

## **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

### **PROYECTO FIN DE CARRERA**

#### **“ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN SMOOTHIES, ZUMOS Y NÉCTARES DE FRUTAS ROJAS”**

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Grupo QUIMYTEC

Alumna: Alexandra Vicente Castillo

Directores: M. Rosario Castellar Rodríguez

José María Obón de Castro

Septiembre, 2013.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis profesores D. Jose Maria Obón de Castro y Dña. M<sup>o</sup> Rosario Castellar Rodríguez. Gracias por permitirme participar en este proyecto de investigación con el que he aprendido y me he adentrado en el mundo de la tecnología de los alimentos, pero sobre todo gracias por toda la ayuda que me habéis dado para poder llevarlo a cabo.

Doy las gracias también a mi familia y amigos, que siempre están conmigo para celebrar los buenos momentos y ayudar a levantarme en los malos.

A Ángel, por estar siempre conmigo dándome todo el cariño y el apoyo que necesito para seguir adelante.

A mi compañera Miriam, por su ayuda y generosidad, con la cual las horas en el laboratorio se me hacían muy cortas.

## Divulgación de resultados

Los resultados obtenidos como parte de este trabajo de investigación, han sido publicados en las siguientes revistas científicas y conferencias de ámbito internacional:

- **7th International Congress on Pigments in Foods.** Novara, Italy. 18-21 de junio de 2013. "*Anthocyanins and bioactives content in a healthy red fruit drinks.*" Participación: Póster.

Autores: Castellar M.R., Diaz-Garcia M.C., Obón J.M., Vicente-Castillo A.

**ÍNDICE**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. ZUMOS, SMOOTHIES Y NÉCTARES DE FRUTAS ROJAS .....	6
1.1.1. Beneficios de las frutas rojas para la salud .....	11
1.1.2.- Definición y tipos de bebidas de frutas.....	12
1.1.3.- Comercialización de zumos y bebidas de frutas .....	15
1.2.- CONTROL DE CALIDAD Y AUTENTICIDAD DE ZUMOS, NÉCTARES Y SMOOTHIES. ..	17
1.2.1.- Los polifenoles en las frutas .....	18
1.2.2.- Análisis de polifenoles .....	28
1.3.- MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ZUMOS, NÉCTARES Y SMOOTHIES DE FRUTAS ROJAS. ....	30
1.3.1.- Naranja (Orange) .....	31
1.3.2.- Manzana (Apple) .....	32
1.3.3.- Plátano (Banana) .....	33
1.3.4.- Fresa (Strawberry) .....	34
1.3.5.- Grosella negra (Blackcurrant).....	35
1.3.6.- Frambuesa (Raspberry) .....	36
1.3.7- Arándano (Blueberry).....	37
1.3.8.- Mora silvestre (Mulberry) .....	38
1.3.9.- Cereza (Cherry).....	39
1.3.10.- Uva tinta (Purple grape).....	40
CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	42
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1.- MATERIALES .....	44
3.1.1.- Zumos, zumos concentrados y purés de una sola fruta.....	44
3.1.2.- Bebidas multifrutas .....	45
3.1.3.- Productos químicos utilizados.....	48
3.2.- MÉTODOS .....	49
3.2.1 - Optimización del método de extracción de polifenoles.....	49
3.2.2 - Caracterización general de las muestras.....	53
3.2.3 - Análisis de polifenoles. ....	55
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1.- EXTRACCION Y ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN: ZUMOS, ZUMOS CONCENTRADOS Y PURÉS, DE UNA SOLA FRUTA.....	62

4.1.1.- Características de los zumos, zumos concentrados y purés, de una sola fruta. ....	62
4.1.2.- Optimización de la extracción de polifenoles en zumos, zumos concentrados y purés, de una sola fruta. ....	66
4.2.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN BEBIDAS MULTIFRUTA.....	77
4.2.1.- Características de las bebidas multifruta comerciales.....	78
4.2.2.- Determinación de polifenoles totales "TP" en bebidas multifruta comerciales.....	82
4.3.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES TOTALES INDIVIDUALES (TIP) POR UHPLC EN BEBIDAS MULTIFRUTA.....	88
4.3.1.a. Smoothie 3 clarificado por centrifugación .....	90
4.3.1-b. Smoothie 3 extraído en agua-HCl y reextraído en metanol-HCl.....	94
4.3.2.a Zumo 1 clarificado por centrifugación.....	98
4.3.2.b. Zumo 1 extraído en agua-HCl y reextraído en metanol-HCl .....	102
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	107
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA .....	108

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **1.1. ZUMOS, SMOOTHIES Y NÉCTARES DE FRUTAS ROJAS**

Los zumos se pueden considerar como una de las principales fuentes de consumo de frutas y hortalizas en todo el mundo, y principalmente en los países que incluyen en su dieta el consumo de 5 vegetales al día (que son la mayoría de los países europeos): Reino Unido, Alemania, Suecia, Austria, Francia, España, Dinamarca, Polonia, Irlanda, Noruega, Bélgica e Italia.

Uno de los motivos por los que se da un elevado consumo de zumos en todas estas regiones, se debe a que es un producto atractivo para el consumidor que de esta forma ingiere una elevada cantidad de fruta, obteniendo una máxima asimilación y aprovechamiento de las propiedades nutritivas y saludables de la misma.

Recientemente, se han implicado los factores dietéticos como causa y prevención de importantes enfermedades, incluyendo el cáncer, defectos del tubo neural y cataratas. Hay una gran evidencia de que los vegetales y frutas protegen frente a estas enfermedades.

