoflavonas son sustancias diferentes a los esteroides endógenos humanos con capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. Las más importantes son la **genisteína** y la **daidzeína**, sus estructuras se pueden ver en la tabla 1.8.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Las flavonas presentan un anillo fenólico en la posición 2 mientras que las isoflavonas lo tienen sustituido en la posición 3.

La doble actividad de las isoflavonas (actuando a la vez como estrogénicas y antiestrogénicas), le confieren una serie de cualidades que permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes que protegen frente al desarrollo de cáncer de mama y reducir los efectos de la menopausia. Las Isoflavonas causan esto al competir con el propio estrógeno del cuerpo por los mismos sitios receptores en las células. Algunas de las enfermedades por estrógeno excesivo pueden disminuirse de esta manera. La mejor manera de consumir las isoflavonas es en la forma de soja (www.isoflavones.info)

Tabla 1.8: Estructura de dos isoflavonas importantes

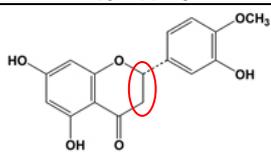
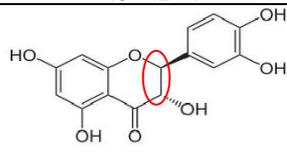
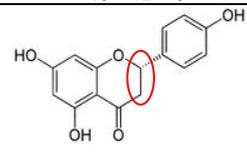
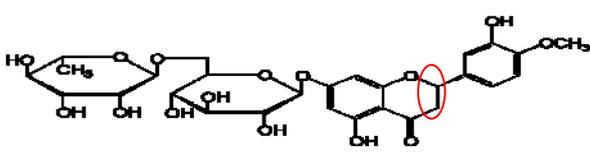
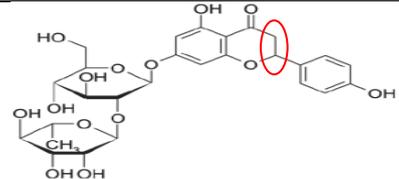
Genisteína	Daidzeína
$C_{15}H_{10}O_5$	$C_{15}H_{10}O_4$
	

➤ Flavanonas

Se diferencian de las flavonas en que la insaturación del heterociclo no está presente.

Se encuentran en los cítricos y son las responsables en muchos casos de su sabor amargo. Las más importantes son: La hesperitina, la naringenina y sus glicosilados correspondientes. Otra flavanona muy frecuente es la taxifolina. Las estructuras de todos ellos se pueden ver en la tabla 1.9.

Tabla 1.9: Estructura de las flavanonas

Hesperitina	Taxifolina	Naringenina
$C_{16}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{12}O_7$	$C_{15}H_{12}O_5$
		
Hesperidina		Naringina
$C_{28}H_{34}O_{15}$		$C_{27}H_{32}O_{14}$
		

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En la tabla 1.10 se exponen ejemplos de presencia de algunos flavonoides en los alimentos:

Tabla 1.10: Ejemplos de flavonoides en la alimentación

Clase	Nombre	Sustituyentes	Fuente en la dieta
Chalcona	Buteína	2,4,3',4'-OH	Varios
	Ocanina	2,3,4,3',4'-OH	Varios
Flavona	Chrisina	5,7-OH	Piel de las frutas
	Apigenina	5,7,4'-OH	Perejil, apio
Flavonona	Naringina	5,4'-OH; 7-rhamnoglucosa	Cítricos, pomelo
	Naringenina	5,7,4'-OH	Cítricos
	Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Cítricos
Flavonol	Kaempferol	3,5,7,4'-OH	Puerro, brócoli, endibias, pomelo, té negro
	Quercetina	3,5,7,3',4'-OH	Cebolla, lechuga, brócoli, tomate, té, bayas, manzanas, aceite de oliva.
Flavononol	Engeletin	3,5,7,4'-OH; 3-O-rhamnosa	Piel de uva blanca
	Astilbin	3,5,7,5',4'-OH; 3-O-rhamnosa	Piel de uva blanca
	Genistina	5,4'-OH; 7-glucosa	Haba de soja
	Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Frutas
Isoflavona	Genisteína	5,7,4'-OH	Haba de soja
	Daidzín	4'-OH; 7-glucosa	Haba de soja
	Daidzeína	4',7-OH;	Haba de soja
Flavanol	(+)Catequina	3,5,7,3',4'-OH	Té
	(+)Gallocatequina	3,5,7,3',4',5'-OH	Té
	(-)Epicatequina	3,5,7,5',4'-OH	Té
Antocianidinas	Epigenidin	5,7,4'-OH	Fruta almacenada
	Cianidina	3,5,7,4',-OH; 3,5-OMe	Cereza, fresa, frambuesa.
	Delfinidina	3,5,7,3',4',5'-OH	Frutas rojas
	Pelargonidina	3,5,7,4',OH	Frutas rojas

2.2.1.3.- Estilbenos

Los estilbenos poseen una estructura básica formada por 14 carbonos (C6-C2-C6) y su distribución en los alimentos vegetales no es muy amplia (García-Alonso, 2005). Los estilbenos con mayor interés nutricional son el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) y el piceido (resveratrol-3-O-β-D-glucósido), presentes en uvas y vinos. Estos compuestos quedan expuestos en la tabla 1.11.

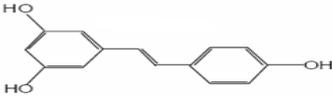
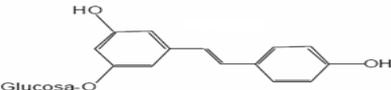
Este grupo ofrece una actividad antioxidante, anticancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora y antiinflamatoria (Stervbo et al., 2007). Estudios recientes en ratones han demostrado que ratones obesos cuya dieta estaba suplementada con resveratrol no solo son más longevos, sino además más activos, presentado en menor medida los efectos negativos de una dieta hipercalórica (Baur et al., 2006).

El resveratrol es el estilbeno más ampliamente distribuido en el Reino Vegetal, aunque sus fuentes en la dieta son escasas. Se encuentran únicamente en cacahuetes, algunas bayas y en uva (piel y semillas), así como en sus derivados (zumo y vino), en cantidades muy pequeñas (Burns et al., 2002). Sin embargo la concentración de estos compuestos se puede incrementar debido a que son fitoalexinas y, por tanto, inducibles por distintos tipos de estrés entre los que destaca el producido por la luz ultravioleta (Cantos et al., 2001). La luz ultravioleta produce un daño en las uvas que hace que éstas respondan al estrés sintetizando estos compuestos.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Actualmente, investigadores del CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura) han descubierto una técnica que permite frenar el envejecimiento celular potenciando los efectos beneficiosos del resveratrol. En concreto, han logrado concentrar en una cápsula los beneficios aportados por 45 botellas de vino. (www.aesan.es).

Tabla 1.11: Estructura de los estilbenos

Resveratrol	Piceido
$C_{14}H_{12}O_3$	$C_{20}H_{22}O_8$
	

2.2.1.4.- Lignanos

Los lignanos nombrados por primera vez por Harworth en 1941, son metabolitos secundarios de las plantas encontrados en una gran variedad de plantas que incluyen las semillas de lino (contiene más de 100 veces la cantidad encontrada en otros alimentos), semillas de calabaza, semillas de ajonjolí, centeno, y en algunas bayas. Aunque están ampliamente distribuidos sus cantidades son muy reducidas, del orden de μg por cada gramo de producto seco.

Su estructura básica consta de dos unidades C6-C3 unidas por enlaces β, β' utilizadas para la nomenclatura de los lignanos.

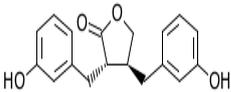
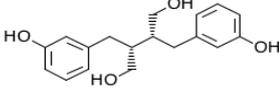
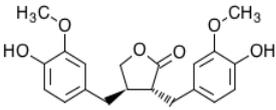
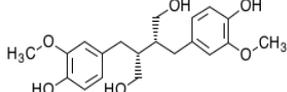
Son considerados fitoestrógenos, al igual que ocurre con las isoflavonas, que son químicos de las plantas que mimetizan la hormona estrógeno. Las bacterias en nuestros intestinos convierten a otros lignanos en dos: enterolactona y enterodiol, los cuales también tienen efectos parecidos al estrógeno.

Los lignanos están siendo estudiados para su posible uso en la prevención del cáncer, particularmente cáncer de mama. Compiten por los mismos puntos de las células donde se sujeta el estrógeno. Si hay poco estrógeno en el cuerpo (después de la menopausia, por ejemplo), los lignanos pueden actuar como estrógeno débil; pero cuando el estrógeno natural es abundante en el cuerpo, los lignanos pueden en su lugar reducir los efectos del estrógeno al desplazarlos de las células. Este desplazamiento de la hormona puede ayudar a prevenir varios tipos de cáncer, como puede ser el cáncer de mama. Además, al menos un estudio de laboratorio sugiere que los lignanos pueden ayudar a prevenir el cáncer de formas que no están ligadas al estrógeno. (<http://healthlibrary.epnet.com>).

A los lignanos también se les atribuyen otros efectos antioxidantes que ayudan a combatir los efectos de los dañinos radicales libres.

Algunos ejemplos de lignanos se muestran en la tabla 1.12:

Tabla 1.12: Estructura de algunos lignanos

enterolactona	enterodiol	7-hidroximatairesinol	secoisolariciresinol
$C_{18}H_{18}O_4$	$C_{18}H_{22}O_4$	$C_{20}H_{22}O_7$	$C_{20}H_{26}O_6$
			

2.2.1.5.- Perfil de los antocianos

En el caso de frutas rojas el **perfil de antocianos** es un parámetro crítico para la evaluación de la calidad y autenticidad. El método comúnmente empleado es el **Método IFU nº 71** de 1998, (Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas) por el cual se determinan las antocianinas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Este método también permite el análisis de betacianinas.

Para conseguir el color del zumo comercial no se permite la presencia de ingredientes colorantes artificiales o naturales, o de otros zumos concentrados diferentes o extractos vegetales, adicionados de forma fraudulenta para enmascarar un zumo deteriorado o de menor calidad. Ejemplos son las adulteraciones de los zumos de grosella negra y cereza con baya de sauco, extracto de uva tinta o aronia. Otra es la del arándano rojo con extracto de uva tinta; también la adición a la fresa, frambuesa o naranja sanguina, de aronia, baya de sauco, extracto de uva tinta, zarzamora, zanahoria o remolacha, etc.

Actualmente hay muchos laboratorios que utilizan estos perfiles de antocianos de frutos rojos para verificar la autenticidad y controlar la calidad de productos alimentarios, tales como siropes, mermeladas, confituras. También se emplean en la industria de zumos de frutas. Debido a este interés por los antocianos, hay un gran número de trabajos de investigación que caracterizan los perfiles de antocianos de muchos frutos, y prácticamente cada grupo investigador ha realizado un método analítico propio por HPLC para realizar estos análisis. Se suelen utilizar mezclas de acetonitrilo o metanol con agua como fases móviles para conseguir la elución. El pH se suele mantener a un pH inferior a 2 por adición de ácido.

Los antocianos o antocianinas son pigmentos solubles en agua que pertenecen al grupo de los flavonoides, y químicamente son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión.

Se trata de los pigmentos naturales responsables de la coloración que va desde el rojo-púrpura al azul.

Se encuentran presentes en numerosos alimentos, frutos, flores y verduras, dando lugar a los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas y grosellas (García-Alonso, 2005).

En las plantas se han aislado más de 400 antocianinas diferentes, siendo los glicosidos más estables que las agliconas libres (antocianidinas). A continuación se exponen las 6 agliconas de los antocianos más importantes y la coloración que proporciona:

- Cianidina (E-163a): colorante alimentario rojo
- Delfinidina (E-163b): colorante alimentario azul-rojo
- Malvidina (E-163c): colorante alimentario púrpura
- Pelargonidina (E-163d): colorante alimentario anaranjado
- Peonidina (E-163e): colorante alimentario rojo-marrón
- Petunidina (E-163f): colorante alimentario rojo oscuro

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

El contenido en antocianos totales de algunas frutas se muestra en la tabla 1.13 (García-Alonso, 2005).

Tabla 1.13: Contenido de antocianos totales en algunas frutas

Fruta	Contenido antocianos (mg/kg o mg/L)
Arándano	600-2000
Cereza	20-4500
Frambuesa negra	1700-4277
Frambuesa roja	100-600
Fresa	150-350
Grosella roja	1300-1400
Uva tinta	3000-7500
Zarzamora	1150

Las antocianinas son moléculas relativamente inestables y sus colores dependen del pH, temperatura, luz y de la presencia de metales. La acilación con ácidos cinámicos u otros ácidos similares confiere una estabilidad adicional a las antocianinas.

Se han desarrollado numerosos métodos para la caracterización de antocianinas, si bien el análisis por HPLC utilizando un detector de fotodiodos, es el método más extendido. El cromatograma obtenido es característico de cada fruta y se conoce como **perfil de antocianos**.

2.3.- Comercialización de los zumos

Actualmente existen diversas asociaciones en la industria de los zumos. A nivel nacional, está la asociación española de fabricantes de zumos (ASOZUMOS), se constituyó en 1978 y está integrada por la mayor parte de las empresas del sector, con una representatividad sectorial estimada en más del 80% de la producción nacional. La pertenencia a **ASOZUMOS** es una garantía para el consumidor de la absoluta responsabilidad de las empresas adheridas y de su compromiso con la autenticidad de los productos que comercializa. A nivel europeo se encuentra la asociación de la industria de zumos y néctares de frutas y vegetales de la unión europea (AIJN) y a nivel internacional está la federación internacional de productores de zumos de frutas (IFU).

Considerando los datos de un informe de mercado realizado por Zenithinternational y lanzado el 31 de mayo 2010 por la organización AIJN, se puede ver la evolución de los seis países más consumidores de zumos de la Unión Europea. Esto se muestra en la figura 1.6.

El volumen total de consumo de zumos y néctares de frutas durante el año 2009 fue de 11.3 billones de litros.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

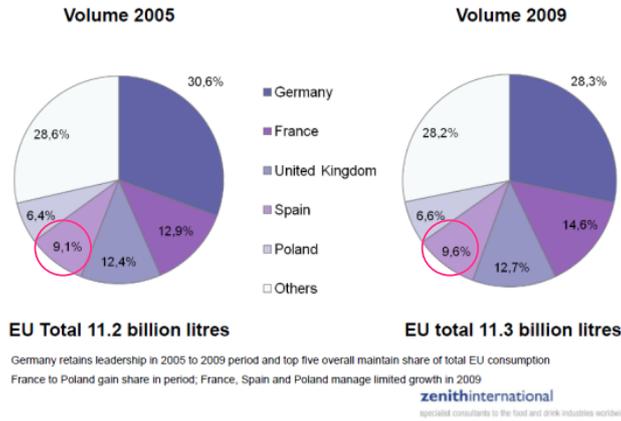


Figura 1.6: Comparativa entre el 2005 y el 2009 de los 5 países de la UE que más han consumido zumo. Obtenido de un informe de FJN

Se constata que Alemania continúa siendo el país en cabeza en la relación de países en cuanto al consumo de zumos y néctares de frutas mientras que España sigue ocupando el cuarto puesto, esto se puede ver en la figura 1.7.

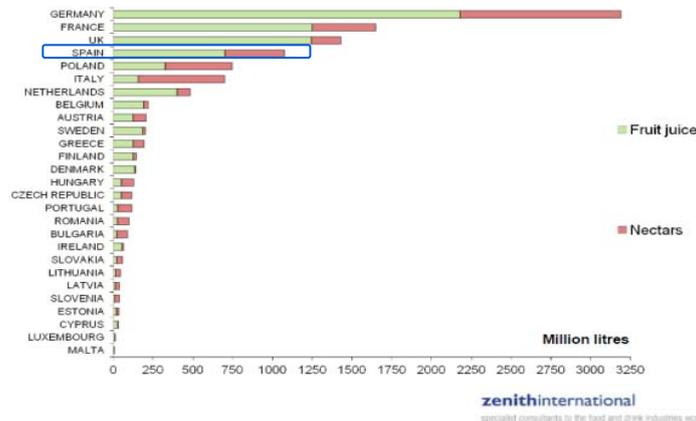


Figura 1.7: Comparación del consumo de zumo y néctar entre los países de la UE en 2009.

Sin embargo a la hora de comparar todos los países por el consumo de zumo por persona, la cosa cambia pues España ocupa el décimo primer puesto, tal y como se puede observar en la figura 1.8.



Figura 1.8: Comparación del consumo de zumo por persona en los distintos países de la Unión Europea en el 2009

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En la figura 1.9 esta comparación se hace más visible:

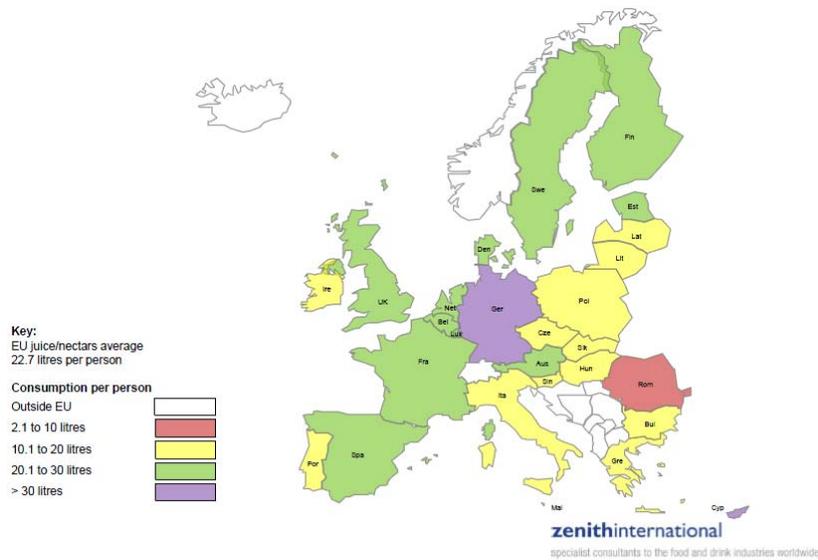


Figura 1.9: Mapa del consumo de zumo y néctar por persona en la UE durante el 2009.

En la figura 1.10 se muestra la comparación a nivel mundial. Cuatro países de la Unión Europea se encuentran entre los diez mayores mercados de zumos de fruta y néctares en el mundo, donde España se halla en el octavo lugar del ranking. Los 10 países que se muestran representan el 62% del consumo total mundial de zumos y néctares de frutas, donde España supone tan sólo el 1,1%.

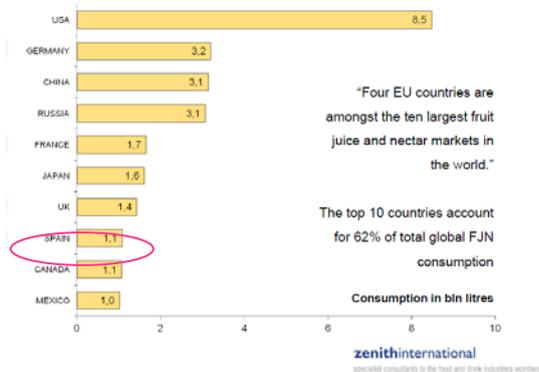


Figura 1.10: Los diez primeros países consumidores de zumo en el mundo durante el 2009

Como se puede apreciar en el gráfico de la figura 1.11, los zumos más comercializados en Europa y en el orden de más a menos consumidos son: naranja, manzana, mezcla de varios, multivitaminados, piña y melocotón.

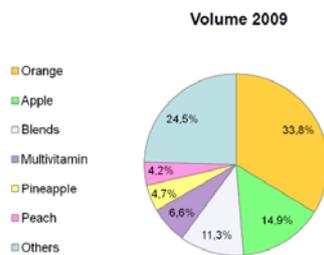


Figura 1.11: Los sabores más vendidos en Europa

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Considerando solamente los valores de España tomados de la asociación ASOZUMO, se observa que las ventas tanto de zumos como de néctares ha aumentado en los últimos años, encontrándose así alrededor de unos 700 millones de litros de zumo de frutas consumido y alrededor de unos 375 millones de litros consumidos de néctar de frutas. Si se suman los litros consumidos de zumos y de néctares de frutas se ve que la cifra obtenida supera los 1000 millones de litros. También se puede observar que en ambos casos el número de litros consumidos en condiciones ambiente supera los litros refrigerados consumidos. En la tabla 1.14 se hace constar que en el caso de los zumos a temperatura ambiente el zumo concentrado supera con creces al zumo exprimido mientras que en el caso del zumo refrigerado el zumo exprimido supera un poco al zumo concentrado. En la figura 1.12 se muestran algunos de los ejemplos de las distintas variedades de zumos y néctares.

Tabla 1.14: Evaluación de las formas de consumo de zumos y néctares de fruta en España desde el 2005 al 2009

ZUMO DE FRUTAS (100%)						
Volumen, millones de litros	2005	2006	2007	2008	2009	% 08-09
Total Zumo de frutas	665	671	706	685	702	+2,4
Ambiente	634	631	658	637	655	+2,8
De concentrado	606	603	628	606	618	+1,9
Zumo exprimido	27	28	30	30	37	+22,5
Refrigerado	31	40	48	49	47	-3,1
De concentrado	13	16	18	17	15	-11,3
Zumo exprimido	18	24	29	30	30	+0,4
Smoothies	0	1	1	2	3	+10,9

NÉCTARES (25-99%)						
Volumen, millones de litros	2005	2006	2007	2008	2009	% 08-09
Total Néctares	349	355	363	373	376	+0,8
Ambiente	336	342	350	361	370	+2,6
Refrigerado	13	13	13	12	6	-50



Figura 1.12: Ejemplos de las distintas variedades de zumos y néctares

En cuanto a los sabores más comercializados en España son mostrados en la figura 1.13:

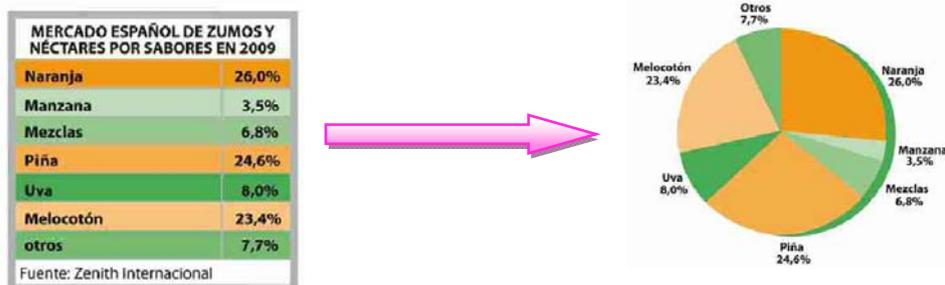


Figura 1.13: Los sabores más comercializados en España

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En relación a estos sabores como se muestra en el cuadro de la tabla 1.15 puede observarse que todos suben a excepción de la manzana sólo y de la uva sólo.

Tabla 1.15: Evolución del mercado de los zumos de frutas en España desde el 2005 hasta el 2009

ZUMOS DE FRUTAS Y NÉCTARES. SABORES						
Volumen, millones de litros	2005	2006	2007	2008	2009	% 08-09
Total Zumos y néctares	1.014	1.026	1.069	1.058	1.078	+1,9
Naranja	270	269	275	273	281	+3,0
Manzana	40	39	41	39	38	-3,7
Mezclas	35	49	67	67	73	+9,9
Piña	256	254	261	259	265	+2,3
Uva	88	88	90	88	85	-3,1
Melocotón	254	252	258	251	252	+0,6
Otros	72	74	78	81	83	+1,9

Es importante destacar que en los últimos años se han introducido en el mercado una amplia gama de zumos de frutas rojas, los cuales se comercializan en la mayoría de los casos en mezclas de zumos que son conocidos como “**Antiox**” (contienen mezcla de frutas rojas en los zumos de frutas tradicionales) aunque en menor medida también se comercializan sólo.

Como ejemplo se puede mencionar la marca Minute Maid AntiOx que combinan piña, grosella negra y ciruela, o bien sabores como naranja, frambuesa, zanahoria, acerola y grosella negra. Otro ejemplo podría ser la marca Don Simón Antioxidantes que combina sabores como piña, grosella, manzana y arándano, o bien naranja, mora, uva y frambuesa. Las marcas blancas como Hacendado y El Corte Inglés también hacen sus zumos de frutas rojas. El zumo de frutas rojas con acerola de El corte inglés combina zumos de uva roja, cereza y grosella y los purés de frambuesa, fresa y mora. Del mismo modo el zumo antioxidante de la marca Hacendado combina purés de granada, frambuesa, cereza, mora y grosella y los zumos concentrados de uva tinta y manzana.



Figura 1.14: Ejemplos de zumos Antiox

3.- LOS ZUMOS DE FRUTAS ROJAS

Hoy en día hay muchas frutas con pigmentos rojos de las que se pueden obtener zumos.

Este trabajo se va a centrar, principalmente, en el estudio de cinco zumos de frutas rojas que son los que se describen en este apartado.

Los pigmentos rojos que aparecen en las frutas rojas pertenecen a dos familias de compuestos químicos, las **antocianinas** y las **betacianinas**, ambas con propiedades antioxidantes.

Las frutas estudiadas en este trabajo deben su color a la presencia de antocianinas.

3.1.- Mirtilo (Blueberry)

El mirtilo (*Vaccinium myrtillus L.*) pertenece a la Familia de las Ericáceas. Crece como un arbusto pequeño, de ramas leñosas y hojas con borde aserrado. Las flores tienen la corola de color rosado y tienen forma acorazonada.

Los frutos son bayas redondeadas de color negro azulado y de consistencia suave; contiene pequeñas semillas. Su sabor es astringente. (www.plantamedicinales.net)

Esta especie es nativa de los Estados Unidos. Actualmente, este país junto con Canadá son los exportadores líderes mundiales con un 90 % de la producción total mundial. En verano abunda en lugares boscosos de Europa, como son Francia, Holanda, Alemania, Polonia y España. Los más consumidores de este tipo de frutas son Japón, Italia, Inglaterra, Alemania, Holanda y España.

El mirtilo es conocido por contener altos niveles de compuestos fenólicos, incluyendo los flavonoles y antocianinas por lo que se le atribuye una gran capacidad antioxidante respecto a otras frutas frescas. Estas antocianinas le aportan su color azul luminoso característico. También tiene otros compuestos como la cera epicuticular que tiene en su superficie.

En cuanto a su **composición nutricional**, tal y como se puede observar en la tabla 1.16, el mirtilo contiene fibra, aporta vitaminas A, B1,B2, B6 y C, hierro y potasio, entre otros muchos nutrientes.

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de zumo y de zumo concentrado, aunque también se puede comercializar en forma de té.

Tabla 1.16: Composición nutricional del mirtilo

Composición por 100 gramos de porción comestible			
Agua(g)	87,4	Vitamina B1 (mg)	0,014
Calorías (Kcal)	42	Vitamina B2 (mg)	0,0024
Fibra (g)	1,7	Vitamina B6 (mg)	0,012
Potasio (mg)	72	Vitamina C (mg)	12
Sodio (mg)	2	Ácido nicotínico (mg)	0,2
Calcio (mg)	14	Ácido pantoténico (mg)	12
Magnesio (mg)	6	Cobre (mg)	0,26
Manganeso(mg)	0,5	Fósforo (mg)	10
Vitamina A (UI)	30	Hierro (mg)	0,5
		Cloro (mg)	4



Figura 1.15: Frutos del mirtilo y la distribución geográfica mundial del cultivo. (www.consumer.es)

3.2.- Arándano europeo (Cranberry)

El arándano (*Vaccinium oxycoccus L.*) es un pequeño arbusto de 25 a 50 cm de altura y 1,5 cm de diámetro. Pertenece a la Familia de las Ericáceas y al Género *Vaccinium*.

El fruto del arándano es una baya pequeña de forma esférica, redonda u ovalada caracterizada por tener el cáliz en forma de estrella. Su tamaño es parecido al de una aceituna (entre 7 y 12 mm de diámetro), con la piel tersa y la pulpa jugosa. Su color es rojo intenso o negro y suele aparecer cubierto por un polvillo azulado o una película resistente brillante. Destaca por su sabor agridulce y acidulado.

Estos frutos son originarios de Asia y Europa, diferenciándose el arándano americano del europeo. Actualmente, las mayores producciones de arándano en Europa se dan en Alemania, Francia y Polonia; El arándano americano se cultiva en Michigan, New Jersey y Carolina del Norte; y, en el hemisferio sur, destacan Chile, Argentina, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. (www.diariomardeajo.com y www.consumer.es).

El arándano que se consume en España procede básicamente de Australia, Chile, Holanda e Italia, pero cada vez toman mayor relevancia los que proceden de Huelva y Asturias. En este proyecto se ha estudiado el **arándano europeo**.

El arándano destaca por sus **cualidades** hipocalóricas, antioxidantes, nutritivas y medicinales, siendo clasificado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en la posición número uno de frutos y vegetales por su capacidad antioxidante por su abundancia de pigmentos naturales: antocianos y carotenoides, también tiene, aunque en menos cantidad que la uva, el resveratrol. En la tabla 1.18 se expone su composición nutricional.

Tabla 1.18: Composición nutricional del arándano europeo

Composición por 100 gramos de porción comestible	
Calorías (Kcal)	30,1
Hidratos de carbono (g)	6,9
Fibra (g)	1,8
Potasio (mg)	88
Magnesio (mg)	0,5
Provitamina A (µg)	12
Vitamina C (mg)	17
Vitamina E (mg)	5

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de zumo y de zumo concentrado.



Figura 1.17: Frutos del arándano y la distribución geográfica mundial del cultivo. (www.consumer.es).

3.3.- Grosella negra (Blackcurrant)

La grosella negra (*Ribes nigrum L.*) es el fruto del grosellero. Se trata de un arbusto frondoso de la Familia de las Grossulariaceae que puede llegar a los 2 m de altura. Crece en forma de pequeños racimos similares a las uvas pero de tamaño muy inferior.

La baya es redonda y globosa con un tamaño de 7 a 10 mm de diámetro. Su color va en función de la variedad. Destaca por su pulpa carnosa y jugosa y está llena de semillas diminutas que no estorban a la hora de consumir el fruto. Su sabor es amargo y muy ácido.

Estas frutas son originarias de las regiones boscosas euroasiáticas. Actualmente, se cultivan especies con fines comerciales, por lo que es fácil encontrarlas en mercados especializados. Los países productores de grosella negra más importantes son: Italia, Bélgica, Holanda e Inglaterra (www.consumer.es).

El **valor nutricional** de la grosella negra, mostrado en la tabla 1.17, destaca por contener un 90 % de agua, mucha fibra y no tiene casi calorías por su escaso aporte de hidratos de carbono. Son especialmente ricas en vitamina C. Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante.

Tabla 1.17: Contenido nutricional de la grosella negra

Composición por 100 gramos de porción comestible (Grosella negra)	
Calorías (Kcal)	35,1
Hidratos de carbono (g)	4,4
Fibra (g)	5,8
Potasio (mg)	280
Magnesio (mg)	1,2
Provitamina A (µg)	36
Vitamina C (mg)	40
Vitamina E (mg)	4,2

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de zumo y de zumo concentrado.



Figura 1.16: Frutos de grosella negra y la distribución geográfica mundial del cultivo. (www.consumer.es)

3.4.- Cereza (Sour cherry)

Las variedades de cereza más conocidas en Europa se dividen en cerezas dulces (*Prunus avium*) o agrias (*Prunus cerasus*). Las cerezas estudiadas en este proyecto pertenecen al segundo grupo. El cerezo (*Prunus cerasus L.*) es un árbol frutal que pertenece a la Familia de las Rosáceas y que puede llegar a alcanzar los 10 m de altura. Las cerezas son drupas, de forma redondeada, globosa o con figura de corazón. Poseen un hueso globoso y casi liso. Su tamaño comercial está entre los 13 y 20 mm, con un diámetro de unos 2 cm y un peso de 6-9 g. Su color varía en función de la variedad, siendo entre el morado oscuro casi negro y el rojo. Destaca por su sabor dulce y jugoso o agrio (las guindas).

El origen de esta fruta se sitúa en el mar Negro y en el mar Caspio, difundiéndose después hacia Europa y Asia, por medio de las aves y las migraciones humanas. En la actualidad, el cerezo se cultiva en numerosas regiones y países del mundo con clima templado, destacando Rusia, Estados Unidos, Alemania, Italia, Francia y España.

En nuestro país, el valle del Jerte, en Cáceres, es un área de producción tradicional aunque el valle del Ebro y la comunidad andaluza están aumentando de forma notable su producción. (www.consumer.es)

El **valor nutricional** de la cereza se caracteriza por ser rica en hidratos de carbono, sobre todo en fructosa, aporta fibra y pequeñas cantidades de provitamina A y de vitamina C. Esto queda plasmado en la tabla 1.19.

Tabla 1.19: Composición nutricional de la cereza.

Composición por 100 gramos de porción comestible	
Calorías (Kcal)	58,3
Hidratos de carbono (g)	13,5
Fibra (g)	1,5
Potasio (mg)	260
Magnesio (mg)	11
Provitamina A (µg)	3
Vitamina C (mg)	8
Calcio (mg)	16

Lo que en realidad destaca de las cerezas es su contenido en flavonoides (sobre todo antocianos, relacionados con el color característico de estas frutas) y ácido elálgico del grupo de los hidroxibenzóicos, ambos excelentes antioxidantes.

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de zumo y zumo concentrado.



Figura 1.18: Frutos del cerezo y la distribución geográfica mundial del cultivo. (www.consumer.es)

3.5.- Uva tinta (Black grape)

La uva es el fruto de la vid y crece en forma de racimos. Pertenece al Género *Vitis* de la Familia *Vitaceae* que incluye unas 600 especies de arbustos.

Los frutos son carnosos y nacen apiñados en largos racimos compuestos por granos redondos o alargados de 1,6 cm de diámetro y un peso 200 a 350 mg. El color de la piel es rojizo o púrpúreo dependiendo de las variedades. Su pulpa es jugosa y dulzona.

La uva se cultiva desde tiempos prehistóricos, tal y como lo demuestran las semillas que se han hallado en yacimientos arqueológicos de la edad del bronce de Suiza, Italia y en tumbas del antiguo Egipto. Los botánicos sitúan el origen de la uva cultivada en Europa en la región asiática del mar Caspio, desde donde las semillas se dispersaron hacia el oeste por toda la cuenca mediterránea. Fueron los colonos españoles los que introdujeron la vid en América del Norte.

Actualmente la vid se cultiva en las regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores: Australia, Sudáfrica, Europa (Italia, Francia, España, Portugal, Turquía y Grecia) y en el continente americano, California, Chile y Argentina. (www.consumer.es)

El **valor nutricional** de la uva tinta, mostrado en la tabla 1.20, se caracteriza por tener un contenido moderado de azúcares, principalmente glucosa y fructosa, y las vitaminas ácido fólico y vitamina B6, esta última en una cantidad que solo se ve superada por las frutas desecadas y por algunas frutas tropicales como el aguacate, el plátano, la chirimoya, la guayaba y el mango.

Tabla 1.20: Composición nutricional de la uva tinta.

Composición por 100 gramos de porción comestible	
Calorías (Kcal)	67
Hidratos de carbono (g)	15,5
Fibra (g)	0,4
Potasio (mg)	320
Magnesio (mg)	4
Calcio (mg)	4
Vitamina B6 (mg)	0,1
Provitamina A (mg)	3
Ácido fólico(µg)	26

En las uvas abundan diversas sustancias con reconocidas propiedades beneficiosas para la salud, tales como antocianos, flavonoides y taninos, responsables del color, aroma y textura característicos de estas frutas, y de los que dependen diversas propiedades que se le atribuyen a las uvas. Además se encuentra un estilbeno que está siendo muy reconocido últimamente, el resveratrol.

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de zumo y de zumo concentrado.



Figura 1.19: Racimo de uva tinta y la distribución geográfica mundial del cultivo. (www.consumer.es)

CAPÍTULO 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

De un tiempo a esta parte lo relacionado con los zumos de frutas rojas ha cobrado gran importancia, generando así un interés cada vez mayor, desde el momento en el que el consumidor asocia un potencial beneficio para su salud por el consumo de estos zumos. Esto repercute en la necesidad de disponer de métodos analíticos que permitan controlar la calidad y autenticidad de estos zumos, que adquieren en el mercado mayores precios, y se encuentran sometidos a una mayor posibilidad de fraudes.

Las adulteraciones o posibles fraudes alimentarios son un problema económico y por ello, la autenticación de los productos alimenticios es un objetivo de gran importancia. En el caso de los zumos de frutas rojas, el tipo de adulteración más frecuente es la mezcla del zumo original con zumos de frutas más baratas principalmente uva tinta.

La estrategia de los métodos de autenticación consiste en medir o analizar un número de compuestos químicos, que formen en conjunto el perfil característico de cada fruta o zumo de fruta. Es decir, la huella dactilar de cada fruta.

La variabilidad en las proporciones y contenidos de antocianinas en los zumos de frutas rojas analizados permite determinar la denominada “huella dactilar” de antocianos. La determinación de este perfil de antocianos es ampliamente usado para verificar la autenticidad de productos alimentarios preparados con frutas rojas, tales como siropes, mermeladas y zumos de frutas (www.solociencia.com/quimica/08012602.htm).

Por todo ello, el principal objetivo que se planteó en este proyecto fin de máster, fue caracterizar el perfil polifenólico de cinco frutas rojas diferentes: mirtilo, arándano, grosella, cereza y uva tinta. Para realizar esta caracterización se aplicará un método de análisis por HPLC de los polifenoles de zumos de frutas rojas como alternativa al método IFU nº 71 empleado para antocianos (CODEX STAN 247-2005). Para ello se estudiará la detección simultánea por PDA y espectrometría de masas. Esta última técnica analítica usada, de forma complementaria a la detección óptica, es capaz de dar información estructural y complementaria muy útil a la hora de confirmar la presencia de polifenoles identificados con PDA y con fluorescencia en algunos casos.

De forma desglosada los objetivos planteados fueron los siguientes:

- **Objetivo 1:** Estudiar los espectros de PDA y masas de patrones de polifenoles para seleccionar las longitudes de onda de absorción para su detección y las fragmentaciones posibles que tienen lugar en los polifenoles presentes en zumos de frutas rojas.
- **Objetivo 2:** Conseguir resolver en un mismo cromatograma el mayor número de polifenoles posibles, evitando solapamientos de picos de compuestos.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- **Objetivo 3:** Analizar el perfil de antocianos y ácidos fenólicos en zumos de frutas rojas.
- **Objetivo 4:** Ampliar el estudio a un mayor número de frutas abriendo el abanico abarcando también a otro tipo de frutas.
- **Objetivo 5:** Interpretación de los espectros de masas, en la medida de lo posible, de los distintos polifenoles presentes en las frutas rojas.
- **Objetivo 6:** Mejorar el método de trabajo inicial acortando el tiempo de análisis mediante el empleo de un UPLC y complementar la detección por PDA, con detección por tándem de masas y fluorescencia.

2.- ESTRUCTURA DEL TRABAJO

El presente Trabajo Fin de Máster y Proyecto de Tesis Doctoral está organizado en los siguientes capítulos:

Capítulo 1: Introducción se incluye una revisión del estado actual de la industria de zumos y bebidas refrescantes.

Capítulo 2: Justificación y objetivos

Capítulo 3: Plan de trabajo recoge la metodología y el plan de trabajo planteado para la consecución de los objetivos propuestos. Se incluye además un diagrama de tiempos del desarrollo del proyecto en el que aparecen recogidos los hitos más importantes del mismo.

Capítulo 4: Resultados preliminares recoge los resultados preliminares correspondientes a los primeros experimentos realizados en el laboratorio.

Capítulo 5: Conclusiones recoge las principales conclusiones extraídas de los capítulos anteriores.

Capítulo 6: Bibliografía presenta la bibliografía utilizada para la elaboración de la presente memoria.

CAPÍTULO 3.- PLAN DE TRABAJO

1.- PLAN DE TRABAJO

Los objetivos planteados en este Trabajo Fin de Máster y Proyecto de Tesis Doctoral “Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas por HPLC-UV/VIS-MASAS” se podrán ir alcanzando de acuerdo con el plan de trabajo y el esquema de tiempos que se presentan a continuación.

- **Objetivo 1: Estudiar los espectros de PDA y masas de patrones de polifenoles para seleccionar las longitudes de onda de absorción para su detección y las fragmentaciones posibles que tienen lugar en los polifenoles presentes en zumos de frutas rojas.**

Se comprarán algunos de los patrones comerciales de los polifenoles a estudiar, y se analizarán sus espectros de PDA y masas en agua y en las fases móviles a utilizar en los análisis por HPLC (agua/trifluoroacético (0.5%) y agua/ acetonitrilo/ trifluoroacético (49.5/50/0.5)(V/V/V), para conocer sus longitudes de onda máximas de absorción y las fragmentaciones que se producen. De estos experimentos se podrán seleccionar las condiciones de detección apropiadas para la identificación de los polifenoles mediante el detector de masas.

- **Objetivo 2: Conseguir ver en un mismo cromatograma el mayor número de polifenoles posibles.**

El método IFU nº 71 es el método de análisis de antocianos propuesto por la Federación Internacional de productores de zumos de frutas (IFU). Este método analiza por HPLC el perfil de antocianos utilizando un detector de fotodiodos (PDA), mientras que para analizar el resto de polifenoles se tienen que emplear diferentes métodos de HPLC.

El objetivo que se plantea aquí es el empleo de un único método de trabajo que es capaz de analizar tanto los antocianos como el resto de los polifenoles mayoritarios en los zumos de frutas rojas. Este método propone una variación del gradiente de elución con respecto al método IFU nº 71. Con este gradiente se consigue corroborar la existencia de prácticamente todos los polifenoles presentes en dichos zumos. Utilizando la detección simultánea por PDA y detector de masas se optimizarán las condiciones de detección por masas de los flavonoides y los ácidos fenólicos, así como, el volumen de inyección / concentración de las muestras.

- **Objetivo 3: Analizar el perfil de los ácidos fenólicos, de los flavonoides y de los estilbenos en zumos de frutas rojas.**

Utilizando el método analítico anterior se optimizarán las condiciones de detección por masas de los flavonoides, de los ácidos fenólicos y de los estilbenos, y se analizarán los zumos de frutas rojas comerciales.

La identificación de compuestos se hará fundamentalmente atendiendo a los tiempos de retención de los patrones, a los espectros UV/Vis-Masas de los picos de

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

cada compuesto, y a la composición de las frutas descritas en trabajos previos de diferentes autores y publicados en revistas científicas.

Los grupos de flavonoides que se estudiarán especialmente serán los antocianos (cianidina, delphinidina, malvidina,...), flavonoles (quercetina, kaempferol...), los flavanoles (catequina, epicatequina...), estilbenos (resveratrol,...).

Los compuestos a identificar entre los ácidos fenólicos, serán los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, ácido protocatecúlico, 4-hidroxibenzoico...) y los derivados del ácido cinámico (ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico...).

En caso de ser necesario se utilizará un detector de fluorescencia para la correcta identificación de algún compuesto importante que ofrezca dudas.

Los zumos de frutas rojas comerciales utilizados están disponibles como zumo concentrado, y son suministrados por distintas casas comerciales.

- **Objetivo 4: Ampliar el estudio a un mayor número de frutas abriendo el abanico abarcando también a otro tipo de frutas.**

Una vez analizados los zumos de frutas rojas se pasará a analizar zumos de otra clase de frutas, así como por ejemplo la manzana (que tiene algunos polifenoles como el ácido clorogénico, el floridzin entre otros) , la naranja (que tiene naringina, hesperidina entre otros), el plátano (que tiene catequina y ácido gálico) y más tipos de frutas.

- **Objetivo 5: Interpretación de los espectros de masas, en la medida de lo posible, de los distintos polifenoles presentes en las frutas rojas.**

Se construirá una tabla de componentes para cada uno de los zumos analizados, atendiendo para la identificación de compuestos a los tiempos de retención de los patrones, a los espectros UV/Vis-Masas de los picos, y a la composición de las frutas obtenidas por diferentes autores en trabajos previos.

- **Objetivo 6: Mejorar el método de trabajo inicial acortando el tiempo de análisis mediante el empleo de un UPLC y complementar la detección por PDA, con detección por tándem de masas y fluorescencia.**

Utilizando un UPLC y una detección complementaria por PDA, tándem de masas y fluorescencia se optimizarán algunos factores importantes:

- 1- El UPLC (cromatografía líquida de ultra eficacia) permite poder trabajar a presiones más altas llegando hasta 100 MPa de presión (unas 1000 atmósferas), y como consecuencia permite poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrómetros), estas partículas de un diámetro tan pequeño, mejoran la resolución porque se minimiza la difusión del analito al atravesar la columna. De este modo, se podrá utilizar una columna más pequeña consiguiendo acortar el tiempo de análisis, a la vez que se mejora la calidad de los resultados. Debe tenerse en cuenta la corrección que ha de hacerse al gradiente de elución, siendo el nuevo gradiente:

$$\text{Gradiente de elución nuevo} = \text{gradiente X (longitud columna larga / longitud columna corta)}$$

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- 2- El empleo de la fluorescencia permite poder detectar compuestos que por PDA son prácticamente inapreciables.
- 3- Utilizando un espectrómetro tándem de masas se puede conseguir una mejor resolución en los espectros de masas permitiendo una visión más completa de cada compuesto.

Redacción y defensa de la Tesis Doctoral

Una vez alcanzados todos los objetivos propuestos y, concluida la fase experimental, se procederá a la redacción y defensa de la Tesis Doctoral.

El plan de trabajo que se propone está planificado para un tiempo aproximado de cuatro años. Este tiempo es necesario para aplicar el método analítico a un elevado número de frutas.

Las etapas de desarrollo del Proyecto de Tesis han sido temporizadas y representadas en forma de tabla como se muestra en la Figura 3.1.

Trabajo a realizar	1 ^{er} año	2 ^o año	3 ^{er} año	4 ^o año
Objetivo 1				
Objetivo 2				
Objetivo 3				
Objetivo 4				
Objetivo 5				
Objetivo 6				

Figura 3.1: Tabla con la distribución temporal del proyecto.

CAPÍTULO 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.-MATERIALES

1.1.- Reactivos empleados

Los reactivos nombrados a continuación serán utilizados con el fin de elaborar las fases móviles para el análisis por HPLC:

- **Acetonitrilo (CH₃CN)** (Acetonitril for HPLC-Super Gradient) procedente de los laboratorios Panreac (Barcelona, España).
- **Ácido trifluoroacético (CF₃COOH)** (Trifluoroacetic acid for synthesis) procedente de los laboratorios Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Alemania)
- **Agua purificada** en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Fase móvil A: Agua ultrapura y ácido trifluoroacético (0,5%)(V/V)

Fase móvil B: Acetonitrilo, agua ultrapura y ácido trifluoroacético (50v/49,5v/0,5v)

1.2.- Patrones comerciales

En este proyecto se han analizado una serie de patrones puros que han sido adquiridos a diversas casas comerciales (tabla a continuación). Dichos patrones pertenecen a cuatro grupos de los polifenoles: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y estilbenos (resveratrol). La Figura 4.1 muestra una fotografía de los productos comerciales y en la tabla 4.1 se pueden ver los patrones estudiados en este proyecto junto con sus solubilidades y sus casas comerciales.