Esta “protección” que ofrecen la fruta y los vegetales frente a la aparición de estas enfermedades y otras se debe a la presencia de compuestos en los zumos que poseen ciertas propiedades beneficiosas para la salud. Estos compuestos son los siguientes:

#### ❖ Antioxidantes naturales

Según una revisión realizada por AZTI-Tecnalia en 1998, (Centro Tecnológico del País Vasco especializado en la investigación Marina y Alimentaria “Pertenece a la Corporación Tecnalia), diversos estudios científicos centrados en el efecto de los *radicales libres* demuestran que éstos pueden ocasionar daños serios sobre las células del organismo, debido a su carácter oxidante, que actúa sobre los lípidos, proteínas y DNA y puede conducir a la lisis celular. La producción de radicales libres es inevitable ya que es el resultado del funcionamiento normal de las células aeróbicas, el organismo se defiende de este efecto nocivo con los sistemas antioxidantes (sistemas enzimáticos, no enzimáticos y coadyuvantes).

Podemos encontrar diversos compuestos antioxidantes presentes principalmente en vegetales y que se ingieren en la dieta. Entre ellos vitaminas C y E, carotenoides, polifenoles, etc.

Los antioxidantes naturales que se ven más involucrados en la prevención de ciertas enfermedades son:

- ✓  $\beta$ -caroteno: es el carotenoide más conocido y el precursor de la vitamina A, actuando como agente antioxidante. Se da una mayor riqueza de este

compuesto en las frutas y vegetales con pigmentos de color naranja, como cítricos, papaya, zanahorias, pimientos, pimentón, etc.

La importancia de este compuesto no radica únicamente en satisfacer las necesidades en vitamina A, sino también en la prevención de enfermedades entre las que se encuentran varios tipos de cánceres. Numerosos estudios evidencian que el  $\beta$ -caroteno también está muy relacionado en la prevención en enfermedades cardiovasculares y con la prevención de cataratas.

- ✓ Vitamina C: También llamada ácido ascórbico, se encuentra principalmente en los cítricos y en otras frutas como las cerezas, fresas y kiwis.

Se ha reconocido que el consumo de cítricos y alimentos ricos en vitamina C está muy asociado a la prevención de varios tipos de cánceres, entre los que se encuentran el de esófago, estómago y cérvix.

La vitamina C favorece además, la absorción del hierro “no hemo” para reducirlo a estado ferroso (forma biodisponible) y a la vez formar un quelato bastante estable. En las frutas, hortalizas, legumbres, etc. el hierro se encuentra en forma “no hemo” que es menos absorbible que la forma hemo de carne y pescado.

- ✓ Licopeno: Se trata de un carotenoide altamente antioxidante presente en el tomate principalmente. Se ha visto que reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
- ✓ Polifenoles: Dentro de este grupo de compuestos se han identificado más de 3.000 moléculas diferentes, productos de metabolismo secundario de los vegetales. Éstos están presentes tanto en las plantas comestibles como en los productos derivados de ellas. Un gran número de publicaciones ponen de manifiesto sus acciones más importantes relacionadas con la prevención de cáncer y de enfermedades cardiovasculares.

#### ❖ Ácido fólico

El ácido fólico o folacina (vitamina B<sub>9</sub>) químicamente es el ácido pteroilmonoglutámico (PGA). La biodisponibilidad de este compuesto en los cítricos hace que estas frutas y sus zumos sean alimentos muy importantes como fuente de esta vitamina.

Este compuesto juega un papel muy importante en el metabolismo como coenzima en el transporte de compuestos carbonados en el metabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos nucleicos. Por ello y debido a que durante el crecimiento se da una mayor síntesis de ácidos nucleicos y formación de proteínas, es en esta etapa cuando se requiere una mayor cantidad de folatos.

El ácido fólico parece tener un papel protector frente a algún tipo de cáncer, ya que una deficiencia en folatos puede dar lugar a una menor reparación en el DNA, produciendo mutaciones y daño en los cromosomas.

También cabe destacar que existe una posible relación entre el ácido fólico y la prevención de enfermedades cardiovasculares.

#### ❖ Fibra dietética

Según un estudio realizado por ASOZUMOS (Asociación Española de fabricantes de zumos) en 1998, actualmente podemos definir la fibra “dietética” o “alimentaria” como el conjunto de polisacáridos que son resistentes a la hidrólisis por los enzimas propios del tubo digestivo del hombre.

La divulgación de las propiedades de la fibra alimentaria al conjunto de la población ha impulsado desde hace unos años hasta la actualidad al incremento del consumo de la misma, ya sea de forma natural en la dieta o como un suplemento añadido.

Estos compuestos no son atacados por el sistema digestivo humano, durante el proceso de digestión en el tubo digestivo, aunque si sufren una hidrólisis parcial al final del aparato digestivo, más concretamente en el ciego.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de la fibra alimentaria, ésta tiene unos efectos fisiológicos que repercuten en una aplicación terapéutica para el ser humano. Entre las numerosas propiedades de la fibra y sus aplicaciones derivadas se encuentran, por ejemplo, la capacidad de retención de agua de la misma, que disminuye el tiempo de tránsito intestinal y aumenta la dilución de agentes carcinógenos. Estos efectos se pueden traducir en una disminución del riesgo de padecer cáncer de colon-recto, estreñimiento y obesidad.