Para la disolución de los patrones se utilizará agua purificada o metanol reactivo análisis (Panreac, España) en función de la solubilidad de cada patrón.

Para el caso de los pigmentos de antocianinas no se dispone de patrones comerciales y para el caso de los pigmentos flavonoles se han analizado en el laboratorio los patrones de los distintos grupos (quercetina, isorhamnetina, kaempferol, Miricetina y rhamnetin).



Figura 4.1: Patrones puros a analizar

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 4.1: Información sobre los patrones estudiados en este proyecto.

NOMBRE SEGÚN IUPAC	OTRA NOMENCLATURA	FÓRMULA QUÍMICA	CASA COMERCIAL	SOLUBILIDAD
Ácidos hidroxibenzóicos				
Ácido 3,4,5-Trihidroxibenzóico	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	Fluka Analytical	Agua
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	Fluka Analytical	Agua
Ácido elágico	Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	Fluka Analytical	Metanol
Ácido 3,4-Dihidroxibenzóico	Ácido protocatequico	C ₇ H ₆ O ₄	Aldrich Chemistry	Agua
Ácidos hidroxicinámicos				
Ácido trans cinámico	Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	Aldrich Chemistry	Agua
Ácido clorogénico	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Sigma	Agua
Ácido 3-(4-hidroxifenil)acrílico	Ácido p- cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	Sigma	Agua
Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico	Ácido caféico	C ₉ H ₈ O ₄	Sigma	Agua
Ácido 3-(4-dihidroxi-3,5-dimetoxifenil)acrílico	Ácido Sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Fluka Analytical	Agua
Flavanoles				
(±) Catequina	(±) Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma	Agua
(-) Epicatequina	(-) Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Fluka Analytical	Agua
Epigalocatequina-3-galato	Epigalocatequina-3-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	Sigma-Aldrich (Madrid, Spain)	Metanol
Estilbenos				
Resveratrol	Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	Sigma-Aldrich (Madrid, Spain)	Metanol
Vitaminas				
Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Fluka Analytical	Agua

1.3.- Muestras de frutas rojas

En este proyecto se han estudiado cinco frutas rojas en forma de zumo concentrado que se emplean normalmente en la elaboración de zumos en la industria. En la tabla 4.2 se especifica la casa comercial de cada zumo.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 4.2: Casas comerciales de los zumos de las frutas rojas analizadas.

FRUTA ROJA	CASA COMERCIAL
Mirtilo (Blueberry) Vaccinium myrtillus L wild	J. García Carrión S.A. (Jumilla, España) (Junio-2006)
Grosella negra (Blackcurrant) Ribes nigrum L.	J. García Carrión S.A. (Jumilla, España) (Mayo-2008)
Arándano rojo (European Cranberry) Vaccinium oxycoccus L.	Grünewald Fruchtsaft (Stainz, Austria) (Mayo-2008)
Cereza agria (Sour Cherry) Prunus cerasus L.	Mondi Food (Rijkevorsal, B)
Uva tinta (Red Grape) Vitis vinifera L.	J. García Carrión S.A. (Jumilla, España)



Figura 4.2: variedad de frutas rojas

2.-MÉTODOS

2.1.- Método de análisis de polifenoles por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada en la investigación de pigmentos, ya que presenta las ventajas de tener una alta sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para su separación y sobre todo, su gran aplicación a sustancias que son de primordial interés en la industria alimentaria. La separación de los componentes que constituyen una muestra mediante esta técnica analítica se basa en la distribución de estos componentes entre dos fases: la fase estacionaria que está contenida en la columna y la fase móvil, la cual eluye a través de la columna. La función de esta fase móvil no sólo es la de arrastrar al analito sino que también debe interactuar con el analito.

La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de acero inoxidable, en la que todas las especies que pueden disolverse pueden separarse según su afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria y mediante la elección de una combinación adecuada de estas fases. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de micras (3- 10 μm), lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Un sistema de HPLC está **compuesto por** cuatro elementos básicos:

1. Un sistema que sea capaz de gestionar e impulsar la fase móvil. **Una bomba** es la encargada de impulsar el/los disolventes al resto del sistema. Las bombas modernas tienen la capacidad para impulsar varios disolventes en proporciones variables y programables, además en muchos casos el equipo dispone de desgasificador de fase móvil.
2. Una **columna cromatográfica** que es la que contiene la fase estacionaria y es donde tiene lugar la separación de los analitos. A veces va precedida por una pre-columna para impedir que lleguen a la columna componentes de la muestra que puedan dañar la fase estacionaria.
Hay que nombrar la presencia de un horno termostatzado que mantiene la temperatura de la columna constante, asegurando una mayor reproducibilidad en las separaciones aunque no siempre es necesario.
3. Un sistema que permita la inserción de las muestras, o sea un **inyector**, el cual permite la introducción de una determinada cantidad de muestra en el sistema.
4. Un sistema capaz de informar del resultado de la separación, es decir, un **sistema de detección** encargado de producir señales o respuestas analíticas ante la presencia de las especies que abandonan la columna. Estos detectores pueden utilizarse simultáneamente colocándolos en serie siempre que no sean destructivos. Además también consta de un sistema de adquisición de datos, tarea de la cual se encargan los ordenadores, dotados con programas específicos para ello.

Evidentemente estos cuatro elementos básicos pueden adoptar diferentes configuraciones y/o especificaciones dependiendo del modo cromatográfico elegido y particularmente de las características de la fase móvil utilizada y de la propia muestra a separar.

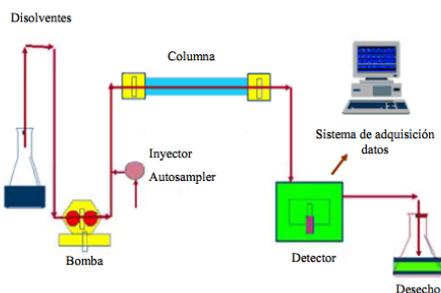


Figura 4.3: diagrama esquemático de un equipo de HPLC

En este proyecto se ha trabajado con una cromatografía de reparto en fase reversa (RP-HPLC), la cual consiste en el empleo de una fase fija o estacionaria apolar C₁₈ y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe₂Cl, donde R es una cadena alquil como por ejemplo C₁₈H₃₇ ó C₈H₁₇. Con estas características se consigue un tiempo de retención mayor para aquellos compuestos de naturaleza apolar, mientras que para las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente y por lo tanto obtiene un tiempo de retención más corto.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se la denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y fluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, la hidrofobicidad de la fase móvil se asocia con un tiempo de retención mayor, por ejemplo, un compuesto con una cadena alquil larga, aumenta la hidrofobicidad de la molécula; la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial porque la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada por ésta y tiende a aumentar el tiempo de retención.

En este trabajo, se ha utilizado un equipo HPLC **WATERS ALLIANCE 2695**. Este equipo consta de las siguientes partes:

- Bomba cuaternaria de flujo variable y gran precisión, con un volumen muerto inferior a 650 µl.
- Horno para termostatar la columna desde 25 °C hasta 60 °C en incrementos de 0,1 °C.
- Sistema de lavado dinámico de las juntas y émbolos.
- Inyector automático de hasta 120 viales, refrigerados desde 4 hasta 40 °C.
- Utilidad informática de control y tratamiento de datos Empower 2002.
- Además se dispone de dos detectores:
 - Detector UV-VIS de fotodiodos en serie, modelo 2996.
 - Analiza entre 190 y 800 nm
 - Rango lineal de hasta 2 unidades de absorbancia
 - 512 diodos
 - Resolución espectral de 1,2 nm
 - Detector de espectrometría de masas ZQ 4000.
 - Interfaz de ionización a presión atmosférica doble ortogonal.
 - Sonda de electropulverización (ESI).
 - Sonda de ionización química a presión atmosférica (APCI).
 - Analizador de tipo cuadrupolo con rango de masas de 2 a 4000 uma, con una resolución de 1 uma.
 - Permite analizar mezclas con componentes que ionicen en modo positivo o en modo negativo, en un mismo análisis.
 - El sistema de vacío controlado digitalmente está compuesto por una bomba turbomolecular y una bomba rotatoria de doble etapa.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Figura 4.4: Equipo empleado (HPLC Waters Alliance 2695 con DAD modelo 2996 y detector de masas ZQ 4000)
[www. UPCT . es / ~ sait /](http://www.UPCT.es/~sait/)

La columna empleada es una Zorbax SB-C18 (80 Å poro, 180 m²/g, carbon load: 10%, estable a pH<2)(ref: 880975-902), 164'1 bares de presión y un tamaño de partícula de 5 µm y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno. Casa Agilent (USA).



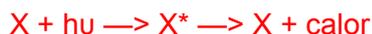
Figura 4.5: Columna de análisis

El método de trabajo empleado en este proyecto es una modificación del método IFU nº71 (1998) de análisis de antocianinas por HPLC con detección UV definido en el código alimentario (CODEX STAN 247-2005). Esta modificación consiste en sustituir el empleo de ácido fórmico por ácido trifluoroacético y de la variación del gradiente de elución.

2.2.- Método de medida del detector de fotodiodos (PDA)

a) Fundamentos del detector de fotodiodos

Los detectores de absorbanza ultravioleta (también visible) son los más utilizados en HPLC. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción, que se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por el analito, como consecuencia de lo cual se origina un estado activado que posteriormente elimina su exceso de energía en forma de calor, en un proceso que esquemáticamente puede representarse así:



La cantidad de calor disipado es muy pequeño, por lo que el método tiene la ventaja de originar un trastorno mínimo en el sistema que se estudia.

Los detectores espectrofotométricos más potentes son los que utilizan una matriz de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Este tipo de detectores consisten en uniones tipo **pn** polarizadas inversamente y montadas sobre un chip de silicio. Los términos “tipo n” y “tipo p” se refieren a materiales semiconductores que han sido dopados, es decir, cuyas propiedades eléctricas han sido alteradas mediante la adición controlada de pequeñísimas concentraciones de impurezas como boro o fósforo. En un diodo, la corriente eléctrica sólo fluye en un sentido a través de la unión: desde el material de tipo p hasta el material de tipo n, y sólo cuando el material de tipo p está a una tensión superior que el de tipo n.

En la figura 4.6a se muestra la forma de la región superficial de algunos de los fotodiodos. Cada uno está constituido por una barra tipo p (positivo) difundida en un sustrato tipo n (negativo) para dar origen a una región superficial que consta de una serie de elementos adyacentes cuyas dimensiones características son 2.5 por 0.025 mm (figura 4.6 b).

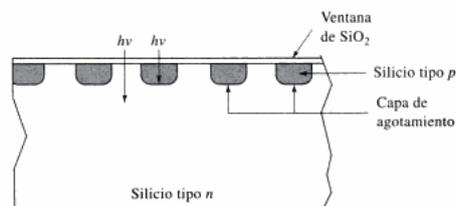


Figura 4.7a: Detector con una serie lineal de diodos en polarización inversa mediante un corte transversal

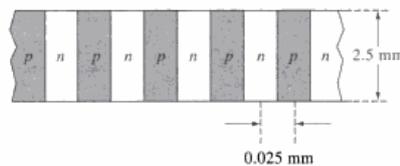


Figura 4.7b: Detector con una serie lineal de diodos en polarización inversa mediante una vista desde arriba.

En un diodo, la corriente eléctrica sólo fluye en un sentido a través de la unión: desde el material de tipo p hasta el material de tipo n, y sólo cuando el material de tipo p está a una tensión superior que el de tipo n. La tensión que debe aplicarse al diodo para crear esa condición se denomina tensión de polarización directa y la tensión opuesta que hace que no pase corriente se denomina tensión de polarización inversa. Esta polarización inversa genera una capa de agotamiento (Es una región formada por iones negativos y positivos descubiertos como consecuencia de la combinación de los electrones y los huecos que están en, o cerca de, la zona de la unión) que reduce casi a cero la conductancia de la unión. En la figura 4.7 se enseña dicha capa.

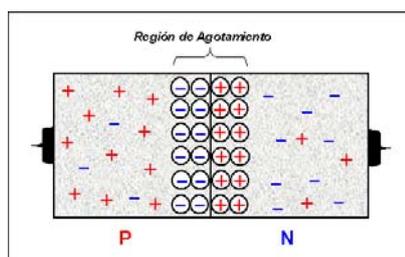


Figura 4.7: Un diodo y su capa de agotamiento

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Los fotodiodos individuales forman parte de un circuito integrado de gran escala formado sobre un solo chip de silicio. La cantidad de diodos en un chip varía de 64 a 4096, pero 1024 es la más común.

La colocación y polarización correctas de las regiones de tipo p y tipo n hacen que la corriente eléctrica fluya por los trayectos adecuados y garantizan el buen funcionamiento de todo el chip.

Al incidir la luz sobre el circuito integrado se generan huecos y electrones en dicha capa, dando lugar a una corriente eléctrica, proporcional a la potencia de la radiación electromagnética.

b) Funcionamiento del detector de fotodiodos

La luz procedente de la fuente de emisión, tal como una lámpara de deuterio se colima por un sistema de lentes acromáticos para que toda la luz pase a través de la celda del detector en una red de difracción holográfica. De este modo, la muestra se somete a la luz de todas las longitudes de onda generada por la lámpara. La luz dispersada de la rejilla se deja caer en una matriz de diodos, la cual puede contener varios cientos de diodos y la salida de cada diodo se muestra regularmente por un equipo de un almacenamiento de datos en un disco duro. Al final del proceso, la salida de cualquier diodo puede ser seleccionada y producir un cromatograma utilizando la longitud de onda UV, que cayó en ese diodo particular. La mayoría de instrumentos permitirán la monitorización de al menos un diodo a tiempo real, para que el cromatograma se pueda seguir y ver cómo se desarrolla la separación.

Este sistema es ideal para señalar el tiempo de un pico en particular, el espectro de un soluto se puede obtener mediante la recopilación de la memoria de la salida de todos los diodos en ese momento concreto.

Esto genera directamente el espectro del soluto, es decir, una curva relacionando la absorción con la longitud de onda.

En la figura 4.8 se muestra un esquema general de un detector de fotodiodos.

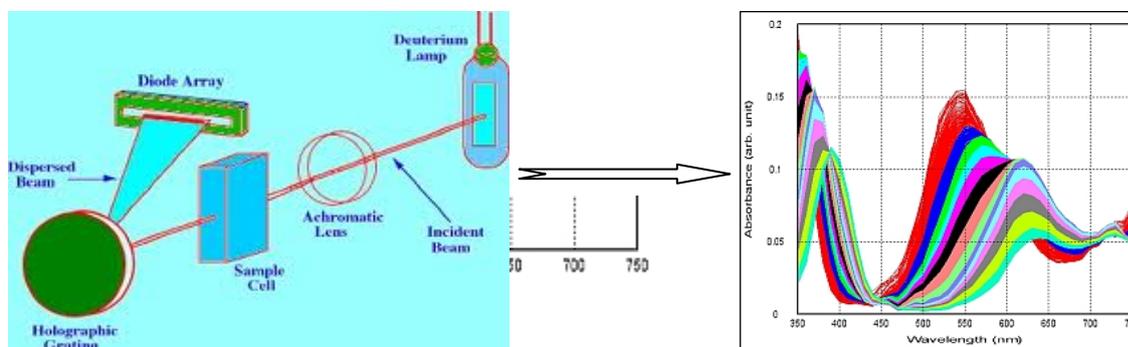


Figura 4.8: Esquema general de un detector de fotodiodos

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- Las **características** que debe cumplir un detector de fotodiodos son:
 - Ser altamente eficientes
 - Tener un bajo nivel de ruido,
 - Tiene un amplio ancho de banda (es decir, que respondan de manera uniforme y rápida en todas las longitudes de onda de la señal),
 - Ser poco sensibles a las variaciones de temperatura
 - Ser baratos, pequeños, etc

2.3.- Método de medida de espectros de masas.

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo en muchos tipos de muestras, desde muestras elementales hasta grandes proteínas y polímeros, para así obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito deseado. En la figura 4.8 se presenta un esquema general del proceso de la obtención del espectro de masas.

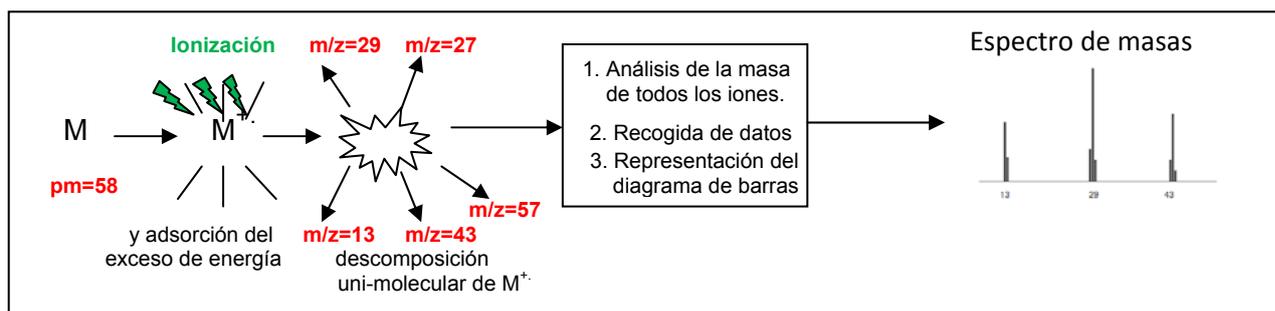


Figura 4.8: Esquema general del proceso de la obtención del espectro de masas

Esta técnica ofrece numerosas **ventajas** frente a las técnicas espectrofotométricas ya que:

- Los límites de detección que son, para muchos elementos, tres órdenes de magnitud más sensibles frente a los métodos ópticos.
- Espectros notablemente más sencillos, generalmente únicos y con frecuencia fácilmente interpretables.
- Capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas.
- No implica la absorción o emisión de luz
- Se utiliza, por ejemplo, un haz de electrones de alta energía que rompe la molécula en fragmentos.
- Las masas de los compuestos y su abundancia relativa proporciona mucha información sobre la estructura de la molécula.

Aunque también hay que comentar la **desventaja** que presenta dicha técnica, Resulta ser una técnica destructiva, de modo que la muestra no se puede recuperar íntegra como consecuencia de haber sufrido la fragmentación.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

El espectrómetro de masas es un instrumento diseñado para separar los iones en fase gaseosa de acuerdo a su valor de m/z .

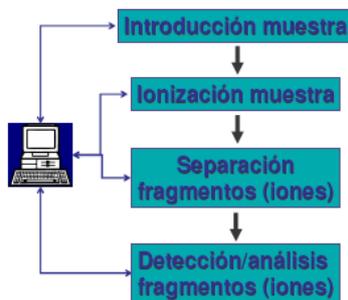


Figura 4.9: Diagrama de un espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas **incluye**:

- Un sistema de vacío
- Herramientas para introducir la muestra (LC, GC...)
- Herramientas para producir los iones en fase gaseosa de las moléculas de la muestra
- Herramientas para fragmentar los iones, con el fin de obtener información estructural, o para obtener una detección más selectiva
- Un analizador, este elemento separa los iones en fase gaseosa. Además en esta zona se movilizan los iones hasta la unidad de detección.
- Un sistema de detección
- Software y computación

En todos los casos, existe la necesidad de una interfaz que va a eliminar el disolvente y generar iones en fase gaseosa, luego estos iones se trasladan al detector del espectrómetro de masas.

En la técnica de ionización a presión atmosférica (API) se combinan los pasos de la eliminación de disolventes y de ionización de la muestra a presión atmosférica.

La interfaz es un tipo de haz de partículas, que separa la muestra del solvente, y permite la introducción de la muestra en forma de partículas sólidas en la región de Alto vacío.

El impacto de electrones es de interés para las moléculas que no se ionizan con la técnica de la API, o cuando un espectro de impacto electrónico es necesario, ya que proporciona información espectral independiente de la técnica de introducción de muestras (GC o LC, o la introducción directa) y del instrumento del proveedor.

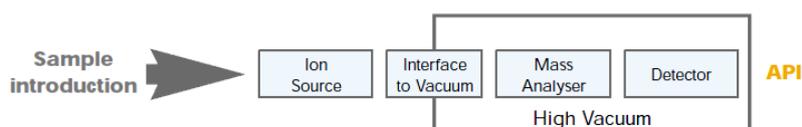


Figura 4.10: Esquema del espectrómetro de masas

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

El “corazón” del espectrómetro de masas es el **analizador**. Este elemento separa los iones en fase gaseosa. El analizador utiliza campos eléctricos o magnéticos, o una combinación de ambas para mover los iones de la región donde se producen, a un detector, donde se produce una señal que es amplificada. Dado que el movimiento y la separación de iones se basa en campos eléctricos o magnéticos, la relación masa/carga, y no sólo la masa, es de suma importancia. El analizador opera sometido a alto vacío, de modo que los iones pueden viajar al detector con un rendimiento suficiente.

Los analizadores utilizados en este tipo de instrumentos son el cuadrupolo, la trampa de iones, el tiempo de vuelo y las combinaciones como por ejemplo los cuadrupolos triple. En nuestro caso el analizador es un **cuadrupolo** simple. Este analizador es el más utilizado debido a su fácil uso, el rango de masas cubiertas, una buena linealidad para el trabajo cuantitativo, resolución, calidad de los espectros de masas y un precio asequible. En la figura 4.10 se plasma el esquema de un cuadrupolo.

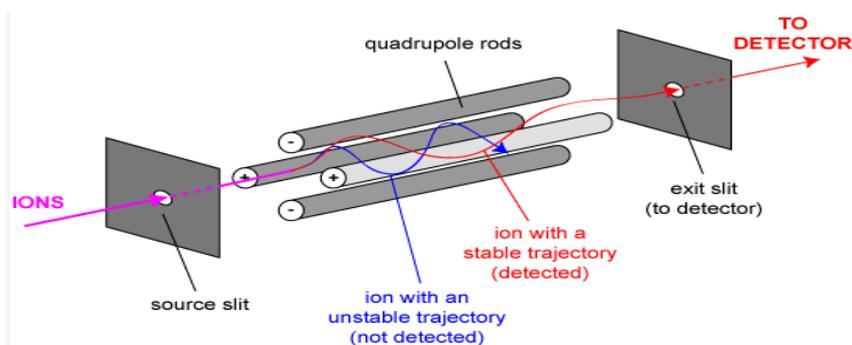


Figura 4.10: Esquema de un cuadrupolo

El tiempo de vida de un ión desde su formación hasta su detección es 50-100 microsegundos. El cuadrupolo se puede utilizar de dos modos:

- 1- **SIM** (monitoreo de iones individuales) El modo de SIM es también llamado SIR (registro de iones individuales). En el modo de SIM, los parámetros (amplitud de las tensiones de voltaje de corriente directa y el radio de frecuencia de voltaje) se disponen para detectar sólo un peso específico, o una selección de masas específicas. Este modo ofrece la mayor sensibilidad para los usuarios interesados en determinados iones o fragmentos, ya que se puede gastar más tiempo. Ese tiempo puede ser ajustado y se denomina tiempo de permanencia. La ventana de masa para la observación de un ion en el modo de SIM se puede ajustar, con el fin de compensar la calibración para pequeños cambios de masas. Este es el factor de amplitud.
- 2- **Scan**. En el modo SCAN se obtienen todos los iones comprendidos en un rango m/z determinado.

En la mayoría de instrumentos LC / MS, es posible hacer el cambio positivo a negativo, con el fin de analizar en el mismo las moléculas que se ionizan en los modos positivos y negativos.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En espectrometría de masas se utiliza una variedad de **fuentes de ionización**, siendo la energía que se transfiere durante el proceso de ionización y las propiedades químico-físicas de la especie a ionizar, los dos aspectos más importantes que deben considerarse en relación con las mismas.

Las fuentes de ionización producen iones principalmente por ionización de una molécula neutra, mediante la expulsión o captura de electrones, protonación, desprotonación, formación de aductos o la transferencia de una especie cargada a partir de una fase condensada a la fase gaseosa. La producción de iones frecuentemente implica reacciones ión-molécula en fase gaseosa. En este proyecto, la fuente de ionización es la ionización mediante electrospray (ESI).

El HPLC se encuentra conectado a la sonda de electrospray, que consiste en un capilar metálico rodeado de un flujo de nitrógeno. Se aplica un voltaje entre la punta de la sonda y el cono de muestreo. En la mayoría de aparatos, la tensión se aplica en los capilares, mientras que el cono de muestreo trabaja a baja tensión. En la figura 4.11 donde se queda plasmada el proceso de formación de electrospray.

El primer paso es la generación de un aerosol. A una velocidad de flujo muy baja (a unos pocos $\mu\text{l} / \text{min}$), la diferencia de potencial es suficiente para crear el spray. Al aumentar el flujo se hace necesario un flujo de nitrógeno para mantener estable el aerosol. Las fuentes de ionización a presión atmosférica incluyen un dispositivo de calentamiento, con el fin de acelerar la evaporación del disolvente.

Una condición indispensable para trabajar con electrospray es que el compuesto de interés debe ser ionizado en solución.

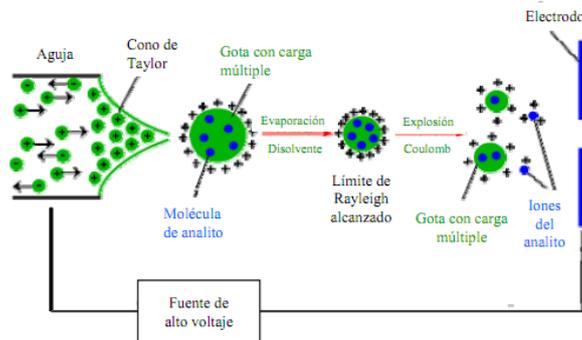


Figura 4.11: proceso de formación del electrospray

En el caso de que este detector no sea compatible con las condiciones del HPLC (es decir en el caso de la cromatografía de fase normal), es posible utilizar una post columna para conseguir las condiciones adecuadas. En el campo eléctrico, en la punta del capilar, la superficie de las gotas que contienen el compuesto ionizado se cargan, ya sea positiva o negativamente, dependiendo de la polaridad del voltaje. Debido a la evaporación del disolvente, el tamaño de la gota se reduce y en consecuencia, la densidad de cargas en la superficie de la gota aumenta. Las fuerzas de repulsión entre las cargas aumentan hasta que haya una explosión de la gota. Este proceso se repite hasta que los iones de analito se evaporan de la gota.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Múltiples iones cargados pueden obtenerse en función de la estructura química de la sustancia analizada. Esta es la razón de por qué ESI es la técnica de elección para el análisis de proteínas y otros biopolímeros en analizadores de cuadrupolo o de trampa de iones.

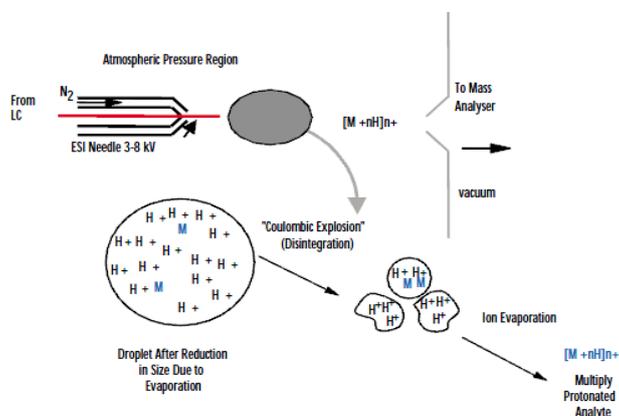


Figura 4.12: Diagrama de una fuente ESI

Esta vez el detector de masas empleado ha sido el **waters micromass ZQ 4000**, dedicado a la identificación de compuestos de alto peso molecular y alta polaridad. Para la ionización dispone de sondas de electrospray y APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) pudiendo trabajar tanto en modo positivo como negativo. Resulta ideal para la confirmación de estructuras ya conocidas y para la cuantificación, es una combinación de detector de HPLC y el analizador de masas de cuadrupolo que determina la relación masa-carga (m/z) para diversos analitos. Un sistema de inyección con un inyector automático introduce las muestras procedentes del HPLC en la fuente del analizador, donde sus moléculas se ionizan a la presión atmosférica. Los iones son entonces introducidos a través de una serie de orificios y separados de acuerdo a su relación masa-carga. Por último, la detección de un sistema fotomultiplicador detecta los iones de masas separadas, amplifica las señales y envía la información al sistema de datos.



Figura 4.13: Detector Waters Micromass ZQ 4000

2.4.- Método de medida de preparación de patrones y de muestras.

a) Preparación de patrones

Atendiendo a la solubilidad de los patrones de polifenoles que se van a analizar, casi todos* se prepararan a una concentración de 1mg/10mL en agua, excepto aquellos no solubles en agua que se disolverán en metanol (el ácido elágico, el resveratrol y la galoepicatequina-3-galato). La preparación de cada uno de los patrones analizados queda expuesta en la tabla 4.3.

Se analiza también el patrón del ácido ascórbico, que se prepara en agua y a la concentración de los patrones anteriormente mencionados (1mg/10ml).

*El resveratrol y la galoepicatequina-3-galato se preparan a una concentración de 1 mg/ml.

Tabla 4.3: Preparación de los patrones analizados

NOMENCLATURA	CONCENTRACIÓN PREPARADA	SOLUBILIDAD
Ácidos hidroxibenzóicos		
Ácido gálico	1mg/10ml	Agua
Ácido vanílico	1mg/10ml	Agua
Ácido elágico	1mg/10ml	Metanol
Ácido protocatequico	1mg/10ml	Agua
Ácidos hidroxicinámicos		
Ácido cinámico	1mg/10ml	Agua
Ácido clorogénico	1mg/10ml	Agua
Ácido p- cumárico	1mg/10ml	Agua
Ácido caféico	1mg/10ml	Agua
Ácido Sinápico	1mg/10ml	Agua
Ácido cinámico	1mg/10ml	Agua
Flavanoles		
(±) Catequina	1mg/10ml	Agua
(-) Epicatequina	1mg/10ml	Agua
Epigalocatequina-3-galato	1mg/ml	Metanol
Estilbenos		
Resveratrol	1mg/ml	Metanol
Acido ascórbico		
Ácido ascórbico	1mg/10ml	Agua

Las cantidades correspondientes de cada compuesto se pesarán en balanza de precisión, se disolverán con ayuda de un agitador magnético y se llevarán al volumen correspondiente haciendo uso de un matraz aforado cuando corresponda.

b) Preparación de las muestras:

Los zumos concentrados de frutas rojas están almacenados a -20 °C en los congeladores del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT. Los análisis de dichos zumos se realizan en el SAIT (Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Edificio I+D+I) de la Universidad Politécnica de Cartagena.

Para su análisis, unos 30 minutos antes, se sacan del congelador y se dejan descongelar completamente a temperatura ambiente. Una vez descongelados se homogeneizan y se cogen 10 ml de cada una de las muestras para su posterior análisis.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Estos zumos se diluyen 5 veces con agua y, antes de analizarse, se filtran aproximadamente 2 ml de muestra a través de filtros de nylon de 0,45 µm para eliminar las posibles partículas que puedan quedarse retenidas en la columna cromatográfica y obturarla.

2.5.- Condiciones del análisis por HPLC con detector de fotodiodos y detector de masas.

Las condiciones del método de trabajo consisten en:

Fase móvil A: Agua/ácido trifluoroacético (99,5/0,5) (v/v)

Fase móvil B: Agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético (49,5/50/0,5) (v/v/v)

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 10 µl de cada muestra de frutos rojos.

Cuidados de la columna: limpieza con acetonitrilo, pues no se debe conservar la columna en medio ácido.

Detección: Se utilizan de manera simultánea el detector de fotodiodos y el de masas. Estos detectores se encuentran acoplados al HPLC mediante el uso de una bifurcación. Del flujo que sale del HPLC a través de esta bifurcación una parte (el 30%) va para el PDA mientras que el resto (70%) va para el detector de masas.

Datos para el espectrómetro de masas: ESI (+)

Temperatura: 25°C

Capilaridad: 3500 V

SCAN: 50-1000 m/z

N₂: 10 l/min

Voltaje de cono: 15 y 45

Datos para el PDA: 240-550 nm

Gradiente de elución según el método propuesto: El gradiente de elución empleado se puede observar en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Gradiente de elución para el método propuesto

Tiempo (min)	Fase móvil A(%)	Fase móvil B (%)
0	92	8
3,3	82	18
37,3	68	32
74,6	40	60
90,6	0	100
103,4	0	100
104,5	92	8
107,2	92	8

En el departamento, además, se realizó el análisis de las distintas frutas con las fases móviles y el gradiente de elución del método IFU nº71. En las tablas 4.5 y 4.6 se muestran las condiciones del método IFU empleado.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 4.5: Comparación de las fases móviles empleadas en ambos métodos

Método propuesto	Método IFU n°71 (1998)
Fase móvil A: Agua/ácido trifluoroacético (99,5/0,5) (v/v)	Fase móvil A: Agua/ácido fórmico (90/10) (v/v)
Fase móvil B: Agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético (49,5/50/0,5) (v/v/v)	Fase móvil B: Acetonitrilo/ácido fórmico (90/10) (v/v)

Tabla 4.6: Gradiente de elución empleada en el método IFU n° 71

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	93,3	6,7
1	93,3	6,7
26	83,3	16,7
35	44,4	55,6
38	44,4	55,6
43	93,3	6,7
46	93,3	6,7

A la hora de comparar ambos métodos se puede observar que con las condiciones del método propuesto se ha conseguido una mejora significativa en los cromatogramas. Con el método IFU n°71 se obtenía una buena resolución de los antocianos pero una escasa resolución del resto de compuestos polifenólicos mientras que con este nuevo método se llega a obtener una buena resolución de una gran variedad de polifenoles y no sólo de los antocianos, lográndose así una buena identificación de un gran número de compuestos polifenólicos: antocianos, flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos y estilbenos.

Además, al trabajar con una fase móvil menos ácida se protege al equipo de HPLC ante una posible corrosión.

CAPÍTULO 5.- RESULTADOS

1.-Análisis por HPLC de los patrones estudiados.

Se realizaron los análisis individuales de estos patrones siguiendo las condiciones del método de análisis por HPLC que están recogidas en el capítulo 4: Materiales y Métodos de este proyecto.

Los resultados obtenidos se pueden resumir en dos puntos:

- Se realizó inicialmente un espectro de UV visible para cada compuesto, obteniéndose así las longitudes de onda máximas de cada patrón y pudiendo establecer una longitud de onda para cada grupo de los polifenoles estudiados en las determinadas frutas.
- Se analizó el espectro de masas obtenido para cada patrón.

Las características espectroscópicas de los patrones estudiados quedan plasmadas en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características espectroscópicas (UV-Vis y masas) de los patrones estudiados

Compuesto	Tiempo de retención (min)	UV-Visible ($\lambda_{\text{máx}}$)nm	Masas
Ácidos hidroxibenzóicos			
Ácido gálico	5,804	272,2	170,8
Ácido protocatequico	8,265	260,3 y 293,5	154,9
Ácido vanílico	15,81	261,5 y 292,3	168,9
Ácido elágico	35,500	253,3 y 365,9	303,2
Ácidos hidroxicinámicos			
Ácido clorogénico	13,816	241,5 y 326,8	354,9 y 162,9
Ácido caféico	16,570	248 y 324,4	180,9
Ácido p- cumárico	26,083	227,3 y 310	147
Ácido Sinápico	34,091	236,8 y 324,4	224,8 y 206,9
Ácido cinámico	61,660	278,1	148,8 y 130,7
Flavanoles			
([±]) Catequina	12,600	279,3	291 y 138,9
Epigallocatequina-3-galato	18,230	226,2 y 274,5	459
(-) Epicatequina	19,240	279,3	291 y 138,9
Estilbenos			
Resveratrol	53,170	223,8 y 320,8	228,9
Ácido ascórbico			
Ácido ascórbico	3.004	243,8	176,8

1.1.-Análisis por UV-Visible de los patrones estudiados.

Los ácidos hidroxibenzóicos se detectan a una $\lambda_{\text{máx}}$ de absorbanza de 260 nm, mientras que los ácidos hidroxicinámicos son detectados a una $\lambda_{\text{máx}}$ de absorbanza de 320 nm. Los flavanoles tienen un pico de absorción a una λ de 280nm y es la λ a la que se va a medir. Hay que señalar que, sin embargo, es un pico muy poco intenso por lo que pueden pasar desapercibidos cuando están presentes en poca concentración. En estos casos, la técnica más apropiada para su identificación es la fluorescencia con la que presenta una $\lambda_{\text{máx}}$ de excitación de 280nm y una $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión de 350nm. En este proyecto no se ha empleado esta técnica pero si se confirmará su presencia por su espectro de masas.

El patrón de resveratrol, único patrón que pertenece al grupo de los estilbenos se detecta a $\lambda_{\text{máx}}$ de absorbanza de 280 nm. A parte de los polifenoles, como se ha podido ver, se ha estudiado también el ácido ascórbico cuya $\lambda_{\text{máx}}$ se alcanza a 243.8.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Los espectros de absorción UV-Visible obtenidos de todos los patrones individuales se muestran en las tablas 5.2; 5.3; 5.4; 5.5 y 5.6.

Tabla 5.2: Espectros individuales de absorción UV-Visible de los patrones del grupo de los ácidos hidroxibenzoicos.

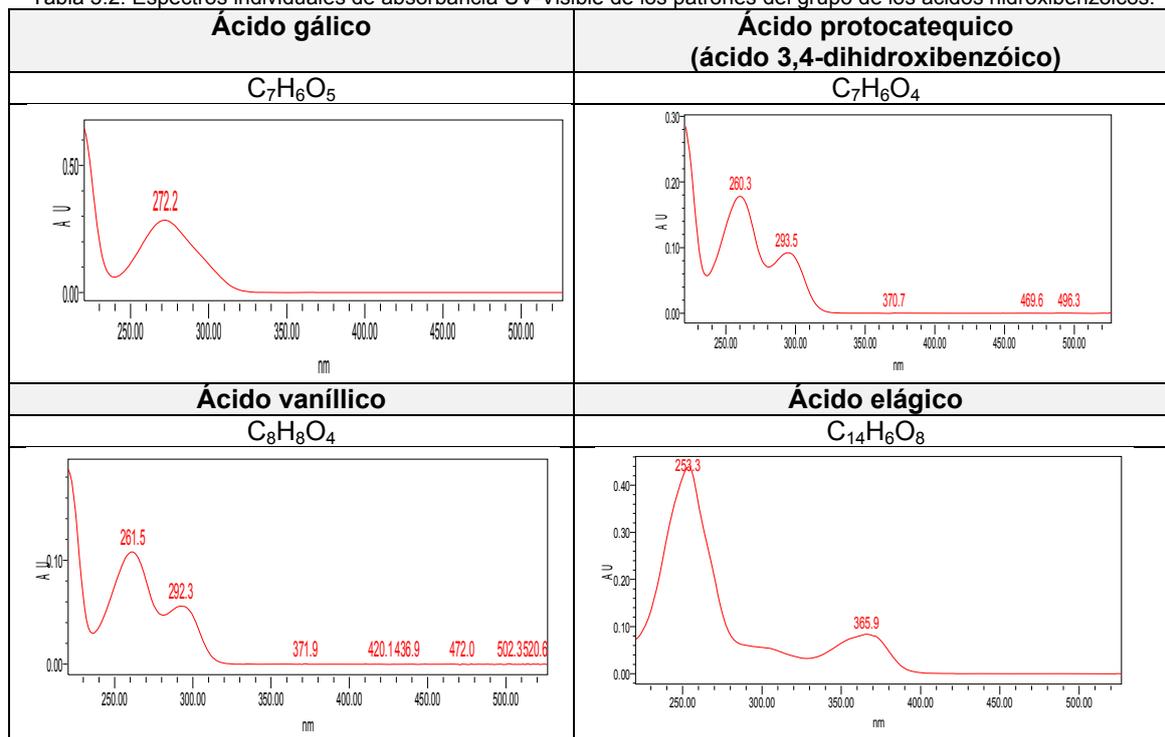
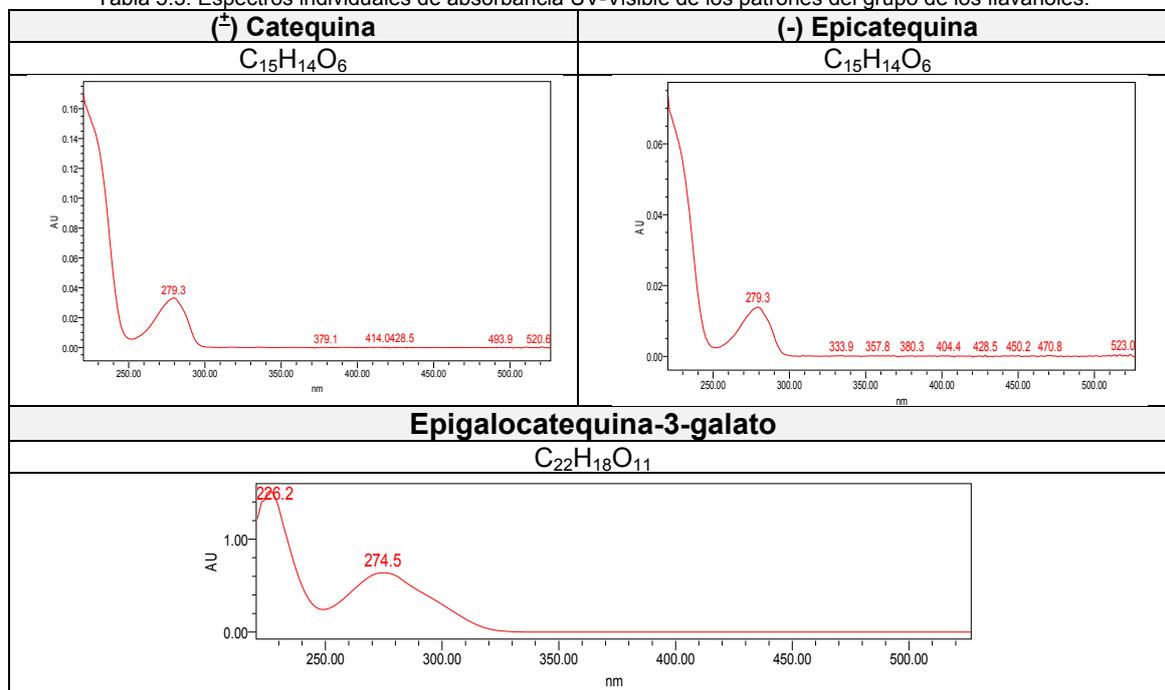


Tabla 5.3: Espectros individuales de absorción UV-Visible de los patrones del grupo de los flavanoles.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.4: Espectros individuales de absorbancia UV-Visible de los patrones del grupo de los ácidos hidroxicinámicos.

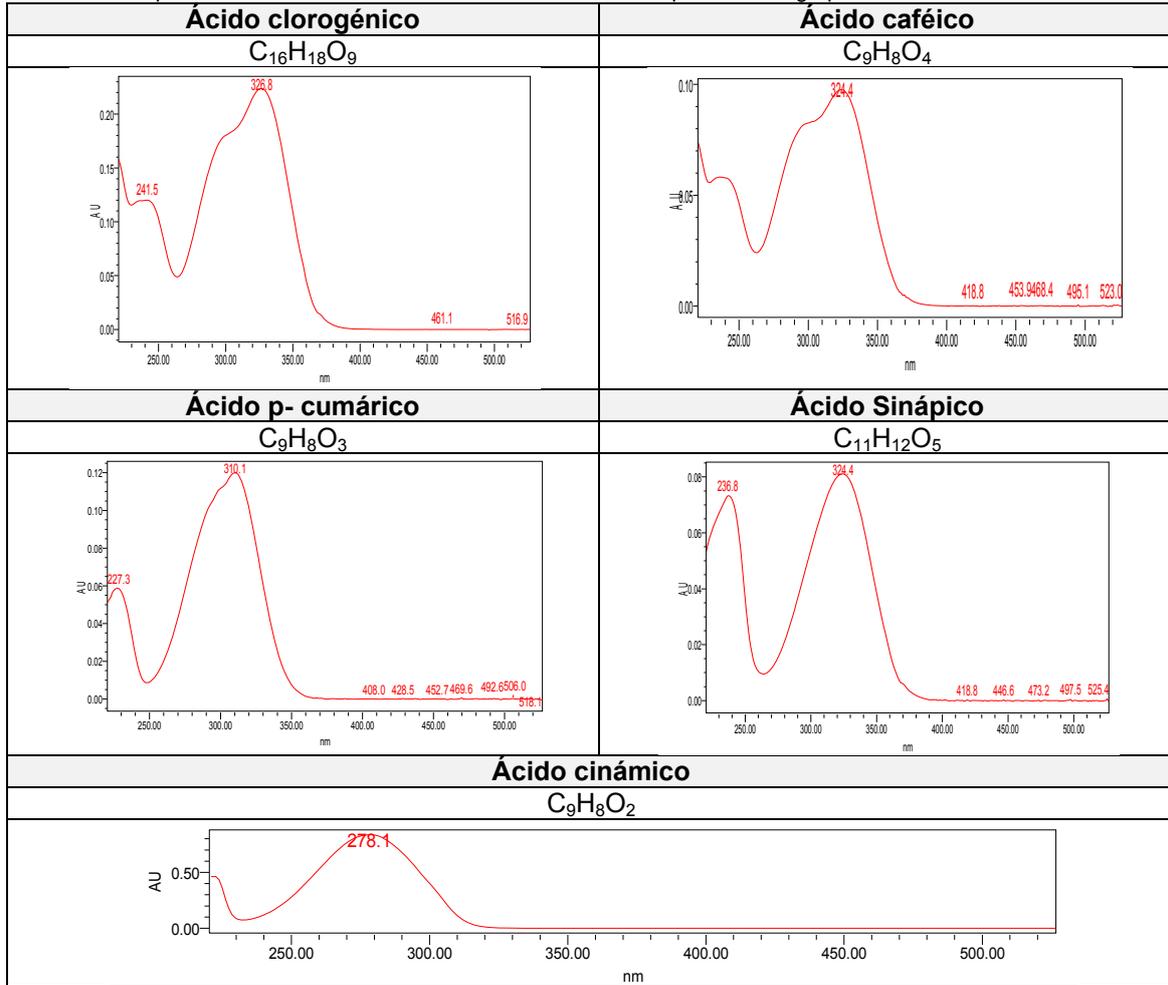


Tabla 5.5: Espectro individual de absorbancia UV-Visible del patrón resveratrol.

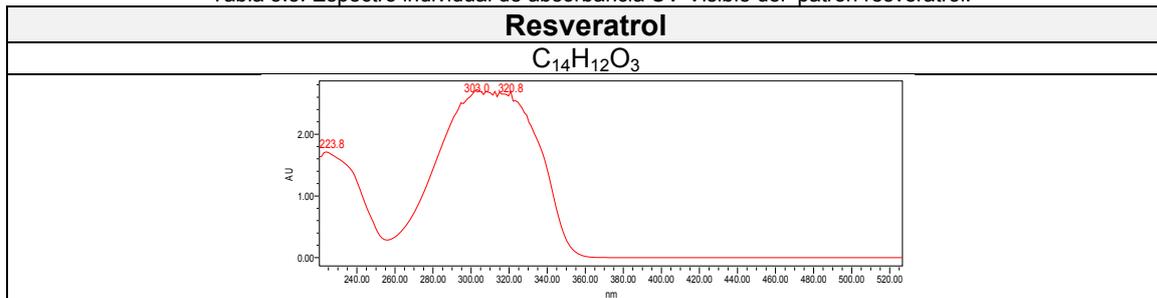
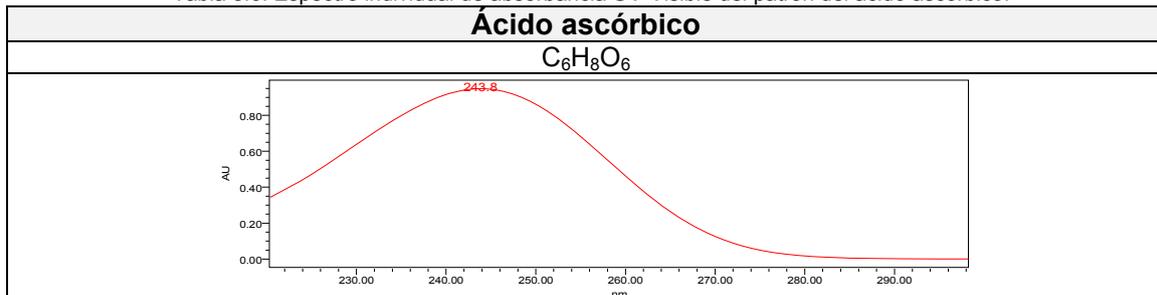


Tabla 5.6: Espectro individual de absorbancia UV-Visible del patrón del ácido ascórbico.



1.2.-Análisis por detector de masas de los patrones estudiados.

Al detector de masas le llega un flujo de 0.7 ml/min, flujo que está dentro de lo permitido sin llegar a saturar el equipo.

Primeramente, al introducir la muestra en este detector se va a generar un cromatograma de respuesta, en el que hay que “buscar” al analito deseado mediante previo conocimiento de la masa de dicho compuesto.

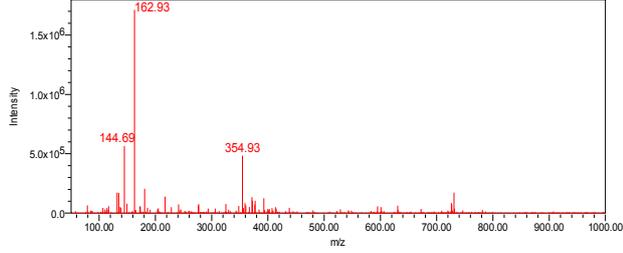
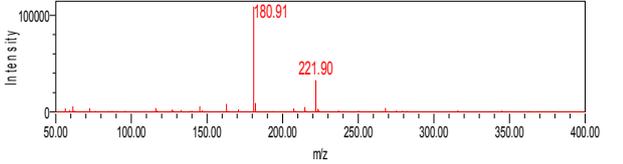
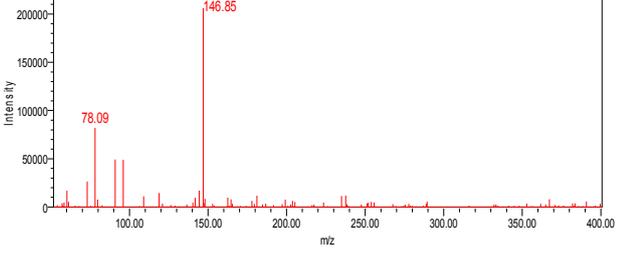
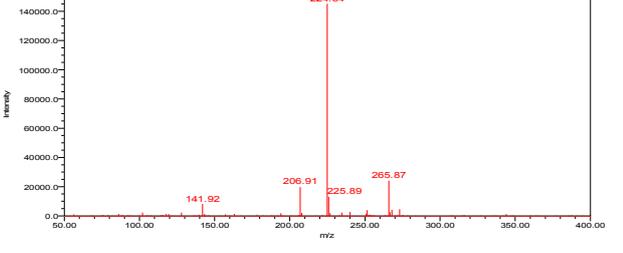
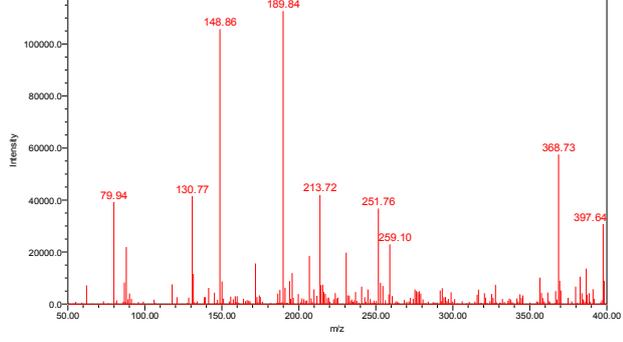
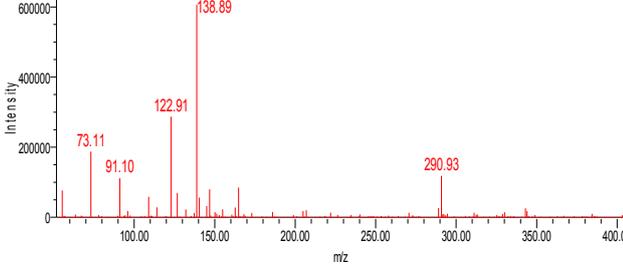
Debido a que las moléculas pequeñas no se podían ver en el detector de masas empleando un CV= 45, se realizó un barrido del voltaje de cono desde CV= 15 (con este voltaje las moléculas apenas se rompen) hasta CV=45 (CV= voltaje de cono), resultando ser que con un voltaje de cono de CV= 45, las moléculas sufrían múltiples rupturas, de modo que las moléculas pequeñas (Pm<300) no se podían ver. Por este motivo se va a trabajar con un CV de 15.

En la tabla 4.13 se muestran los espectros de masas de los patrones estudiados.

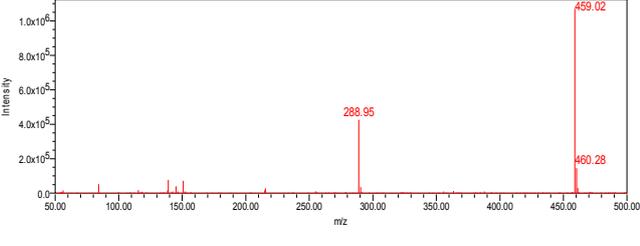
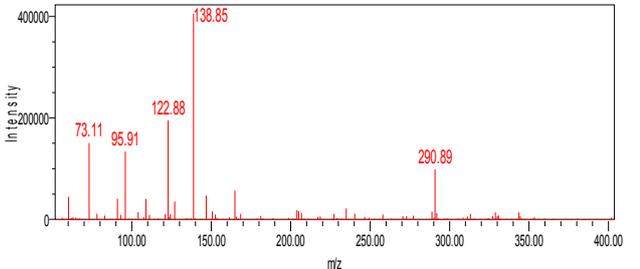
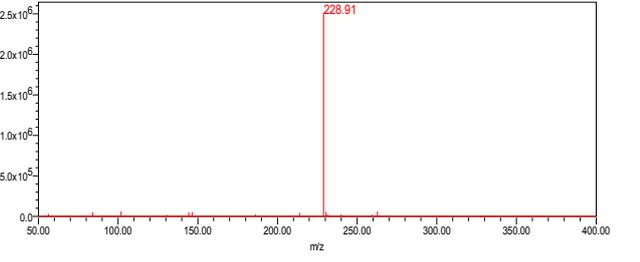
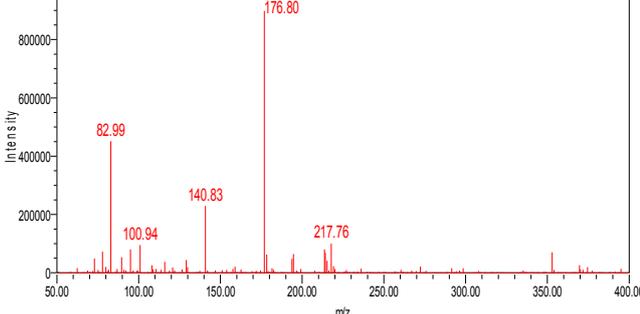
Tabla 5.7: Espectros de masas de los patrones estudiados

Nombre	Fórmula y peso molecular	Espectro de masas
Ácido gálico	$C_7H_6O_5 \rightarrow 170$	
Ácido protocatequico (ácido 3,4-dihydroxibenzóico)	$C_7H_6O_4 \rightarrow 154$	
Ácido vanílico	$C_8H_8O_4 \rightarrow 168$	
Ácido elágico	$C_{14}H_6O_8 \rightarrow 302$	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

<p>Ácido clorogénico</p>	<p>$C_{16}H_{18}O_9 \rightarrow 354$</p>	 <p>Mass spectrum of Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$) showing major peaks at m/z 144.69, 162.93, and 354.93.</p>
<p>Ácido caféico</p>	<p>$C_9H_8O_4 \rightarrow 180$</p>	 <p>Mass spectrum of Caffeic acid ($C_9H_8O_4$) showing major peaks at m/z 180.91 and 221.90.</p>
<p>Ácido p- cumárico</p>	<p>$C_9H_8O_3 \rightarrow 146.8$</p>	 <p>Mass spectrum of p-Coumaric acid ($C_9H_8O_3$) showing major peaks at m/z 78.09 and 146.85.</p>
<p>Ácido Sinápico</p>	<p>$C_{11}H_{12}O_5 \rightarrow 224$</p>	 <p>Mass spectrum of Sinapic acid ($C_{11}H_{12}O_5$) showing major peaks at m/z 141.92, 206.91, 224.84, 225.89, and 265.87.</p>
<p>Ácido cinámico</p>	<p>$C_9H_8O_2 \rightarrow 148$</p>	 <p>Mass spectrum of Cinnamic acid ($C_9H_8O_2$) showing major peaks at m/z 79.94, 130.77, 148.86, 189.84, 213.72, 251.76, 259.10, 368.73, and 397.64.</p>
<p>(±) Catequina</p>	<p>$C_{15}H_{14}O_6 \rightarrow 290$</p>	 <p>Mass spectrum of Catechin ($C_{15}H_{14}O_6$) showing major peaks at m/z 73.11, 91.10, 122.91, 138.89, and 290.93.</p>

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Epigallocatequina-3-galato	$C_{22}H_{18}O_{11} \rightarrow 458$	
(-) Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6 \rightarrow 290$	
Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3 \rightarrow 228$	
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6 \rightarrow 176$	

Para poder exponer los resultados obtenidos es necesario conocer unos conceptos previos:

- **Ión Molecular (pico molecular) M⁺:** es el ión obtenido por la pérdida de un electrón por la molécula. Es el pico que representa la masa sin ese electrón.
- **El pico base:** el pico más intenso del espectro, al que por convenio se le asigna una intensidad del 100 %
- **Radical cation⁺:** son especies cargadas con un número impar de electrones
- **Picos de fragmentación:** picos correspondientes a fragmentos más ligeros, formados por descomposición del ión molecular. A menudo se corresponden con los carbocationes más estables.

En el espectro de masas se va a obtener la masa de los diferentes iones como M+1, de modo que la molécula que tiene un peso molecular de 170, por ejemplo, tendrá un ión molecular de 171, siempre que la carga que tenga la molécula sea igual a la unidad.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- El primer patrón a explicar va a ser el **ácido gálico**. En su espectro se obtiene un pico base producto de su ión molecular (m/z 171). El pico obtenido a una relación m/z de 305 debe ser debido a la formación de un aducto del ácido gálico.
- En el **ácido protocatequico** (ácido 3,4-dihidroxibenzóico) se ha obtenido el pico importante debido a su ión molecular (155 umas) y se han encontrado también otros picos causados por fragmentaciones que no se conocen muy bien.
- El **ácido vanillico** presenta un pico fundamental debido a su ión molecular (m/z 169) y un pico base de 60 umas. El pico resultante a una relación m/z de 207 debe ser debido a la posible formación de un aducto.
- En el **ácido elágico** se puede ver su ión molecular a 303 ($pm+1$), diferentes fragmentos debido a las diferentes rupturas que sufre la molécula y un pico base de $m/z=60$.
- En el caso del **clorogénico** se obtiene el ión molecular a m/z de 355 ($pm+1$) y un pico base a 162.9, pico característico de los ácidos hidroxicinámicos esterificados. Éste es un ácido hidroxicinámico esterificado. Según la bibliografía (Abad-García et al., 2009), el primer fragmento que se pierde es la parte alcohólica para obtener el ácido hidroxicinámico deshidratado (pico de 162.9) y una posterior pérdida característica de una molécula de agua (pico a 144.7).

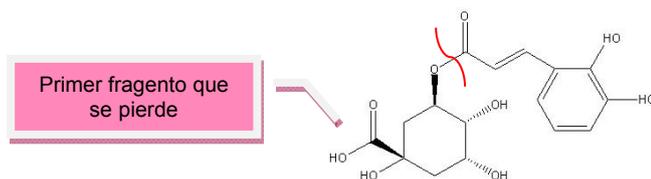


Figura 5.1: Estructura del clorogénico

- En el caso del **ácido caféico** se ve el pico base que se corresponde con su masa+1(180.9) y un pico con una relación masa/carga de 221.9 debido seguramente a la formación de algún aducto o bien debido a una posible esterificación del grupo ácido.
- El espectro del **ácido p-cumárico** muestra dos señales importantes. La primera, obtenida a una relación m/z de 146.9, debido a la pérdida de una molécula de agua y la segunda señal con una $m/z=118.9$, producida por la pérdida de una molécula de agua y una molécula de CO (B. Abad-García et al, 2009). El pico base del espectro en cuestión se da a una relación masa/carga de 100.9, podría corresponderse con la pérdida de otra molécula de agua.

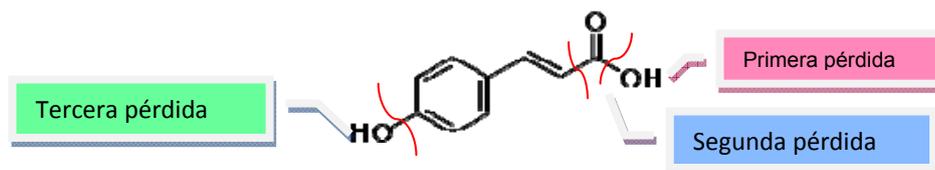


Figura 5.2: Estructura del ácido cumárico

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

-
- **El Ácido Sinápico** muestra un pico base con una relación $m/z = 224.8$ correspondiente a su ión molecular. Se puede ver también otro pico característico a 206.9, debido a la pérdida de una molécula de agua (B. Abad-García et al, 2009). El pico correspondiente a la masa/carga 141.9 no se conoce muy bien aunque se intuye que podría explicarse mediante la pérdida de los dos grupos CH_3OH y una posible ciclación. El pico correspondiente a la relación de 265.8 puede deberse a la esterificación del ácido sinápico o a la posible formación de un aducto.

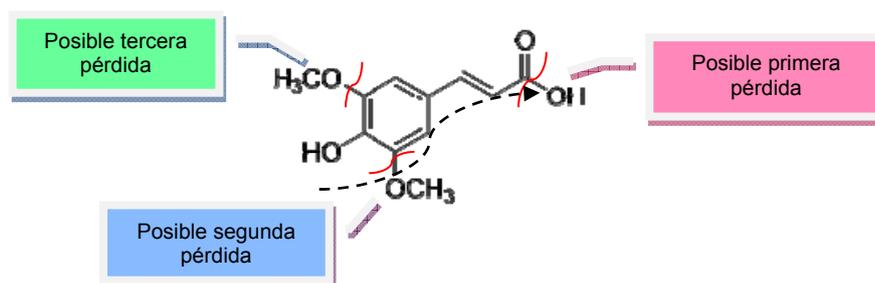


Figura 5.3: Estructura del ácido sinápico

- **El Ácido Cinámico** muestra dos picos importantes. El primero, obtenido a una m/z 148.8 correspondiente a su ión molecular y el otro pico importante es el obtenido a la relación m/z 130.7, producto de la pérdida de una molécula de agua. También presenta un pico base cuya relación m/z 189.8 podría deberse a la unión de este ácido mediante un puente de hidrógeno con una molécula de acetonitrilo de la fase móvil.
- En el espectro de **la (+) Catequina** se ve claramente el ión molecular que corresponde a su $m+1 = 291$. El pico base se obtiene a una relación masa/carga = 138.9, se corresponde con una fragmentación muy intensa que sucede en el heterociclo conteniendo un hidroxilo en el carbono β al heteroátomo (B. Abad-García et al, 2009).

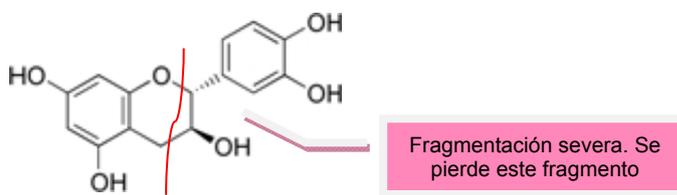


Figura 5.4: Estructura de la catequina

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- En el espectro del **Epigallocatequina-3-galato** se ve claramente el pico base que se corresponde con su $m/z + 1$ (m/z 459). El otro pico obtenido (m/z 288.9) debe ser fruto de la fractura causada en el enlace que une el carboxilo a la estructura flavonoide.

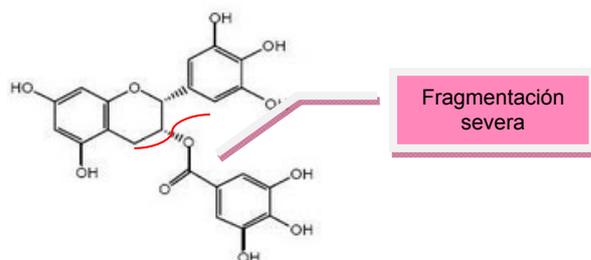


Figura 5.5: Estructura de la epigallocatequina-3-galato

- En el espectro de **la (-) Epicatequina** se ve claramente el ión molecular que corresponde a su $m/z + 1 = 291$. El pico base se obtiene a un $m/z + 1 = 138.9$, se corresponde con una fragmentación muy intensa que sucede en el heterociclo que contiene un hidroxilo en el carbono β al heteroátomo. La diferencia con respecto al anterior está en la posición del OH en el anillo dihidropirano.

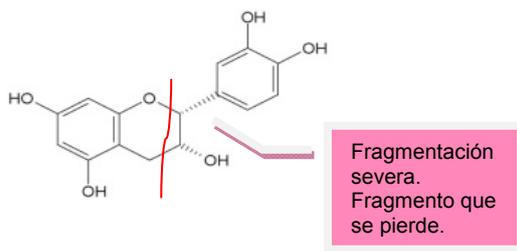


Figura 5.6: Estructura de la epicatequina

- En el espectro del **resveratrol** se ve un único pico que es el pico base, el cual se corresponde con su masa +1 resultando ser una masa de 228.9.
- En el espectro del **ácido ascórbico** se observan dos picos importantes, el primero que es el pico base y se corresponde con su ión molecular (m/z 176.8) y el segundo, obtenido a una m/z 140.8 producido por la pérdida de dos moléculas de agua. En este espectro también se puede ver otra señal a una m/z 217.7, la cual podría ser generada por la unión de este ácido mediante un puente de hidrógeno a una molécula de acetonitrilo de la fase móvil.

2.-ANÁLISIS POR HPLC DE LOS ZUMOS DE FRUTAS ROJAS

En este proyecto se han analizado los perfiles de antocianos, flavonoles, flavanoles y ácidos fenólicos de cinco frutas rojas. El análisis se ha llevado a cabo mediante la técnica de HPLC acoplada a un detector de fotodiodos y a un detector de masas. El método está indicado en el apartado 2.5 de la sección de métodos.

2.1.- Mirtilo (*Blueberry; Vaccinium myrtillus*)

La muestra analizada se trata de un zumo concentrado de esta fruta procedente de la empresa J.García Carrión. La muestra es analizada en el laboratorio del edificio de Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Edificio I+D+I (SAIT). Anteriormente a su análisis esta muestra se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

➤ Antocianos presentes en el mirtilo

Para identificar los antocianos presentes en el mirtilo se mira el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 520 nm, el resultado obtenido se comprueba con la bibliografía y posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada antociano. La propuesta de identificación de los antocianos en las frutas rojas se ha realizado mediante la comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía. El motivo de este tipo de identificación se debe a la gran diversidad de antocianos presentes en las frutas rojas y a la no comercialización de patrones de muchos de ellos.

En la figuras 5.7; 5.8 y 5.9 se muestra el perfil de los antocianos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

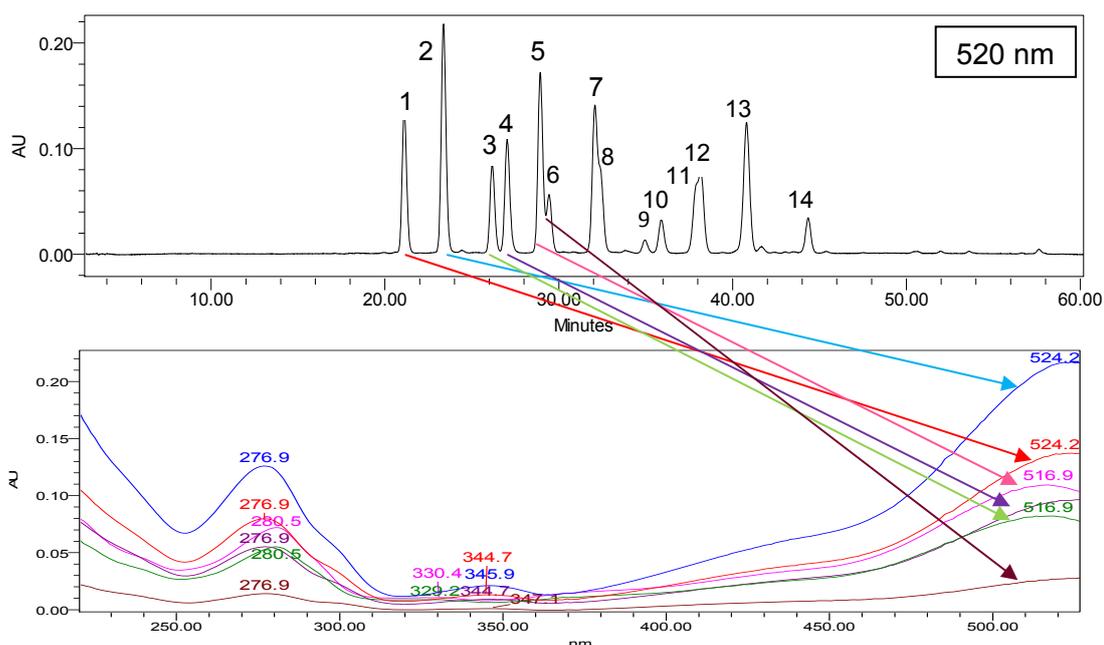


Figura 5.7: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

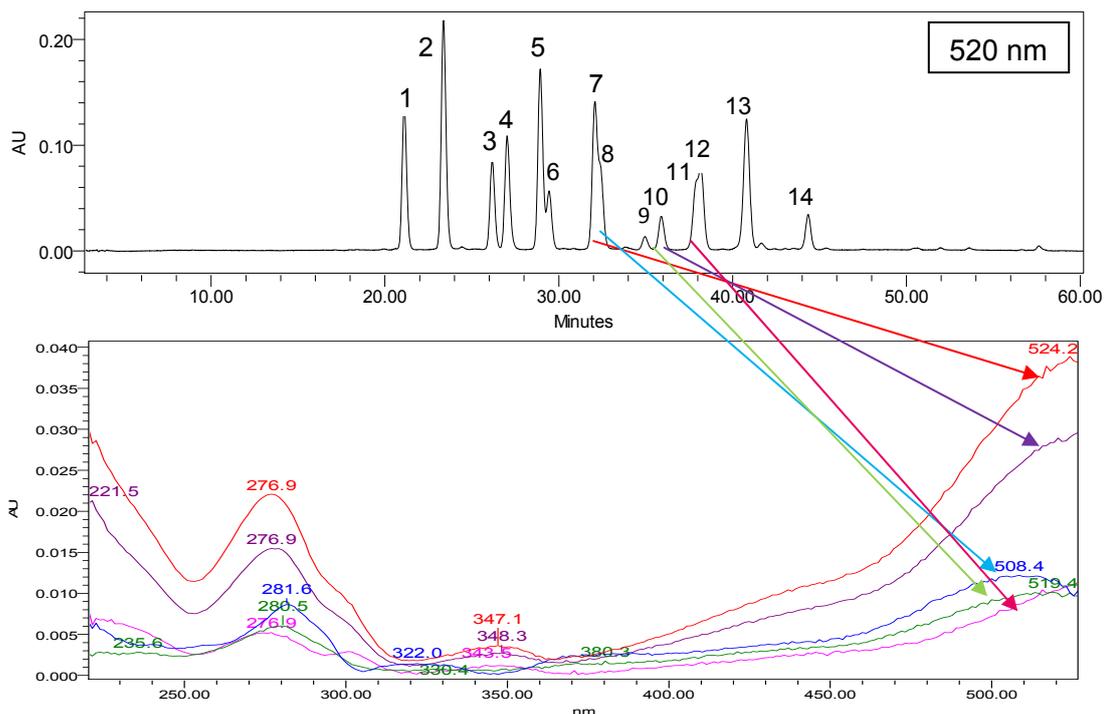


Figura 5.8: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

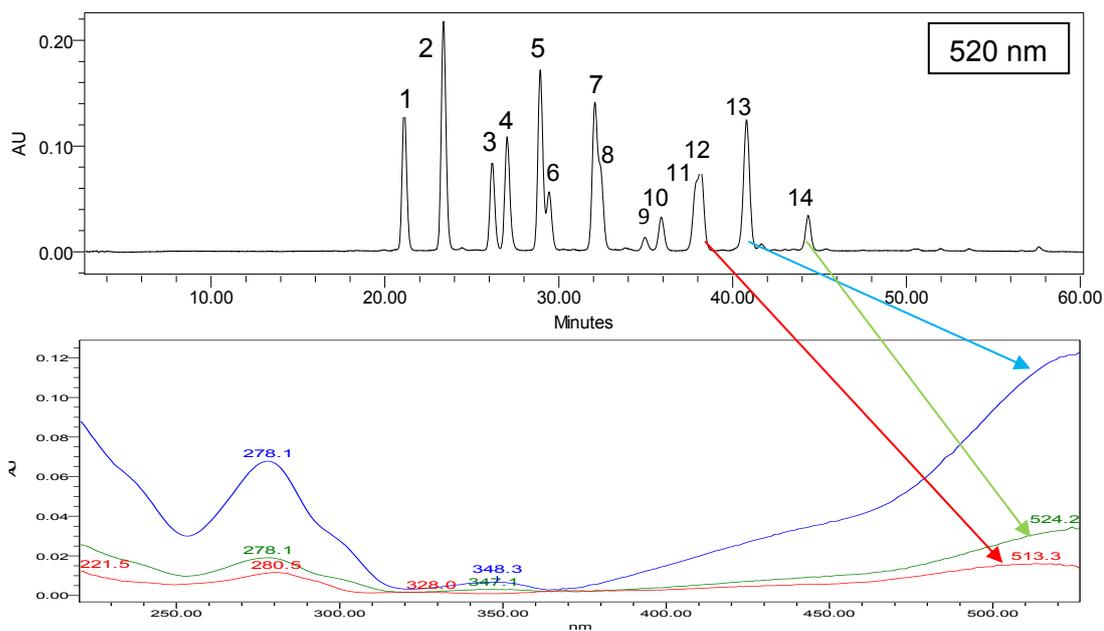


Figura 5.9: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

A continuación, en la tabla 5.8, se realiza la propuesta de identificación de los antocianos presentes en el mirtilo.

Tabla 5.8: Propuesta de la identificación de los antocianos presentes en el mirtilo

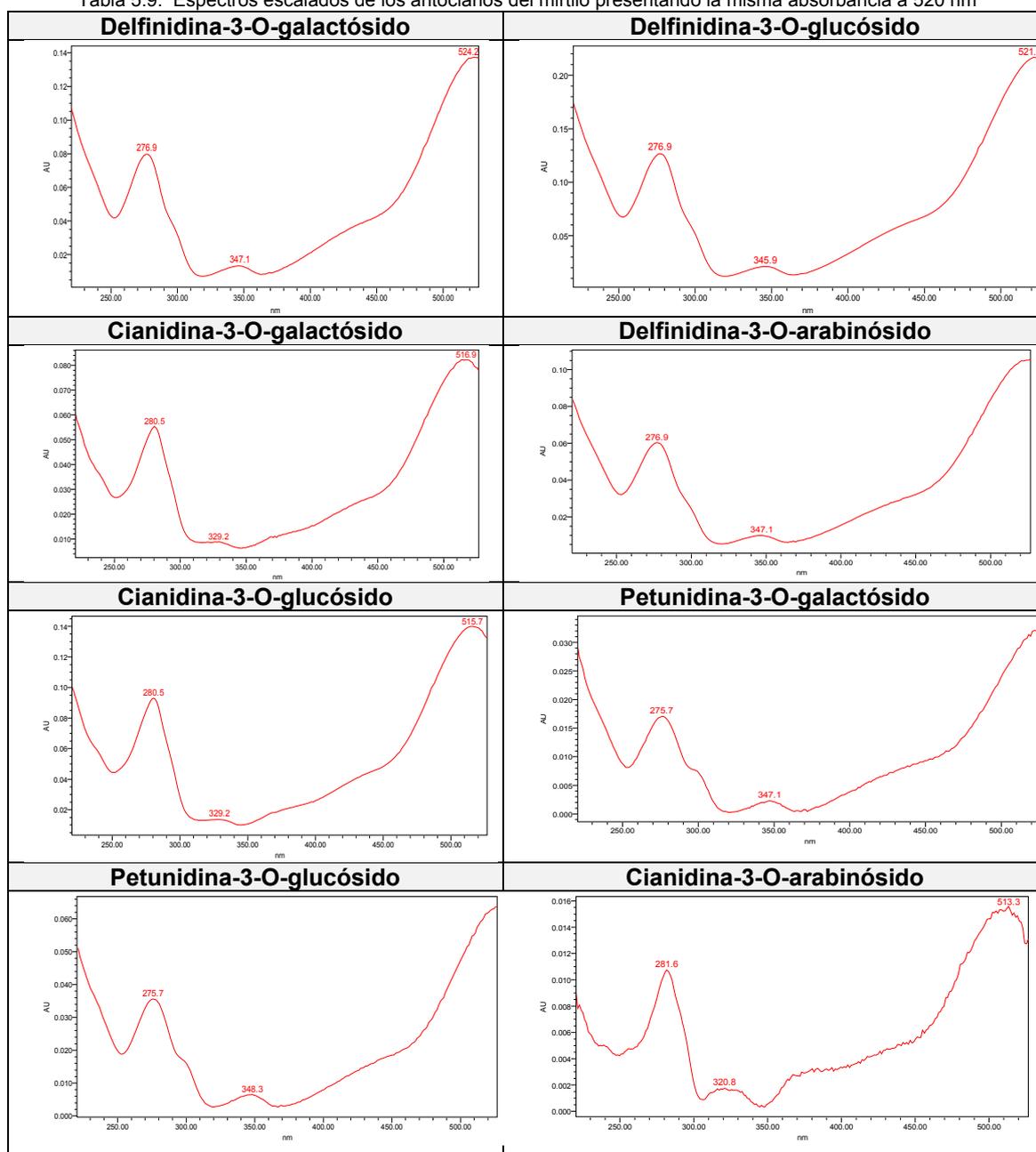
Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los antocianos
1	21,054	Delfinidina-3-O-galactósido
2	23,246	Delfinidina-3-O-glucósido
3	26,113	Cianidina-3-O-galactósido

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

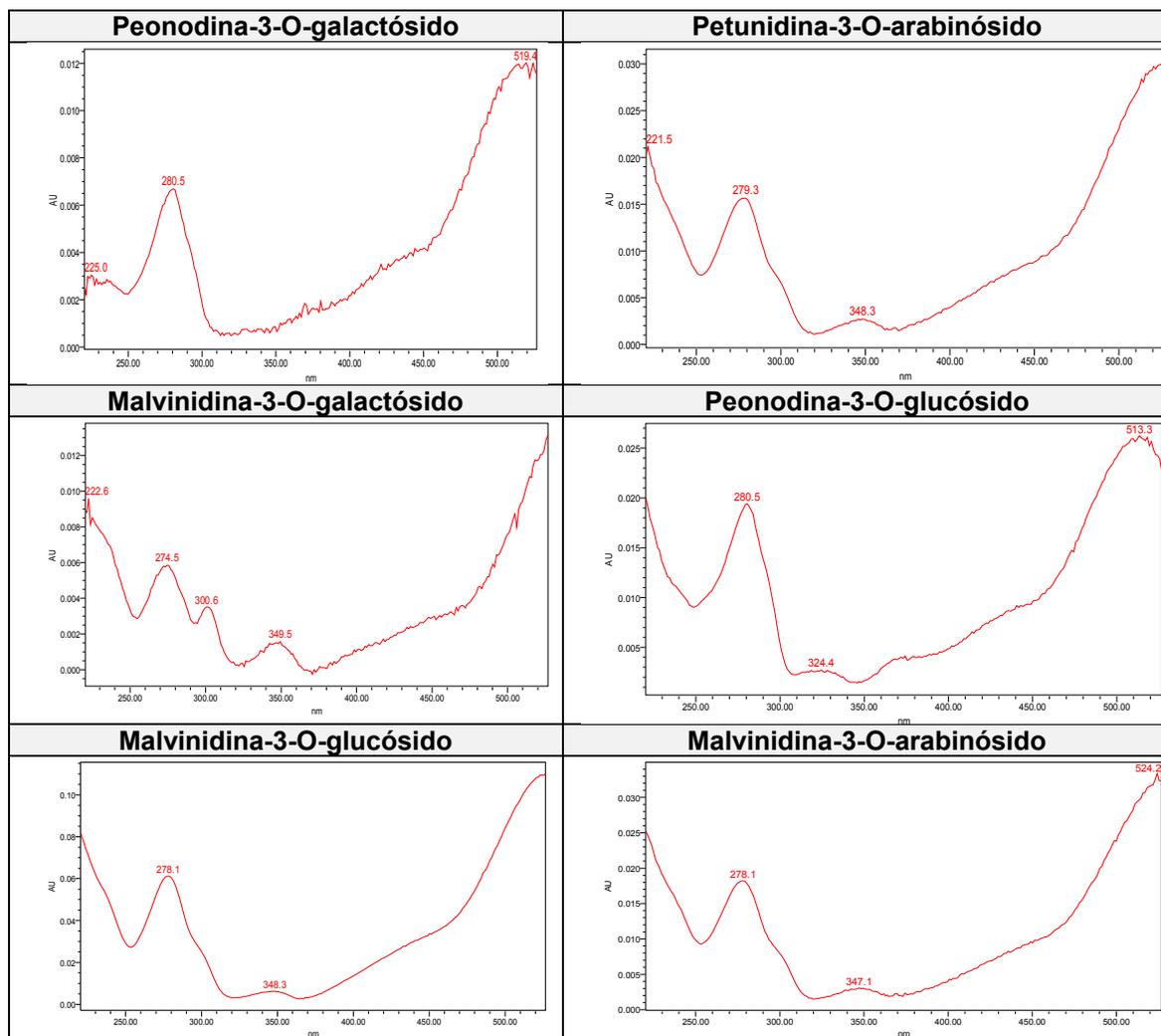
4	26,918	Delfinidina-3-O-arabinósido
5	28,909	Cianidina-3-O-glucósido
6	29,326	Petunidina-3-O-galactósido
7	32,016	Petunidina-3-O-glucósido
8	32,366	Cianidina-3-O-arabinósido
9	34,854	Peonodina-3-O-galactósido
10	35,994	Petunidina-3-O-arabinósido
11	37,746	Malvinidina-3-O-galactósido
12	38,204	Peonodina-3-O-glucósido
13	40,625	Malvinidina-3-O-glucósido
14	44,270	Malvinidina-3-O-arabinósido

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.9 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 520 nm.

Tabla 5.9: Espectros escalados de los antocianos del mirtilo presentando la misma absorbancia a 520 nm



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Al no tener patrones de los antocianos, la propuesta de identificación de cada antociano se ha realizado mediante una comparación con los datos de la bibliografía. Esto queda expuesto en la tabla 5.10.

Tabla 5.10: Bibliografía de los antocianos presentes en el mirtilo

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Tian et al (2005)	Phenol explorer	Díaz García, Obón, Castellar(2011)
1	Delfinidina-3-O-galactósido	x	x	X
2	Delfinidina-3-O-glucósido	X	X	X
3	Cianidina-3-O-galactósido	X	X	X
4	Delfinidina-3-O-arabinósido	X	X	X
5	Cianidina-3-O-glucósido	X	X	X
6	Petunidina-3-O-galactósido	X	X	X
7	Petunidina-3-O-glucósido	X	X	X
8	Cianidina-3-O-arabinósido	X	X	X

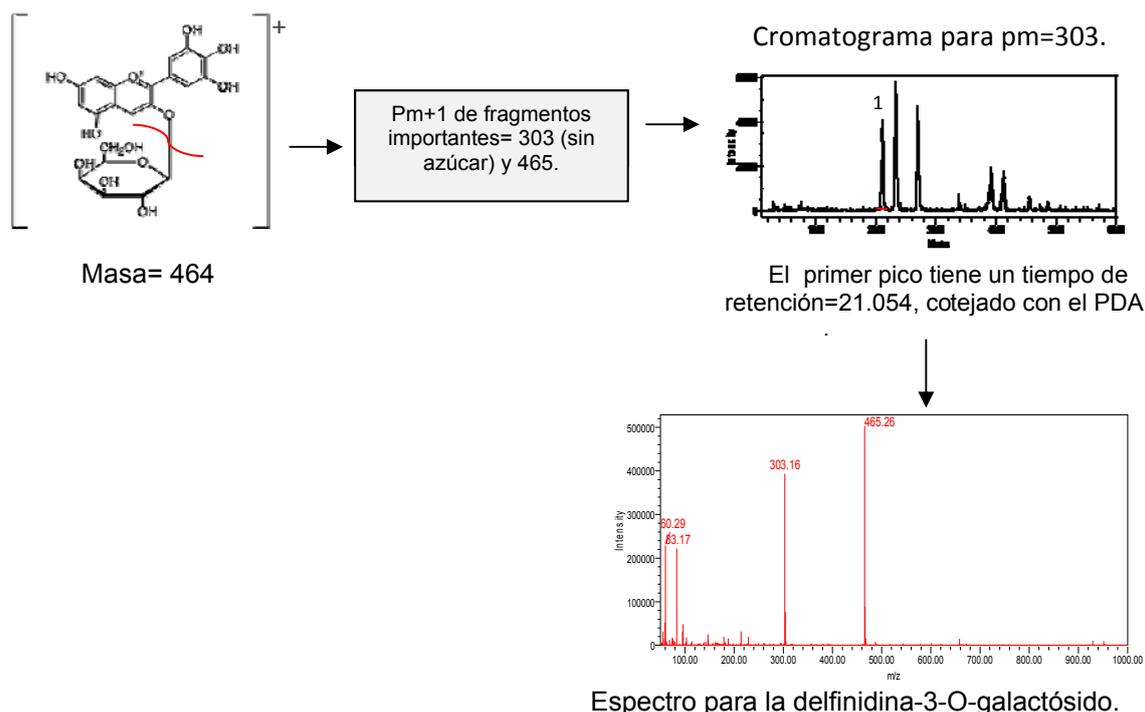
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

9	Peonodina-3-O-galactósido	x	X	X
10	Petunidina-3-O-arabinósido	X	X	X
11	Malvinidina-3-O-galactósido	X	X	X
12	Peonodina-3-O-glucósido	X	X	X
13	Malvinidina-3-O-glucósido	X	X	X
14	Malvinidina-3-O-arabinósido	X	X	X

Para corroborar dicha propuesta se “busca” cada antociano por espectrometría de masas. El modo de proceder para esa “búsqueda” es el siguiente:

- Con el objetivo de obtener una buena resolución y una buena sensibilidad del cromatógrafo, se va a trabajar en modo SCAN. Así mismo, lo primero que se hace es extraer el cromatograma correspondiente a la masa+1 de un determinado compuesto, para ello es importante saber los fragmentos importantes que van a resultar del compuesto en cuestión, ya que puede facilitar la función. A veces es más práctico y fácil buscar un compuesto por el peso de su fragmento mayoritario.
- Mediante integración de un pico de dicho cromatograma se obtiene el espectro de un determinado compuesto. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se queda identificado dicho compuesto.

A modo de ejemplo, en la figura 5.10, se expone un esquema de la verificación del primer antociano de la lista, el delfinidina-3-O-galactósido.

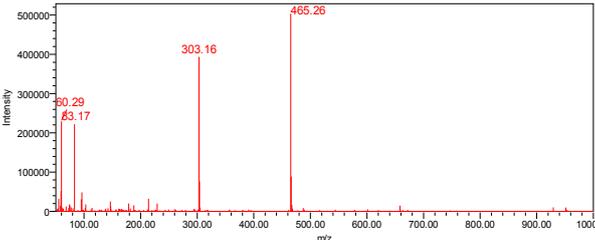
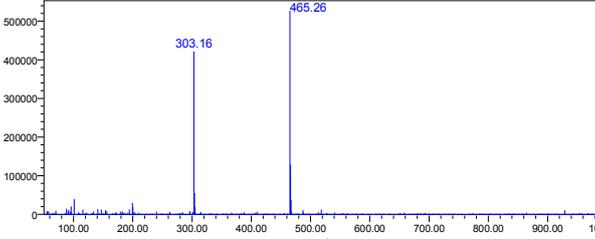
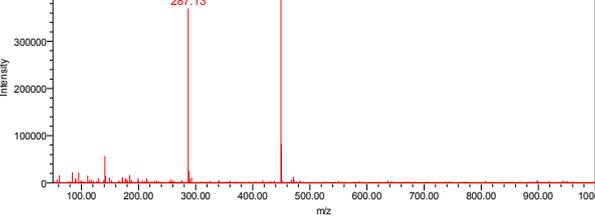
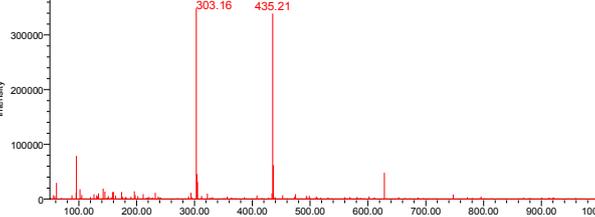
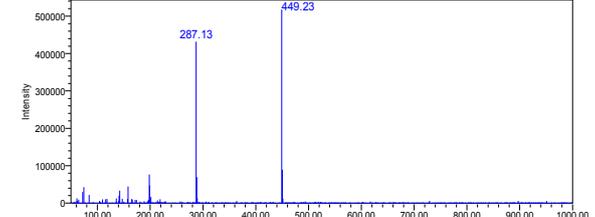


Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Figura 5.10: Esquema de la verificación del primer antociano de la lista, la delphinidina-3-O-galactósido

En la tabla 5.11 se presentan los espectros de masas referentes a los antocianos identificados en el mirtilo.

Tabla 5.11: Espectros de masas referentes a los antocianos identificados en el mirtilo.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Espectro de masas
1	Delphinidina-3-O-galactósido	 <p>Mass spectrum showing peaks at m/z 80.29, 83.17, 303.16, and 465.26.</p>
2	Delphinidina-3-O-glucósido	 <p>Mass spectrum showing peaks at m/z 303.16 and 465.26.</p>
3	Cianidina-3-O-galactósido	 <p>Mass spectrum showing peaks at m/z 287.13 and 449.23.</p>
4	Delphinidina-3-O-arabinósido	 <p>Mass spectrum showing peaks at m/z 303.16 and 435.21.</p>
5	Cianidina-3-O-glucósido	 <p>Mass spectrum showing peaks at m/z 287.13 and 449.23.</p>

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

6	Petunidina-3-O-galactósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 60.29, 83.17, 317.12, and 479.28.</p>
7	Petunidina-3-O-glucósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 60.29, 73.19, 78.12, 101.13, 317.19, and 479.22.</p>
8	Cianidina-3-O-arabinósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 83.17, 287.13, and 419.25.</p>
9	Peonodina-3-O-galactósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 60.29, 83.17, 78.12, 301.23, and 463.26.</p>
10	Petunidina-3-O-arabinósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 60.29, 317.19, and 449.23.</p>
11	Malvinidina-3-O-galactósido	<p>Mass spectrum showing major peaks at m/z 60.29, 83.17, 331.22, and 493.24.</p>

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

12	Peonodina-3-O-glucósido	<p>Mass spectrum of Peonodina-3-O-glucósido. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 600,000. The base peak is at m/z 60.29. Other significant peaks are labeled at m/z 73.26, 301.16, and 463.26.</p>
13	Malvinidina-3-O-glucósido	<p>Mass spectrum of Malvinidina-3-O-glucósido. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 600,000. The base peak is at m/z 493.31. Another significant peak is labeled at m/z 331.22.</p>
14	Malvinidina-3-O-arabinósido	<p>Mass spectrum of Malvinidina-3-O-arabinósido. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 400,000. The base peak is at m/z 463.33. Another significant peak is labeled at m/z 331.15.</p>

A la hora de explicar este grupo de flavonoides por razones de sencillez se hace necesaria unas subdivisiones en función del grupo flavonoide principal. Se tienen así varios grupos: las delfinidinas (Df), las cianidinas (Ci), las petunidinas (Pt), peonidinas (Pn) y las malvidinas (Mv).

- Las delfinidinas glicosiladas identificadas son tres: la Df-3-O-galactósido, Df-3-O-glucósido y el Df-3-O-arabinósido. Estos tres compuestos tienen en común la señal de un fragmento importante (m/z 303) debido a la estructura flavonoide. Incluso los dos primeros antocianos también coinciden en el segundo fragmento importante (m/z 465) ya que los azúcares glicosilados a la estructura principal son epímeros (Valls et al, 2009). Por el contrario, la tercera delfinidina varía en el peso total de la estructura final (m/z 435) debido a que el azúcar es una pentosa y no como en los casos anteriores que era una hexosa (Valls et al, 2009).
- Con las cianidinas glicosiladas sucede lo mismo que en el caso anterior, se identifican tres compuestos glicosilados, la Ci-3-O-galactósido, Ci-3-O-glucósido y la Ci-3-O-arabinósido. Coincidiendo los dos primeros en los fragmentos importantes hallados, los cuales son debidos a la estructura principal (m/z 287) y a ésta con sus azúcares epímeros glicosilados (m/z 449) (Valls et al, 2009). Sin embargo, al igual que ocurre en el caso anterior, la Ci-3-O-arabinósido coincide con las moléculas anteriores en la estructura principal (m/z 287) pero no en el azúcar, ya que de nuevo es una pentosa, lo que genera una señal diferente con una relación m/z de 419, que se corresponde con su peso molecular más uno (Valls et al, 2009).
- En el caso de las petunidinas vuelve a darse la misma relación que en los casos anteriores, identificándose así dos petunidinas glicosiladas, la Pt-3-O-galactósido y la Pt-3-O-glucósido, con iguales fragmentos importantes. El primer fragmento origina una señal a m/z de 317, correspondiente a la

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

estructura flavonoide y el segundo fragmento se corresponde a la estructura completa lo que genera un pico a m/z 479 (Valls et al, 2009). La tercera peonidina identificada es la Pt-3-O-arabinósido, cuyo pico producto de su estructura completa tiene una relación masa/carga de 449. La otra señal que se ve, como ya se esperaba, es debida a la fragmentación causada por la hidrólisis del azúcar. Esta señal tiene una m/z de 317 (Valls et al, 2009).