Otros de los efectos fisiológicos que tiene la fibra alimentaria es la estabilización del epitelio colónico, la regulación del equilibrio bacteriano y un aumento de la absorción de sodio y agua (también se ve aumentado el nivel de flatulencia). Estos efectos se traducen en una mejora general de la homeostasis y una disminución del riesgo de padecer cáncer de colon-recto.

La fibra alimentaria está integrada por celulosa, hemicelulosa, lignina y sustancia pécticas. Este tipo de fibra se encuentra en los alimentos de origen vegetal como son las verduras, las frutas, las legumbres y los cereales y sus derivados, entre ellos en los **zumos**.

### Evolución en la elaboración de zumos de fruta

Según el estudio realizado por la Asociación Española de Fabricantes de Zumos ASOZUMOS “*Zumos y Néctares. La fruta líquida*” (2012): En España, el impulso de la industria de derivados vegetales se produce entre 1890 y la I Guerra Mundial (1914), Sin embargo, por entonces, los mecanismos que activaban su desarrollo eran muy débiles, puesto que la demanda interna se mostraba aún escasa como consecuencia del bajo poder adquisitivo de los consumidores.

La industria de los zumos en nuestro país inicialmente es un apéndice de la industria de las conservas vegetales y tiene su origen inmediato en las fábricas de pulpas de frutas y aprovechamiento de aceites esenciales y cortezas de cítricos que se instalaron en Murcia y Valencia a finales del XIX y principios del siglo XX, que utilizaban la cocción al vapor y el envasado en lata.

Este inicio de la elaboración de zumos en España, corresponde con el que se denomina hoy en día, método tradicional de elaboración de zumos. Éste se sigue conservando en la actualidad en la elaboración de zumo ecológico y se basa fundamentalmente en la selección de materias primas, obtención del zumo, rápido proceso de pasteurización colocando el zumo en un depósito cerrado con agua a una temperatura no superior a 60°C, y envasado en caliente (hoy en día, generalmente en botellas de vidrio transparente).

El proceso de industrialización de elaboración de zumos en España, se vio muy impulsado por 2 procesos: Uno de ellos se debió a la presencia desde 1963 de los nuevos envases de cartón que, tras los primeros diseños en forma de tetraedro que, se comercializaron en nuestro país desde 1960 para envasar la leche, dieron lugar a los envases Tetra Brik para zumos en su forma actual.

El otro hito importante fue la irrupción de la marca Tropicana en Europa a partir de 1968. Ésta empieza a vender zumo directo envasado en botellas de vidrio con tapa *twist-off*, lo que rápidamente imitan algunas empresas españolas, que también proporcionan el zumo a granel pasteurizado y refrigerado a los mercados francés y alemán. Durante esta década se industrializan anualmente unas 120-200.000 toneladas de naranjas.

A partir de los años ochenta el mercado de los zumos comienza a experimentar una verdadera transformación, produciéndose incrementos de consumo del orden del 15 y hasta del 20% anual. A partir de este punto, con la llegada de multinacionales alimentarias y la entrada al sector de zumos de grandes empresas nacionales (Grupo Leche Pascual), arrasan con el modelo tradicional de elaboración de zumos del levante español, dirigiendo su objetivo a una mayor industrialización que optimice al máximo la elaboración de estos productos.

Paralelo a la comercialización de zumos se han elaborado y comercializado los néctares, que llevan en su composición un porcentaje de zumo, en torno a un 50% y el resto lo componen agua, saborizantes, azúcares, etc.; en ocasiones se presentan como bebidas de fruta enriquecidas en vitaminas. Su consumo está bastante extendido aunque su composición no sea 100% vegetal.

### Smoothies. Origen y descripción

En cuanto a los **smoothies**, cabe destacar que son elaborados a partir de puré de fruta, incluyendo en su elaboración toda la fruta íntegra, es por lo que también son llamados batidos de frutas, pueden prepararse también con verduras o la combinación de ambas.

Pueden tener una parte líquida (agua, té o leche) y una parte sólida (pulpa de frutas y verduras). Esta bebida se popularizó en los años 60 en California, cuando se vendían batidos de frutas con helados a los veraneantes, actualmente ha resurgido su consumo debido a su fácil preparación y a lo saludable y nutritivo de sus ingredientes. Resulta una forma fácil y atractiva de incluir en la dieta una fuente de nutrientes rica en antioxidantes, vitaminas, minerales y fibra. Los smoothies contienen:

- ✓ Vitaminas y minerales que refuerzan el sistema inmune y previenen enfermedades como el cáncer.
- ✓ Antioxidantes presentes en la fruta que contrarrestan la acción de los radicales libres que provocan el envejecimiento celular.
- ✓ Proteínas propias de la leche, yogurt o leche de soja (según los productos utilizados en su elaboración) que estimulan el crecimiento, la reconstitución de tejidos y que ayudan al metabolismo celular.
- ✓ Fibra soluble presente en la fruta que contribuye a disminuir el colesterol, acelerando el metabolismo.
- ✓ Clorofila, presente en los vegetales de hojas verdes, contiene hierro y tiene propiedades anticancerígenas, energizantes y antioxidantes.



Figura 1.1. Variedad de smoothies comercializados a partir de zumos de fruta y verdura.

### **1.1.1. Beneficios de las frutas rojas para la salud**

Los pigmentos rojos de las frutas se deben a la presencia de antocianos o betacianinas, dos grupos de metabolitos secundarios que tienen propiedades antioxidantes y cuyo consumo resulta muy beneficioso para la salud. Los antioxidantes captan los radicales libres, que están relacionados con el envejecimiento celular.