- Las peonidinas identificadas son dos: Pn-3-O-galactósido y Pn-3-O-glucósido, los cuales presentan los mismos fragmentos importantes como resultado de que los azúcares glicosilados en ambos casos son epímeros. Los fragmentos importantes se dan tienen una relación masa/carga a 301(sin azúcar) y a 463 (estructura completa) (Valls et al, 2009).
- El último subgrupo es el de las malvidinas, resultando estar formado de tres compuestos glicosilados, los cuales son Mv-3-O-galactósido, Mv-3-O-glucósido y Mv-3-O-arabinósido. Los tres presentan un fragmento común debido a la hidrólisis del azúcar generando así una señal con una relación m/z de 331. Los dos primeros compuestos coinciden en la señal producida por la estructura completa (493) debido a que los azúcares glicosilados son epímeros (Valls et al, 2009). Mientras que el Mv-3-O-arabinósido muestra un pico con m/z 463 como resultado de la estructura completa del compuesto (Valls et al, 2009).

➤ Flavonoles presentes en el mirtilo

Para identificar los flavonoles presentes en el mirtilo se mira el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 360 nm. El resultado obtenido se comprueba con la bibliografía disponible y con los patrones analizados en el departamento, posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada flavonol.

En la figura 5.11 se muestra el perfil cromatográfico de los flavonoles presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada flavonol.

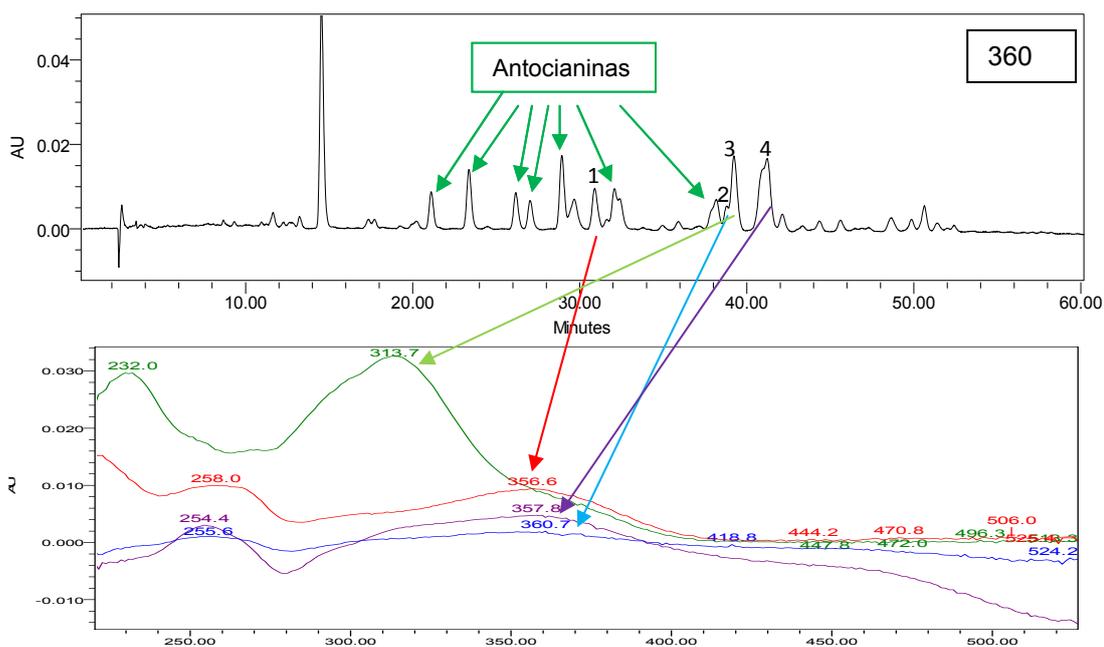


Figura 5.11: Perfil de los flavonoles presentes en el mirtilo relacionado con sus espectros de absorbancia correspondientes.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

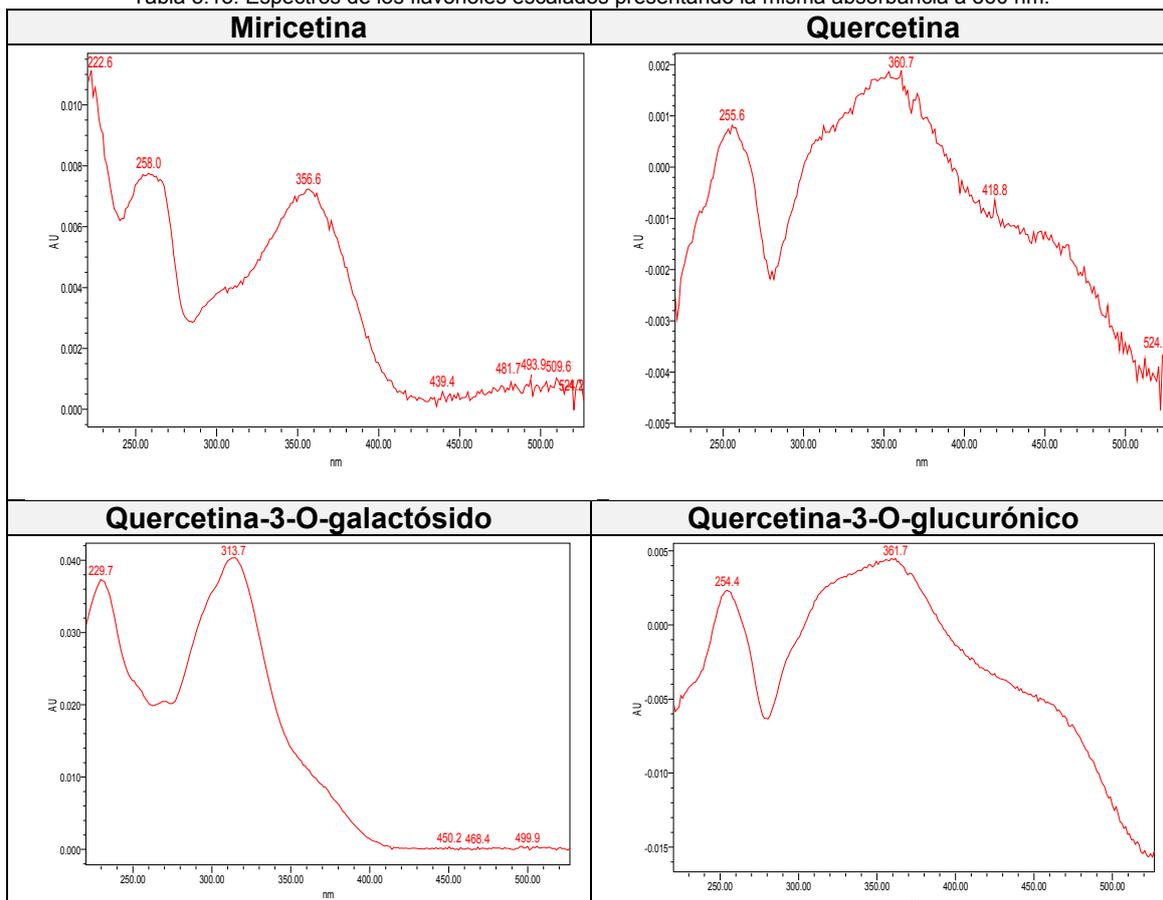
En la tabla 5.12 se realiza la propuesta de identificación de los flavonoles presentes en el mirtilo, para la identificación se atiende al tiempo de retención.

Tabla 5.12: Propuesta de identificación de los flavonoles presentes en el mirtilo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	30,834	Miricetina
2	38,909	Quercetina
3	39,164	Quercetina-3-O-galactósido
4	40,126	Quercetina-3-O-glucurónico

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.13 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 360 nm.

Tabla 5.13: Espectros de los flavonoles escalados presentando la misma absorbancia a 360 nm.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

La bibliografía estudiada identifica en el mirtilo los siguientes flavonoles, esto se presenta en la tabla 5.14.

Tabla 5.14: Bibliografía de los flavonoles presentes en el mirtilo

Flavonoles	Phenol explorer	Díaz García, Obón, Castellar (2011)
Kaempferol	X	-
Kaempferol-3-O-glucósido	X	X
Miricetina	X	-
Miricetina-3-glucósido	-	X
Miricetina-3-arabinósido	X	-
Miricetina-3-rhamnósido	X	-
Quercetina	X	-
Quercetina-3-acetilrhamnósido	X	-
Quercetina-3-arabinósido	X	X
Quercetina-3-galactósido	X	X
Quercetina-3-glucósido	X	X
Quercetina-3-xilósido	X	-

Para verificar dicha propuesta se recurre a la espectrometría de masas. Los distintos espectros de masas quedan recogidos en la tabla 5.15. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.15: Espectros de masas de los flavonoles encontrados en el mirtilo.

Número de identificación	Identificación de los flavonoles	Espectro de masas
1	Miricetina	
2	Quercetina	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

3	Quercetina-3-O-galactósido	
4	Quercetina-3-O-glucurónico	

Por razones estructurales se hace preciso hacer una subdivisión a la hora de explicar los flavonoles presentes en el mirtilo. En la primera subclase entra la miricetina, este flavonol presenta un pico importante producto de la estructura completa del compuesto (m/z 319). En su espectro se ven también otros picos pequeños generados por las sucesivas rupturas que van teniendo lugar en el proceso con el electrospray (Lin and Harnly, 2007).

En la otra subclase entran las tres quercetinas. La quercetina presenta un pico importante debido a la estructura total del compuesto cuya masa +1 es 303. Se ven otros picos pequeños generados por la sucesiva fragmentación del compuesto (Cho, Howard et al, 2005).

En el espectro de la quercetina-3-O-galactósido se ven dos picos importantes, el pico base correspondiente a la masa+1 de la estructura flavonoide (302 umas), el segundo pico es el correspondiente a la estructura completa del compuesto (464 umas) (Cho, Howard et al, 2005).

En el espectro de la quercetina-3-O-glucurónico se pueden ver dos picos importantes. El primero, producto de la estructura flavonoide, corresponde a la señal obtenida a una relación m/z de 303 y el segundo es generado por la estructura molecular completa (478 umas) (Cho, Howard et al, 2005).

➤ Ácidos hidroxibenzóicos presentes en el mirtilo

El perfil cromatográfico de absorción para los hidroxibenzóicos se identifica a una absorbancia de 260 nm. La propuesta de identificación de los ácidos hidroxibenzóicos en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

A continuación, en la figura 5.12, se muestra el perfil de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada uno de ellos.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

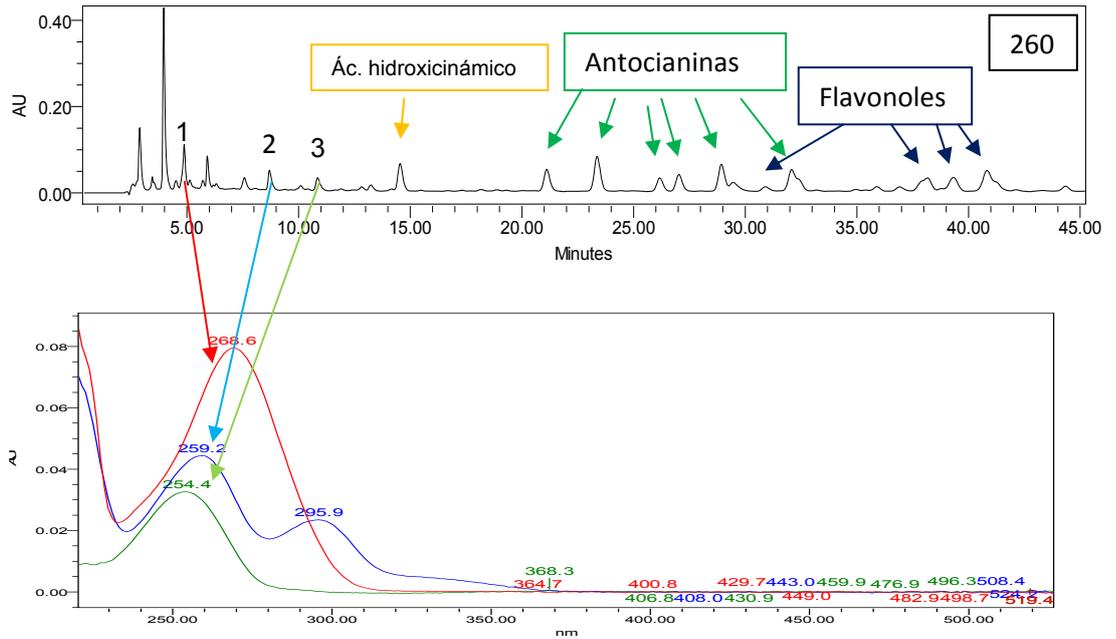


Figura 5.12: Perfil de los ácidos hidroxibenzoicos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorbanza originados por cada uno de ellos.

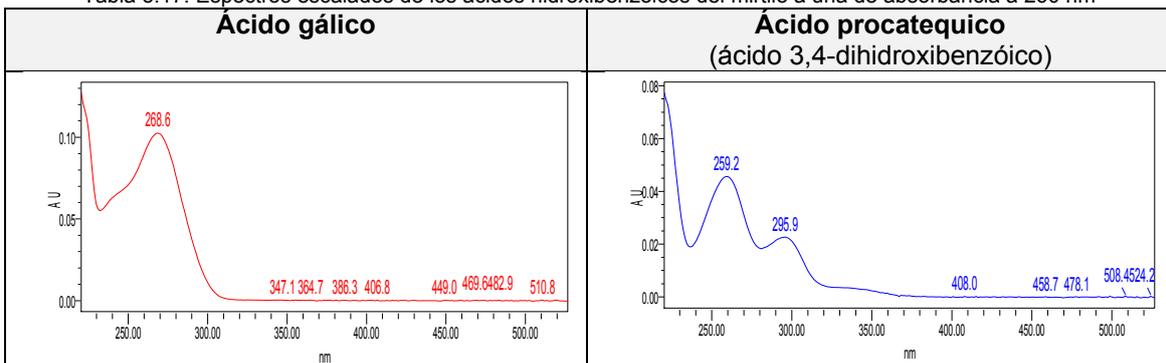
La propuesta realizada para los ácidos hidroxibenzoicos presentes en el mirtilo se ofrece en la tabla 5.16. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

Tabla 5.16: Propuesta realizada para los ácidos hidroxibenzoicos presentes en el mirtilo

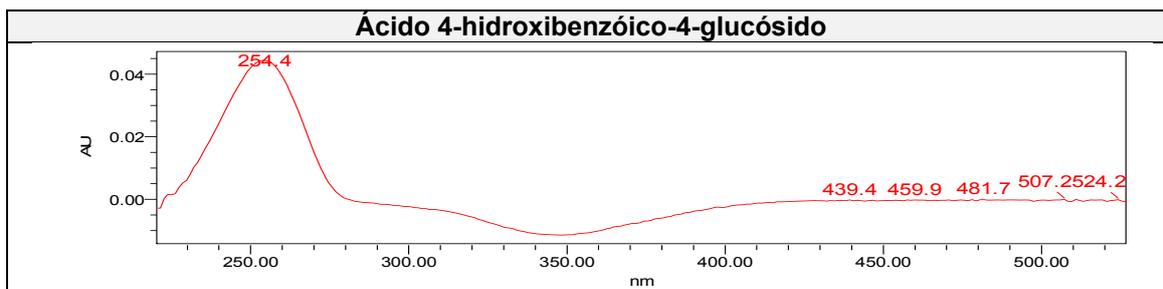
Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxibenzoicos
1	4,786	Ácido gálico
2	8,395	Ácido procatequico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico)
3	10,681	Ácido 4-hidroxibenzoico-4-glucósido

A modo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbanza obtenidos, se adjunta la tabla 5.17 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbanza a 260 nm.

Tabla 5.17: Espectros escalados de los ácidos hidroxibenzoicos del mirtilo a una de absorbanza a 260 nm



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Los ácidos hidroxibenzóicos identificados en el mirtilo según la bibliografía quedan plasmados en la tabla 5.18.

Tabla 5.18: Bibliografía de los ácidos hidroxibenzóicos identificados en el mirtilo.

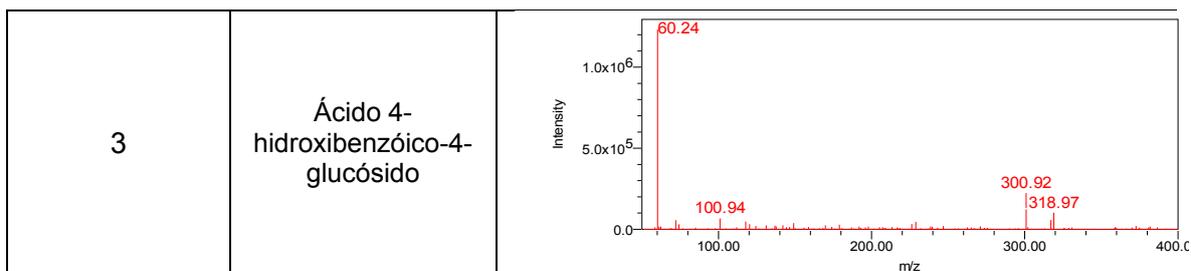
Ácidos hidroxibenzóicos	USDA	Díaz García, Obón, Castellar (2011)
Ácido 4-hidroxibenzóico-4-glucósido	X	-
Ácido gálico-4-glucósido	X	-
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico-4-glucósido	X	-
Ácido gálico	-	X
Ácido elágico	-	X
Ácido 4-hidroxibenzóico	-	X
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	-	X

Para verificar la propuesta realizada se recurre a la espectrometría de masas. Los respectivos espectros de masas se pueden ver en la tabla 5.19. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.19: Espectros de masas de los respectivos ácidos hidroxibenzóicos.

Número de identificación	Identificación de los hidroxibenzóicos	Espectro de masas
1	Ácido gálico	
2	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



En el espectro del ácido gálico es importante destacar su ión molecular, que es 171.6. Los otros dos picos no se sabe con exactitud a qué son debidos aunque se supone que el pico obtenido a una relación de masa m/z 129.9 es producto de la apertura del anillo seguido de unas posteriores fragmentaciones.

El segundo espectro presenta varios picos de los cuales cabe destacar el pico de 154.7, debido al peso molecular del ácido 3,4-dihidroxi-benzóico. Otra señal que podría ser importante es el pico con una relación m/z 127.5 obtenido también en el patrón aunque no se termina de conocer la fragmentación que lo genera.

El tercer espectro es el correspondiente al Ácido 4-hidroxi-benzóico-4-glucósido, este espectro es más sencillo a la hora de interpretar. La señal de m/z 300 es debida a su $M+1$ y la señal de 318 debe ser producida por la formación de un puente de hidrógeno con una molécula de agua.

➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo

El perfil cromatográfico de absorción para los ácidos hidroxicinámicos se identifica a una absorbancia de 320 nm.

En la figura 5.13 se muestra el perfil de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo relacionado con los espectros de absorción originados por cada uno de los ácidos.

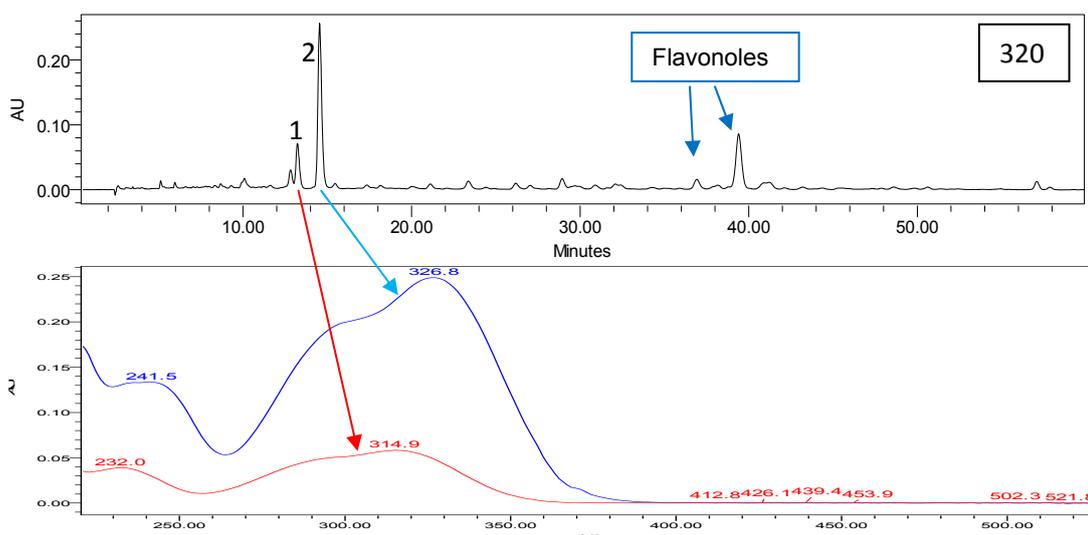


Figura 5.13: Perfil de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo relacionado sus respectivos espectros de absorción.

La propuesta realizada para los ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo se adjunta en la tabla 5.20. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

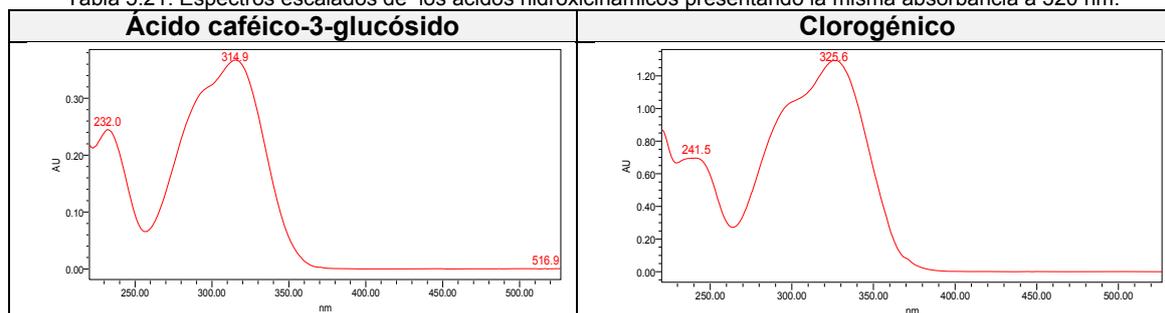
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.20: Propuesta de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos
1	12,670	Ácido caféico-3-glucósido
2	14,471	Clorogénico (ácido 3 - O - cafeoilquinico)

Con el objetivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se muestra en la tabla 5.21 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 320 nm.

Tabla 5.21: Espectros escalados de los ácidos hidroxicinámicos presentando la misma absorbancia a 320 nm.



Los hidroxicinámicos identificados por la bibliografía estudiada quedan expuestos en la tabla 5.22.

Tabla 5.22: Bibliografía para los ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo.

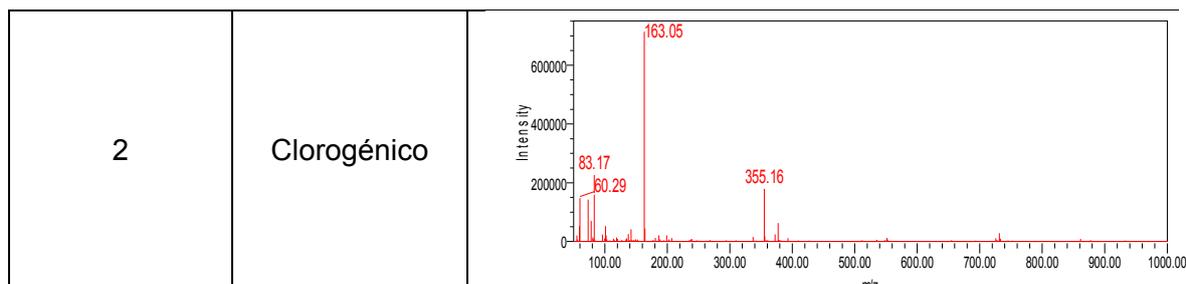
Ácido hidroxicinámico	Jakobek, L. (2007)	Díaz García, Obón, Castellar (2011)
Ácido caféico	X	-
Ácido p-cumárico	X	-
Ácido ferúlico	X	-
Ácido p-cumárico-glicósido	-	X
clorogénico	-	X
sinápico	-	X

Con el fin de comprobar que dicha propuesta es acertada se procede a examinar los espectros de masas recogidos en la tabla 5.23.

Tabla 5.23: Espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en el mirtilo.

Número de identificación	Ácido hidroxicinámico	Espectro de masas
1	Ácido caféico-3-glucósido	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



El espectro debido al ácido caféico-3-glucósido presenta dos picos importantes, el ión molecular correspondiente a su M+1 (343) y el pico a m/z 180.8, producto de la hidrólisis del azúcar (Abad-García et al, 2009).

El espectro del clorogénico muestra dos señales importantes, el pico base que es producto de la pérdida de la parte alcohólica del éster originando así esa señal a m/z 163 (Abad-García et al, 2009). El segundo pico obtenido es el ión molecular que se corresponde con su M+1 (355).

➤ Flavonoles presentes en el mirtilo

El perfil cromatográfico de absorción para los flavonoles se identifica a una absorbancia de 280 nm. La propuesta de identificación del flavanol presente en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones de los flavonoles en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

En la figura 5.14 se muestra el perfil cromatográfico del flavanol presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorción.

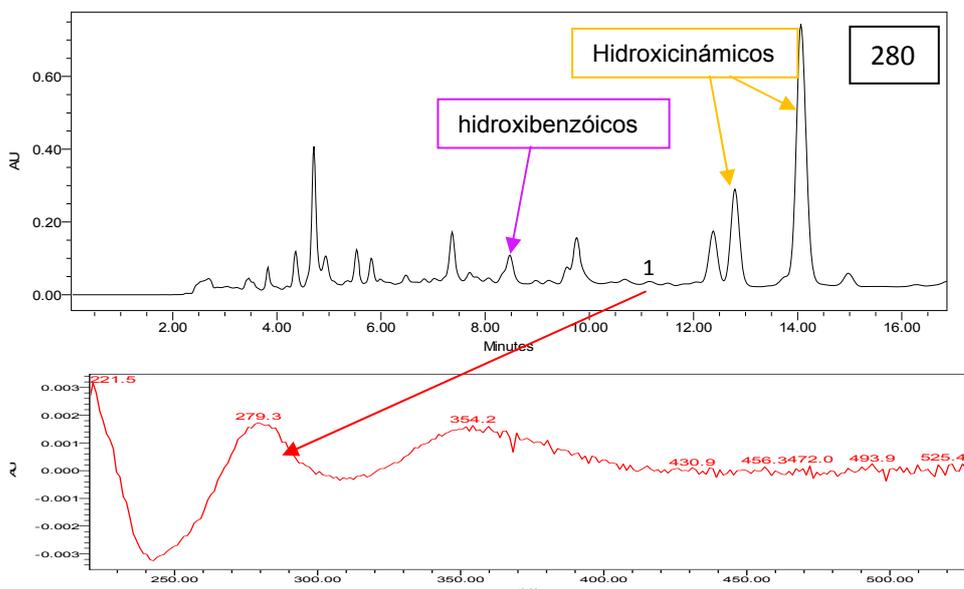


Figura 5.14: Perfil del flavanol presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorción.

Como se puede apreciar el flavanol presenta una absorbancia casi inapreciable en UV Visible. Este tipo de compuestos es apreciable en fluorescencia. Esta propuesta se plasma en la tabla 5.24, dicha identificación se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

en los cromatogramas, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masa.

Tabla 5.24: Propuesta de identificación de la catequina presente en el mirtilo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavanoles
1	11,796	Catequina

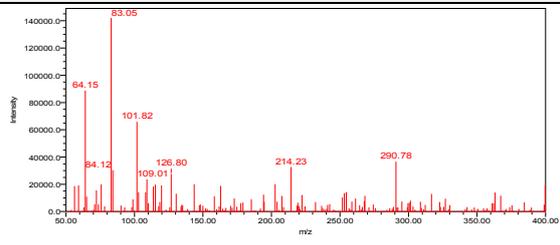
A continuación, los flavanoles identificados por la bibliografía estudiada quedan expuestos en la tabla 5.25.

Tabla 5.25: Bibliografía de los flavanoles presentes en el mirtilo.

Ácido hidroxicinámico	USDA	Díaz García, Obón, Castellar (2011)
Catequina	X	X
Epicatequina	X	X
Galocatequina	X	-
Epigalocatequina	X	X

Con el fin de mostrar que dicha propuesta es la correcta se adjunta la tabla 5.26 en la que se expone su espectro de masas.

Tabla 5.26: Espectro de masas de la catequina presente en el mirtilo.

Número de identificación	Flavanol	Espectro de masas
1	Catequina	

En este espectro se puede ver el ión molecular que se corresponde con la M+1 de la catequina (291). El resto de picos son fruto de las pérdidas sucesivas que ha ido sufriendo la molécula aunque no se pueden explicar con exactitud (Lin and Harnly, 2007).

Se propone la utilización de un detector de fluorescencia para corroborar la presencia de este compuesto.

➤ El resveratrol en el mirtilo

El perfil cromatográfico de absorción para el resveratrol se obtiene a una absorbancia de 280 nm, la misma $\lambda_{\text{máxima}}$ a la que se miran los flavanoles. En la figura 5.15 se puede ver el perfil del estilbeno presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorcancia.

Esta propuesta de identificación se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención del patrón en el cromatograma, también a sus espectros en ultravioleta visible y en masas.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

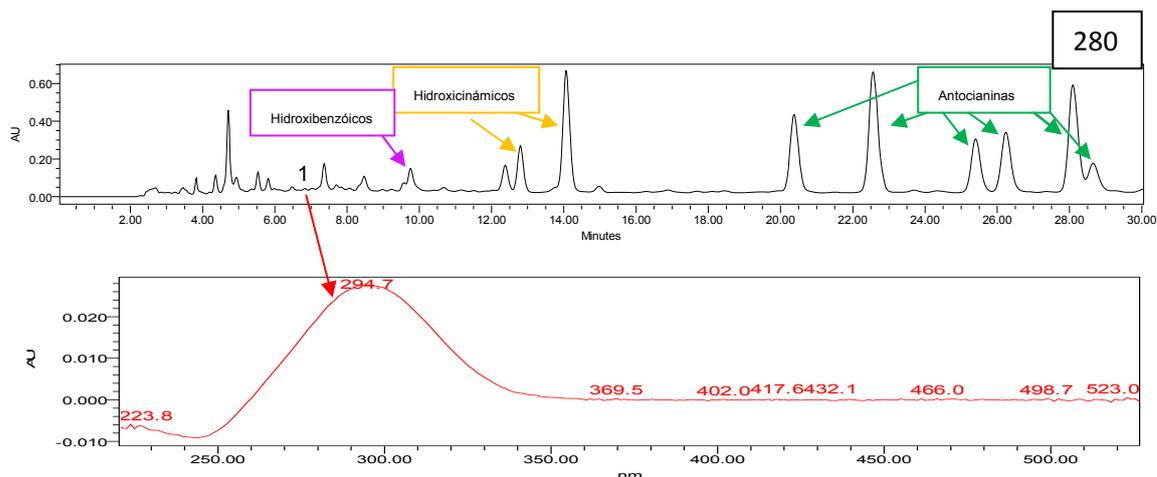


Figura 5.15: Perfil del resveratrol presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorbanca.

Como se puede ver el resveratrol, al igual que ocurría con la catequina, es prácticamente inapreciable en UV Visible, para verlo bien es necesaria la técnica de fluorescencia. En la tabla 5.27 se adjunta la identificación del estilbeno.

Tabla 5.27: Identificación del estilbeno en el mirtilo

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación del estilbeno
1	6,580	Resveratrol glicosilado (piceido)

En cuanto a la bibliografía estudiada para el resveratrol, Rimando et al(2004) identifican en el mirtilo una cantidad de 768 ng/100g de muestra seca. Según Trela y Waterhouse, a pesar de que se dan tanto la forma cis como la forma trans del resveratrol, en las bayas sólo está presente el trans-resveratrol cuyo crecimiento está estimulado con su exposición a luz ultravioleta.

En la tabla 5.28 se muestra el espectro de masas del resveratrol glicosilado (piceido).

Tabla 5.28: Espectro de masas del resveratrol glicosilado.

Número de identificación	Identificación del estilbeno	Espectro de masas
1	Resveratrol glicosilado	

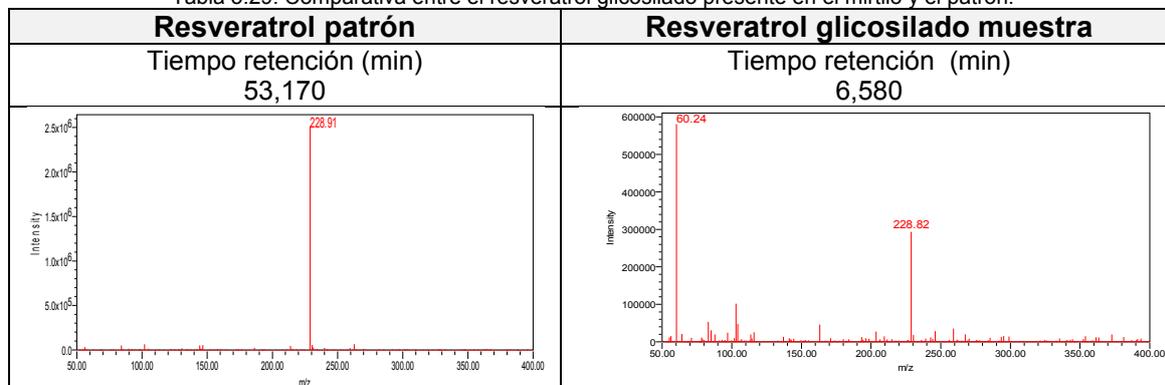
Como se puede ver en este espectro hay un pico importante que es el que se corresponde con el peso molecular más uno de la estructura del resveratrol, pero hay que decir que el tiempo de retención que se ha obtenido dista mucho del obtenido por el patrón, lo que lleva a la conclusión de que el que el compuesto identificado no es el

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

resveratrol propiamente dicho sino un glicosilado de dicho compuesto y por motivo de una hidrólisis muy rápida el azúcar no aparece en el espectro (Rimando et al, 2004).

En la tabla 5.29 se realiza la comparación del resveratrol glicosilado presente en el mirtilo y del patrón.

Tabla 5.29: Comparativa entre el resveratrol glicosilado presente en el mirtilo y el patrón.



➤ La vitamina C en el mirtilo

La vitamina C o lo que es lo mismo el ácido ascórbico aparece si hacemos un perfil cromatográfico de absorción a una longitud de onda de 243 nm. En la figura 5.16 se puede ver el perfil cromatográfico del ácido ascórbico presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorción.

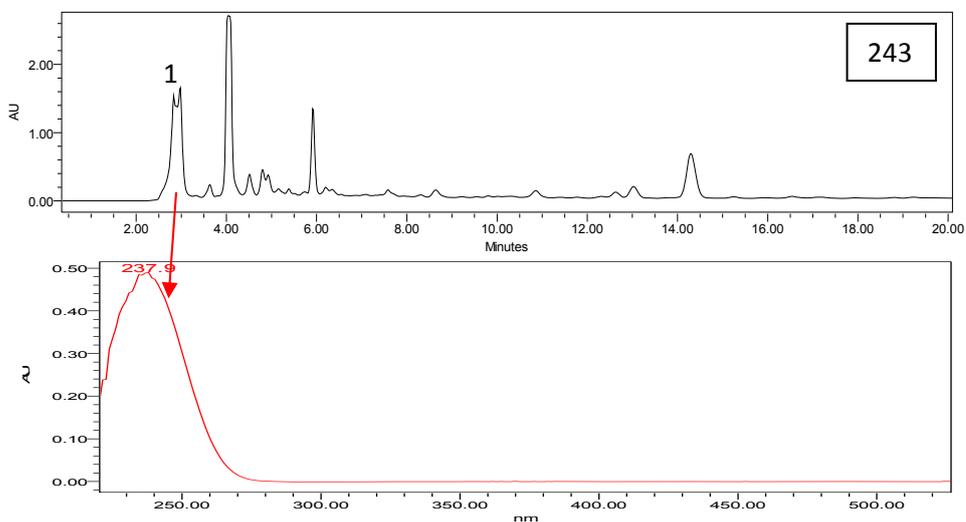


Figura 5.16: Perfil cromatográfico del ácido ascórbico presente en el mirtilo relacionado con su espectro de absorción.

En la tabla 5.30 se muestra el tiempo de retención del ácido ascórbico presente en el mirtilo en las condiciones de análisis explicadas anteriormente, muy parecido al que obtuvimos para el patrón (3 minutos).

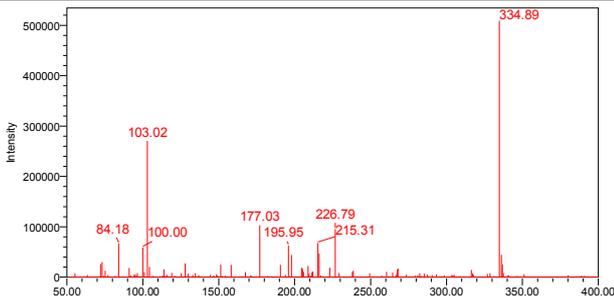
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.30: Identificación de la vitamina C presente en el mirtilo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación
1	2,978	Ácido ascórbico

Según la bibliografía, www.consumer.es, el mirtilo presenta una concentración de ácido ascórbico de 12mg/100g producto comestible. Para constatar esto se recurre a la espectrometría de masas cuyo resultado se recoge en la tabla 5.31.

Tabla 5.31: Espectro de masas del ácido ascórbico presente en el mirtilo.

Número de identificación	Identificación	Espectro de masas
1	Ácido ascórbico	

En este espectro el pico a resaltar es su ión molecular, obtenido a una m/z de 177. Se piensa que la señal a 195.95 es producto de la captación de una molécula de agua aunque esta señal no se obtuvo en el patrón.

Si comparamos con el espectro de masas del ácido ascórbico patrón, se observan en éste muchos más picos. Esto puede deberse a que el pico que aparece está solapado con otro compuesto desconocido por el momento.

2.2.- Arándano europeo (*Cranberry*; *Vaccinium oxycoccus*)

La muestra analizada consiste en un zumo concentrado de esta fruta procedente de la casa comercial Grünwald Fruchtsaft. La muestra es analizada en el laboratorio del edificio de Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Edificio I+D+I (SAIT). Anteriormente a su análisis esta muestra se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

➤ Antocianos presentes en el arándano

Para identificar los antocianos presentes en el arándano se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 520 nm. El resultado obtenido se comprueba con la bibliografía y posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada antociano.

En la figura 5.17 se muestra el perfil de los antocianos presentes en el arándano europeo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

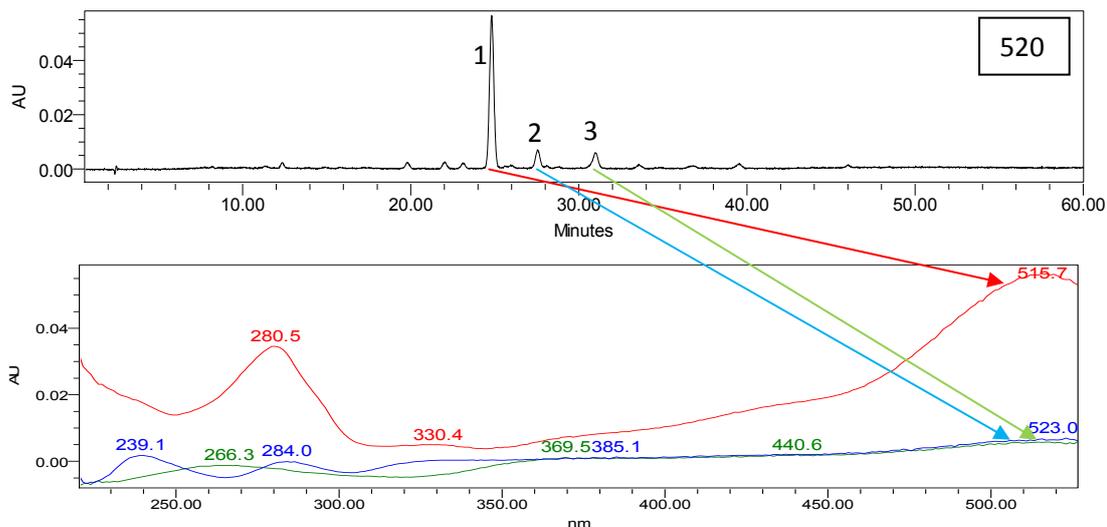


Figura 5.17: Perfil de los antocianos presentes en el arándano europeo relacionado con los espectros de absorbanca originados por cada antociano.

La propuesta de identificación de los antocianos en las frutas rojas se ha realizado mediante la comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía.

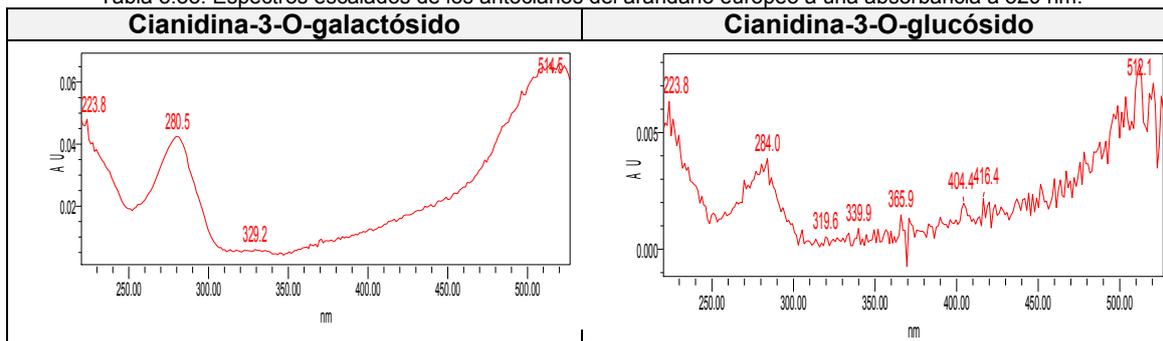
A continuación, en la tabla 5.32, se realiza la propuesta de identificación de los antocianos presentes en el arándano.

Tabla 5.32: Propuesta de identificación de los antocianos presentes en el arándano.

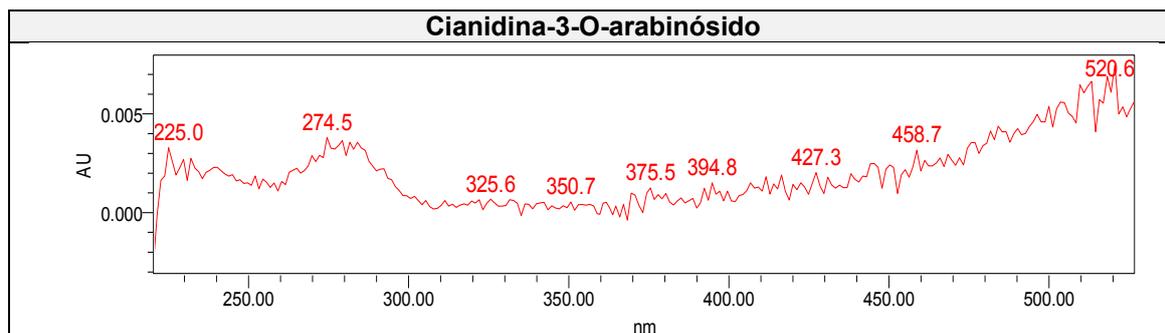
Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los antocianos
1	24,871	Cianidina-3-O-galactósido
2	27,653	Cianidina -3-O-glucósido
3	31,018	Cianidina-3-O-arabinósido

A modo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbanca obtenidos, se adjunta la tabla 5.33 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbanca a 520 nm. Los espectros de los picos 2 y 3, al presentar una absorbanca muy baja, están distorsionados con el ruido del aparato y no se aprecia bien su forma.

Tabla 5.33: Espectros escalados de los antocianos del arándano europeo a una absorbanca a 520 nm.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Al no tener patrones de los antocianos, la propuesta de identificación de cada antociano se ha realizado mediante una comparación con los datos de la bibliografía. Esto queda expuesto en la tabla 5.34.

Tabla 5.34: Bibliografía de los antocianos en el arándano europeo.

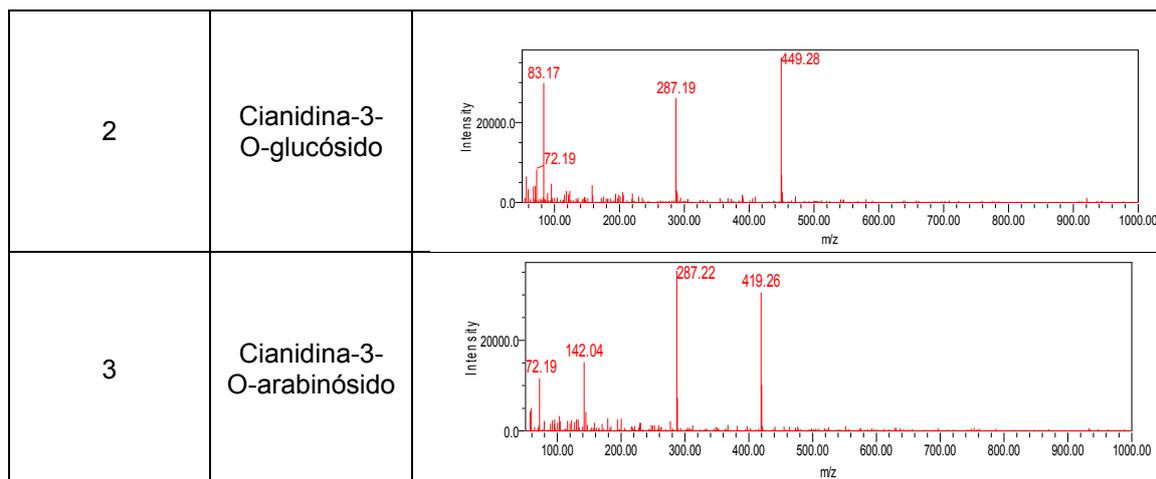
Número de identificación	Identificación de los antocianos	Borges et al (2010)	Andersen (1989)
1	Cianidina-3-O-galactósido	X	X
2	Cianidina-3-O-glucósido	-	X
3	Cianidina-3-O-arabinósido	X	X
4	Peonidina-3-galactósido	X	X
5	Peonidina-3-arabinósido	X	-
6	peonidina-3-O-glucósido	X	X
7	malvidina-3-O-arabinósido	X	-
8	malvidina-3-O-glucósido	-	X
9	Delfinidina-3-O-glucósido	-	X
10	Delfinidina-3-O-galactósido	-	X

En la tabla 5.35 se presentan los espectros de masas referentes a los antocianos identificados en el arándano europeo.

Tabla 5.35: Espectros de masas referentes a los antocianos identificados en el arándano europeo.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Espectro de masas
1	Cianidina-3-O-galactósido	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Los tres espectros coinciden en el primer pico importante, m/z 287.2, correspondiente a la estructura flavonoide de la cianidina. Diferenciándose las tres en el segundo pico importante, el primer y segundo espectros muestran la otra señal importante a una m/z 449.3, ya que este pico es debido al flavonoide glicosilado y en ambos casos los azúcares son epímeros. Mientras que en el tercer espectro, la tercera señal característica se obtiene a una m/z de 419.3, producto de la glicosilación de la cianidina con la arabinosa (Valls et al, 2009).

➤ Flavonoles presentes en el arándano

Para identificar los flavonoles presentes en el arándano se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 360 nm. El resultado obtenido se comprueba con la bibliografía disponible y con los patrones analizados en el departamento, posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada flavonol.

En la figura 5.18 se muestra el perfil de los flavonoles presentes en el arándano relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada flavonol.

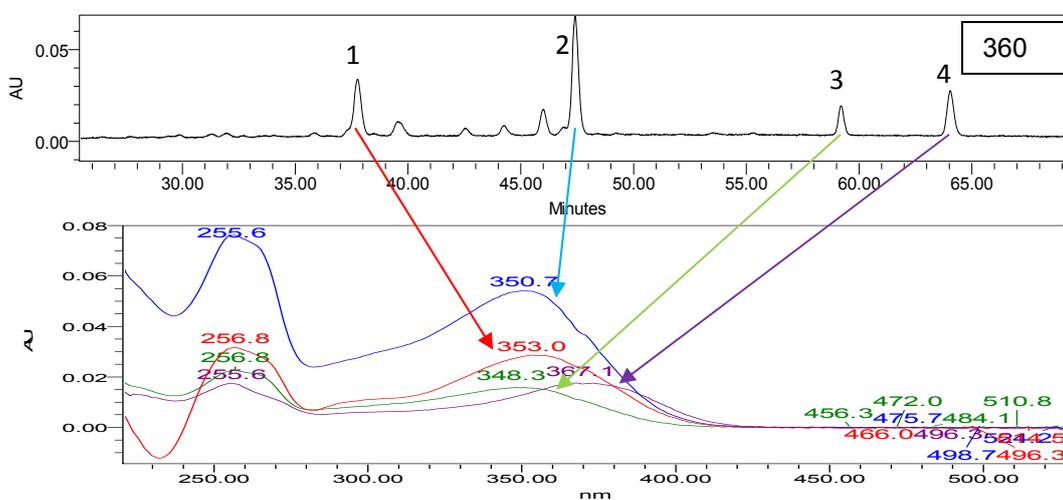


Figura 5.18: Perfil de los flavonoles presentes en el arándano estudiado relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

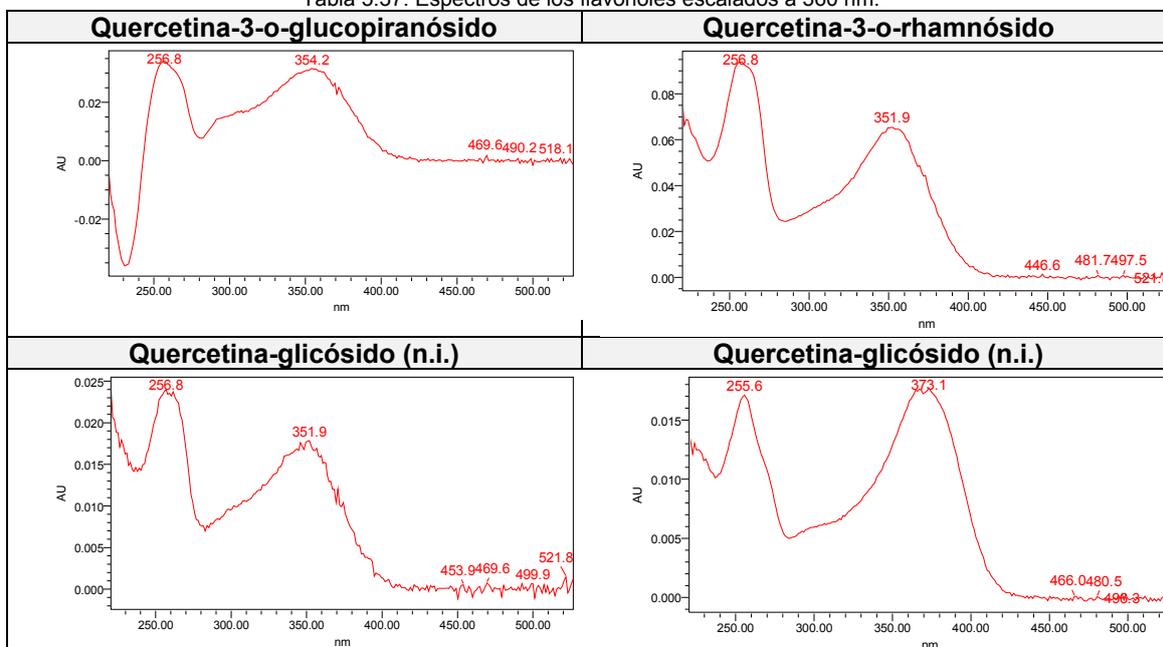
A continuación, en la tabla 5.36 se realiza la propuesta de identificación de los flavonoles presentes en el arándano, para la identificación se atiende al tiempo de retención.

Tabla 5.36: Propuesta de identificación de los flavonoles presentes en el arándano europeo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	37,716	Quercetina-3-o-glucopiranosido
2	47,347	Quercetina-3-o-rhamnósido
3	59,176	Quercetina-glicósido (n.i.)
4	64,064	Quercetina-glicósido(n.i.)

Con el fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.37 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 360 nm.

Tabla 5.37: Espectros de los flavonoles escalados a 360 nm.



La bibliografía estudiada (tabla 5.38) identifica en el arándano los siguientes flavonoles.

Tabla 5.38: Bibliografía de los flavonoles presentes en el arándano estudiado.

Flavonoles	Borges et al (2010)	Phenol explorer
Quercetina-3-O-galactósido	X	-
Quercetina-3-O-(2"-O-xylosyl)piranosido	X	-
Quercetina-3-O-arabinosilfuranósido	X	-
Quercetina-3-O-rhamnósido	X	-
Miricetina-3-O-galactósido	X	-
Miricetina-3-arabinósido	X	-
Quercetina	-	X

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Para verificar dicha propuesta se recurre a la espectrometría de masas cuyo resultado se adjunta en la tabla 5.39. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.39: Espectros de masas de los flavonoles encontrados en el arándano.

Número de identificación	Identificación de los flavonoles	Espectro de masas
1	Quercetina-3-o-glucopiranosido	
2	Quercetina-3-o-rhamnósido	
3	Quercetina-glicósido (n.i.)	
4	Quercetina-glicósido (n.i.)	

Los cuatro espectros son de cuatro quercetinas, ya que todos presentan el mismo pico característico del flavonoide sin glicosilar (m/z 303) siendo diferentes el pico resultante de la glicosilación de este flavonoide. La quercetina-3-O-glucopiranosido, presenta el otro pico característico a m/z 465, consecuencia de la glicosilación con una molécula de glucosa. La quercetina-3-O-rhamnósido muestra el otro pico importante a m/z 449, correspondiente a la glicosilación del flavonoide con la rhamnosa (Abad-García et al, 2009). Los otros dos espectros ofrecen dos picos a parte del debido a la estructura de la quercetina (303), uno a m/z 593 y otro a 350.9. El problema que plantean ambos espectros es la identificación del azúcar glicosilado.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

➤ Ácidos hidroxibenzóicos presentes en el arándano europeo

El perfil cromatográfico de absorción para los hidroxibenzóicos se identifica a una absorbancia de 260 nm.

A continuación, en la figura 5.19, se muestra el perfil cromatográfico de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en el arándano europeo relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada uno de ellos.

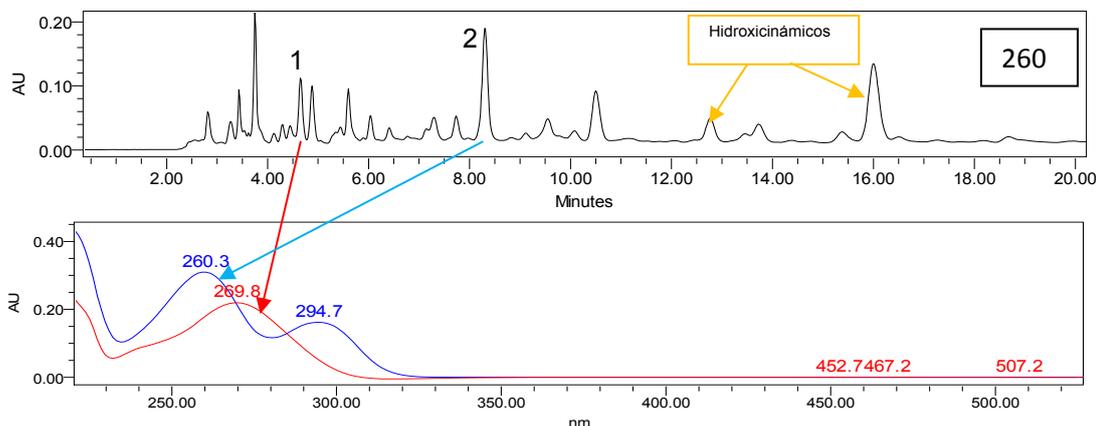


Figura 5.19: Perfil de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en el arándano europeo relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

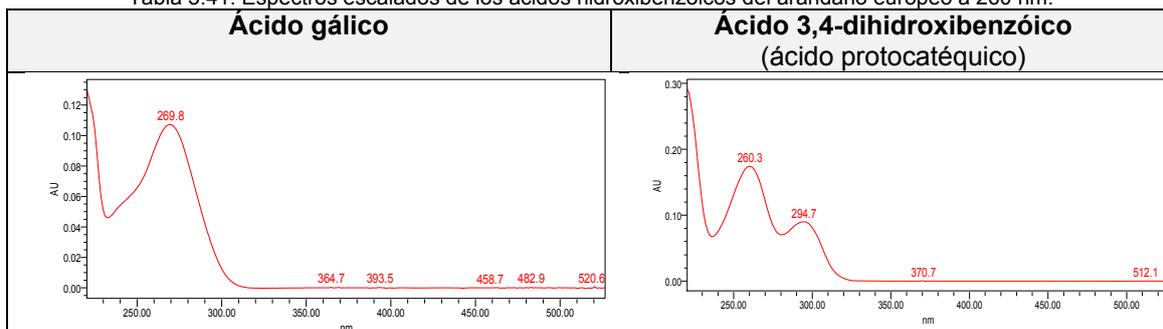
La propuesta realizada para los ácidos hidroxibenzóicos presentes en esta fruta se ofrece en la tabla 5.40. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros de masas.

Tabla 5.40: Propuesta de identificación de los ácido hidroxibenzóicos en el arándano europeo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxibenzóicos
1	4,321	Ácido gálico
2	8,240	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico (ácido protocatéquico)

Con motivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos se adjunta la tabla 5.41 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 260 nm.

Tabla 5.41: Espectros escalados de los ácidos hidroxibenzóicos del arándano europeo a 260 nm.

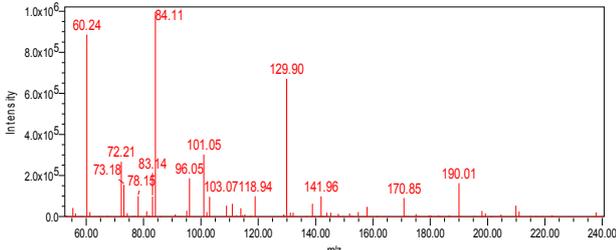
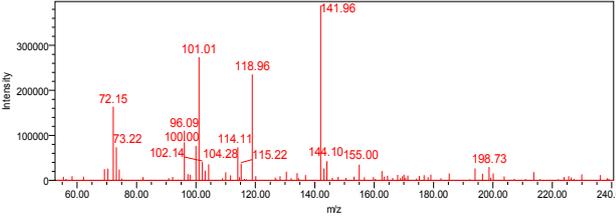


Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Según Häkkinen, S. (1999), los ácidos hidroxibenzóicos presentes en el arándano europeo se reducen a un 1.8% de ácido elágico.

Para verificar la propuesta realizada se recurre a la espectrometría de masas. En la tabla 5.42 quedan plasmados los espectros de los distintos ácidos hidroxibenzóicos presentes en el arándano europeo. Teniendo en cuenta el tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.42: Espectros de masas de los ácidos hidroxibenzóicos identificados en esta variedad de arándano.

Número de identificación	Identificación de los hidroxibenzóicos	Espectro de masas
1	Ácido gálico	 <p>Mass spectrum of Gallic acid. The x-axis represents m/z from 60.00 to 240.00, and the y-axis represents Intensity from 0.0 to 1.0x10⁶. The base peak is at m/z 84.11. Other significant peaks are labeled at m/z 60.24, 72.21, 73.18, 78.15, 83.14, 96.05, 101.05, 103.07, 118.94, 129.90, 141.96, 170.85, and 190.01.</p>
2	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	 <p>Mass spectrum of 3,4-dihydroxybenzoic acid. The x-axis represents m/z from 60.00 to 240.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 300,000. The base peak is at m/z 141.96. Other significant peaks are labeled at m/z 72.15, 73.22, 96.09, 100.00, 102.14, 104.28, 101.01, 114.11, 115.22, 118.96, 144.10, 155.00, and 198.73.</p>

Por comparación con el patrón explicado previamente se deduce que el pico característico del ácido gálico es su ión molecular obtenido a una relación m/z 170.8.

Según el patrón, el espectro del ácido protocatequico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico) muestra tres picos característicos de esta molécula, sus relaciones m/z son respectivamente 102.1; 141.9 y 155 (ión molecular). El pico base es el obtenido a la relación m/z 141.96, cuya fragmentación, al igual que la sufrida para obtener el pico a m/z 102.1, no se sabe muy bien. La explicación del tercer pico importante es que es su ión molecular (Abad-García et al, 2009).

➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano

El perfil cromatográfico de absorción para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos se obtiene a una absorbancia de 320 nm.

En la figura 5.20 se muestra el perfil de los ácidos hidroxicinámicos en relación con sus respectivos espectros de absorción.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

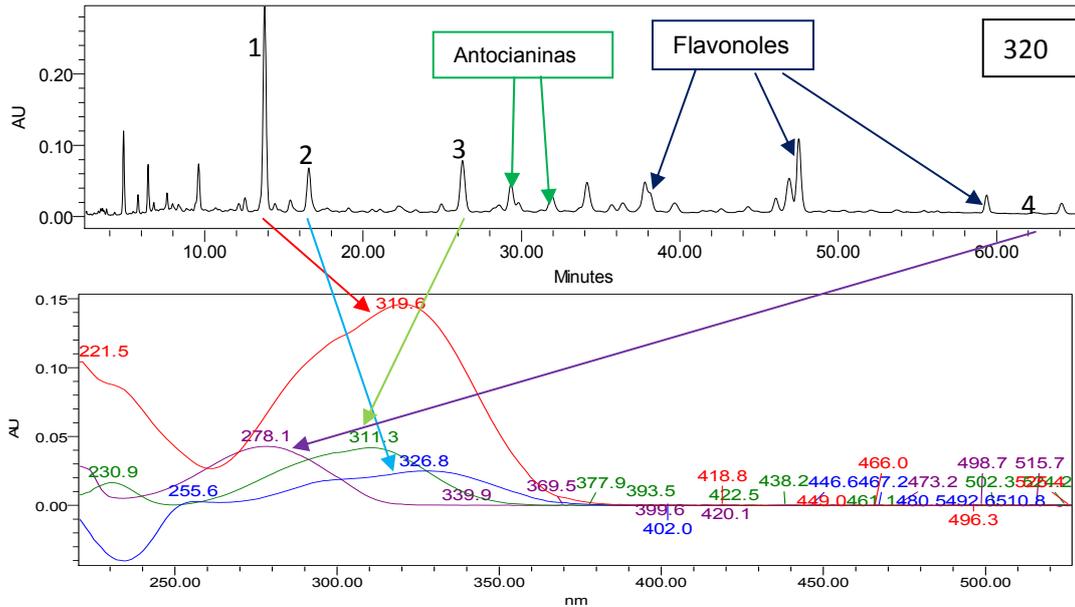


Figura 5.20: Perfil cromatográfico de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo relacionado con sus respectivos espectros de absorbanca.

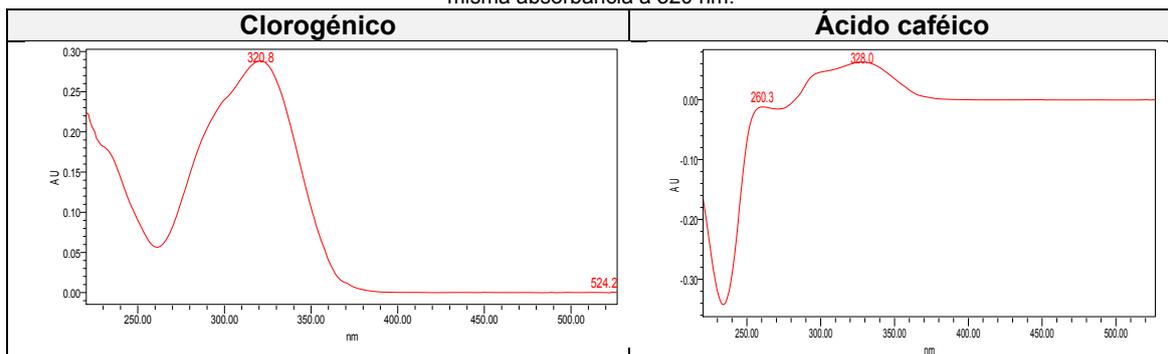
La propuesta realizada se ofrece en la tabla 5.43. Dicha propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

Tabla 5.43: Propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo.

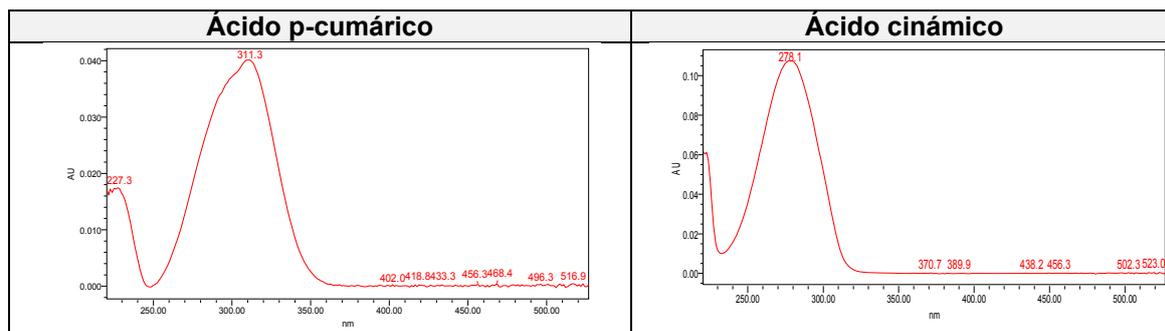
Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos
1	13,731	Clorogénico (ácido 3 - O - cafeoilquinico)
2	16,583	Ácido caféico
3	26,301	Ácido p-cumárico
4	62,347	Ácido cinámico

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbanca obtenidos, se adjunta la tabla 5.44 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbanca a 320 nm.

Tabla 5.44: Espectros escalados de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en el arándano europeo presentando la misma absorbanca a 320 nm.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Los hidroxicinámicos identificados por la bibliografía estudiada quedan expuestos en la tabla 5.45.

Tabla 5.45: Bibliografía para los ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo.

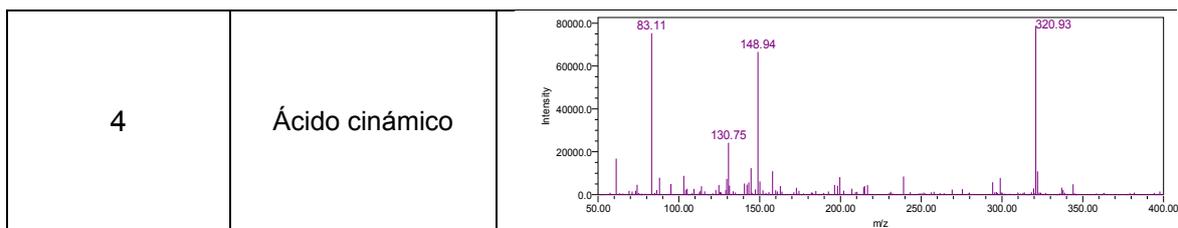
Ácido hidroxicinámico	Borges et al (2010)	Häkkinen,S. (1999)	Phenol explorer
Ácido p-cumárico	-	X	X
Ácido caféico	-	X	-
Ácido ferúlico	-	X	-
CClorogénico	X	-	-
Ácido p-cumárico-hexósido	X	-	-

Con el fin de comprobar que dicha propuesta es correcta se procede a examinar los espectros de masas recogidos en la tabla 5.46.

Tabla 5.46: Espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos identificados en el arándano estudiado.

Número de identificación	Ácido hidroxicinámico	Espectro de masas
1	Clorogénico	
2	Ácido caféico	
3	Ácido p-cumárico	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



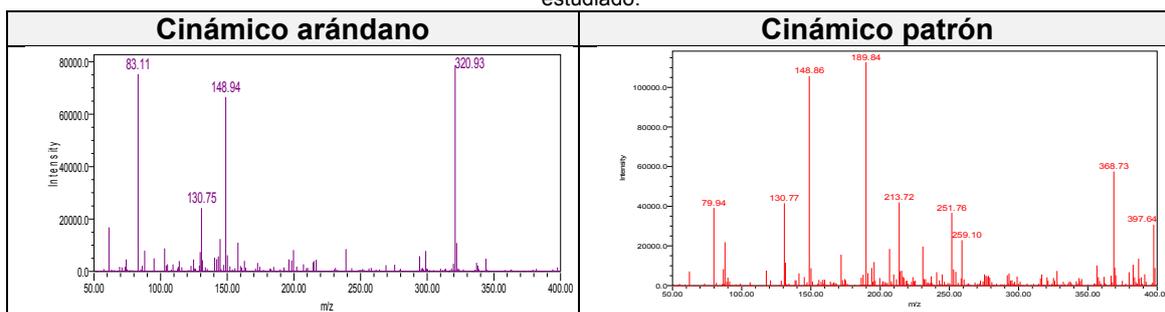
El espectro del clorogénico muestra dos señales importantes, el pico base que es producto de que se pierde la parte alcohólica del éster originando así esa señal a m/z 163. El segundo pico obtenido es el ión molecular que se corresponde con su $M+1$ (354.4) (Abad-García et al, 2009).

El espectro correspondiente al ácido caféico presenta dos picos característicos, uno cuya m/z es 162.9 producto de la eliminación de una molécula de agua de este flavonoide. El otro pico importante es el obtenido a una m/z 144.9, debido a la pérdida de otra molécula de agua (Abad-García et al, 2009). El pico que se ve a m/z 324.9 debe ser el resultado de la formación de un aducto. Pensamos que se trata del ácido caféico porque coincide con el tiempo de retención del patrón.

El espectro del ácido *p*-cumárico muestra una señal característica de este hidroxicinámico. Dicha señal es el resultado de la pérdida de una molécula de agua (m/z 146.8) (Abad-García et al, 2009). El espectro de masas del patrón analizado tampoco muestra la señal de su masa +1 (166) e igualmente presenta un pico a 146.9.

Por último, al mirar la tabla 5.47 para comparar el espectro del ácido cinámico aquí obtenido con el obtenido por el patrón se ve claramente que ofrece dos picos característicos, uno debido al $M+1$ de este ácido (m/z 148.9) y el otro se debe a la pérdida de una molécula de agua (m/z 130.7). El último pico, m/z 320.9 debe ser el resultado de la formación de un dímero.

Tabla 5.47: Comparativa de los espectros de masas del ácido cinámico patrón y el que se encuentra en el arándano estudiado.



➤ Flavanoles presentes en el arándano europeo

El perfil cromatográfico de absorción para los flavanoles se identifica a una absorbancia de 280 nm.

En la figura 5.21 se muestra el perfil de los flavanoles presentes en el arándano relacionado con sus espectros de absorción.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

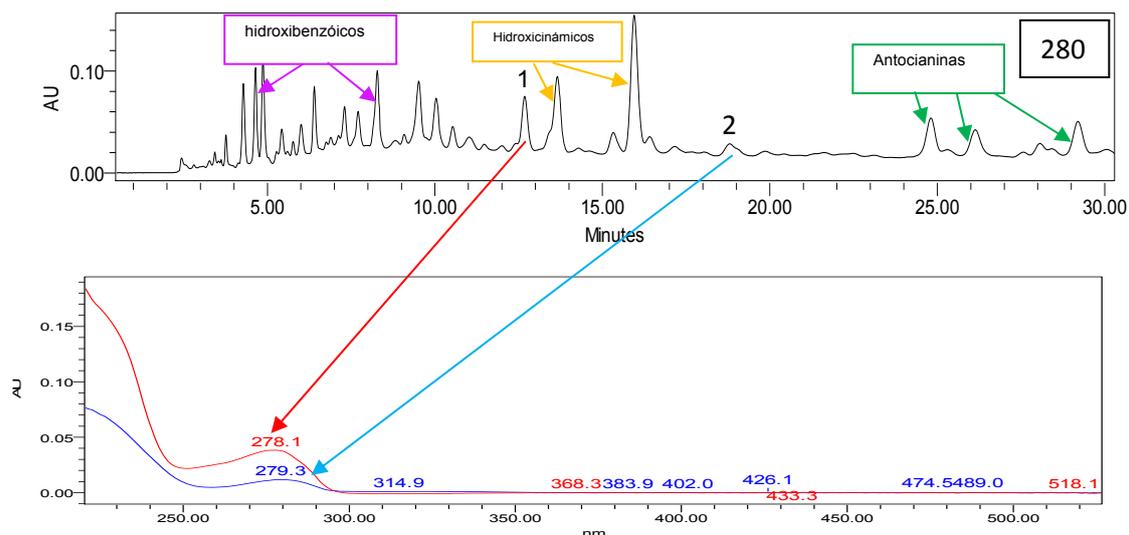


Figura 5.21: Perfil de los flavanoles presentes en esta variedad de arándano relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

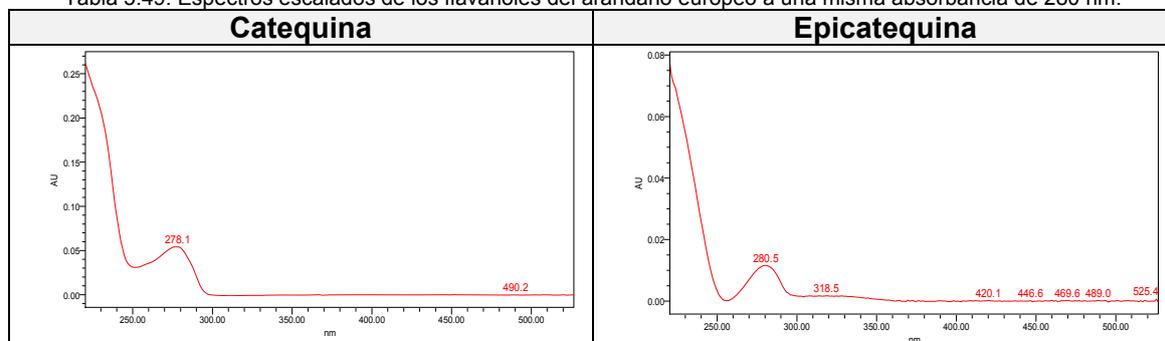
Como se puede ver la epicatequina presenta una absorbancia casi inapreciable en UV Visible, cosa que era de esperar ya que este tipo de compuestos es apreciable visualmente en fluorescencia. La sorpresa es que la catequina sí que se consigue visualizar en esta longitud de onda (posiblemente se encuentre en alta concentración). La propuesta recogida en la tabla 5.48 se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masa.

Tabla 5.48: Propuesta de los flavanoles presentes en el arándano europeo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavanoles
1	12,790	Catequina
2	19,295	Epicatequina

Con el objetivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.49 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 280 nm.

Tabla 5.49: Espectros escalados de los flavanoles del arándano europeo a una misma absorbancia de 280 nm.



A continuación, se muestran los flavanoles identificados por la bibliografía, quedan expuestos en la tabla 5.50.

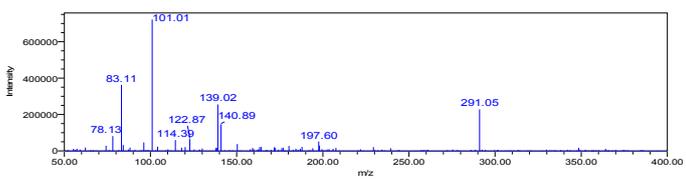
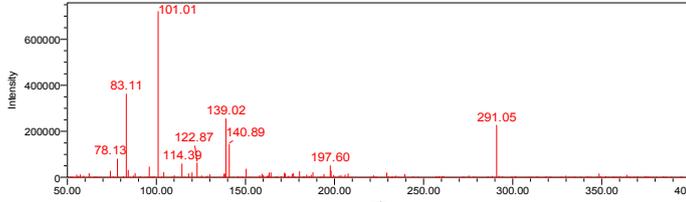
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.50: Bibliografía para los flavanoles en el arándano europeo.

Ácido hidroxicinámico	Borges et al (2010)	Phenol explorer
Epicatequina	X	X

Con el fin de mostrar que dicha propuesta es la correcta expone su espectro de masas en la tabla 5.51:

Tabla 5.51: Espectro de masas de los flavanoles hallados en esta variedad de arándano.

Número de identificación	Flavanol	Espectro de masas
1	Catequina	
2	Epicatequina	

En ambos casos se obtiene el mismo espectro ya que son epímeros. Se puede ver un pico importante a m/z 291.05 correspondiente a su $M+1$. Otro pico importante es el obtenido a m/z 139.02, producto de la fractura de la molécula por el anillo B (fragmento que contiene al anillo A). El otro pico importante es el que se ve a m/z 122.8 y es el producto de la fractura por el anillo B conteniendo al anillo C (Abad-García et al, 2009).

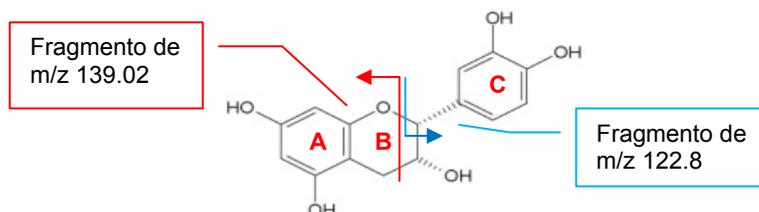


Figura 5.22: Estructura de la epicatequina

➤ El resveratrol en el arándano

El perfil cromatográfico de absorción para el resveratrol se obtiene a una absorbancia de 280 nm, la misma λ máxima a la que se estudian los flavanoles. En la figura 5.23 se muestra el perfil de este estilbeno presente en el arándano europeo relacionado con su espectro de absorbancia.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Esta propuesta de identificación se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención del patrón en el cromatograma de absorción, a sus espectros en ultravioleta visible y en masas.

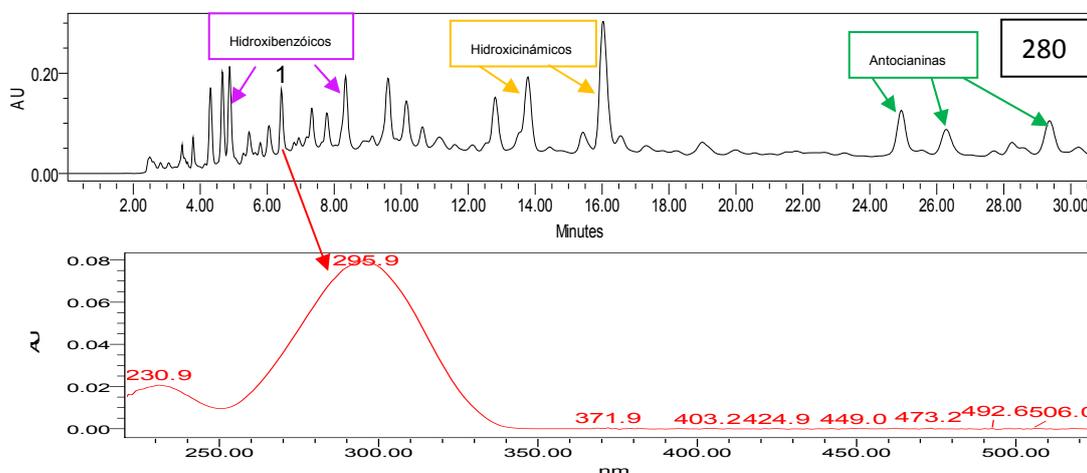


Figura 5.23: Perfil cromatográfico del resveratrol presente en el arándano estudiado relacionado con su espectro de absorción.

Como se puede ver, el resveratrol, al igual que ocurría con la epicatequina, es prácticamente inapreciable en UV Visible, para verlo bien es necesaria la técnica de fluorescencia. El proponer la presencia de resveratrol en el arándano se realizó fundamentalmente teniendo en cuenta el tiempo de retención al que salía el pico del patrón en el cromatograma durante su análisis, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masa. La identificación del resveratrol en este tipo de arándano se puede ver en la tabla 5.52.

Tabla 5.52: Propuesta de identificación del resveratrol en el arándano europeo.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación del estilbeno
1	6,570	Resveratrol glicosilado

En cuanto a la bibliografía estudiada para el resveratrol, Trela y Waterhouse afirman que a pesar de que se dan tanto la forma cis como la forma trans del resveratrol, en las bayas sólo está presente el trans-resveratrol cuyo crecimiento está estimulado con su exposición a luz ultravioleta. Según el phenol explorer, el arándano europeo contiene 1.92 mg/100g de peso fresco.

A continuación, en la tabla 5.53, se muestra el espectro de masas del resveratrol glicosilado (piceido).

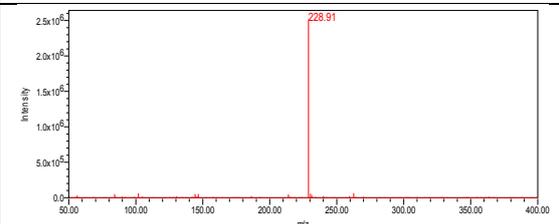
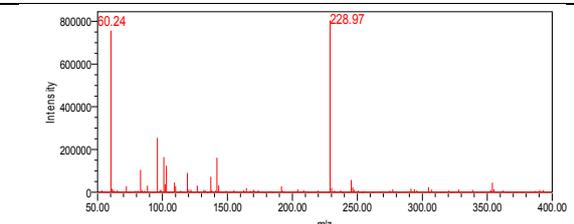
Tabla 5.53: Espectro de masas del resveratrol presente en el arándano europeo.

Número de identificación	Identificación del estilbeno	Espectro de masas
1	Resveratrol glicosilado	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Como se puede ver en este espectro hay un pico importante que es el que se corresponde con el M+1 de la estructura del resveratrol, pero hay que decir que el tiempo de retención que se ha obtenido dista mucho del obtenido por el patrón, lo que lleva a la conclusión de que el que el compuesto identificado no es el resveratrol propiamente dicho sino un glicosilado de dicho compuesto y por motivo de una hidrólisis muy rápida el azúcar no aparece en el espectro (Rimando et al, 2004). La comparativa entre el patrón y el estilbeno encontrado en esta variedad de arándano se puede ver muy bien en los espectros de la tabla 5.54.

Tabla 5.54: Comparativa entre el resveratrol glicosilado encontrado en este tipo de arándano y el patrón.

Resveratrol patrón	“Resveratrol” muestra (min)
tiempo retención (min) 53,170	tiempo retención (min) 6,570
	

➤ La vitamina C en el arándano

La vitamina C se observa representando un perfil cromatográfico de absorción a una longitud de onda de 243 nm, tal y como se puede ver en la figura 5.24.

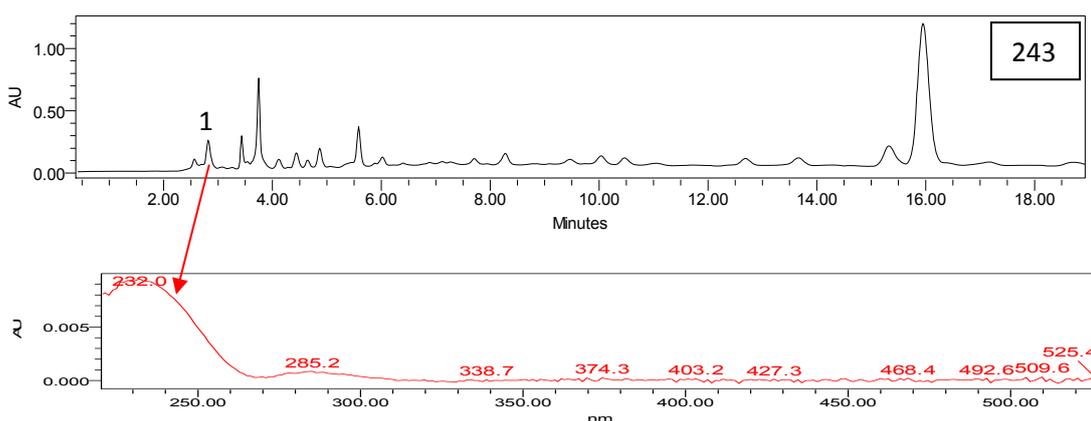


Figura 5.24: Perfil cromatográfico del ácido ascórbico encontrado en el arándano europeo relacionado con su espectro de absorción.

A continuación, en la tabla 5.55, se muestra el tiempo de retención del ácido ascórbico presente en el arándano europeo en las condiciones de análisis explicadas anteriormente.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.55: Identificación del ácido ascórbico presente en este tipo de arándano.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación
1	2,964	Ácido ascórbico

Según la bibliografía, www.consumer.es, el arándano muestra una concentración de ácido ascórbico de 17mg/100g producto comestible. Aunque Borges et al (2010) afirman que el arándano europeo contiene 19.48mg/100g de producto. Tal y como se ve en la tabla 5.56, por espectrometría de masas se muestra la presencia del ácido ascórbico en la muestra tomada.

Tabla 5.56: Espectro de masas de la vitamina C en el arándano europeo.

Número de identificación	Identificación	Espectro de masas
1	Ácido ascórbico	

De este espectro se puede decir que el pico importante a destacar es el ión molecular del ácido ascórbico con una m/z de de 177. Hay que decir que este espectro sale muy “sucio” posiblemente por las fragmentaciones de otros compuestos con tiempo de retención cercano.

2.3.-Grosella (*Blackcurrant; Ribes nigrum*)

La muestra analizada consiste en un zumo concentrado de esta fruta procedente de la empresa J.García Carrión. La muestra es analizada en el laboratorio del edificio de Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Edificio I+D+I (SAIT). Anteriormente a su análisis esta muestra se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

➤ Antocianos presentes en la grosella

Para identificar los antocianos presentes en la grosella se mira el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 520 nm. Los picos se identifican por el tiempo de retención, PDA e identificación con el espectro de masas obtenido para cada antociano.

La propuesta de identificación de los antocianos en las frutas rojas se ha realizado mediante la comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía. El motivo de este tipo de identificación se debe a la gran diversidad de antocianos presentes en las frutas rojas y a la no comercialización de patrones de muchos de ellos.

En la figura 5.25 se muestra el perfil cromatográfico de los antocianos presentes en la grosella relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

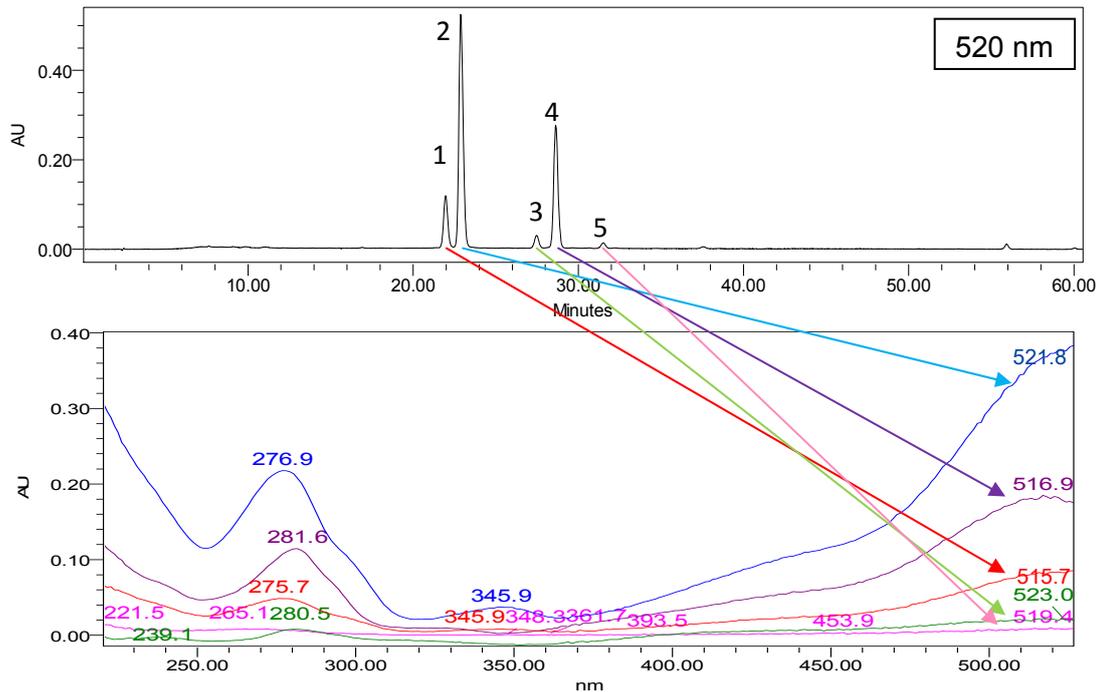


Figura 5.25: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en la grosella relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

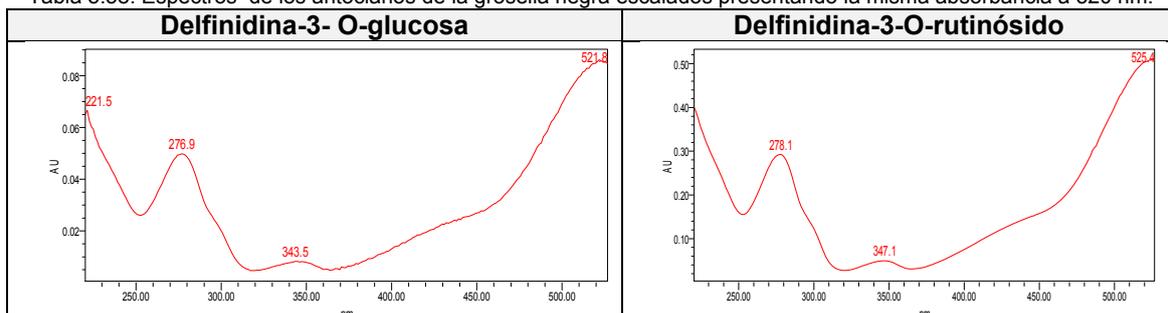
A continuación, en la tabla 5.57, se realiza la propuesta de identificación de los antocianos presentes en la grosella.

Tabla 5.57: Propuesta de identificación de los antocianos hallados en la grosella negra.

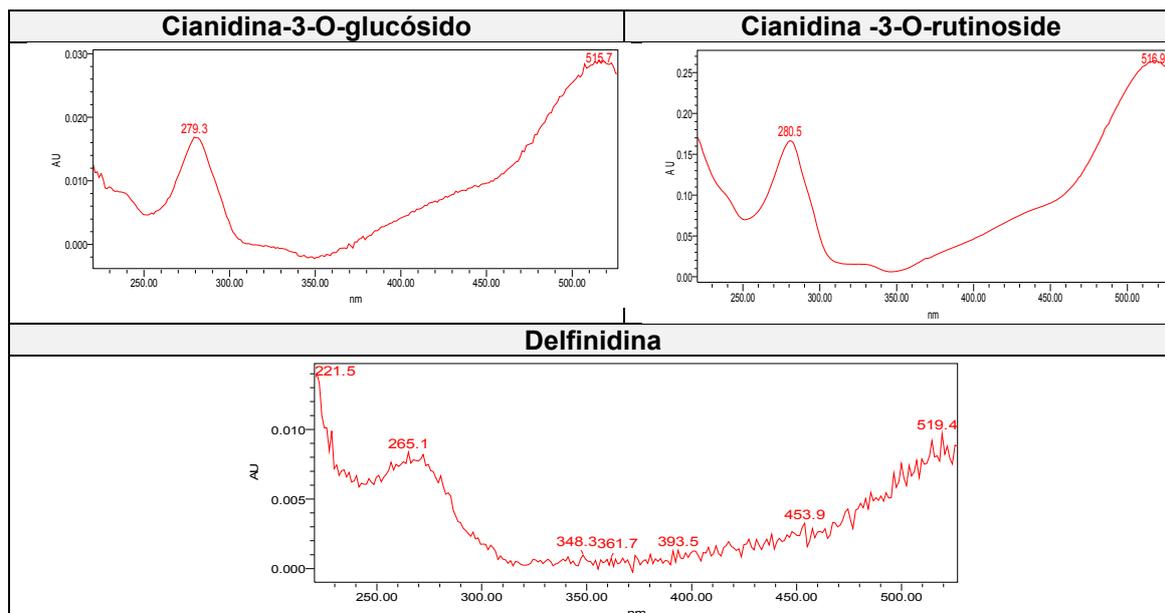
Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los antocianos
1	21.917	Delfinidina-3- O-glucósido
2	22.827	Delfinidina-3-O-rutinósido
3	27.456	Cianidina-3-O-glucósido
4	28.544	Cianidina-3-O-rutinósido
5	32.248	Delfinidina

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.58 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 520 nm.

Tabla 5.58: Espectros de los antocianos de la grosella negra escalados presentando la misma absorbancia a 520 nm.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



En la tabla 5.59 se expone la propuesta de identificación de cada antociano hecha mediante la comparación con los datos de la bibliografía.

Tabla 5.59: Propuesta de identificación para los antocianos en este tipo de grosella.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Bermúdez et al. (2004)	Phenol explorer	Goiffon et al. (1999)
1	Delfinidina-3-O-glucósido	X	X	X
2	Delfinidina-3-O-rutinósido	X	X	X
3	Cianidina-3-O-glucósido	X	X	X
4	Cianidina-3-O-rutinósido	X	X	X
5	Delfinidina	X	X	-
6	Peonodina-3-O-rutinósido	-	X	-
7	Malvidina-3-O-rutinósido	-	X	-
8	Pelargonidina		X	
9	Pelargonidina-3-O-rutinósido	-	X	.
10	Peonidina	-	X	.
11	Petunidina-3-O-rutinósido	-	X	.