Las betacianinas colorean a una escasa variedad de frutas rojas como higo chumbo y pitaya y a la remolacha. Tienen efecto antiviral y antimicrobiano (Strack *et al.*, 2003); además de actividad antioxidante. Su consumo favorece la quimioprevención de cánceres de pulmón y de piel, inhibiendo la proliferación de células tumorales humanas (Muntha *et al.*, 2005 y Sreekanth *et al.*, 2007).

Debido a la escasa presencia de las betacianinas en los frutos rojos la industria alimentaria se centra en los zumos de frutas rojas con antocianinas, que son los mayoritariamente consumidos. Los antocianos son importantes tanto por aportar características organolépticas a los zumos y smoothies como por su efecto beneficioso sobre la salud humana (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Las antocianinas o antocianos son los pigmentos comunes en la mayoría de las frutas rojas: fresa, frambuesa, ciruela, cereza, mora, mirtilo, arándano, grosella, uva, naranja sanguina, pomelo rosa, granada, baya de sauco, etc. Estudios realizados en relación a los antocianos y otros componentes derivados de los frutos rojos han demostrado los beneficios frente a enfermedades como el cáncer, diabetes y artritis, entre otras.

Las 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.



Figura 1.2. Varios frutos rojos.

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).

### **1.1.2.- Definición y tipos de bebidas de frutas**

En este apartado es preciso comentar la labor realizada por el Codex Alimentarius, comisión creada en 1936 por la FAO junto con la OMS para facilitar el comercio internacional de alimentos y garantizar a los consumidores su calidad, seguridad e inocuidad.

La importancia de este código radica en su amplia aceptación de forma mundial y su labor ocupándose de la protección del consumidor así como de la producción y comercio de los alimentos a escala mundial, nacional, regional y local. Esto se puede observar en muchos de sus principios aplicables, como por ejemplo el que “un alimento no es nutritivo si no es inocuo”

Dentro del Codex Alimentarius se encuentra un código aplicable exclusivamente a zumos, es el CODEX STAN 247-2005. Este código define un zumo de fruta como 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 de conformidad con las disposiciones pertinentes de la Comisión del Codex Alimentarius.

A nivel nacional, la legislación que regula todo lo relacionado con la producción y comercialización de zumos es la siguiente:

- ✓ **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.
- ✓ **Directiva 2009/106/CE de la Comisión**, de 14 de agosto de 2009, por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

La legislación española, en el R.D. 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.

Algunos zumos se podrán elaborar junto con determinadas partes de la propia materia prima como son las 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 eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación (BPF).

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 contener sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que podrán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y que deberán proceder del mismo tipo de fruta. Se permite la introducción de estos compuestos para restablecer en nivel de los mismos hasta alcanzar la concentración normal que se obtiene en el mismo tipo de fruta (CODEX STAN 247-2005).

Según, este código, un zumo de un solo tipo es el que se obtiene de un solo tipo de fruta, mientras que un zumo mixto es el que se obtiene mezclando dos o más zumos, o zumos y purés de diferentes tipos de frutas.



Figura 1.3. Distintas variedades de zumos que se encuentran en el mercado

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

- **Zumo de fruta** exprimido directamente por procedimientos de extracción mecánica.
- **Zumo de fruta a partir de concentrados**, mediante reconstitución del zumo concentrado de fruta, con agua potable que se ajuste a los requisitos establecidos en la última edición de las *Directrices de la OMS para la Calidad del Agua Potable*.
- **Zumo concentrado de fruta**, corresponde a un zumo de fruta al que se le ha eliminado físicamente el agua en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix al menos en un 50% más que el valor establecido para el zumo reconstituido de la misma fruta. Podrán añadirse pulpa y células (envoltura del zumo obtenido del endocarpio), obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.

- **Zumo de fruta extraído con agua.** Se entiende por el zumo de fruta que se obtiene por difusión con agua de:
  - Fruta pulposa entera cuyo zumo no puede extraerse por procedimientos físicos
  - Fruta deshidratada entera.

- **Puré de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas.** Se entiende el producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos idóneos, por ejemplo, tamizado, triturando o desmenuzando la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el zumo.

El puré de fruta podrá contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y que deberán proceder del mismo tipo de fruta. Podrán añadirse pulpa y células obtenidas por procedimientos físicos que también sean adecuados al mismo tipo de fruta.

- **Puré concentrado de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas.** Se obtiene mediante la eliminación física del agua del puré de fruta en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix establecido para el zumo reconstituido de la misma fruta.

El puré concentrado de fruta podrá contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse, tal y como ocurre en los tipos anteriores, por procedimientos físicos adecuados y que deberán proceder del mismo tipo de fruta.

- **Néctar de fruta.** Por néctar de fruta se entiende el producto sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene añadiendo agua con o sin azúcares de miel y/o jarabes, y/o edulcorantes, a los productos definidos en todas las apartados definidos anteriormente, o a una mezcla de ellos.

Podrán añadirse sustancias aromáticas o aromatizantes volátiles, pulpa y células, todos los cuales deberán proceder del mismo tipo de fruta y obtenerse por procedimientos físicos. Dicho producto deberá satisfacer además los requisitos para los néctares de fruta que se definen en el Anexo del CODEX STAN 247-2005.

### 1.1.3.- Comercialización de zumos y bebidas de frutas

Asociaciones relacionadas con el comercio de zumos y bebidas de frutas, elaboran informes sobre comercialización de sus productos. Así informes de la Asociación Europea de Zumos (AIJN) y la consultora *Zenith Internacional* reflejan el elevado consumo de zumos y néctares a nivel europeo, lo que demuestra la solidez del mercado de estos productos.