Para corroborar dicha propuesta se trabaja con espectrometría de masas. En la tabla 5.60 se presentan los datos referentes a los antocianos identificados en la grosella.

Tabla 5.60: Espectros de masas de los antocianos identificados en esta variedad de grosella.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Espectro de masas
1	Delfinidina-3-O-glucosa	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

2	Delfinidina-3-O-rutenosido	<p>Mass spectrum showing intensity versus m/z. Major peaks are labeled at m/z 55.37, 303.23, 611.31, and 612.31.</p>
3	Cianidina-3-O-glucósido	<p>Mass spectrum showing intensity versus m/z. Major peaks are labeled at m/z 61.35, 196.16, 287.20, 288.13, and 449.37.</p>
4	Cianidina-3-O-rutinoside	<p>Mass spectrum showing intensity versus m/z. Major peaks are labeled at m/z 83.30, 287.13, 595.36, and 596.35.</p>
5	Delfinidina	<p>Mass spectrum showing intensity versus m/z. Major peaks are labeled at m/z 60.36, 55.37, 73.19, 83.24, 78.32, 74.26, 100.26, 87.87, 89.33, 102.26, and 303.16.</p>

A la hora de explicar este grupo de flavonoides, por razones de sencillez, se hace necesario dividirlos en función del grupo flavonoide principal: Se tienen así dos grupos: las delfinidinas(Df) y las cianidinas(Ci).

- Las delfinidinas glicosilados identificados son tres: la Df-3-O-glucósido y la Df-3-O-rutinósido y la delfinidina. Estos tres compuestos tienen en común la señal de un fragmento importante (m/z 303) debido a la estructura flavonoide. El primer antociano tiene otra señal a una relación m/z de 465, razón de la estructura completa del antociano (Valls et al, 2009). El segundo antociano la otra señal importante a m/z 611, debida a la estructura flavonoide con el azúcar glicosilado, en este caso es el rutinósido (6-O-β-L-rhamnosyl-D-glucosa) (Sójka et al, 2009).
- Hay dos cianidinas glicosiladas, la Cianidina-3-O- glucósido, y la Cianidina-3-O-rutinósido. Coincidiendo los dos en el fragmento debido a la estructura principal del flavonoide (m/z 287). Ambas cianidinas presentan otra señal importante producto de su correspondiente glicosilación siendo sus respectivas relaciones m/z 449 y 595.3 (Sójka et al, 2009).

➤ Flavonoles presentes en la grosella

Para identificar los flavonoles presentes en la grosella se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotiododos (PDA) a una absorbancia de 360 nm, el resultado obtenido se comprueba con la bibliografía disponible y con los patrones analizados en el departamento, posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada flavonol.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En la figura 5.26 se muestra el perfil de los flavonoles presentes en esta fruta relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada flavonol.

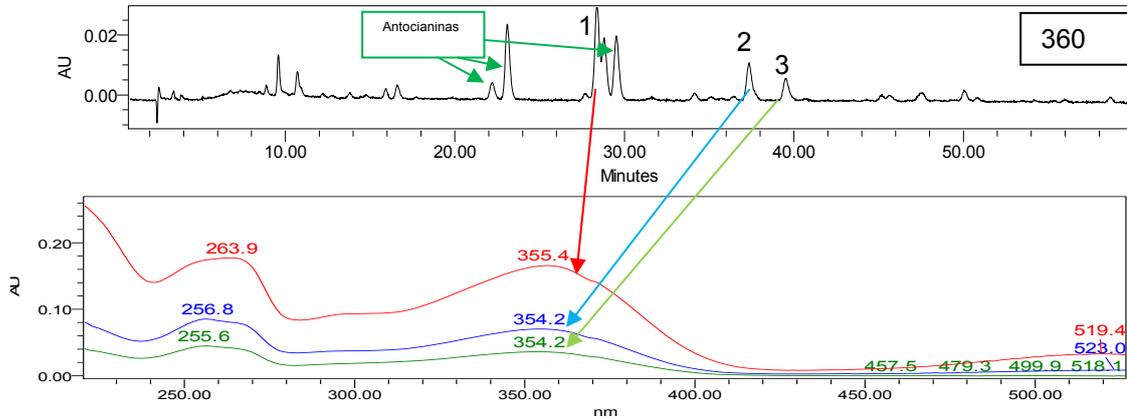


Figura 5.26: Perfil de los flavonoles presentes en la grosella negra relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

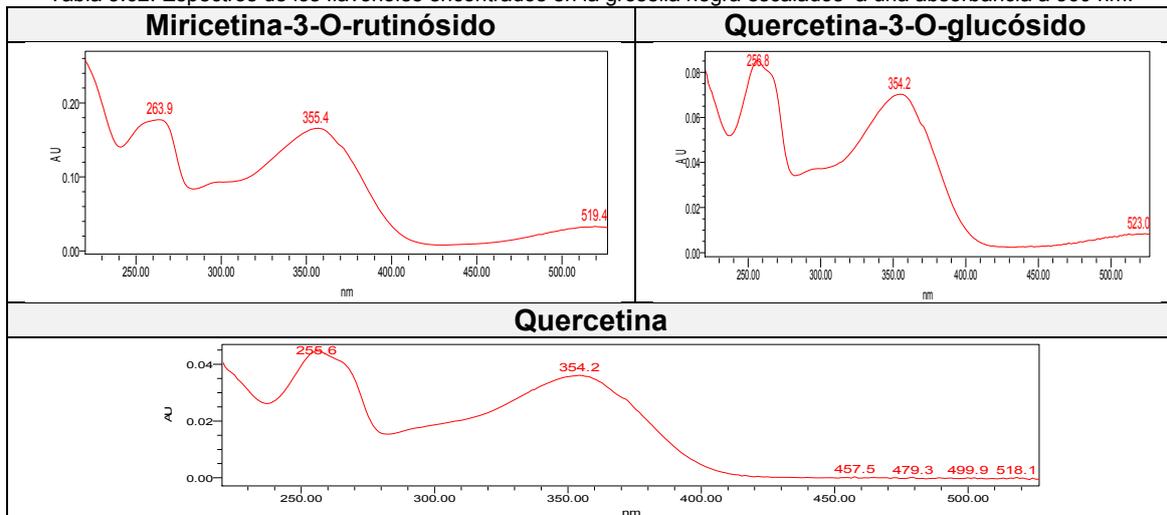
En la tabla 5.61 se expone la propuesta de identificación de los flavonoles presentes en la grosella, para la identificación se atiende al tiempo de retención.

Tabla 5.61: Propuesta de identificación de los flavonoles presentes en esta variedad de grosella.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	28,294	Miricetina-3-O-rutinósido
2	37,226	Quercetina-3-O-glucósido
3	39,446	Quercetina

Con motivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.62 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 360 nm.

Tabla 5.62: Espectros de los flavonoles encontrados en la grosella negra escalados a una absorbancia a 360 nm.



La bibliografía que se muestra en la tabla 5.63 identifica en la grosella los siguientes flavonoles.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.63: Bibliografía para los flavonoles en la grosella negra.

Flavonoles	Sójka, Guyot, Kolodziejzy, Król y Baron (2009)	Phenol explorer	Chen et al (2001)
Kaempferol	X	X	-
Kaempferol-3-O-glucósido	-	X	-
Miricetina	X	X	X
Miricetina-3-glucósido	X	X	-
Miricetina-3-rutinósido	-	X	-
Quercetina	-	-	X
Quercetina-3-glucósido	X	X	-
Quercetina-3-rutinósido	-	X	-
Quercetina-3-galactósido	-	X	-
Isorhamnetina	X	-	-
Quercetina-3-xilósido	-	X	-

Para verificar dicha propuesta se recurre a la espectrometría de masas que queda recogida en la tabla 5.64. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.64: Espectros de masas de los flavonoles presentes en esta variedad de grosella.

Número de identificación	Identificación de los flavonoles	Espectro de masas
1	Miricetina-3-O-rutinósido	
2	Quercetina-3-O-glucósido	
3	Quercetina	

Por razones estructurales se hace preciso hacer una subdivisión a la hora de explicar los flavonoles identificados. En la primera subclase entra el miricetina. Este flavonol presenta tres picos importantes, el primer pico es producto de la estructura flavonoide del compuesto (m/z 319), el segundo es fruto de la glicosilación de éste con la glucosa (m/z 481) y el tercer pico se debe al ión molecular (m/z 627) (Sójka et al, 2009).

En la otra subclase entran los dos quercetinas. Ambas quercetinas coinciden en la señal debida al ión molecular de la quercetina (m/z 303). En el espectro de la quercetina-3-O-glucósido, además, se ve otro pico fundamental y es el

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

correspondiente a la estructura completa del compuesto (464 umas) (Sójka et al, 2009).

➤ Ácidos hidroxibenzóicos presentes en la grosella

El perfil cromatográfico de absorción para los hidroxibenzóicos se identifica a una absorbancia de 260 nm. En la figura 5.27 se muestra el perfil de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en la grosella relacionado con los espectros de absorción originados por cada uno de ellos.

La propuesta de identificación de los ácidos hidroxibenzóicos en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

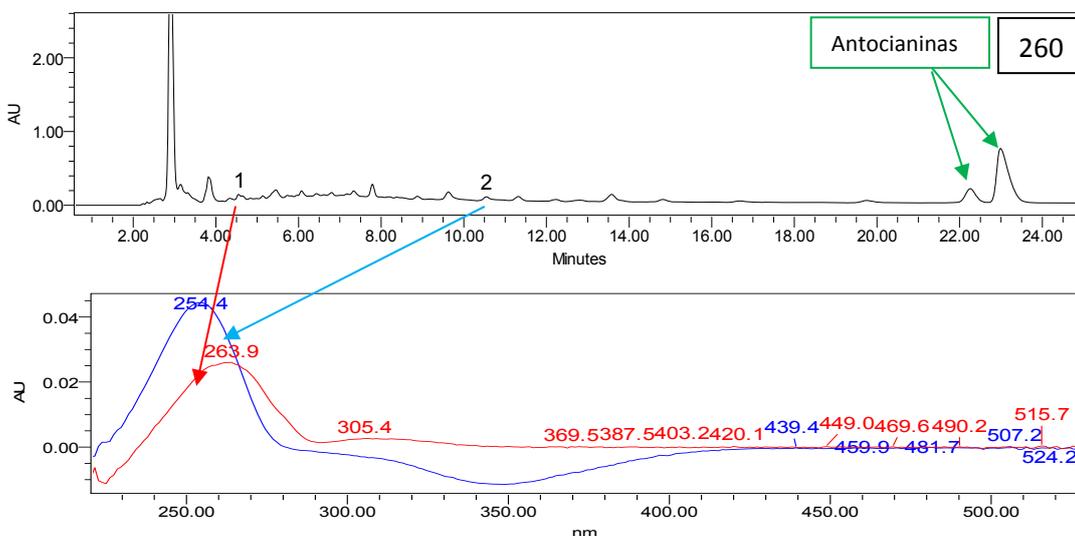


Figura 5.27: Perfil cromatográfico de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en la grosella negra relacionado con sus respectivos espectros de absorción.

La propuesta realizada para los ácidos hidroxibenzóicos presentes en la grosella negra se muestra en la tabla 5.65. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

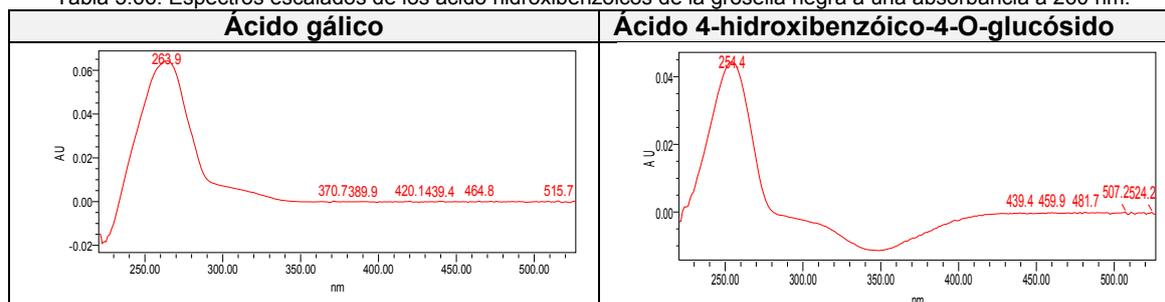
Tabla 5.65: Propuesta de identificación de los ácidos hidroxibenzóicos presentes en este tipo de grosella.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxibenzóicos
1	4,553	Ácido gálico
2	10,548	Ácido 4-hidroxibenzóico-4-O-glucósido

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorción obtenidos, se adjunta la tabla 5.66 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 260 nm.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.66: Espectros escalados de los ácido hidroxibenzóicos de la grosella negra a una absorbancia a 260 nm.



Los ácidos hidroxibenzóicos identificados en la grosella según la bibliografía quedan plasmados en la tabla 5.67.

Tabla 5.67: Bibliografía para los ácidos hidroxibenzóicos en la grosella negra.

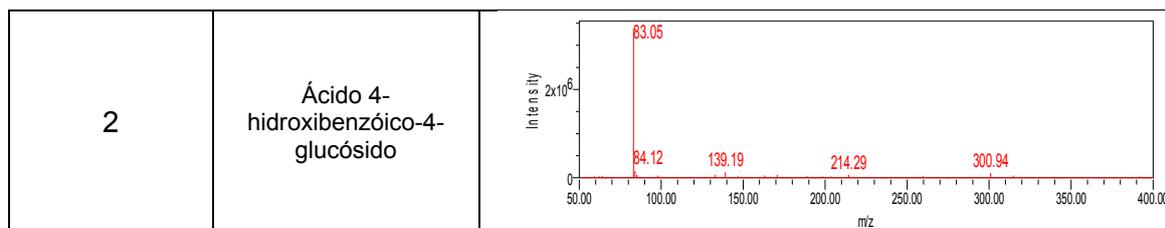
Ácidos hidroxibenzóicos	Phenol explorer	Russell, W. (2009)	Chen et al (2001)	Häkkinen, S. (1999)
Ácido gálico	-	X	-	-
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	-	X	-	-
Ácido vanillico	-	X	-	-
Ácido elágico-glucosa	-	-	-	X
Ácido 4-hidroxibenzóico-4-O-glucósido	X	-	-	-
Ácido galloilquínico	X	-	-	-
Ácido gálico-4-O-glucósido	X	-	-	-
Galoil glucosa	X	-	-	-
Ácido Protocatequico-4-glucósido	X	-	-	-
Ácido p-anísico	-	-	X	-
Ácido benzóico	-	-	X	-

Para verificar la propuesta realizada se recurre al análisis de los espectros de masas que están recogidos en la tabla 5.68. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.68: Espectros de masas de los ácidos hidroxibenzóicos encontrados en esta variedad de grosella.

Número de identificación	Identificación de los hidroxibenzóicos	Espectro de masas
1	Ácido gálico	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



En el ácido gálico, según el patrón previamente explicado, se observa su ión molecular a una m/z 170.9. Éste es el pico de mayor m/z pero se puede ver que aparece otro pico más intenso que éste cuya relación m/z es 129.9 cuya fractura no se sabe con exactitud. Podría pensarse que el ácido es oxidado mediante la formación de dos aldehídos y la correspondiente apertura del anillo. Tras lo cual se podría perder un grupo carbonilo quedando de este modo un fragmento cuya masa es de 129, por lo tanto su $M+1$ sería 130.

El segundo espectro presenta dos picos importantes. El primero es el ión molecular obtenido a m/z 300.9, que es el peso molecular del hidroxibenzoico glicosilado. El segundo es el pico correspondiente al peso molecular de la estructura principal del flavonoide cuya m/z es 139.2 (Bendini et al, 2007).

➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella

El perfil cromatográfico de absorción para los ácidos hidroxicinámicos se identifica a una absorbancia de 320 nm, tal y como se demuestra en la figura 5.28, en la que enseña el perfil de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

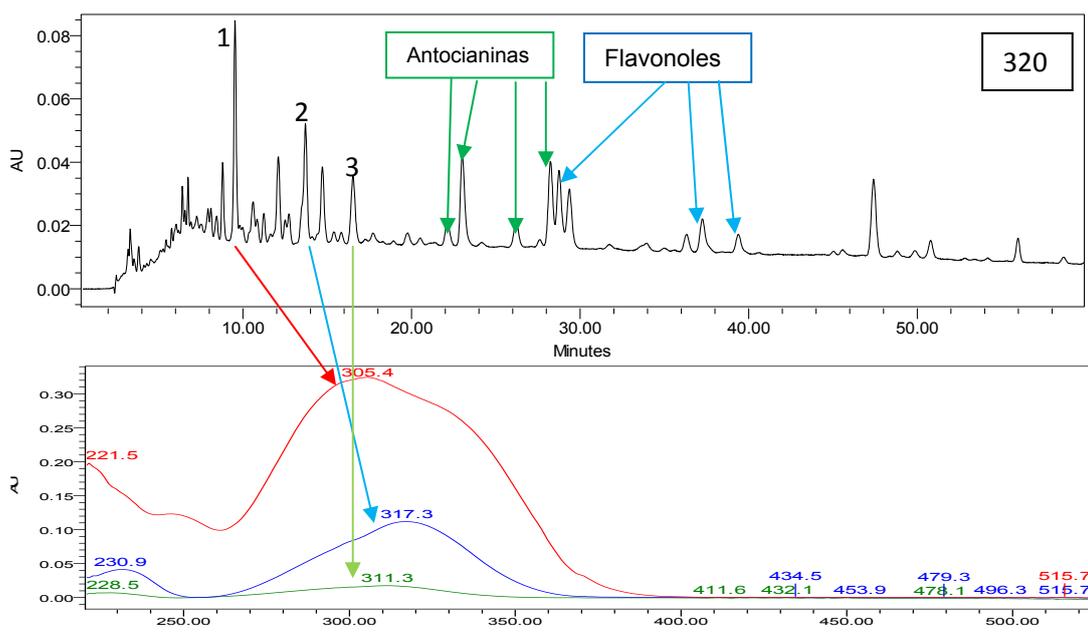


Figura 5.28: Perfil de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

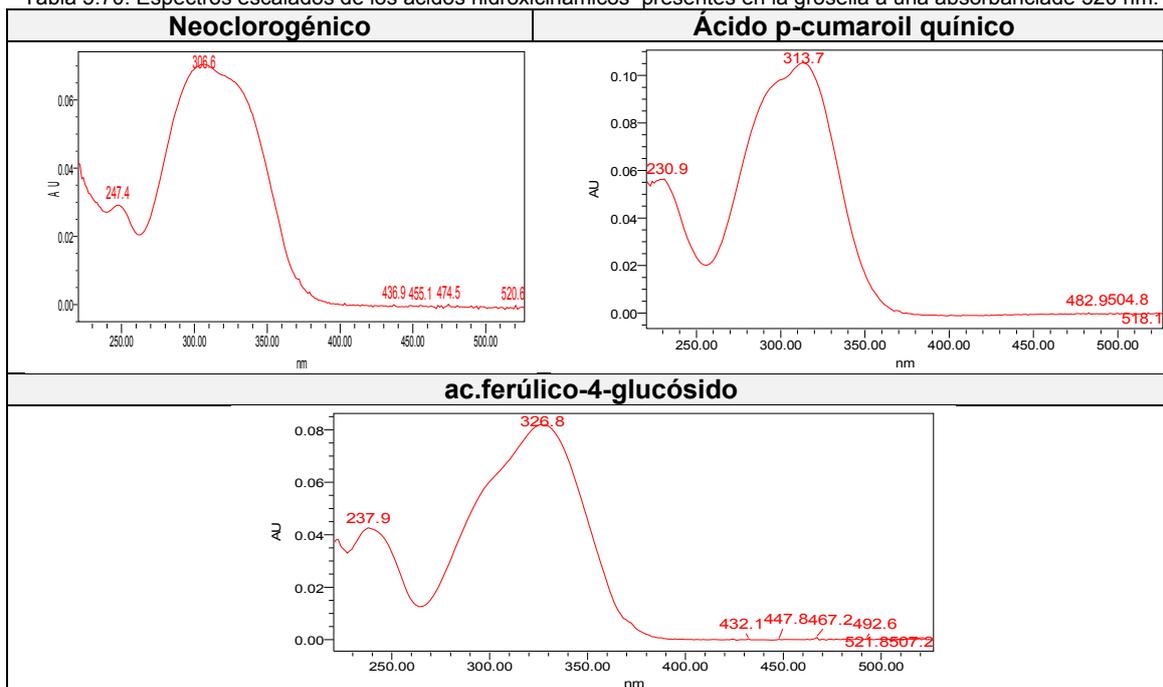
La propuesta realizada para los ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella se ofrece en la tabla 5.69. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

Tabla 5.69: Propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos
1	9,502	Neoclorogénico (ácido 5 - O - cafeoilquinico)
2	12,237	Ácido p-cumaroil quínico
3	16,948	ac.ferúlico-4-glucósido

Con el objetivo comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.70 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 320 nm.

Tabla 5.70: Espectros escalados de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella a una absorbancia de 320 nm.



Los hidroxicinámicos identificados por la bibliografía estudiada quedan expuestos en la tabla 5.71.

Tabla 5.71: Bibliografía para los ácidos hidroxicinámicos en la grosella negra.

Ácido hidroxicinámico	Jakobek, L. (2007)	Phenol explorer
Ácido caféico	X	-
Ácido p-cumárico	X	-
Ácido ferúlico	X	-
Ácido trans cinámico	X	-

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Ácido clorogénico	X	X
Ácido 3-feruloilquinico	-	X
Ácido 3-p-cumaroilquinico	-	X
Ácido 4-cafeoilquinico	-	X
Ácido 4-feruloilquinico	-	X
Ácido 4-p-cumaroilquinico	-	X
Ácido 5-cafeoilquinico	-	X
Ácido 5-feruloilquinico	-	X
Ácido caféico-4-glucósido	-	X
Cafeoil-glucosa	-	X
Ácido ferúlico-4-glucósido	-	X
Feruloil-glucosa	-	X
Ácido p-cumárico-4-glucósido	-	X
p-cumaroil glucosa	-	X

Con el fin de comprobar que dicha propuesta es cierta se procede a examinar los espectros de masas que se encuentran recogidos en la tabla 5.72.

Tabla 5.72: Espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos identificados en la grosella negra.

Número de identificación	Ácido hidroxicinámico	Espectro de masas
1	Neoclorogénico	<p>Mass spectrum of Neoclorogénico. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents intensity from 0 to 4x10⁶. The base peak is at m/z 83.05. Other significant peaks are labeled at m/z 60.18, 84.12, 294.08, and 354.86.</p>
2	Ácido del p-cumaroil quinico	<p>Mass spectrum of Ácido del p-cumaroil quinico. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents intensity from 0 to 600,000. The base peak is at m/z 60.24. Other significant peaks are labeled at m/z 83.05, 118.90, 146.90, 162.94, 176.93, and 338.87.</p>
3	Ácido ferúlico-4-glucósido	<p>Mass spectrum of Ácido ferúlico-4-glucósido. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents intensity from 0 to 200,000. The base peak is at m/z 194.76. Other significant peaks are labeled at m/z 62.19, 84.12, 102.96, and 356.85.</p>

En el espectro del neoclorogénico (ácido 5 -O-cafeoilquinico) se puede ver el ión molecular que se corresponde con su M+1(m/z 354.8). Se sabe que es el neoclorogénico y no el clorogénico por el tiempo de retención del patrón y por la ausencia del pico que sale en el patrón a una m/z de 162.9. Esta comparación se puede ver bien en los espectros de la tabla 5.73. En la figura 5.29 Se puede observar la diferencia estructural que hay entre ambos isómeros.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

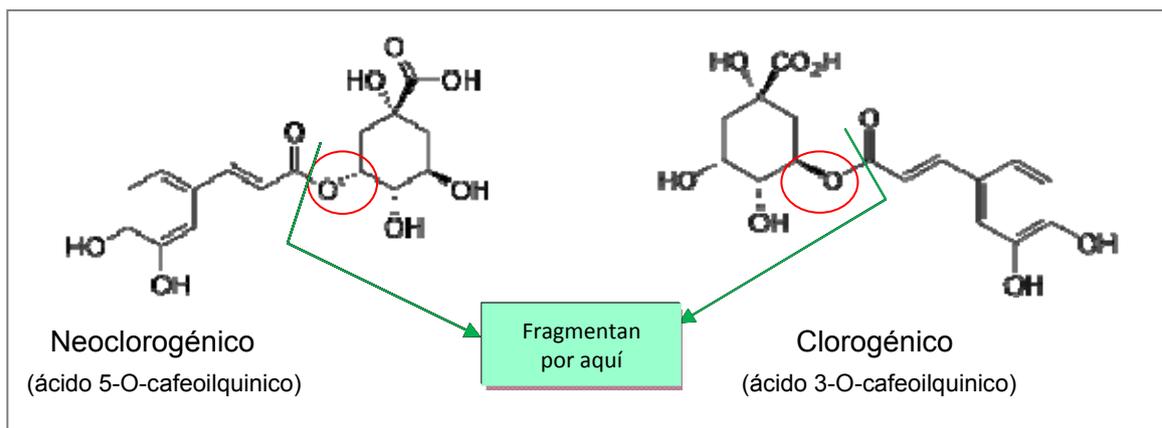


Figura 5.29: Diferencias estructurales entre los isómeros clorogénico y neoclorogénico

Tabla 5.73: Comparativa del "clorogénico" encontrado en la grosella con el patrón.

Clorogénico patrón	Neoclorogénico grosella
Tiempo de retención (min) 13,816	Tiempo de retención (min) 9,502

El segundo espectro de masas de los ácidos hidroxicinámicos corresponde al ácido p-cumaroil quínico ($C_{16}H_{18}O_8$), se sabe que esa señal es debida al ácido p-cumaroil quínico porque además de presentar el pico debido a la masa del ácido cumárico sin la molécula de agua (m/z 146.8), muestra una señal a una m/z 338.8 producto de su ión molecular. Mirando su espectro del UV Visible se puede ver que es muy similar al del cumárico, la principal diferencia que hay entre estos dos compuestos es el tiempo de retención al que salen. Esta diferencia se aprecia bien en los espectros de la tabla 5.74 y en la figura 5.30 queda reflejada la diferencia estructural entre ambos compuestos.

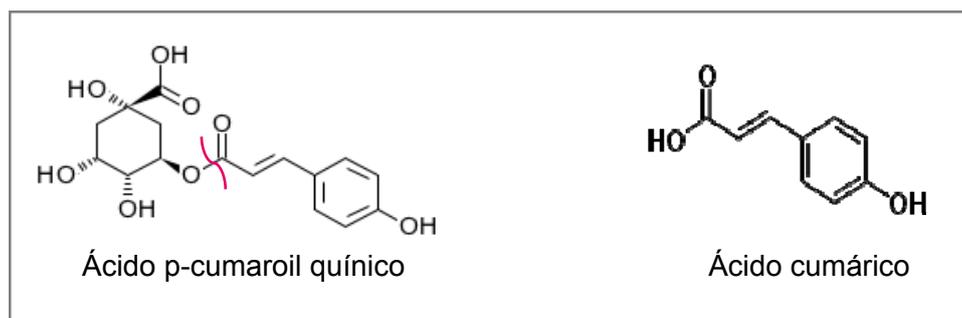
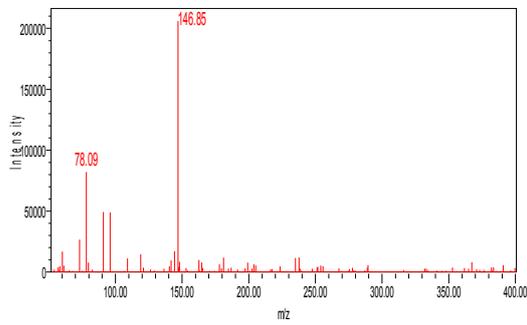
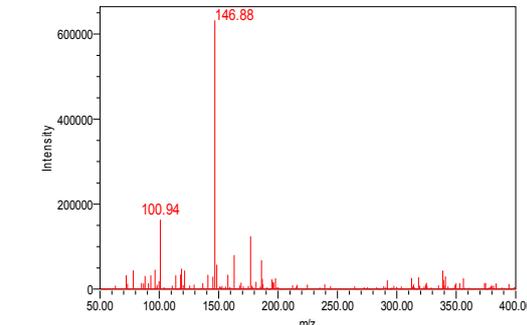


Figura 5.30: Diferencia estructural entre el ácido p-cumaroil quínico y el ácido cumárico.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.74: Comparativa entre el derivado del ácido p-cumárico y el patrón.

Ácido p-cumárico patrón	Ácido p-cumaroil quínico en la grosella
Tiempo de retención (min) 26,08	Tiempo de retención (min) 12,2
	

El tercer espectro es el del ácido ferúlico-4-glucósido. En este espectro se ven dos señales importantes, la primera es el pico base que se corresponde con la estructura flavonoide del ácido ferúlico (m/z 194.7) y la segunda es el ión molecular que es el producto del flavonoide glicosilado (m/z 356.8) (Abad-García et al, 2009).

➤ Flavanoles presentes en la grosella

El perfil cromatográfico de absorción para los flavanoles se identifica a una absorbancia de 280 nm.

Para continuar, en la figura 5.31, se muestra el perfil de los flavanoles presentes en la grosella relacionado con sus espectros de absorción.

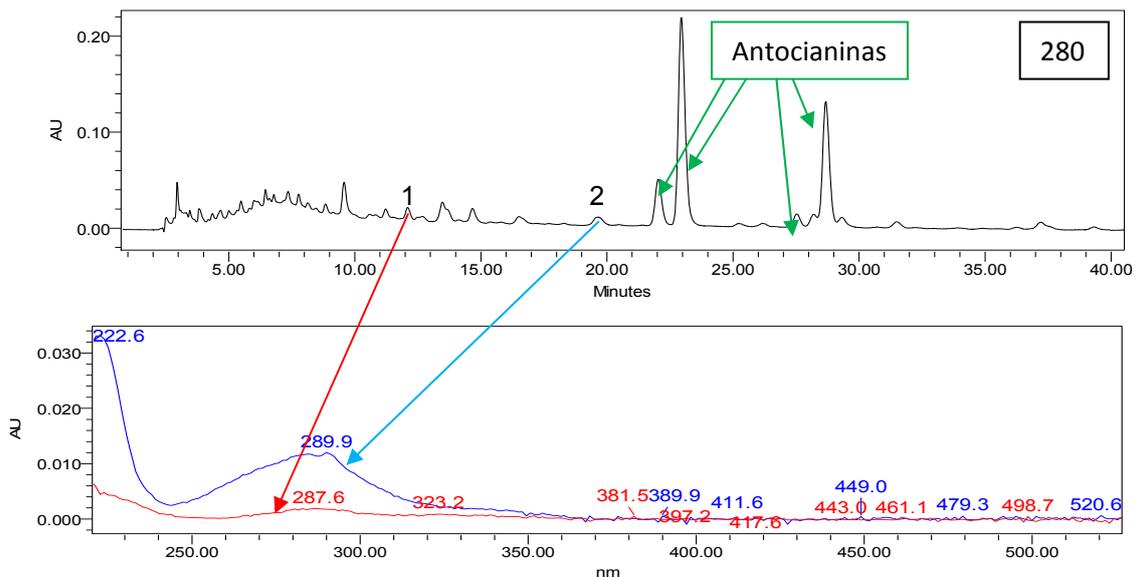


Figura 5.31: Perfil cromatográfico de los flavanoles presentes en la grosella negra relacionado con sus respectivos espectros de absorción.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

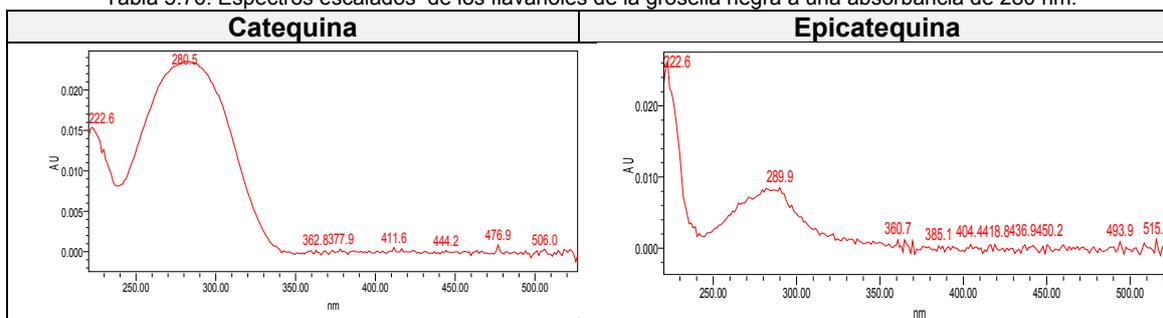
Al igual que ocurría en el mirtilo, los flavanoles son casi inapreciables en el cromatograma, este tipo de compuestos es apreciable en fluorescencia. La propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masas. Esta propuesta se plasma en la tabla 5.75.

Tabla 5.75: Propuesta de identificación de los flavanoles en esta variedad de grosella.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavanoles
1	12,596	Catequina
2	19,775	Epicatequina

Con motivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.76 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 280 nm.

Tabla 5.76: Espectros escalados de los flavanoles de la grosella negra a una absorbancia de 280 nm.



A continuación, en la tabla 5.77, se muestran los flavanoles identificados por la bibliografía estudiada quedan expuestos en la tabla de abajo.

Tabla 5.77: Bibliografía para los flavanoles de este tipo de grosella.

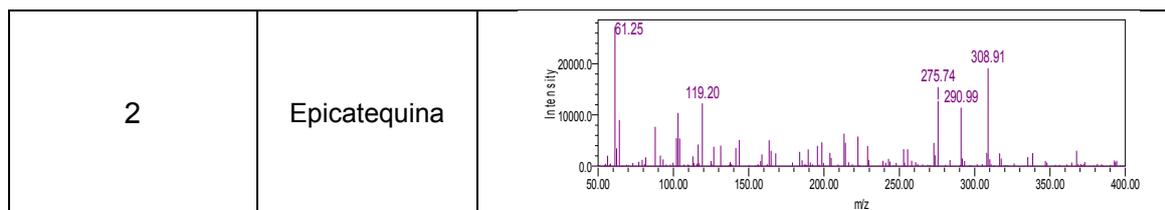
Flavanol	Phenol explorer	Chen et al (2001)
Catequina	X	X
Epicatequina	X	-

Con el fin de corroborar que dicha propuesta es la correcta, en la tabla 5.78 se muestran sus espectros de masas.

Tabla 5.78: Espectros de masas de los flavanoles identificados en la grosella negra.

Número de identificación	Flavanol	Espectro de masas
1	Catequina	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



Por comparación con el patrón y por bibliografía en el espectro de la catequina se puede ver un pico importante, el debido a su ión molecular (291). Mientras que en el espectro de la epicatequina se pueden ver dos señales importantes, la primera, obtenida a una relación m/z 290.9 que se corresponde con el ión molecular de la epicatequina y la segunda, obtenida a una m/z de 119.2 es producto de la escisión del anillo B y la posterior pérdida de dos moléculas de agua y una molécula de CO (Abad-García et al, 2009).

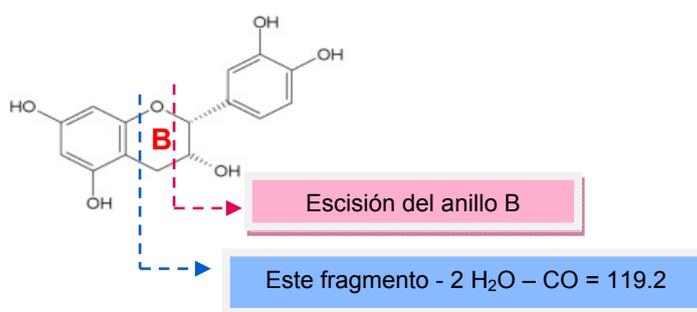


Figura 5.32: Estructura de la epicatequina

➤ La vitamina C en la grosella

La vitamina C o lo que es lo mismo el ácido ascórbico se observa haciendo un perfil cromatográfico de absorción a una longitud de onda de 243 nm, como se puede ver en la figura 5.33.

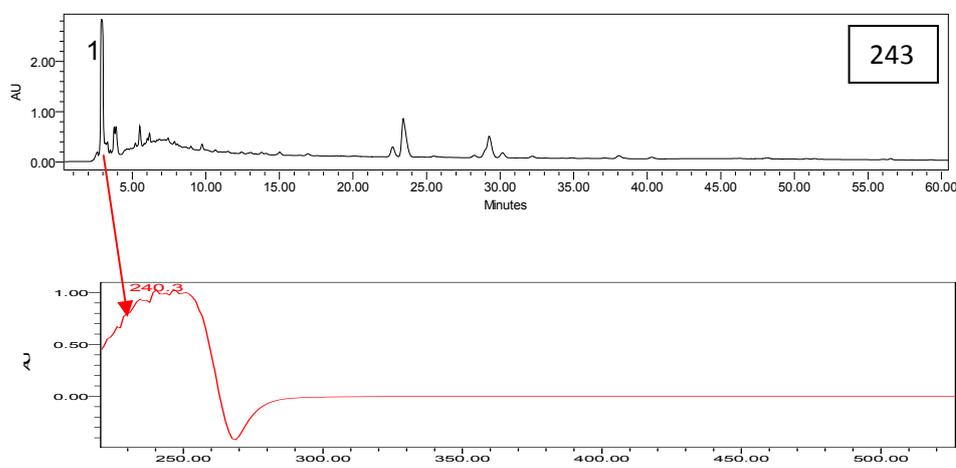


Figura 5.33: Perfil cromatográfico del ácido ascórbico presente en la grosella negra relacionado con su espectro de absorción.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

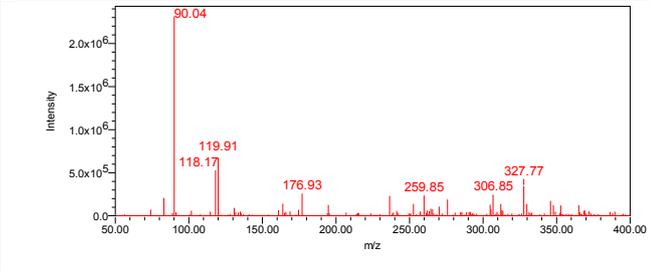
En la tabla 5.79 se muestra el tiempo de retención del ácido ascórbico presente en esta fruta en las condiciones de análisis explicadas anteriormente.

Tabla 5.79: Identificación de la vitamina C en la grosella negra.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación
1	2,968	Ácido ascórbico

Según la bibliografía, www.consumer.es, la grosella presenta un rango de concentración de ácido ascórbico de 200-40 mg/100g producto comestible. Para constatar la presencia de la vitamina C en la grosella se recurre a la espectrometría de masas que se muestra en la tabla 5.80.

Tabla 5.80: Espectro de masas del ácido ascórbico.

Número de identificación	Identificación	Espectro de masas
1	Ácido ascórbico	

Por comparación con el patrón pinchado cabe destacar en este espectro su ión molecular cuya relación m/z es 176.9.

2.4. - Cereza (Sour cherry; *Prunus cerasus*)

La muestra de cereza analizada consiste en un zumo concentrado de esta fruta procedente de la casa comercial Mondi Food. La muestra es analizada en el laboratorio del edificio de Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT), Edificio I+D+I. Anteriormente a su análisis esta muestra se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

➤ Antocianos presentes en la cereza

Para identificar los antocianos presentes en la cereza se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 520 nm, el resultado obtenido se comprueba con la bibliografía disponible y posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada antociano.

En la figura 5.34 se muestra el perfil de los antocianos presentes en la cereza relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada antociano.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

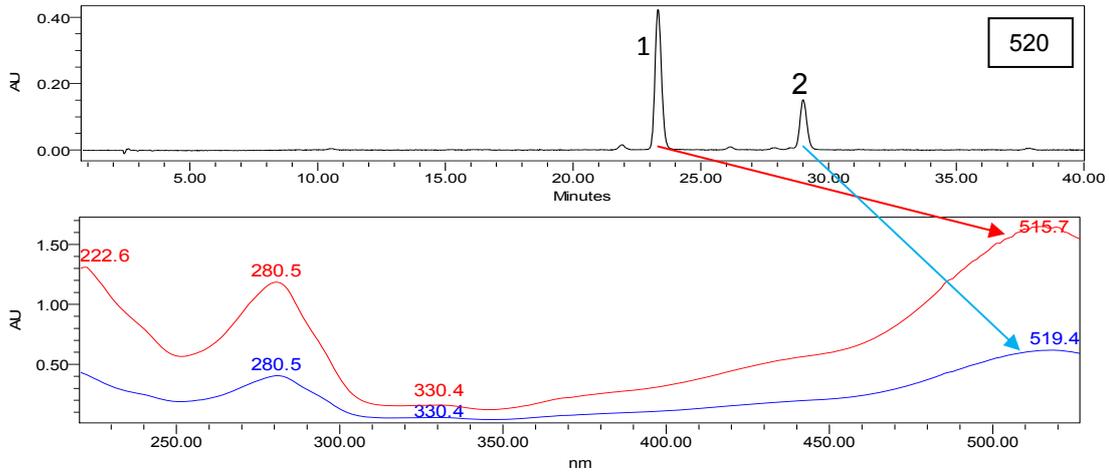


Figura 5.34: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

La propuesta de identificación de los antocianos en las frutas rojas se ha realizado mediante la comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía.

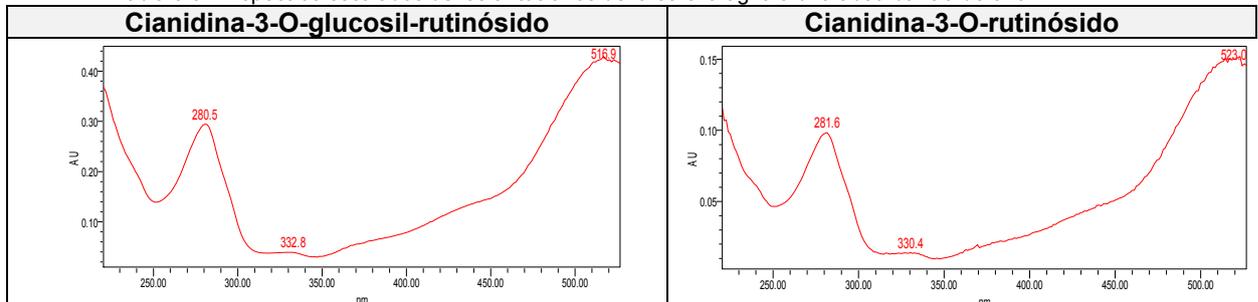
A continuación, en la tabla 5.81, se realiza la propuesta de identificación de los antocianos presentes en la esta fruta.

Tabla 5.81: Propuesta de identificación de los antocianos en la cereza agria.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los antocianos
1	23,300	Cianidina-3-O-glucosil-rutinósido
2	28,939	Cianidina-3-O-rutinósido

Con objetivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.82 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 520 nm.

Tabla 5.82: Espectros escalados de los antocianos de la cereza agria a una absorbancia de 520 nm.



Al no tener patrones de los antocianos, la propuesta de identificación de cada antociano se ha realizado mediante una comparación con los datos de la bibliografía. Esto queda expuesto en la tabla 5.83.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.83: Bibliografía de los antocianos en esta variedad de cereza

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Stintzing et al (2006)	Phenol explorer	Chaovanaalikit y Wrolstad (2004)
1	Cianidina-3-sophorido	-	-	X
2	Cianidina-3-(2G-xilosil-rutinósido)	-	-	-
3	Cianidina-3-O-glucósido	-	X	X
4	Cianidina-3-O-glucosil-rutinósido	X	X	X
5	Cianidina-3-O-rutinósido	X	X	X
6	Peonodina-3-O-rutinósido	X	X	X

Con el fin de corroborar dicha propuesta se trabaja con espectrometría de masas. En la tabla 5.84 se presentan los datos referentes a los antocianos identificados en la cereza.

Tabla 5.84: Espectros de masas de los antocianos identificados en la cereza.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Espectro de masas
1	Cianidina-3-O-glucosil-rutinósido	<p>The mass spectrum for Cyanidin-3-O-glucosyl-rutinoside shows a base peak at m/z 757.41. Other significant peaks are labeled at m/z 158.11, 287.27, 611.38, 758.34, and 759.34. The x-axis represents m/z from 100.00 to 1000.00, and the y-axis represents intensity up to 500,000.</p>
2	Cianidina -3-O-rutinósido	<p>The mass spectrum for Cyanidin-3-O-rutinoside shows a base peak at m/z 595.36. Other significant peaks are labeled at m/z 95.13, 140.90, 287.13, 596.35, 597.42, and 617.31. The x-axis represents m/z from 100.00 to 1000.00, and the y-axis represents intensity up to 400,000.</p>

En el espectro de la Cianidina-3-O-glucosil-rutinósido se ven claramente tres señales correspondientes a las fragmentaciones importantes que sufre la molécula. La primera señal (m/z 287) es la debida a la estructura principal de la cianidina. La segunda señal, a una relación m/z 611, es la debida al flavonoide unido a una molécula de glucosa y ésta a su vez unida a la molécula de glucosa del rutinósido (6-O- β -L-rhamnosil- D-glucosa) fragmentado. La tercera señal se corresponde con la estructura completa del antociano glicosilado con la glucosa y el rutinósido (Wu and Prior, 2005).

En el espectro de la Cianidina-3-O-rutinósido se ven dos picos importantes. El primero, causado por la estructura principal de la cianidina (m/z 287) y el segundo, obtenido a una m/z 595, es producido por la glicosilación de la cianidina con el disacárido rutinósido (Wu and Prior, 2005).

➤ Flavonoles presentes en la cereza

Para identificar los flavonoles presentes en la cereza se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 360 nm, el resultado obtenido se comprueba con la bibliografía disponible y con los patrones analizados en el departamento, posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada flavonol.

En la figura 5.35 se muestra el perfil cromatográfico de los flavonoles presentes en esta fruta relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada flavonol.