**A nivel mundial**, Europa es con diferencia el mayor consumidor de zumos y néctares, con un término medio de 25,3 litros por persona en el año 2009. Así, durante el año 2010 se llegaron a consumir 11.260 millones de litros de zumo de frutas en la UE.

**A nivel europeo**, Alemania es el consumidor más destacado con diferencia, teniendo una cuota del 28% del volumen total del consumo en el año 2010. Inmediatamente después le siguen Francia, Reino Unido, España y Polonia. Estos son los 5 países europeos que presentan un mayor consumo de este producto en toda Europa.

Tabla 1.1. Países con un mayor consumo en volumen de zumos en la UE.

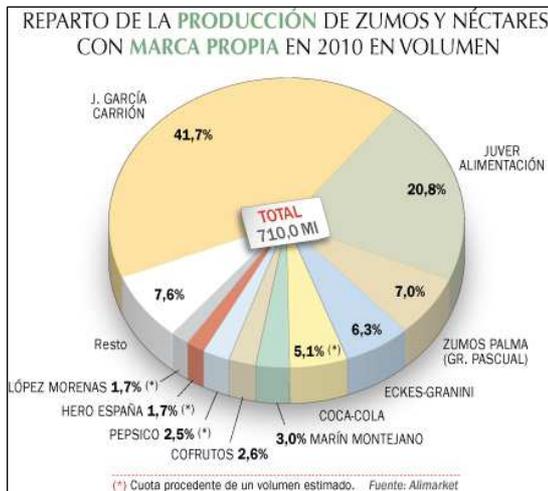
*Fuente: Alimarket (2009)*

Country	Million litres
Germany	3,193
France	1,651
United Kingdom	1,435
Spain	1,078
Poland	749
Others	3,154
Total	11,275

Por tanto, se observa que este producto presenta una fuerte resistencia a la crisis, presentando unos niveles de consumo cada vez mayores en marcas blancas. Cabe pensar que debido a la actual crisis económica, el consumidor ha optado por las marcas blancas (cuota del 52% del total de ventas), es decir, productos de coste más bajo.

Otros datos que se observan en informes realizados por Asociación Europea de Zumos (AIJN), en concreto, en su estudio del año 2012 "Market Report. 2010. Liquid Fruit", es que cada vez se da un consumo mayor de venta de zumos recién exprimidos en máquinas expendedoras, y que el envase de cartón sigue siendo el formato más vendido (un 60% del total). Un dato que cabe mencionar es que el zumo y néctar con una venta muy superior al resto de todas las ventas de este producto es, de forma indiscutible el de naranja: presentando un tercio total de las ventas.

**A nivel nacional**, según los datos recopilados por Zenith Internacional y AIJN, en España se consumieron en el año 2009, 1.078 millones de litros de zumos y néctares. Las tendencias más observadas en España son, además de aumentar el consumo de bebidas que mezclan zumo y leche combinando varios sabores o frutas, es la conjunta con el resto de Europa, el aumento de consumo en zumos y néctares de marcas blancas. También se observa que la tendencia es un aumento en el consumo de bebidas antioxidantes y sin azúcares añadidos.



Según se observa en la "Figura 1.4" extraída de la revista Alimarket de un estudio realizado en 2010, se observa como J. García Carrión acapara casi la mitad de la producción de zumos con marca propia en España, seguido con diferencia por Juver, con un 20% de la producción. Las demás marcas siguen a éstas de lejos con una producción mucho menor en volumen, dentro de las que se encuentran Grupo Pascual, Granini y Coca Cola, entre otros.

Figura 1.4. Porcentaje en volumen de producción de zumos con marca propia. (Alimarket.2010)

## 1.2.- CONTROL DE CALIDAD Y AUTENTICIDAD DE ZUMOS, NÉCTARES Y SMOOTHIES.

Los zumos y néctares de frutas, deberán presentar, como criterio de calidad un color, aroma y sabor característico de la fruta de la que procede. La autenticidad, viene definida en El Código Alimentario de Zumos, como el mantenimiento de las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de la fruta o frutas de las que proceden.

Según indica el RD 462/2011, del 1 de abril, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y otros productos similares, destinados a la alimentación humana; 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

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 los métodos de análisis que se deben utilizar para verificar estos factores.

El RD 1518/2007, de 16 de noviembre, establece los parámetros mínimos de calidad y autenticidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. Este Real Decreto indica los parámetros para naranja, piña, mandarina, albaricoque, pera, manzana, melocotón, indicando los métodos de análisis aplicables a cada fruta.

Un ejemplo de estos parámetros son la densidad relativa, los grados brix, la acidez valorable a pH 8,1, el contenido de ácido cítrico, en glucosa, en fructosa, en sacarosa,... en las diferentes frutas mencionadas en el párrafo anterior.

El cumplimiento de estos parámetros mínimos, no implica que no tengan que ajustarse también a otros que afecten a su calidad y autenticidad, 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). Como criterio de evaluación de calidad y autenticidad la AIJN presenta una guía de referencia para cada tipo de fruta.

El análisis de zumos por HPLC permite conocer no solo adulteraciones, sino también errores no intencionados que hayan tenido lugar en el procesado (fallos en la clasificación, insuficiente lavado de los tanques de las líneas de procesado, etc.). Por ejemplo podemos encontrarnos con mezclas de grosellas roja, negra y blanca, uvas blanca y tinta, cereza dulce y amarga, etc.

### 1.2.1.- Los polifenoles en las frutas

Las frutas constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. En ellas es frecuente encontrar derivados de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoles, catequinas y taninos. Según Paredes-López, *et al.*, (2010) en concreto las frutas consistentes en bayas son ricas en compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, y taninos.

La estructura fenólica se compone de un núcleo aromático (anillo fenólico) y un grupo hidroxilo libre, y se diferencian de otros compuestos al poseer dicha estructura fenólica de origen biosintético.

Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen unos anillos con otros (Manach *et al.*, 2004). Tal y como se muestra en la Figura 1.5 se puede distinguir entre:

- Ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos)
- Flavonoides
- Estilbenos
- Lignan
- Chalconas

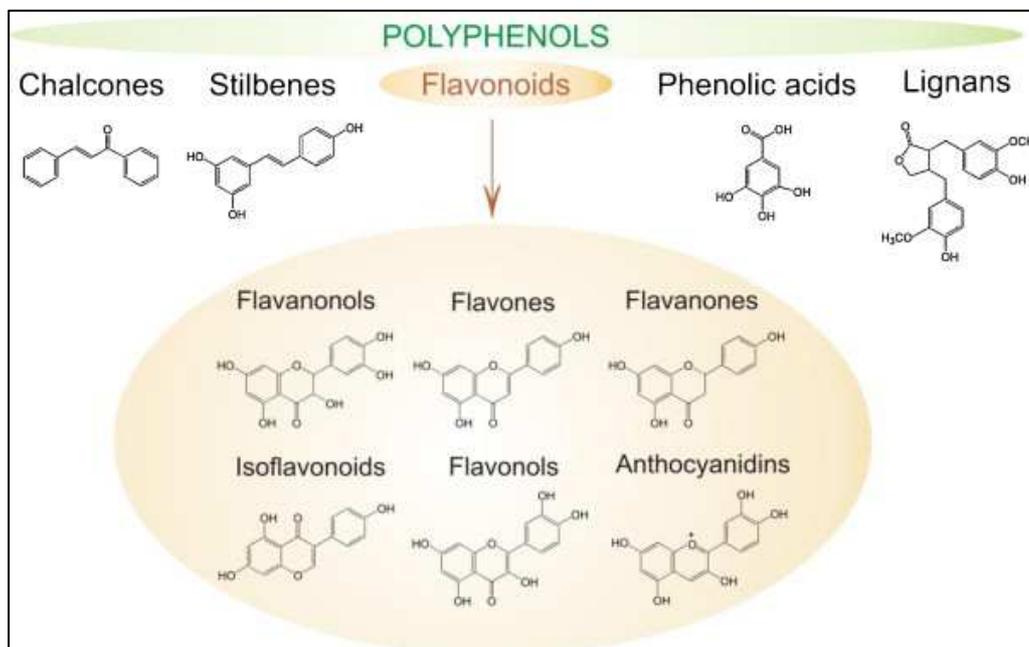


Figura 1.5. Estructura química de los polifenoles (Pescarmona, 2008).

A continuación, se explican los distintos polifenoles:

### 1.2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son una familia de metabolitos secundarios que contienen estructuras derivadas del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico. Están extensamente distribuidos en la constitución de las plantas, bien como ácidos libres o bien formando complejos con ésteres, glicósidos,... jugando un papel muy importante en la resistencia de las plantas a patógenos, en el estrés hídrico, y a la regulación del crecimiento vegetal (Kawsar *et al.*, 2008).

#### ➤ Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos poseen una estructura C6-C1, formada por un anillo aromático unido a un carbono, el cual se puede encontrar libre o ligado formando ésteres de ácido benzoico, en muchas especies vegetales y animales.

El contenido de estos ácidos fenólicos en las plantas comestibles es relativamente bajo, excepto en frutos rojos como los arándanos donde puede llegar a alcanzar los 270 mg/kg de peso fresco. El té verde también es una fuente importante de ácido gálico, y la frambuesa puede llegar a tener hasta 100 mg de ácido protocatecúlico por cada kg de peso fresco (Granado-Serrano, 2009)

Los principales ácidos hidroxibenzoicos son el ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecúlico, vanílico y sirínico.

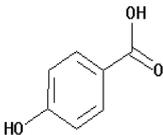
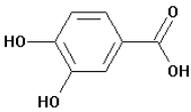
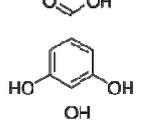
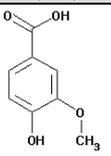
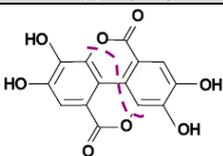
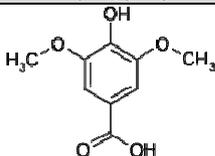
<b>Ácido 4- hidroxibenzoico</b>	<b>Ácido 3,4- dihidroxibenzoico</b>	<b>Ácido gálico</b>
<b>C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub></b>
		
<b>Ácido vanílico</b>	<b>Ácido elágico</b>	<b>Ácido sirínico</b>
<b>C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub></b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub></b>
		

Figura 1.6. Estructura de ácidos hidroxibenzoicos.

El ácido gálico y el ácido protocatecúlico, se encuentran en muy pocos alimentos de origen vegetal, por lo que han sido poco estudiados. Estos compuestos forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables (Granado Serrano, 2009).

#### ➤ Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos. Siendo los más abundantes el ácido cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico.