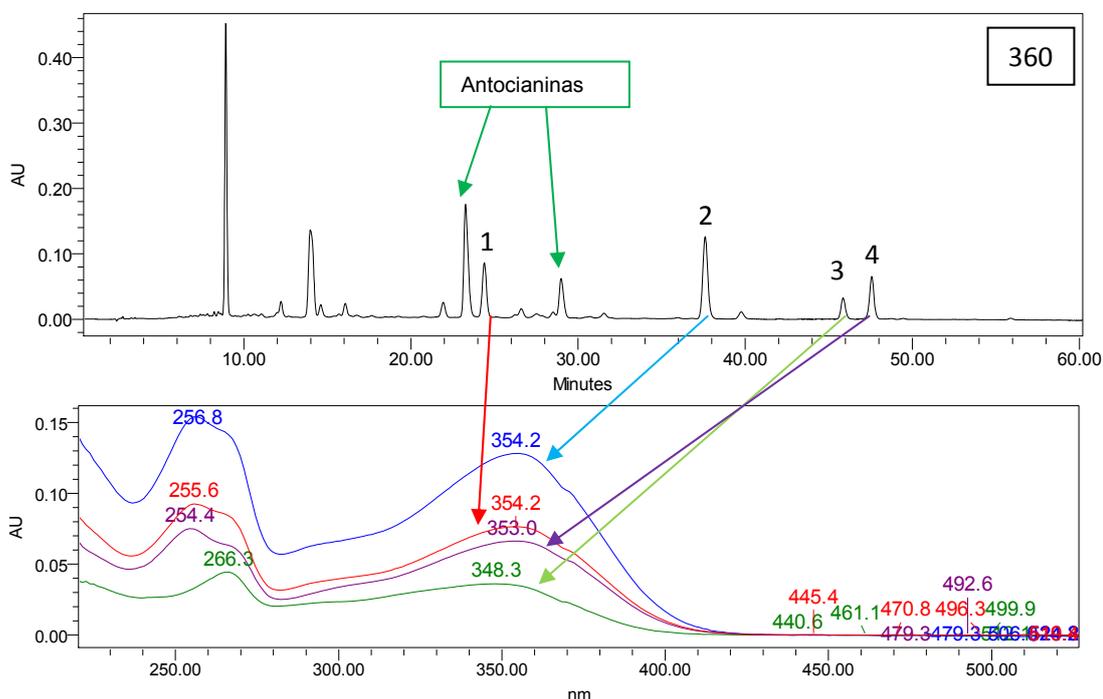


Figura 5.35: Perfil de los flavonoles presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

En la tabla 5.85 se expone la propuesta de identificación de los flavonoles presentes en esta fruta, para la identificación se atiende al tiempo de retención.

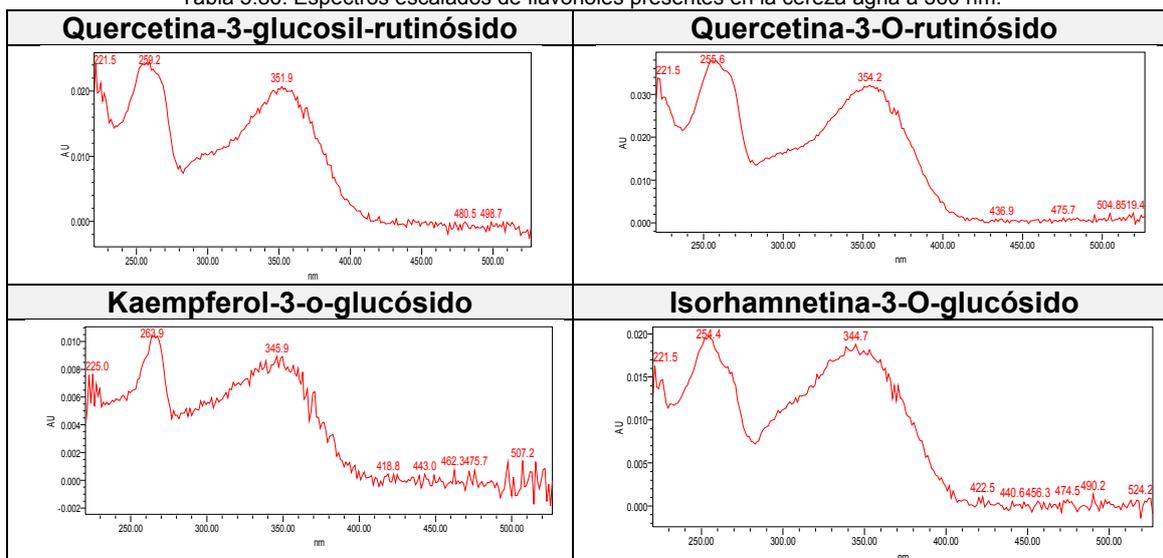
Tabla 5.85: Propuesta de flavonoles presentes en esta variedad de cereza.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	24,325	Quercetina-3-glucosil-rutinósido
2	37,533	Quercetina-3-O-rutinósido
3	45,794	Kaempferol-3-o-glucósido
4	47,473	Isorhamnetina-3-O-glucósido

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.86 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 360 nm.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.86: Espectros escalados de flavonoles presentes en la cereza agria a 360 nm.



En cuanto a la bibliografía estudiada para los flavonoles identificados en la cereza agria se recogen en la tabla 5.87.

Tabla 5.87: Bibliografía para los flavonoles en la cereza agria.

Flavonol	Lugasi et al (2003)	USDA	Ferretti et al (2010)
Quercetina	X	X	-
Quercetina-3-O-glucósido	-	-	X
Quercetina-3-O-rutenósido	-	-	X
Kaempferol-3-O-rutenósido	-	-	X

Para verificar la propuesta se recurre a la espectrometría de masas que se enseña en la tabla 5.88. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.88: Espectros de masas de los flavonoles hallados en este tipo de cereza.

Número de identificación	Identificación de los flavonoles	Espectro de masas
1	Quercetina-3-glucosil-rutinósido	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

2	Quercetina-3-O-rutinósido	
3	Kaempferol-3-o-glucósido	
4	Isorhamnetina-3-O-glucósido	

Por razones estructurales se hace preciso hacer una subdivisión a la hora de explicar los flavonoles identificados. En la primera subclase entran las dos quercetinas. La quercetina-3-glucosil-rutinósido presenta un ión molecular a una relación m/z 773.3 correspondiente al flavonol glicosilado con la glucosa y el rutinósido y un pico base a una m/z de 303.2 propio de la quercetina. En el espectro de la Quercetina-3-O-rutinósido se pueden ver tres picos característicos de este flavonol. El primer pico (m/z 303.1) es el fragmento correspondiente a la estructura del flavonol sin glicosilar, el segundo pico, obtenido a 565.3, es debido a la glicosilación de la quercetina con la glucosa del dímero, y el tercer pico, cuya m/z es 611.3, es producto del flavonol glicosilado con el dímero completo (Lin and Harnly, 2007).

En la segunda subclase entra el kaempferol-3-o-glucósido. El espectro de este flavonol glicosilado presenta dos picos característicos de este flavonol glicosilado. El primero es debido a la estructura principal del flavonol (m/z 287) y el segundo es producto de su glicosilación (m/z 449.2) (Lin and Harnly, 2007).

En la tercera subclase está el Isorhamnetina-3-O-glucósido. El espectro de este flavonol glicosilado muestra dos picos debidos a dos fragmentaciones importantes. El primero, característico de la estructura flavonoide muestra una m/z a 317.2. El otro pico importante, m/z de 479,2 fruto de la glicosilación del flavonoide (Lin and Harnly, 2007).

➤ Ácidos hidroxibenzóicos presentes en la cereza

El perfil cromatográfico de absorción para los hidroxibenzóicos se identifica a una absorbancia de 260 nm, lo cual se puede ver en la figura 5.36. La propuesta de identificación de los ácidos hidroxibenzóicos en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

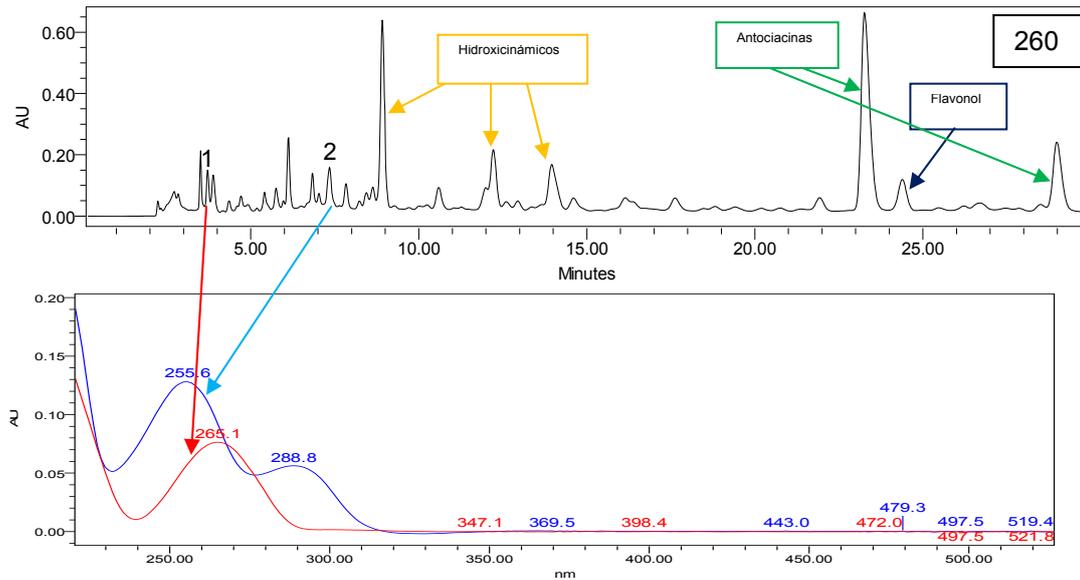


Figura 5.36: Perfil cromatográfico de los ácidos hidroxibenzoicos presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbanca.

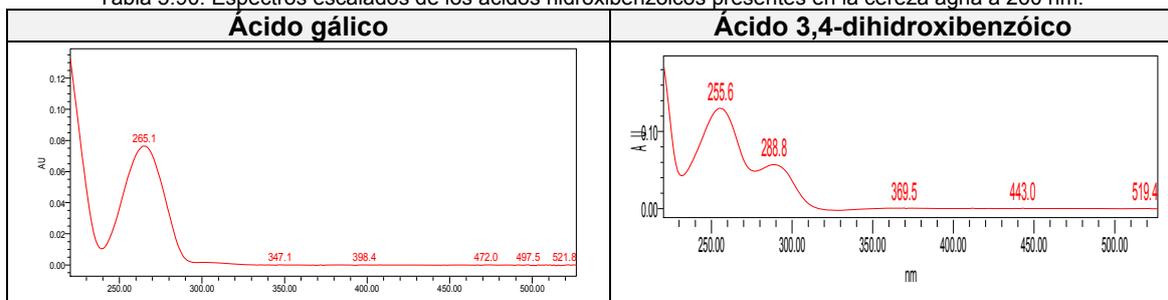
La propuesta realizada para los ácidos hidroxibenzoicos presentes en la cereza se ofrece en la tabla 5.89. Esta propuesta se realizó atendiendo sobre todo al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

Tabla 5.89: Propuesta de los ácidos hidroxibenzoicos en este tipo de cereza.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxibenzoicos
1	4,045	Ácido gálico
2	7,463	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico

Con el objetivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbanca obtenidos, se adjunta la tabla 5.90 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbanca a 260 nm.

Tabla 5.90: Espectros escalados de los ácidos hidroxibenzoicos presentes en la cereza agria a 260 nm.

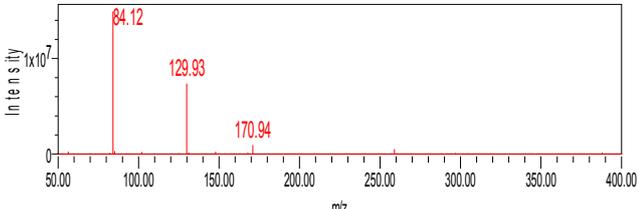
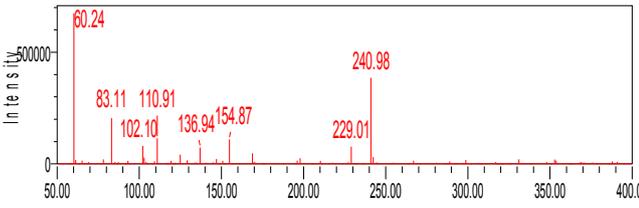


Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

En cuanto a la bibliografía, Jakobek et al (2007) afirman que en la cereza agria no hay ni ácido elágico ni el ácido 4-hidroxibenzóico. Y según Dae-Ok kim et al (2005), el ácido gálico en la cereza agria varía desde 146,1 a 312,4 mg/100g de producto.

Para comprobar que la propuesta realizada es correcta se trabaja con espectrometría de masas, la cual se presenta en la tabla 5.91. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 5.91: Espectros de masas de los ácidos hidroxibenzóicos identificados en la cereza agria

Número de identificación	Identificación de los hidroxibenzóicos	Espectro de masas
1	Ácido gálico	 <p>The mass spectrum for Gallic acid shows a base peak at m/z 84.12. Other significant peaks are labeled at m/z 129.93 and 170.94. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents intensity in units of 10⁷.</p>
2	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	 <p>The mass spectrum for 3,4-dihydroxybenzoic acid shows a base peak at m/z 60.24. Other labeled peaks include m/z 83.11, 102.10, 110.91, 136.94, 154.87, 229.01, and 240.98. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents intensity in units of 10⁵.</p>

Por comparación con el patrón previamente explicado se observa su ión molecular a una m/z 170.9. Éste es el pico más importante pero se puede ver que aparece otro pico más aparte de éste cuya relación m/z es 129.9 cuya fractura no se sabe con certeza pero podría pensarse que el ácido es oxidado mediante la formación de dos aldehídos y la correspondiente apertura del anillo. Tras lo cual se podría perder un grupo carbonilo quedando de este modo un fragmento cuya masa es de 129, por lo tanto su M+1 sería 130.

El espectro del ácido 3,4-dihidroxibenzóico presenta varios picos, importantes. Uno de los más importantes es el pico obtenido a una m/z de 154.87, pues es el debido al M+1 del ácido 3,4-dihidroxibenzóico. Debido a la pérdida de una molécula de agua, se obtiene el fragmento m/z 136.90 y por una pérdida del ácido de una molécula de CO₂ se genera el fragmento de m/z 110.9 (Abad-García et al, 2009).

El pico cuya m/z es 240.9 debe obtenerse por la formación de un aducto.

➤ **Ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza**

El perfil cromatográfico de absorción para los ácidos hidroxicinámicos se identifica a una absorbancia de 320 nm. En la figura 5.37 se expone el perfil cromatográfico de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

La propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

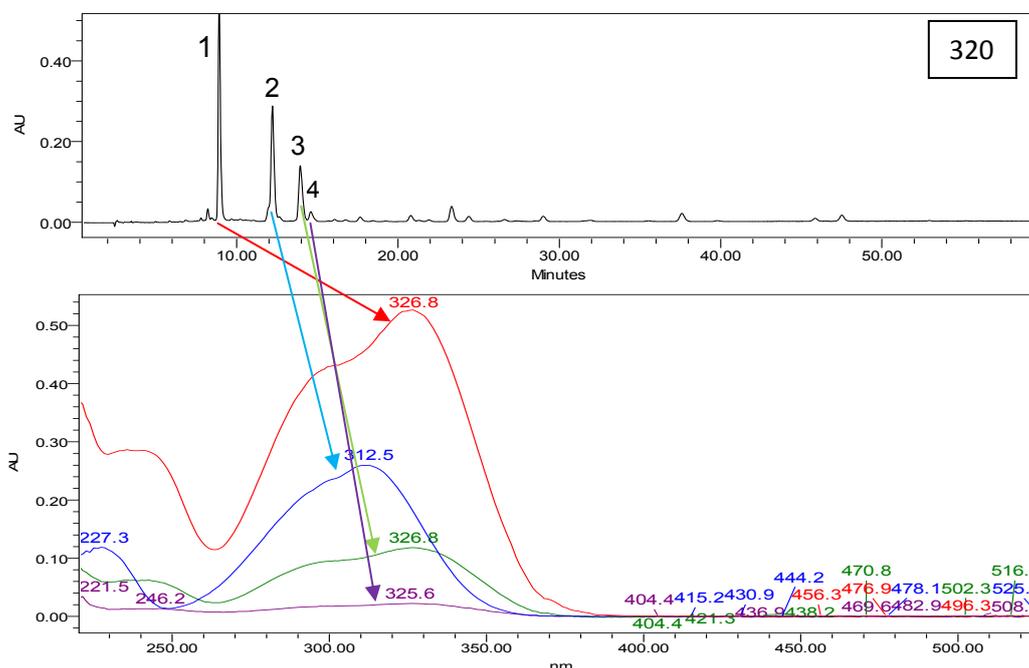


Figura 5.37: Perfil de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

En la tabla 5.92 se ofrece la propuesta hecha para los ácidos hidroxicinámicos presentes en esta fruta. Esta propuesta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a sus espectros en ultravioleta visible.

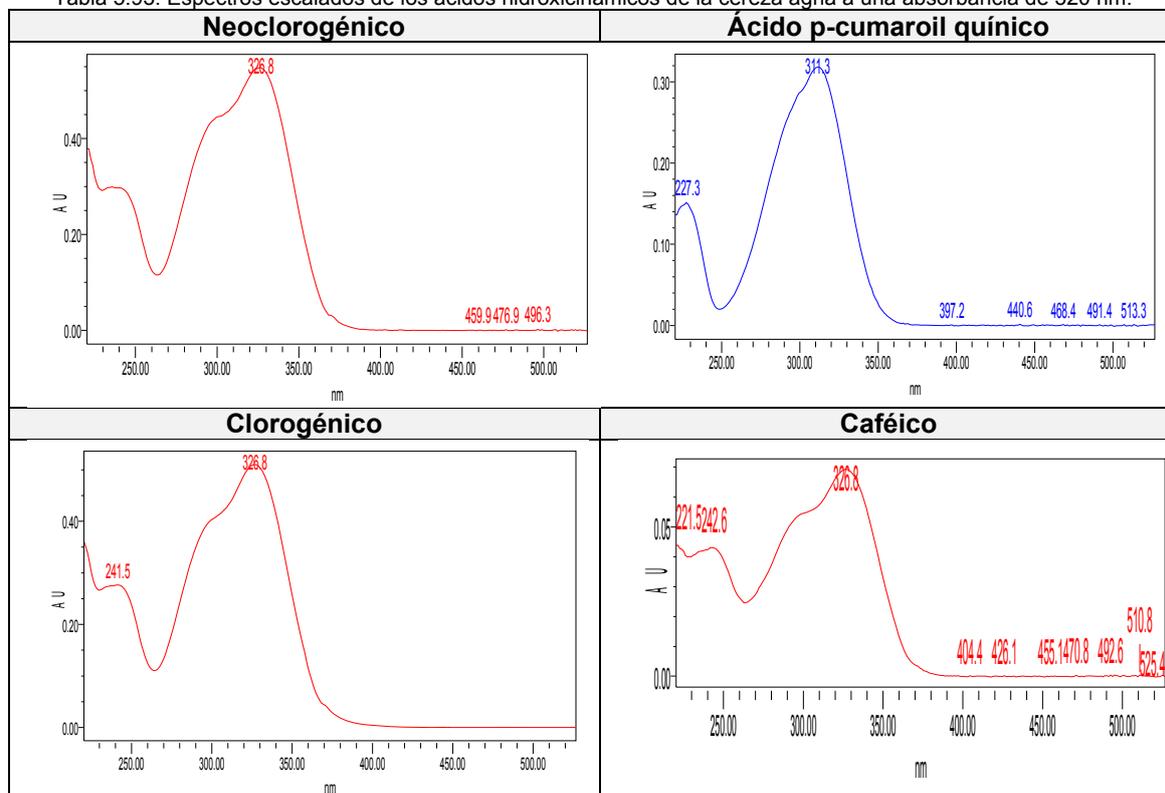
Tabla 5.92: Propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos en esta variedad de cereza.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos
1	8,909	Neoclorogénico (ácido 5-O-cafeoilquinico)
2	12,124	Ácido p-cumaroil quinico
3	13,819	Clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquinico)
4	14,633	Caféico

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

A modo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.93 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 320 nm.

Tabla 5.93: Espectros escalados de los ácidos hidroxicinámicos de la cereza agria a una absorbancia de 320 nm.



Los hidroxicinámicos identificados por la bibliografía estudiada quedan recogidos en la tabla 5.94.

Tabla 5.94: Bibliografía para los ácidos hidroxicinámicos en la cereza agria.

Ácido hidroxicinámico	Kirakosyan et al (2009)	Jakobek, L. (2007)	Phenol explorer
Ácido caféico	-	X	-
Ácido p-cumárico	-	X	-
Ácido neoclorogénico	X	-	-
Ácido p-3-cumaroil-quínico	X	-	X
Ácido clorogénico	-	-	-

Con el fin de comprobar que dicha propuesta es cierta se procede a examinar los espectros de masas que se presentan en la tabla 5.95.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.95: Espectros de masas de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en la cereza agria.

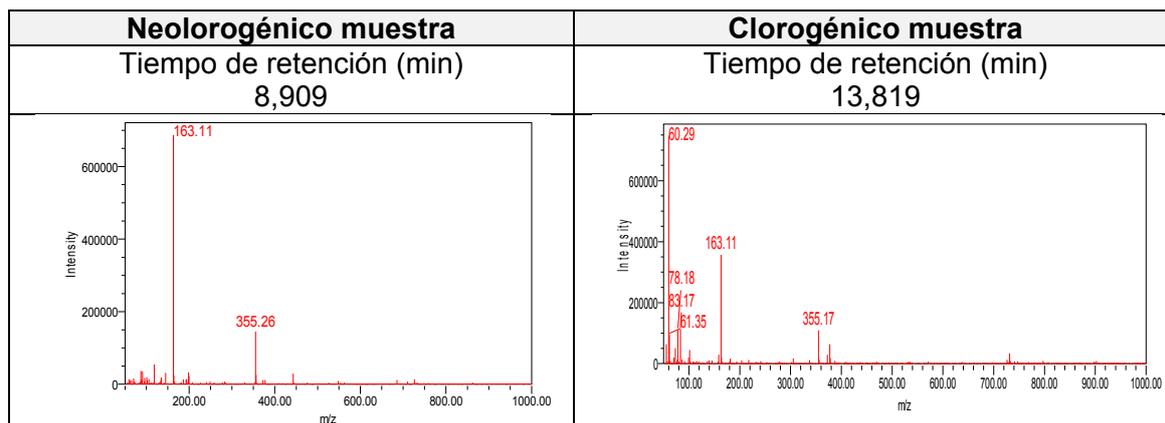
Número de identificación	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos	Espectro de masas
1	Neoclorogénico	<p>Mass spectrum of Neoclorogénico. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 600,000. The base peak is at m/z 163.11. Another significant peak is at m/z 355.26.</p>
2	Ácido p-cumaroil quínico	<p>Mass spectrum of Ácido p-cumaroil quínico. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 4x10⁶. The base peak is at m/z 146.88. Another significant peak is at m/z 338.92.</p>
3	Clorogénico	<p>Mass spectrum of Clorogénico. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 600,000. The base peak is at m/z 60.29. Other labeled peaks include 78.18, 83.17, 81.35, 163.11, and 355.17.</p>
4	Caféico	<p>Mass spectrum of Caféico. The x-axis represents m/z from 50.00 to 400.00, and the y-axis represents Intensity from 0 to 400,000. The base peak is at m/z 85.06. Other labeled peaks include 78.13, 97.10, 118.96, 132.59, 144.92, 162.94, 176.92, 203.84, and 324.83.</p>

En los espectros del neoclorogénico y del clorogénico se pueden ver las mismas señales: el ión molecular (355) y el pico base (163). El ión molecular se corresponde con su M+1 y el pico base se obtiene por la eliminación de la parte alcohólica del éster y así obtener el ácido deshidratado (m/z 163.1) (García-Abad et al, 2009). Se pueden distinguir perfectamente por el tiempo de retención, tal y como se muestra en los espectros de la tabla 5.96. Sus diferencias isoméricas pueden verse en la figura 5.28 del apartado de ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella.

Tabla 5.96: Comparativa del clorogénico y del neoclorogénico con el patrón.

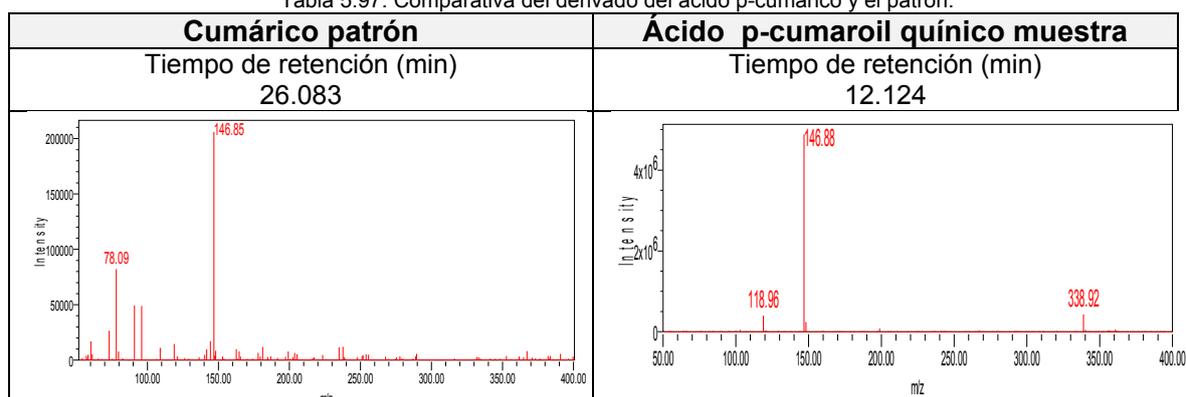
Clorogénico patrón
Tiempo de retención (min)
13.816
<p>Mass spectrum of Clorogénico patrón. The x-axis represents m/z from 0 to 1000.00, and the y-axis represents Intensity from 0.0 to 1.5x10⁶. The base peak is at m/z 162.93. Other labeled peaks include 144.69 and 354.93.</p>

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



El segundo espectro se sabe que es del ácido p-cumaroil quínico porque muestra dos señales: la primera, debida a la pérdida de una molécula de agua del ácido p-cumárico (m/z 147) y la segunda, producto de su ión molecular. La principal diferencia entre ambos compuestos es el tiempo de retención al que salen. Esto es muy apreciable en la tabla 5.97, donde se muestra la comparativa entre el espectro del ácido p-cumaroil quínico y el espectro del patrón utilizado.

Tabla 5.97: Comparativa del derivado del ácido p-cumárico y el patrón.



Las diferencias estructurales entre el ácido p-cumaroil quínico y el ácido cumárico se recogen en la figura 5.29 del apartado ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella.

En el espectro debido al caféico se pueden ver dos señales importantes. La primera en explicar es su pico base obtenido a una m/z 162.9, se produce como consecuencia de la pérdida de una molécula de agua del ácido caféico y la segunda señal a explicar es la generada a m/z 144.9, consecuencia de la pérdida de otra molécula de agua (Abad-García et al, 2009). De todos modos se observan gran cantidad de fragmentos ya que la señal del ácido caféico es muy débil. El ión molecular no se observa, a diferencia de en el patrón, donde es el pico base.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

➤ Flavonoles presentes en la cereza

El perfil cromatográfico de absorción para los flavonoles se identifica a una absorbancia de 280 nm. La propuesta de identificación de los flavanol presentes en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones de los flavonoles en los cromatogramas, a sus espectros en ultravioleta visible y a sus espectros en masas.

En la figura 5.38 se muestra el perfil de los flavonoles en la cereza relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

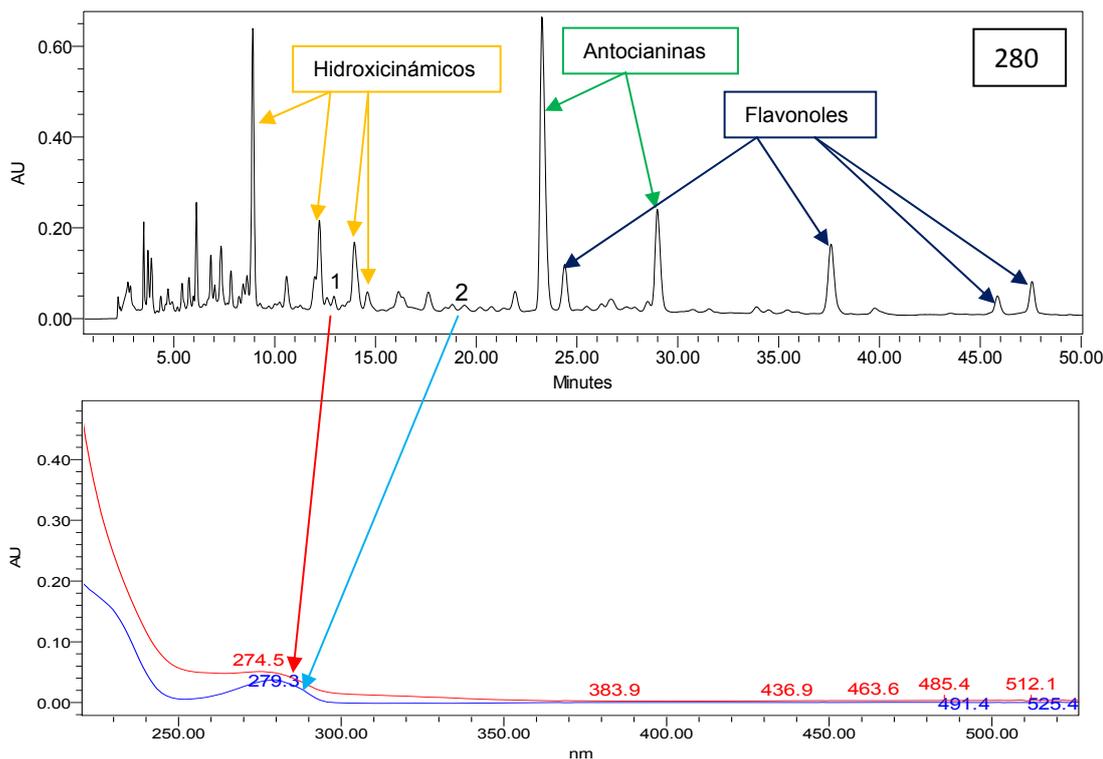


Figura 5.38: Perfil cromatográfico de los flavonoles presentes en la cereza agria relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

Al igual que ocurría en las otras frutas, estos flavonoles presentan una absorbancia demasiado baja para ser diferenciada de la línea base. Este tipo de compuestos es apreciable en fluorescencia. La propuesta realizada se expone en la tabla 5.98, se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masa.

Tabla 5.98: Propuesta de identificación del flavanol presente en este tipo de cereza.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	12,590	Catequina
2	19,388	Epicatequina

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

La tabla 5.99 muestra los flavanoles identificados por la bibliografía estudiada.

Tabla 5.99: Bibliografía de los flavanoles en la cereza agria.

Ácido hidroxicinámico	Ferretti et al (2010)	USDA	Chaovanalikit y Wrolstad (2004)
Catequina	X	X	-
Epicatequina	X	X	X

Con el fin de demostrar que la propuesta realizada es la correcta se muestra su espectro de masas en la tabla 5.100.

Tabla 5.100: Espectros de masas de la epicatequina presente en la cereza agria.

Número de identificación	Flavanol	Espectro de masas
1	Catequina	
2	Epicatequina	

En estos dos espectros las señales importantes son las mismas. El ión molecular que se da a m/z 290.9 y el pico a m/z 138.9, producto de la fractura que sufre la molécula por el anillo B (Abad-García et al, 2009).

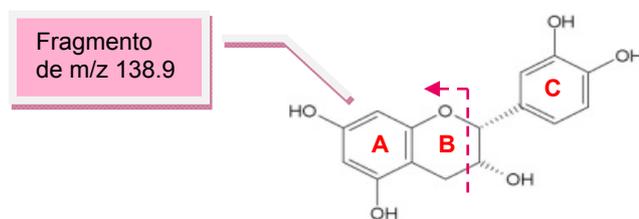


Figura 5.39: Estructura de la epicatequina

➤ La vitamina C en la cereza

El ácido ascórbico presenta un perfil cromatográfico de absorción a una longitud de onda de 243 nm, como se puede apreciar en la figura 5.40.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

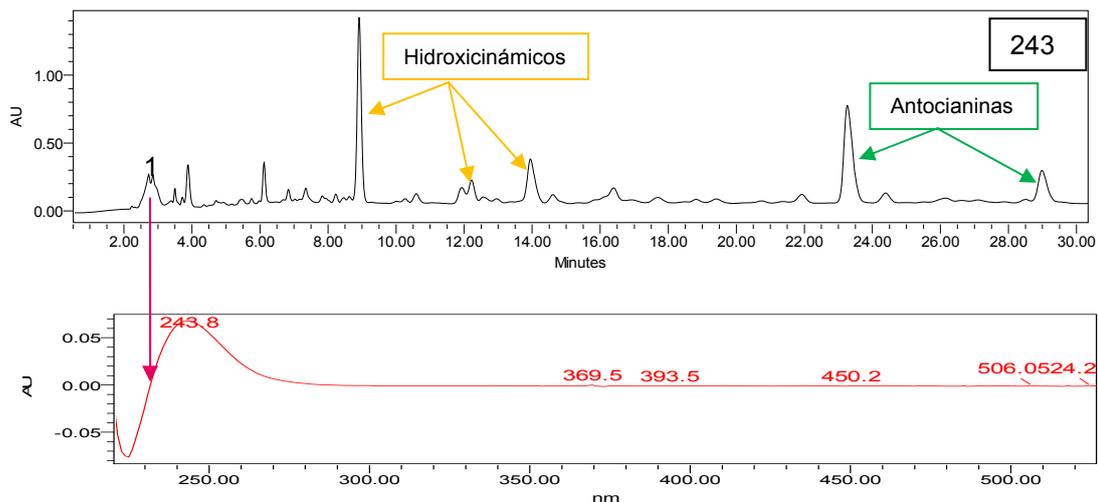


Figura 5.40: Perfil cromatográfico del ácido ascórbico presente en la cereza agria relacionado con su espectro de absorbancia.

El tiempo de retención del ácido ascórbico presente en la cereza bajo las condiciones de análisis explicadas anteriormente se muestra en la tabla 5.101.

Tabla 5.101: Identificación del ácido ascórbico.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación
1	2,859	Ácido ascórbico

Según Ferretti et al (2010), la cereza agria presenta una concentración de ácido ascórbico de 10mg/100g de producto.

En la tabla 5.102 se muestra el espectro del ácido ascórbico presente en este tipo de cerezas.

Tabla 5.102: Espectro del ácido ascórbico presente en la cereza agria.

Número de identificación	Identificación	Espectro de masas
1	Ácido ascórbico	

Mediante comparación con el patrón explicado anteriormente, los picos importantes de este espectro y que merece la pena explicar son dos. El primero y más importante es el debido a su M+1 (m/z 176.87) y el segundo más importante es el resultado de perder dos moléculas de agua (140.67). Es importante decir que como consecuencia de la poca concentración que debe haber de ácido ascórbico en la cereza y por lo tanto la tan escasa señal producida por este ácido junto a los compuestos que tienen una fragmentación parecida a la de dicho compuesto y que además salen al mismo tiempo, pues este espectro se obtiene muy contaminado.

2.5.- Uva tinta (*Black grape; Vitis vinifera L.*)

La muestra analizada se trata de un zumo concentrado de esta fruta procedente de la empresa J.García Carrión. La muestra es analizada en el laboratorio del edificio de Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Edificio I+D+I (SAIT). Anteriormente a su análisis esta muestra se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

➤ Antocianos presentes en la uva tinta

Los antocianos presentes en la uva tinta se identifican con el detector de fotiododos (PDA) a una absorbancia de 520 nm, lo cual se puede ver en la figura 5.41. El resultado obtenido con el PDA se comprueba con la bibliografía y posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada antociano.

La propuesta de identificación de los antocianos en las frutas rojas se ha realizado mediante la comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía.

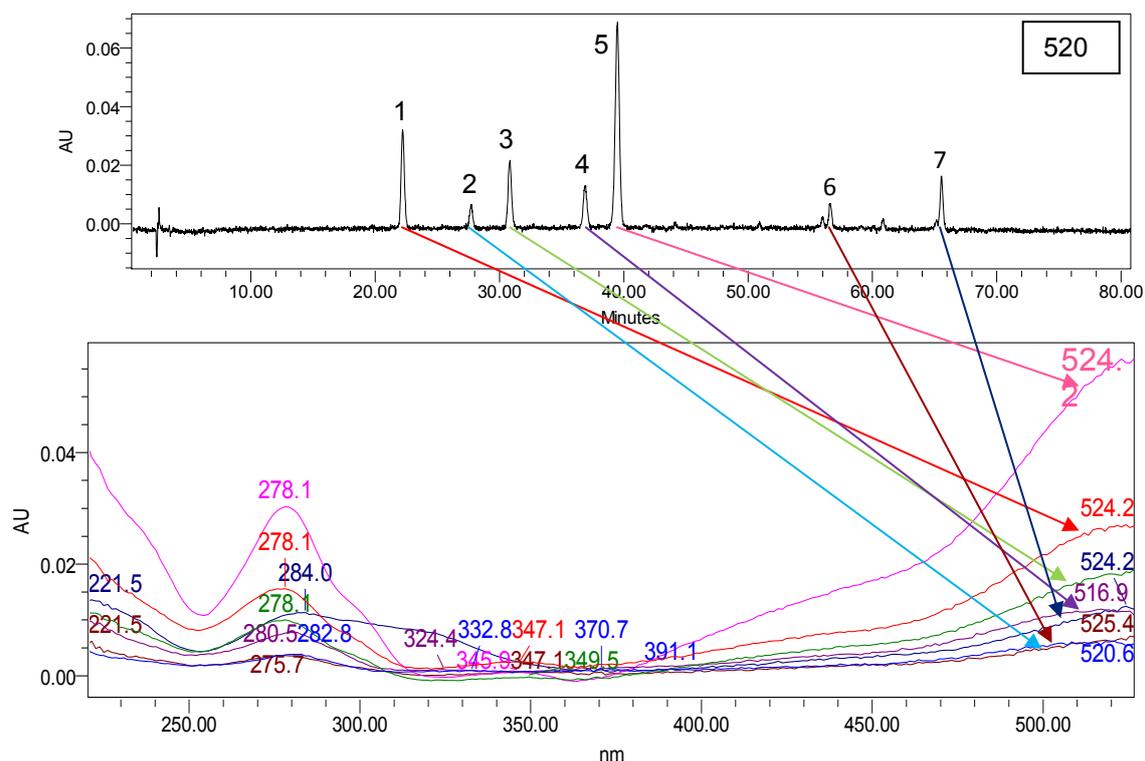


Figura 5.41: Perfil cromatográfico de los antocianos presentes en la uva tinta relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia.

Seguidamente en la tabla 5.103 se plantea la propuesta de identificación de los antocianos presentes en la uva tinta.

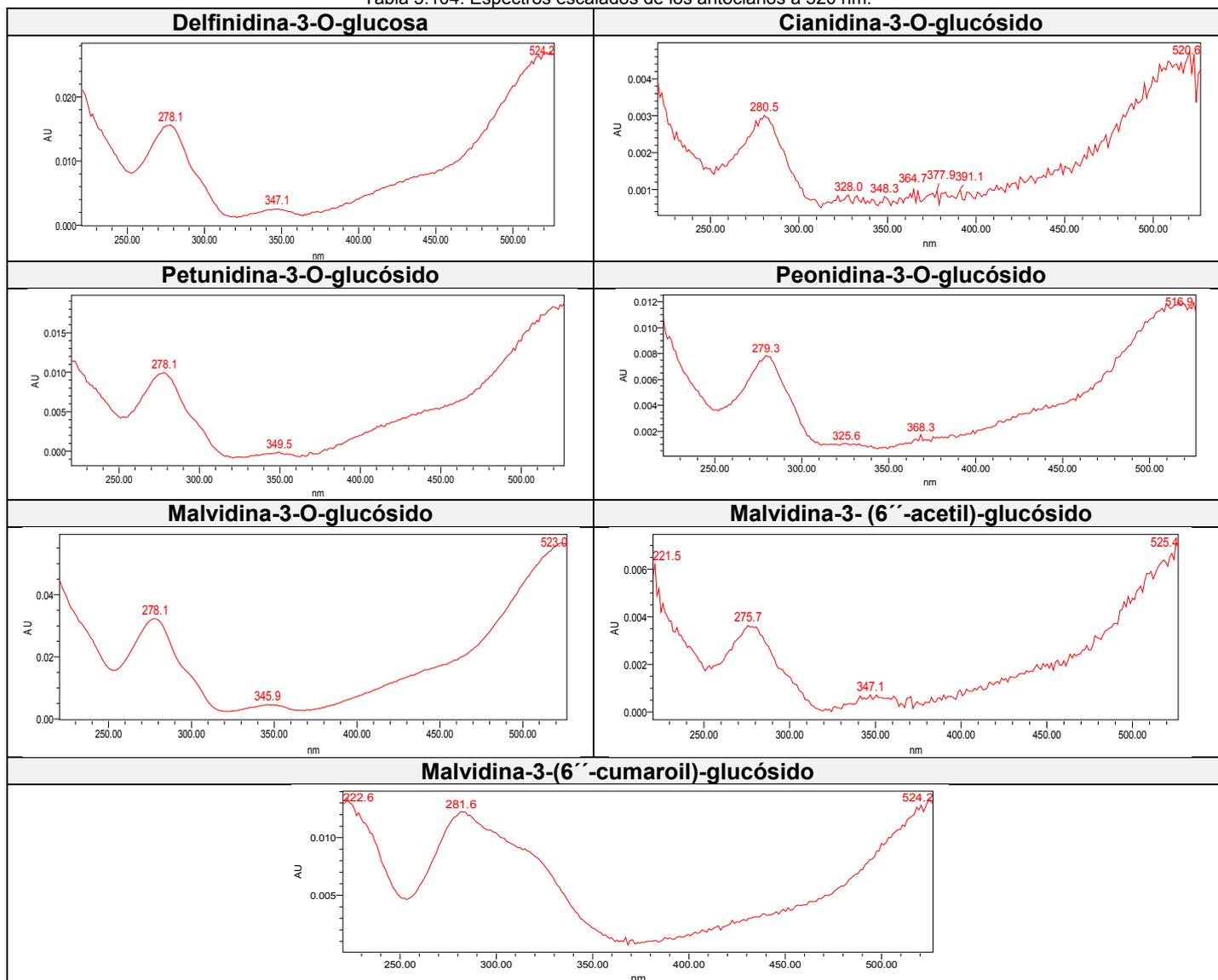
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.103: Propuesta de identificación de los antocianos presentes en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los antocianos
1	21,960	Delfinidina-3-O-glucosa
2	27,390	Cianidina-3-O-glucósido
3	30,592	Petunidina-3-O-glucósido
4	36,645	Peonidina-3-O-glucósido.
5	39,241	Malvidina-3-O-glucósido
6	56,243	Malvidina-3-(6-acetil)-glucósido
7	65,559	Malvidina-3-(6-cumaroil)-glucósido

Con objetivo de comparar la forma de los distintos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.104 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbancia a 520 nm.

Tabla 5.104: Espectros escalados de los antocianos a 520 nm.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Al no tener patrones de los antocianos, la propuesta de identificación de cada antociano se ha realizado mediante una comparación con los datos de la bibliografía. Esto queda expuesto en la tabla 5.105.

Tabla 5.105: Bibliografía para los antocianos en la uva tinta.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Wu y Prior (2005)	Phenol explorer	Goiffon et al. (1999)
1	Delfinidina-3-O-glucósido	X	X	X
2	Cianidina-3-O-glucósido	X	X	X
3	Petunidina-3-O-glucósido	X	X	X
4	Peonidina-3-O-glucósido	X	X	X
5	Malvidina -3-O-glucósido	X	X	X
6	Delfinidina 3-cumaroilglucósido	X	-	-
7	Malvidina-3-(6''-acetil)-glucósido	X	X	-
8	Cianidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	X	X	-
9	Petunidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	X	X	-
10	Peonidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	X		-
11	Malvidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	X	X	-
12	Cianidina	-	X	-
13	Delfinidina	-	X	-
14	Delfinidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	-	X	-
15	Delfinidina -3-(6''-acetil)-glucósido	-	X	-
16	Malvidina	-	X	-
17	Peonidina	-	X	-
18	Petunidina	-	X	-
19	Pelargonidina	-	X	-

Para corroborar dicha propuesta se trabaja con espectrometría de masas. En la tabla 5.106 se presentan los datos referentes a los antocianos identificados en esta fruta.

Tabla 5.106: Espectros de masas de los antocianos identificados en la uva tinta.

Número de identificación	Identificación de los antocianos	Espectro de masas
1	Delfinidina-3- O-glucosa	<p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 200000) versus m/z (0 to 1000.00). Key peaks are labeled: 60.36, 83.24, 101.20, 129.06, 146.29, 303.23, and 465.26.</p>

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

2	Cianidina-3-O-glucósido	
3	Petunidina-3-O-glucósido	
4	Peonidina-3-O-glucósido.	
5	Malvidina-3-O-glucósido	
6	Malvidina-3-(6''-acetil)-glucósido	
7	Malvidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	

En cuanto a la explicación de los respectivos espectros, se pueden hacer varias subdivisiones en función del grupo flavonoide principal: Se tienen así varios grupos: las delphinidinas (Df) y las cianidinas (Ci), Malvidinas (Mv), Petunidinas (Pt) y las peonidinas (Pn).

- La Delphinidina-3- O-glucósido presenta dos picos importantes. El primero se corresponde con el M+1 del la estructura principal flavonoide (303.2) y el segundo (465.2) es debido a la glicosilación de la delphinidina (Valls et al, 2009).
- En el espectro de la Cianidina-3-O-glucósido se ven dos señales fundamentales. La primera, con una relación m/z de 287.13, debida a la estructura de la cianidina y la segunda (m/z 449.14) producto de su glicosilación (Valls et al, 2009).
- La Petunidina-3- O-glucósido dos señales características. La primera, producto de la relación m/z de la estructura principal este flavonoide (317.1) y la segunda (479.3) es debida a la glicosilación del petunidina (Valls et al, 2009).

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- El espectro de la Peonidina-3-O-glucósido ofrece dos señales principales. La primera se corresponde con la M+1 del peonidin obteniéndose así el pico a la relación m/z 301.16 y la segunda señal es fruto de la glicosilación del flavonoide, generándose así un pico a m/z 463.26 (Valls et al, 2009).
- Por último hay que hablar del grupo de las malvidinas en el que se encuentran las tres malvidinas encontradas: malvidina-3-O-glucósido, la Malvidina-3-(6''-acetil)-glucósido y la Malvidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido. Cada una de ellas presenta dos picos característicos teniendo el primero en común (m/z 331). La segunda señal obtenida en cada caso se debe a las respectivas glicosilaciones de la malvidina, de este modo para la primera malvidina encontrada se obtiene una señal de relación m/z 493.24 (Valls et al, 2009), para la segunda malvidina la señal de m/z 535.3 (Valls et al, 2009) y por último, para la tercera malvidina la señal de m/z 638.9 (Valls et al, 2009).

➤ Flavonoles presentes en la uva tinta

Para identificar los flavonoles presentes en la uva tinta se estudia el cromatograma obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) a una absorbancia de 360 nm, el resultado obtenido se comprueba con la bibliografía y con los patrones analizados en el departamento, posteriormente se corrobora dicha identificación con el espectro de masas obtenido para cada flavonol.

En la figura 5.42 se muestra el perfil de los flavonoles presentes en esta fruta relacionado con los espectros de absorbancia originados por cada uno de ellos.

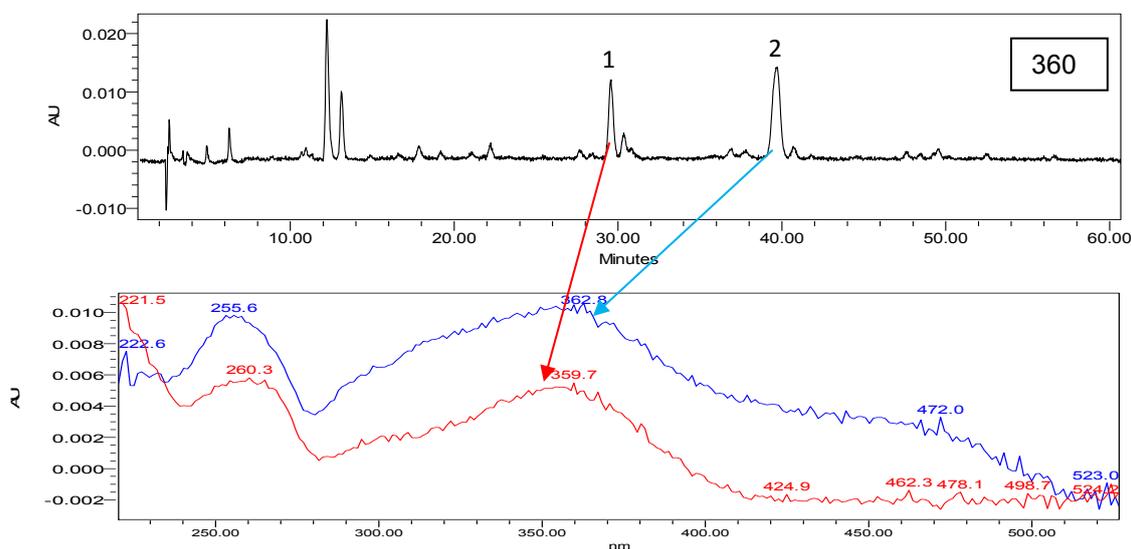


Figura 5.42: Perfil de los flavonoles presentes en la uva tinta relacionado con sus respectivos espectros de absorbancia

En la tabla 5.107 se expone la propuesta de identificación de los flavonoles presentes en la uva tinta, para la identificación se atiende al tiempo de retención.

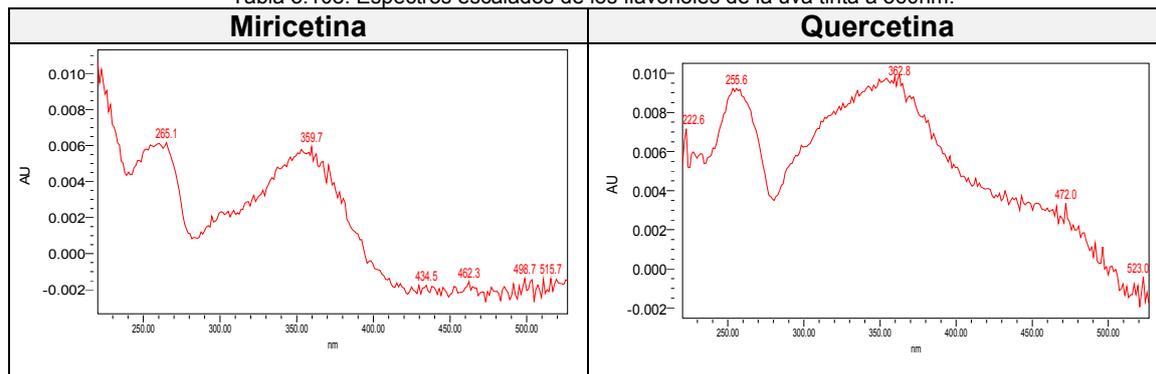
Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.107: Propuesta de identificación de los flavonoles presentes en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavonoles
1	29,574	Miricetina
2	39,604	Quercetina

A fin de comparar la forma de los distintos espectros de absorbanza obtenidos, se adjunta la tabla 5.108 en la que se muestran los espectros escalados presentando la misma absorbanza a 360 nm.

Tabla 5.108: Espectros escalados de los flavonoles de la uva tinta a 360nm.



La bibliografía estudiada identifica en la uva tinta los flavonoles mostrados en la tabla 5.109.

Tabla 5.109: Bibliografía para los flavonoles en la uva tinta.

Flavonoles	Downey, Rochfort (2008)	Phenol explorer	Xia, Gui-Fang Deng, et al (2010)
Miricetina	-	X	X
Quercetina	-	X	X
Miricetina-3-glucósido	X	-	-
Quercetina-3-galactósido		X	-
Quercetina-3-O-glucurónide	X	X	X
Quercetina-3-glucósido	X	-	-
Laricitrin-3-O-galactósido	X	-	-
Kaempferol		-	X
Kaempferol-3-O-glucósido	X	-	-
Laricitrin-3-O-rhamnosa-7-O-ácido trihidroxicinámico	X	-	-
Kaempferol-3-O-cafeoilato	X	-	-
Isorhamnetina-3-O-glucósido	X	-	-
Siringetin-3-O-galactósido	X	-	-

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Para verificar dicha propuesta se recurre a la espectrometría de masas, la cual se muestra en la tabla 5.110. Atendiendo al tiempo de retención obtenido en masas y por comparación con el tiempo de retención obtenido en el PDA se quedan identificados dichos compuestos.

Tabla 3.110: Espectros de masas de los flavonoles presentes en la uva tinta.

Número de identificación	Identificación de los flavonoles	Espectro de masas
1	Miricetina	
2	Quercetina	

El espectro de la miricetina presenta un pico importante a una relación de m/z 319 correspondiente a su ión molecular (Lin and Harnly, 2007).

En el espectro de la quercetina la señal fundamental es la debida a su ión molecular (m/z 303.2) (Lin and Harnly, 2007).

➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta

El perfil cromatográfico de absorción para los ácidos hidroxicinámicos se identifica a una absorbancia de 320 nm. Esto se presenta en la figura 5.43, en la que se puede ver el perfil del ácido hidroxicinámico presente en la uva tinta relacionado con su espectro de absorbancia.

La propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos se realizó teniendo en cuenta fundamentalmente su espectros en ultravioleta visible y su espectros en masas.

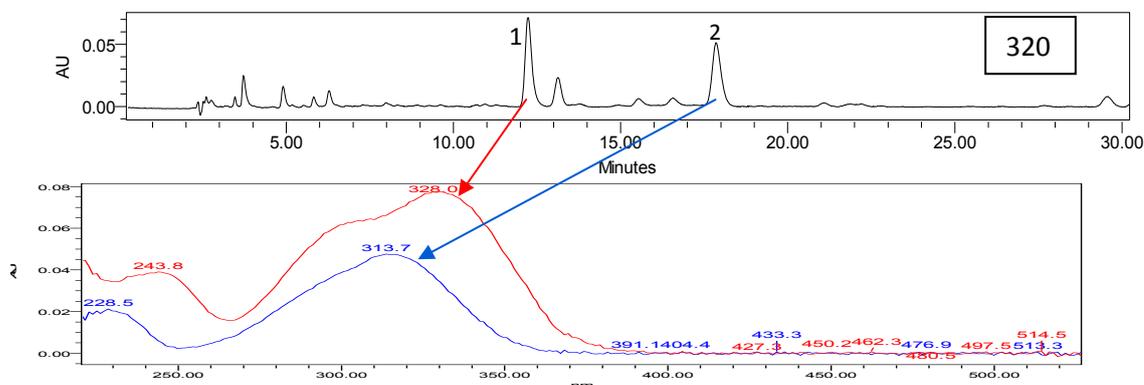


Figura 5.43: Perfil cromatográfico de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta relacionados con sus respectivos espectros de absorbancia.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

La propuesta realizada para estos ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta se ofrece en la tabla 5.111.

Tabla 5.111: Propuesta de identificación de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los ácidos hidroxicinámicos
1	12,230	Ácido caftárico
2	17.773	Ácido p-cumaroil tartárico

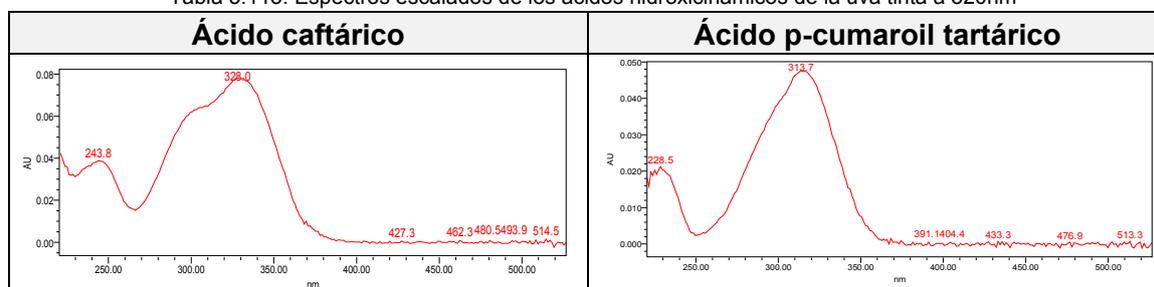
Los hidroxicinámicos identificados por la bibliografía estudiada quedan recogidos en la tabla 5.112.

Tabla 5.112: Bibliografía para los ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta.

Ácido hidroxicinámico	Russell, W. (2009)	Phenol explorer
Ácido caféico	X	-
Ácido p-cumárico	X	-
Ácido ferúlico	X	-
Ácido caffeoil tartárico (caftárico)	-	X
Ácido p-cumaroil tartárico	-	X

A modo de comparar la forma de los dos espectros de absorbancia obtenidos, se adjunta la tabla 5.113 en la que se muestran sendos espectros escalados presentando la misma absorbancia a 320 nm.

Tabla 5.113: Espectros escalados de los ácidos hidroxicinámicos de la uva tinta a 320nm

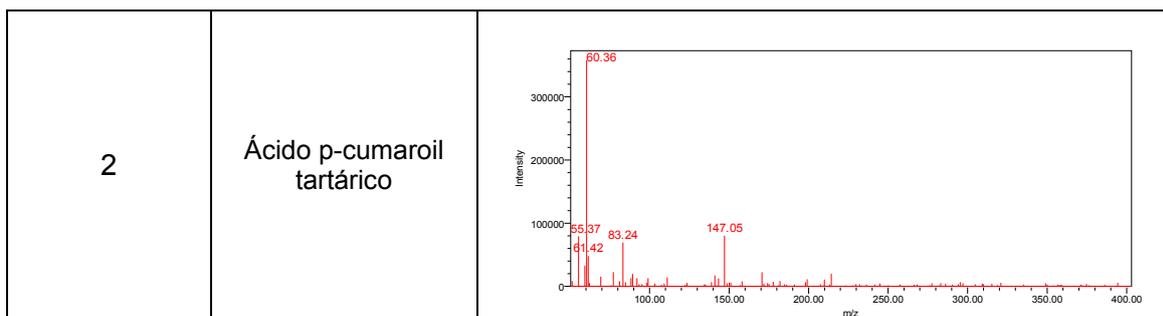


Con el fin de comprobar que la propuesta hecha es cierta se procede a examinar el espectro de masas que se ofrece en la tabla 5.114.

Tabla 5.114: Espectro de masas del ácido caftárico y cumaroil tartárico presentes en la uva tinta.

Número de identificación	Ácido hidroxicinámico	Espectro de masas
1	Ácido caftárico	

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas



En el espectro del caftarico se obtiene un único pico importante cuya m/z es de 163.03, pico característico de los ácidos hidroxicinámicos esterificados. Éste es un ácido hidroxicinámico esterificado, según la bibliografía (Abad-García et al., 2009), el primer fragmento que se pierde es la parte alcohólica para obtener el ácido hidroxicinámico deshidratado (pico a 163.03).

El segundo espectro de masas de lás ácidos hidroxicinámicos corresponde al ácido p-cumaroil tartárico (C₁₃H₁₂O₈). En este espectro se obtiene una señal significativa y es la debida a la pérdida de la parte alcohólica del éster (147.05). Se puede ver que su espectro del UV Visible es similar al del ácido p-cumárico, la principal diferencia que hay entre ambos compuestos es el tiempo de retención al que salen. Esta diferencia se aprecia bien en los espectros de la tabla 5.115 y en la figura 5.44 queda reflejada la diferencia estructural entre ambos compuestos.

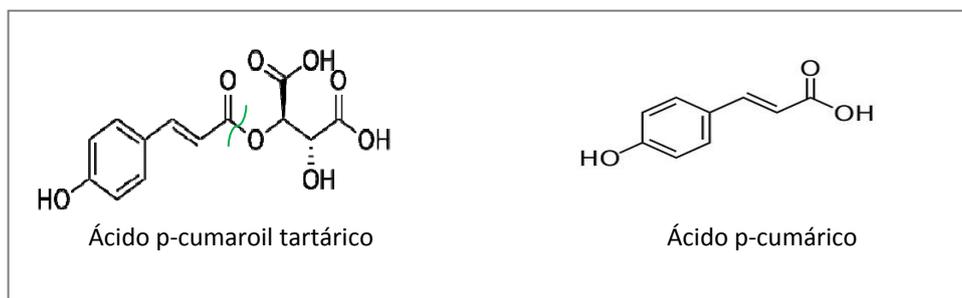
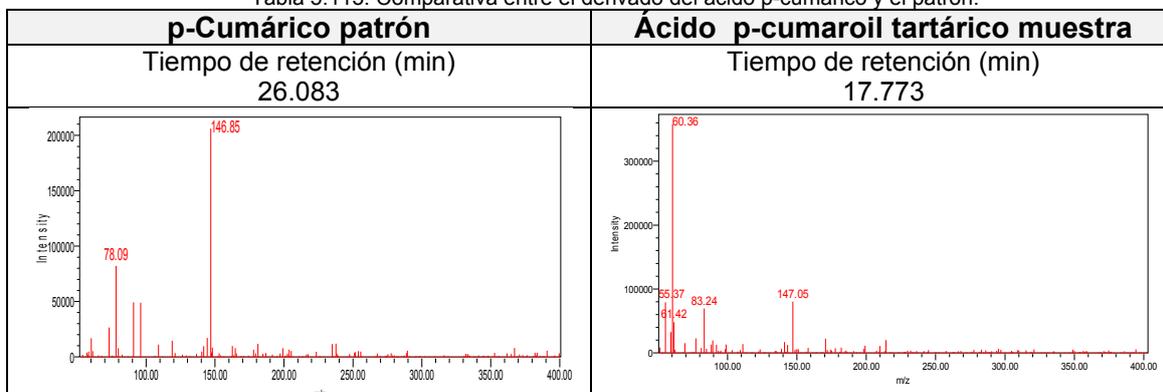


Figura 5.44: Diferencia estructural entre el ácido p-cumaroil tartárico y el ácido cumárico.

Tabla 5.115: Comparativa entre el derivado del ácido p-cumárico y el patrón.



Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

➤ Flavanoles presentes en la uva tinta

El perfil cromatográfico de absorción para los flavanoles se identifica a una absorbancia de 280 nm, tal y como se aprecia en la figura 5.45. La propuesta de identificación del flavanol presente en esta fruta se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían el pico del patrón correspondiente en el cromatograma, a su espectro en ultravioleta visible y a su espectro en masas.

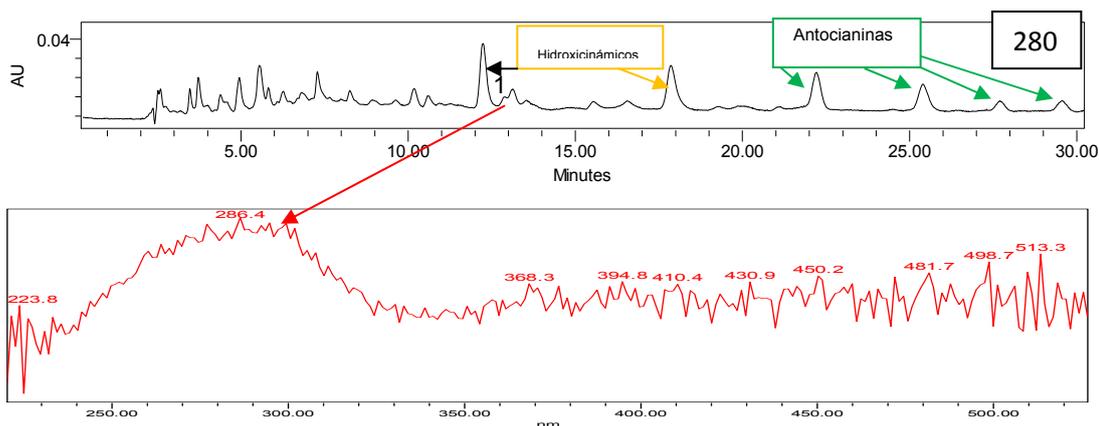


Figura 5.45: Perfil cromatográfico del flavanol presente en la uva tinta relacionado con su espectro de absorbancia.

Al igual que ocurría en las frutas anteriores, este tipo de compuestos es apreciable visualmente en fluorescencia. La propuesta de este flavanol se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecía el pico del patrón en el cromatograma, un poco a su espectro en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masas. Dicha propuesta se plasma en la tabla 5.116.

Tabla 5.116: Propuesta de identificación del flavanol presente en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación de los flavanoles
1	12,596	Catequina

A continuación, en la tabla de 5.117, se muestran los flavanoles identificados por la bibliografía estudiada.

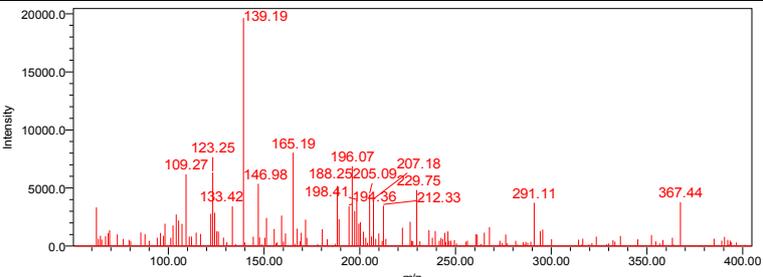
Tabla 5.117: Bibliografía para los flavanoles presentes en la uva tinta.

Flavanoles	Phenol explorer	Goiffon et al. (1999)
Catequina	X	X
Epicatequina	X	-
Galocatequina	X	-
Epigalocatequina	X	-

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Con el fin de demostrar que dicha propuesta es correcta se expone su espectro de masas en la tabla 5.118.

Tabla 5.118: Espectro de masas de la catequina identificada en la uva tinta.

Número de identificación	Flavanol	Espectro de masas
1	Catequina	

La señal más importante que se puede ver en el espectro de la catequina es el pico característico de los flavanoles. Este pico se obtiene a una relación masa/carga 139, se corresponde con una fragmentación muy intensa que sucede en el heterociclo que contiene un hidroxilo en el carbono β al heteroátomo. Otra señal también muy importante y que es necesario mencionar es la debida a su ión molecular, obtenida a una m/z 291.1 (Abad-García et al, 2009).

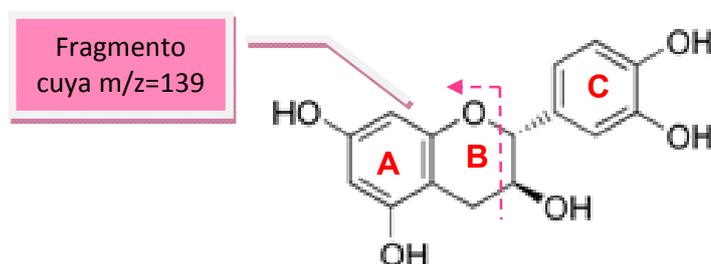


Figura 5.46: Estructura de la catequina

➤ El resveratrol en la uva tinta

El perfil cromatográfico de absorción para el resveratrol se obtiene a una absorbancia de 280 nm, la misma $\lambda_{\text{máxima}}$ a la que se miran los flavanoles. Dicho perfil está expuesto en la figura 5.47, donde se relaciona con su espectro de absorción.

Esta propuesta de identificación se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención del patrón en el cromatograma de absorción, a sus espectros en ultravioleta visible y en masas.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

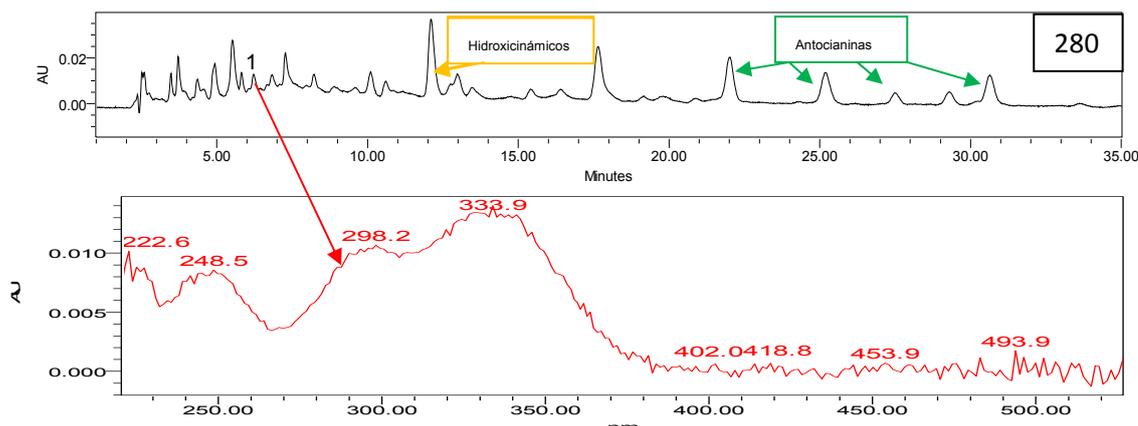


Figura 5.47: Perfil cromatográfico del resveratrol encontrado en la uva tinta relacionado con su espectro de absorbancia.

Como se puede ver el resveratrol, al igual que ocurría con la catequina, es prácticamente inapreciable en UV Visible, para verlo bien es necesaria la técnica de fluorescencia. La propuesta de la presencia de resveratrol en la uva tinta se realizó fundamentalmente teniendo en cuenta el tiempo de retención al que salía el pico del patrón en el cromatograma durante su análisis, un poco a sus espectros en ultravioleta visible y sobre todo por su espectro de masa. Esta propuesta se recoge en la tabla 5.119.

Tabla 5.119: Propuesta de identificación del estilbeno en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación del estilbeno
1	6.475	Resveratrol glicosilado

En cuanto a la bibliografía estudiada para el resveratrol, mostrada en la tabla 5.120, Rimando et al (2004), se identifica para tres tipos de vitis vinífera L.

Tabla 5.120: Bibliografía para el resveratrol en la uva tinta.

Tipos de Vitis vinífera L. según cultivos	resveratrol (ng/g muestra seca)
Cabernet	2475
Pinot Noir	5746
Merlot	6356

El phenol explorer expone que en la uva tinta se identifica el resveratrol y su glicosilado (piceido).

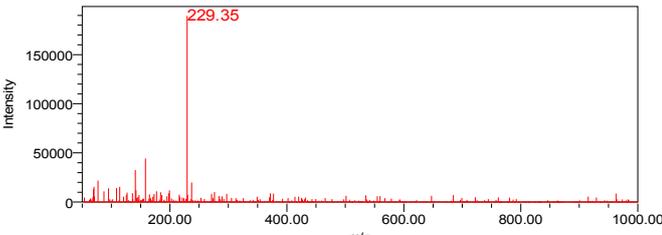
Según Trela y Waterhouse, a pesar de que se dan tanto la forma cis como la forma trans del resveratrol, en la uva tinta solamente se ha visto el trans-resveratrol. Actualmente se comercializa un fármaco (revidox) que está constituido por el trans resveratrol. Para conseguir dicha concentración de trans resveratrol, se irradia, en condiciones de pH bajos (aproximadamente pH=1) una disolución del isómero cis-resveratrol con luz UV durante unas horas (22.8horas). En estas condiciones, se

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

obtiene una conversión de trans resveratrol del 95% y se minimiza la conversión del trans en cis resveratrol.

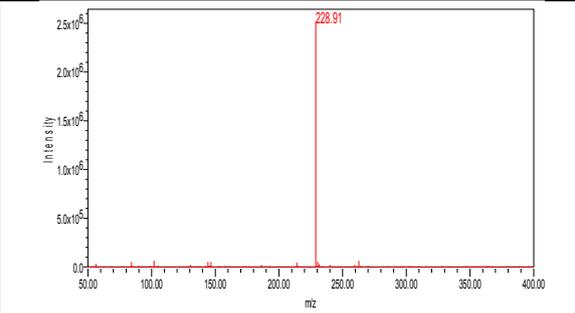
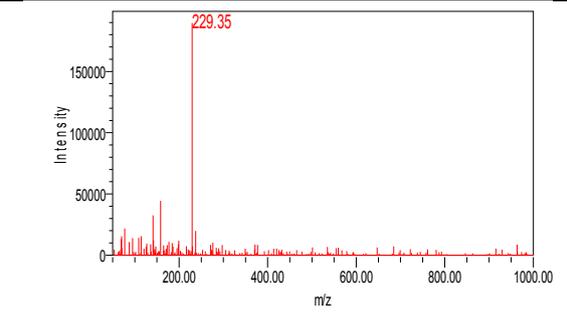
Para continuar, en la tabla 5.121 se muestra el espectro de masas del resveratrol glicosilado (piceido).

Tabla 5.121: Espectro de masas del estilbeno identificado en la uva tinta.

Número de identificación	Identificación del estilbeno	Espectro de masas
1	Resveratrol glicosilado	

Como se puede ver en este espectro hay un único pico (m/z 229.3) que es el que se corresponde con el peso molecular más uno de la estructura del resveratrol, pero hay que decir que el tiempo de retención que se ha obtenido dista mucho del obtenido por el patrón, lo que lleva a la conclusión de que el que el compuesto identificado no es el resveratrol propiamente dicho sino un glicosilado de dicho compuesto y por motivo de una hidrólisis muy rápida el azúcar no aparece en el espectro. En la tabla 5.122 se puede ver la diferencia de los tiempos de retención.

Tabla 5.122: Comparativa entre el estilbeno hallado en la uva tinta y el patrón.

Resveratrol patrón	Resveratrol glicosilado muestra
Tiempo retención (min) 53,170	Tiempo retención (min) 6,475
	

➤ La vitamina C en la uva tinta

La vitamina C o lo que es lo mismo el ácido ascórbico presenta un perfil cromatográfico de absorción a una longitud de onda de 243 nm, el cual se presenta en la figura 5.48.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

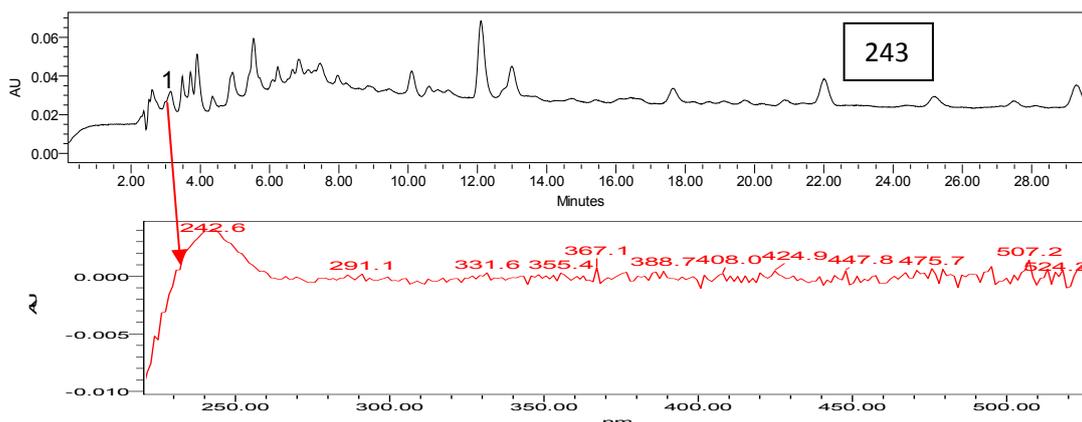


Figura 5.48: Perfil cromatográfico del ácido ascórbico presente en la uva tinta relacionado con su espectro de absorbancia.

A continuación, en la tabla 5.123, se muestra el tiempo de retención del ácido ascórbico presente en esta fruta en las condiciones de análisis explicadas anteriormente.

Tabla 5.123: Identificación del ácido ascórbico en la uva tinta.

Número de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificación
1	2,897	Ácido ascórbico

Según la bibliografía, www.consumer.es; Yim Tong Szeto, Brian Tomlinson and Iris F. F. Benzi. (2002) y Phenol explorer la uva tinta o bien presenta un rango de concentración de ácido ascórbico tan bajo que no lo mencionan o bien es que la uva tinta carece de dicho ácido. En este trabajo se ha demostrado que hay una muy pequeña cantidad de ácido ascórbico en esta fruta, para constatar la presencia de la vitamina C en la uva tinta se recurre a la espectrometría de masas que se expone en la tabla 5.124.

Tabla 5.124: Espectro de masas del ácido ascórbico en la uva tinta.

Número de identificación	Identificación	Espectro de masas
1	Ácido ascórbico	

Por comparación con el patrón explicado anteriormente, en este espectro hay que destacar la señal obtenida a la relación m/z 177.1 generada por el ión molecular. En cualquier caso, la concentración de vitamina C es baja y el espectro de masas está muy contaminado por la presencia de otros compuestos que eluyen a tiempos de retención muy similares.

3.- Resumen de los polifenoles identificados en estas cinco frutas

3.1.- Antocianos identificados

La propuesta de identificación de antocianos en las frutas rojas se ha realizado fundamentalmente mediante comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía disponible.

La Tabla 5.125 presenta el conjunto de todos los antocianos identificados (20 en total) en cada una de las frutas rojas analizadas.

Mirtilo: se identificaron un total de catorce antocianos de los cuales cinco son los más característicos: Delfinidina-3-galactosido, Delfinidina-3-glucosido, Cianidina-3-glucosido, Petunidina-3-glucosido y Malvidina-3-glucosido.

Arándano europeo: se identificaron tres antocianos, siendo el más característico el Cianidina-3-galactosido. En el caso de ir acompañado este fruto con el mirtilo, su perfil cromatográfico se obtendría enmascarado con este último, lo cuál deberá tenerse en cuenta al analizar las mezclas de ambas frutas.

Grosella negra: se identificaron cinco antocianos de los cuales dos son los característicos: Delfinidina-3-rutinosido y Cianidina-3-rutinosido.

Cereza: se identificaron dos antocianos. El más característico es el Cianidina-3-glucosil rutinosido.

Uva tinta: se identificaron cinco antocianos de los cuáles tres son los más característicos: Malvidina-3-glucosido, Malvidina-3-(6''-acetil)-glucósido y la Malvidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido.

Tabla 5.125: Tabla resumen de los antocianos encontrados en las cinco frutas rojas estudiadas.

Propuesta de identificación	Tiempo de retención (minutos)	Mirtilo (Blueberry)	Arándano europeo (Cranberry)	Grosella negra (Blackcurrant)	Cereza agria (Sour cherry)	Uva tinta (Black grape)
Delfinidina-3-o-galactósido	21,054	X				
Delfinidina-3-o-glucósido	22.374	X		X		X
Delfinidina-3-o-rutinósido	22,827			X		
Cianidina-3-o-glucosil-rutinósido	23,322				X	
Cianidina-3-o-galactósido	26,132	X	X			
Delfinidina-3-o-arabinósido	26,918	X				
Cianidina-3-o-glucósido	28,439	X	X	X		X

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Cianidina-3-o-rutinósido	28,741			X	X	
Petunidina-3-o-galactósido	29,326	X				
Petunidina-3-o-glucósido	31,304	X				X
Delfinidina	32,248			X		
Cianidina-3-o-arabinósido	32,452		X			
Peonidina-3-o-galactósido	34,854	X				
Petunidina-3-o-arabinósido	35,994	X				
Peonidina-3-o-glucósido	37,423	X				X
Malvidina-3-o-galactósido	37,746	X				
Malvidina-3-o-glucósido	39,933	X				X
Malvidina-3-o-arabinósido	44,270	X				
Malvidina-3-(6''-acetil)-glucósido	56,423					X
Malvidina-3-(6''-cumaroil)-glucósido	65,559					X

3.2.- Flavonoles identificados

La propuesta de identificación de flavonoles en las frutas rojas se ha realizado fundamentalmente mediante comparación de los datos obtenidos con los de la bibliografía disponible.

La Tabla 5.126 presenta el conjunto de todos los flavonoles identificados (11 en total) en cada una de las frutas rojas analizadas:

Mirtilo: se identificaron un total de cuatro flavonoles, siendo dos los más característicos: Quercetina-3-o-galactósido y Quercetina glucurónico.

Arándano europeo: se encontraron cuatro pero se pudieron identificar solamente dos flavonoles, siendo el más característico la Quercetina-3-o-rhamnósido.

Grosella negra: se identificaron tres flavonoles de los cuales el más característico es: la Miricetina-3-o-rutinósido.

Cereza: se identificaron cuatro flavonoles de los cuales los más característicos son dos: Quercetina-3-o-glucosil-rutinósido y Quercetina-3-o-rutinósido.

Uva tinta: se identificaron los dos flavonoles más característicos de esta fruta: Miricetina y Quercetina.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.126: Tabla resumen de los flavonoles identificados en las cinco frutas rojas estudiadas.

Propuesta de identificación	Tiempo de retención (minutos)	Mirtilo (Blueberry)	Arándano europeo (Cranberry)	Grosella negra (Blackcurrant)	Cereza agria (Sour cherry)	Uva tinta (Black grape)
Quercetina-3-o-glucosil-rutinósido	24,325				X	
Miricetina-3-o-rutinósido	28,294			X		
Miricetina	30,188	X				X
Quercetina-3-o-glucósido	37,417		X	X		
Quercetina-3-o-rutinósido	37,533				X	
Quercetina-3-o-galactósido	39,118	X				
Quercetina	39,326	X		X		X
Quercetina-glucurónico	41,126	X				
Kaemperol-3-o-glucósido	45,794				X	
Quercetina-3-o-rhamnósido	47,347		X			
Isorhamnetina-3-o-glucósido	47,473				X	

3.3.- Ácidos fenólicos identificados

La propuesta de identificación de los ácidos fenólicos en las frutas rojas se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a su espectro en ultravioleta visible.

La Tabla 5.127 muestra los 13 ácidos fenólicos que se han identificado, si bien, se han podido detectar un mayor número de compuestos que todavía faltarían por identificar, el cual es uno de nuestros siguientes objetivos.

Los perfiles de composición de ácidos fenólicos para estas cinco frutas son diferentes y pueden ser utilizados como criterio de autenticidad de cada una de las frutas.

El perfil del arándano europeo es característico y se basa, entre otros componentes, en la presencia de ácido caféico y ácido clorogénico. En el supuesto de una mezcla de arándano y mirtilo, el conocer el contenido en ácido caféico-glucosilado y de ácido caféico de cada fruta sería de gran interés.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

Tabla 5.127: Tabla resumen de los ácidos fenólicos hallados en las cinco frutas rojas estudiadas.

Propuesta de identificación	Tiempo de retención (minutos)	Mirtilo (Blueberry)	Arándano europeo (Cranberry)	Grosella negra (Blackcurrant)	Cereza agria (Sour cherry)	Uva tinta (Black grape)
Ácido gálico	4,426	X	X	X	X	
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	8,033	X	X		X	
Neoclorogénico	9,205			X	X	
Ácido-4-hidroxibenzóico-4-glicósido	10,614	X		X		
Ácido p-Cumaroil quínico	12,180			X	X	
Ácido caftárico	12,230					X
Ácido caféico-3-glicósido	12,670	X				
Clorogénico	14,007	X	X		X	
Caféico	15,608		X		X	
Ácido ferúlico-4-glicósido	16,948			X		
Ácido p-cumárico	26,301		X			
Ácido cinámico	62,347		X			

3.4.- Flavanoles, estilbenos y ácido ascórbico identificados

La identificación de estos compuestos en las frutas rojas se llevó a cabo principalmente considerando el tiempo de retención en el que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas y a su espectro en ultravioleta visible.

En la tabla 5.128 se recogen los cuatro compuestos identificados para las diferentes frutas.

Tabla 5.128: Tabla resumen de los flavanoles, estilbenos y del ácido ascórbico identificados en las cinco frutas estudiadas.

Propuesta de identificación	Tiempo de retención (minutos)	Mirtilo (Blueberry)	Arándano europeo (Cranberry)	Grosella negra (Blackcurrant)	Cereza agria (Sour cherry)	Uva tinta (Black grape)
Catequina	12,444	X	X	X		X
Epicatequina	19,486		X	X	X	
Resveratrol glicosilado	6,542	X	X			X
Ácido ascórbico	2,933	X	X	X	X	X

CAPÍTULO 6.-CONCLUSIONES

1.- CONCLUSIONES

En base a los resultados conseguidos hasta el momento y del análisis de la información recogida en la presente memoria se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La utilización de este método mejorado del método analítico por HPLC IFU nº 71 de análisis de antocianos variando el gradiente de elución, y que está implementado con el uso simultáneo de dos detectores: el habitual de fotodiodos y un segundo detector de masas ayuda en la detección de los polifenoles presentes en los zumos.
2. La espectrometría de masas es una técnica muy apropiada para la identificación llevada a cabo en este proyecto, consiguiéndose una confirmación de los compuestos identificados previamente con PDA, además, posibilita la identificación de aquellos compuestos que no se aprecian bien con el detector de fotodiodos. Esto permite obtener una huella dactilar más precisa de los zumos de frutas pudiéndose, de este modo, detectar las posibles adulteraciones puedan producirse en éstos durante su comercialización.
3. Debe tenerse en consideración que aquellos compuestos cuyo peso molecular es muy bajo van a poder aparecer enmascarados con las fracciones de los otros compuestos de alto peso molecular que eluyan en tiempos cercanos. Para solventar esta dificultad, se ha estudiado la posibilidad de que aquéllos sufran el menor número de fragmentaciones posibles disminuyendo el voltaje de cono en el detector de masas.
4. El método empleado permite analizar prácticamente todos los polifenoles de las frutas rojas, además de otros compuestos como la vitamina C, es de gran interés para el control de calidad y para conocer la huella dactilar de cada uno de los zumos en su posible etiquetado. Además, esto permitirá identificar y cuantificar los componentes de las frutas rojas que pueden mostrar efectos beneficiosos para la salud de los consumidores.
5. Cada fruta ha mostrado unos perfiles característicos de antocianos, flavonoles, ácidos fenólicos y flavanoles, que sirven como criterio de autenticidad de esa fruta.
6. Con este método se han logrado identificar en los zumos de las cinco frutas rojas estudiadas un total de 48 compuestos, de los cuales 20 son antocianinas, 11 son flavonoles, 13 ácidos fenólicos, 2 flavanoles, un estilbeno y el ácido ascórbico.

CAPÍTULO 7.-BIBLIOGRAFÍA

1.- BIBLIOGRAFÍA

- Abad-García, B.; Berrueta, L.A.; Garmón-Lobato, S.; Gallo,B; Vicente,F; (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruits by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5398-5415.
- Andersen, O.M. (1989) Anthocyanins in fruits of *Vaccinium oxycoccus* L.(small cranberry) *Journal of Food Science*, 54,383-384
- Ara Kirakosyan ; E.M. Seymour; Daniel E. Urcuyo Llanes; Peter B. Kaufman; Steven F. Bolling. (2009) Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products. *Food Chemistry* Vol.115, Issue 1, Páginas:20-25.
- Arango Acosta, G. J.; Dr. Pharm, Sc. (2010) Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido sikímico. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía.
- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca (2007) Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, 1679-1719.
- Bermúdez-Soto, M.J.; Tomás-Barberán, F.A. (2004) Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *EUR.Food Res. Technol.*; 219,133-141.
- Borges, G.; Degeneve, A.; Mullen, W.; Crozier, A. (2010) Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3901-3909.
- Cantos E., E.; Guerrero, R.F.; Puertas, B.; Jiménez, M.J.; Jurado, M.S. (2007) Tratamiento postcosecha de uva de vinificación con radiación UVC para obtención de vinos enriquecidos en resveratrol. *Revista iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, Vol.8, Nº 2, sin mes, 120-120. Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. México.
- Capdevila Grases, Ramón Carlos. Trabajo de cuatro meses: Caracterización y determinación de polifenoles del vino.
- Chaovanalikit, A.y Wrolstad, R.E. (2004) Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 73-83.
- Chen, Hao; Zuo, Yuegang; Deng, Yiwei. (2001) Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913,387–395.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- Cho, M. J; Howard, L.R.; Prior, R. L; Clark, J.R; (2005). Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 85, 2149-2158.
- Chrzanowski, G.; Sempruch, C.; Sprawka, I. Investigation of phenolic acids in leaves of blackcurrant (*ribes nigrum* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.). (2007). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. Vol.10. Issue 4. Topic: Biology.
- Dae-Ok Kim; Ho Jin Heo; Young Jun Kim; Hyun Seuk Yang; Chang Y. Lee. (2005) Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9921–9927.
- De Brito, E. S.; Pessanha de Araújo, M. C.; Lin, Long-Ze; Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry* 105, 1112–1118.
- De Pascual-Teresa, S., Sánchez-Ballesta, M.T.; (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry, Revision*; 7, 281–299.
- Díaz-García, M.C. (2009). Perfil de los compuestos funcionales en zumos de frutas rojas. Trabajo fin de máster en Ingeniería Ambiental y de procesos Químicos y Biotecnológicos
- Díaz-García, M.C.; Obón de Castro, J.M.; Castellar Rodríguez, M.R. Análisis composicional de polifenoles en el zumo de mirtilo (*Vaccinium Myrtillus* L. Wild). *Investigación ETSIA*.
- Downey, M. O.; Rochfort, S. (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201, 43–47.
- Ferretti, G.; Bacchetti, T; Belleggia, A.; Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: From farm to table. *Molecules*, 15, 6993-7005. Review.
- Goiffon, J.P.; Mouly, P.P.; Gaydou, E.M. (1999) Anthocyanin pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 382, 39-50.
- Gómez Caravaca, A.M. (2009) Caracterización de alimentos funcionales mediante metodologías separativas avanzadas y aplicaciones a tecnología de alimentos. Tesis doctoral para optar al título de doctor europeo en química. Facultad de ciencias en la Universidad de Granada.
- Häkkinen, S; Heinonen, M.; Kärenlampi, S; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J; Törrönen, R; (1999). A screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*; 32,345-353.
- Harnly, J. M.; Doherty, Robert F.; BEECHER G.R. ; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Bhagwat, S.; Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9966-9977.
- IFU N° 71, (1998) Anthocyanins.
- Iwashina T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal Research*.113,287-99

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- Jakobek, L. ; Seruga, M; Medvidovic-Kosanovic, M;Novak,I. (2007). Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rindschau*; 103, 369-378.
- Jakobek, L; Seruga, M; Medvidovic-Kosanovic, M;Novak,I. (2007). Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rindschau*; 103, 58-64.
- Kraemer-Schafhalter, A; Fuchs, H; Pfannhauser,W; (1998). *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 78, 435-440.
- Lecerf, J.M. (2006) Functional claims of article 13: Polyphenols in juices and processed fruits and vegetables. References and scientific evidences. Pasteur Institute-AIJN-ADEPALE.
- Lin, Long-Ze; Harnly, James M.; (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55, 1084-1096.
- Lugasi, A.; Hóvári, J.; Sági, K. V.; Bíró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. SYMPOSIUM
- M. Sójka; S. Guyot; K. Kolodziejczyk; B. Król; A. Baron.(2009) Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology. Isafruit Special Issue* 100–106.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jimenez, L.; (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 79, 727- 747.
- Martínez M., A. (2005). Flavonoides. Tesis doctoral en la facultad de química farmacéutica, en la Universidad de Antioquia.
- Martínez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Ros, G.(2000) Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol.50, N°1.
- McKay, Diane L.; PhD; Blumberg, J. B.; PhD. (2007) Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and Cardiovascular. Disease Risk Factors. Special article. *Nutrition Reviews*, Vol. 65, No. 11, 490–502.
- Pedrola, I. E. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid. Trabajo de investigación.
- Rimando, A. M.; Kalt, W.; Magee, J. B.; Dewey, J.; Ballington, J. R. (2004) Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4713-4719.
- Rodrigues Pereira, O. (2009) Estudio estructural y determinación de propiedades antioxidativas de extractos etanólicos de *Thymus citriodorus* y *citisus multiflorus*. Memoria presentada para optar al título de grado en la facultad de farmacia en la Universidad de Salamanca
- Romero Buitrago, E. I. (2010) Introducción de la zumoterapia en centros hospitalarios como complemento nutricional básico al tratamiento de patologías. Trabajo para optar al título de Especialista en Nutrición Clínica. Universidad del Atlántico. Facultad de nutrición y dietética.

Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas

- Russell, W.; Labat, A.; Scobbie, L.; Duncan, G.; Duthie, G. (2009) Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*; 115, 100-104.
- (Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler F. J. Libro: Principios de análisis instrumental. Cap.8, 196-197)
- Stintzing, F.C.; Trichterborn, J.; Carle, R.; (2006) Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*; 94, 296-309.
- Trela, B.C.; Waterhouse, A. L; (1996). Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 44, 1253-1257.
- Valls, J.; Millán, S.; Martí, M.P.; Borrás,E.;Arola,L; (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavonols. Review . *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143-7172. Volume 47(1-4):119-125. *Acta Biologica Szegediensis*.
- Von Staszewski, M. (2011) Impacto de la interacción entre los polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial.
- Wu, Qingli; Wang, Mingfu; E.Simon, J.; (2004). Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *Journal of chromatography B. Review*, 812, 325-355.
- Wu, Xianli ; Prior, Ronald. (2005) Identification and characterization of anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry in common Foods in the United States: Vegetables, Nuts, and Grains. *Journal of agricultural and food chemistry* 53,3101-3113.
- Wu, Xianli ; Prior, Ronald. (2005) Systematic Identification and Characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *Journal of agricultural and food chemistry*; 53, 2589-2599.
- Xia, En-Qin; Deng, Gui-Fang; Guo, Ya-Jun; Li, Hua-Bin. (2010). Biological activities of polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 622-646.
- Yim Tong Szeto; Brian Tomlinson; Iris F. F. Benzie. (2002) Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British Journal of Nutrition*, 87, 55-59.

Direcciones de internet consultadas

www.zonadiet.com/comida/nutricion-frutas.htm
www.alimentacionynutricion.org
www.dietcan.net/docs/POLIFENOLES-MAD.pdf
www.boe.es
www.aijn.org
www.alimentatec.com
www.asozumos.org
healthlibrary.epnet.com
www.codexalimentarius.net
www.consumer.es
www.diariomardeajo.com
www.plantamedicinales.net
www.solociencia.com/quimica/08012602.htm
www.isoflavones.info
www.legiscomex.com/
[www. UPCT . es / ~ sait /](http://www.UPCT.es/~sait/)
[www. fenol - explorador . eu /](http://www.fenol-explorador.eu/)
www.usda.gov/
www.Chromatography-on line.org
<http://milolab.webfactional.com/>