Estos compuestos se encuentran esterificados en la pared de las células vegetales, actuando como un gran agente antioxidante. Así, los kiwis contienen hasta 1 g de ácido cafeico. Por otra parte, el ácido ferúlico es el más abundante en los granos de cereales y un grano de trigo alcanza hasta valores entre 0,8 – 2 g/kg de peso seco (supone un 90% del total de polifenoles) (Granado-Serrano, 2009.)

Su estructura química se compone de un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en su extremo. Debiendo el nombre de ácido hidroxicinámico a la sustitución de un grupo –OH en el anillo aromático.

La estructura de los ácidos hidroxicinámicos más representativos de este grupo se puede visualizar en la Figura 1.7.

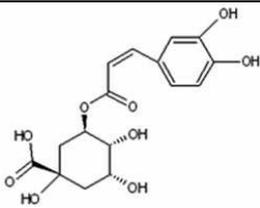
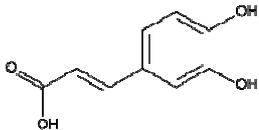
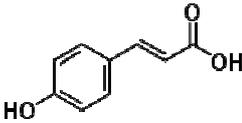
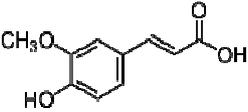
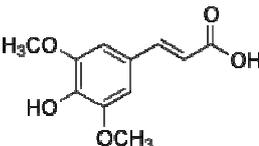
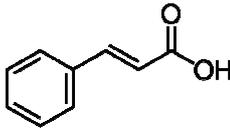
Ácido Clorogénico (cafeico+quínico)	Ácido Cafeico	Ácido p-Cumárico
$C_{16}H_{18}O_9$	$C_9H_8O_4$	$C_9H_8O_3$
		
Ácido Ferúlico	Ácido Sinápico	Ácido Cinámico
$C_{10}H_{10}O_4$	$C_{11}H_{12}O_5$	$C_9H_8O_2$
		

Figura 1.7. Principales ácidos hidroxicinámicos. Estructura básica y tipos.

### 1.2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Martínez Flores *et al.*, 2002).

Estos compuestos fueron descubiertos en 1930 por Szent-György (Premio Nobel) aislando una sustancia, la citrina, de la cáscara de limón que regulaba la permeabilidad

de los capilares. Inicialmente, los flavonoides se denominaron vitamina P (por Permeabilidad), y también vitamina C2. Hacia 1950 se abandonaron estos nombres, debido a que no se pudo probar su carácter vitamínico.

Son compuestos que comparten un esqueleto molecular común, de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto de 2 anillos fenólicos (A y B), ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Estos compuestos, son los antioxidantes más potentes de todos los presentes en los vegetales.

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y frutos de los vegetales, desempeñando un papel importante en la biología vegetal, así responden a la luz y controlan el nivel de crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración lo que contribuye a la polinización, y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez Flores, *et al.*, 2002). Este grupo de polifenoles se clasifica en distintos subgrupos según su estructura química básica, como se muestra en la Figura 1.8.

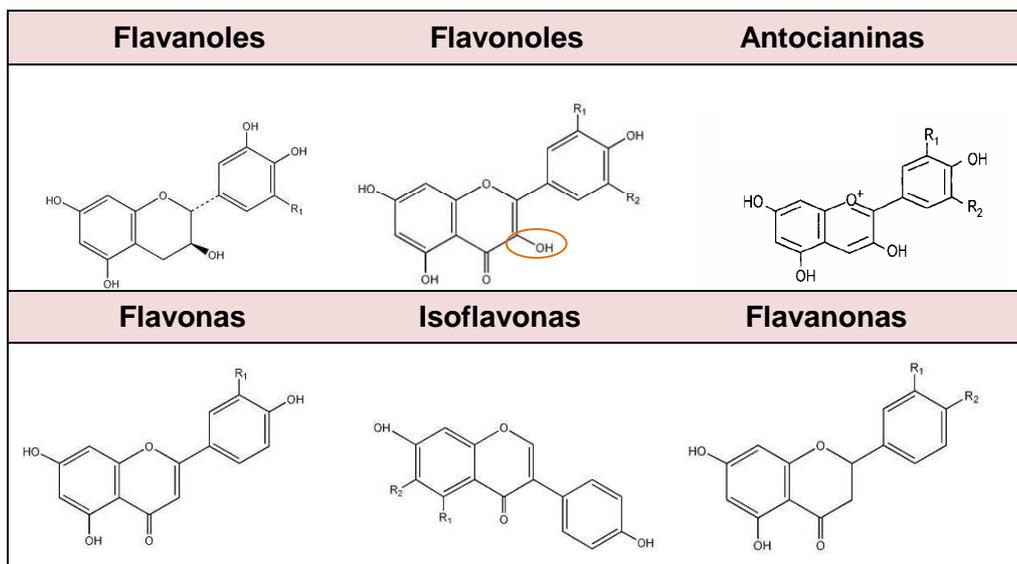


Figura 1.8. Flavonoides. Estructura básica y tipos.

➤ Los **flavanoles** presentan estructuras derivadas de 3 esqueletos básicos: Flavan – 3-ol, Flavan-4-ol, y Flavan-3,4-diol; y se diferencian entre sí según el grado de hidroxilación de su anillo B. Los predominantes son la catequina (monómeros de Flavan 3-ol). Existen derivados “trans” (catequina y galocatequina) y sus correspondientes isómeros “cis” (epicatequina y epigalocatequina). Son poco habituales las combinaciones de tipo heterosídico (Rivas Gonzalo *et al.*, 2002).

➤ Los **flavonoles** se encuentran en numerosas plantas superiores, aunque predominan en frutas. Los más conocidos son la quercetina, kaempferol y miricetina. Los flavonoles sí se presentan generalmente en forma de glicósidos.

➤ Las **flavanonas** son análogas a las flavonas con el anillo C saturado. Constituyen un grupo minoritario de flavonoides en los alimentos. Están, por ejemplo, en frutas cítricas, donde podemos encontrar tanto flavanonas amargas (naringina) como insípidas (hesperidina) (Peterson y Dwyer, 1998).

➤ Las **isoflavonas** son un grupo que estructuralmente difieren de los flavonoides comunes en la posición del anillo B en la molécula, que en este caso está unido por la posición 3. Se encuentran principalmente en legumbres, con actividad estrogénica. La soja es una fuente de isoflavonoides, aunque también se encuentran en judías pintas y guisantes (Peterson y Dwyer, 1998).

➤ Los **antocianos** son un grupo de pigmentos naturales, cuyo interés radica en dos aspectos; pueden ser utilizados en el campo tecnológico como colorantes naturales, y también porque tienen importantes implicaciones en el campo de la salud humana.

Son responsables del color azul, violeta, rojo y naranja de muchas frutas y verduras, habiéndose identificado hasta el momento, más de 500 estructuras diferentes de antocianos (Andersen y Markham, 2006).

Son pigmentos solubles en agua que pertenecen al grupo de los flavonoides, y son derivados glicosilados del catión 3, 5, 7,4'-tetrahidroxi-flavilio y presenta los grupos hidroxilo y metoxilo en diferentes posiciones. En función de la posición en la que se encuentren estos sustituyentes surgen docenas de antocianidinas diferentes, de las cuales 6 son las más comunes (Figura 1.9):

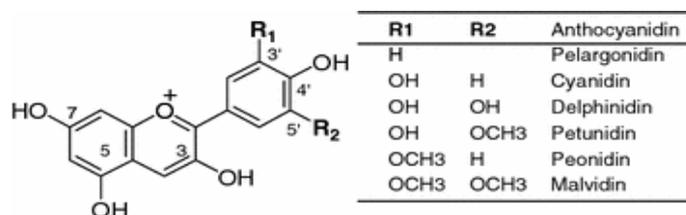


Figura 1.9. Estructura de las antocianinas más comúnmente encontradas en alimentos (De Pascual - Teresa *et al.*; 2007)

Las antocianinas se encuentran normalmente diluidas en la disolución vacuolar de células epidérmicas de diferentes partes de las plantas (flores, tallos, hojas, frutas y raíces). Como fuentes principales de antocianinas se encuentran los frutos rojos, maíz, verduras y vino tinto entre otros.

Tabla 1.2. Concentración de antocianinas en alimentos (De Pascual *et al.*, 2007)

ALIMENTOS	PIGMENTO (mg/100 g)	REFERENCIAS
Manzana	1,7	Koponen <i>et al.</i> 2007
Arándano	300-698	Mazza y Miniati, 1993
Grosella negra	130-476	Timberlake, 1998; Wu, <i>et al.</i> 2006
Cereza	2-450	Harbone y Hall, 1964; Mazza y Miniati, 1993; Gao y Mazza, 1995
Berenjena	8-85	Wu <i>et al.</i> , 2006; Koponen <i>et al.</i> , 2007
Lechuga	2,2-5,2	Wu <i>et al.</i> , 2006; Koponen <i>et al.</i> 2007
Ciruela	2-25	Wu <i>et al.</i> , 2006
Frambuesa	20-687	Wang y Lin, 2000; Wu <i>et al.</i> , 2006.
Lombarda	322	Wu <i>et al.</i> , 2006
Grosella	22	Koponen <i>et al.</i> , 2007
Cebolla roja	23,3-48,5	Ferreres <i>et al.</i> , 1996; Wu <i>et al.</i> , 2006.
Vino tinto	16,4-35	Bakker y Timberlake, 1985; Teissedre y Landrault, 2000; Frankel <i>et al.</i> , 1995
Fresa	19-55	Lópes da Silva <i>et al.</i> , 2007
Mora	82.5-325.9	De Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2010
Uva tinta	30-750	De Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2010

Se han aislado más de 500 antocianinas en diferente literatura, siendo los glicosidos más estables que las agliconas libres (antocianidinas). Tal y como se muestra en la Figura 1.9, las antocianidinas más comunes son pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina, siendo la distribución de las mismas en las partes comestibles de las plantas la siguiente: (De Pascual Teresa *et al.*, 2007)

- Cianidina (50%) “
- Pelargonidina (12%)
- Peonidina (12%)
- Delphinidina (12%)
- Petunidina (7%)
- Malvidina (7%).

Según Wu, *et al.*; 2006, Frankel, *et al.*; 1995, y Kuhnau, 1976, el consumo diario y total de antocianinas se puede estimar en una cifra que oscila entre 3 y 215 mg/día. Se produce mucha variación en estas cifras debido a que algunas antocianinas sólo se

encuentran en cerezas, frutos y rojos y vino tinto, y el consumo de estos productos es muy variable entre la población.

Sin embargo, las diferencias que se producen en la metodología seguida para la evaluación de estos compuestos, así como las diferencias nutricionales, sociales y culturales de las poblaciones investigadas, pueden explicar la amplia gama entre la que oscila el consumo de antocianinas en la población (De Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

Sólo una pequeña parte de las antocianinas consumidas en la dieta se absorbe como tal en el estómago durante la hidrólisis, por lo tanto, grandes cantidades de estos compuestos ingeridos tienden a entrar en la vía intestinal. Esto no quiere decir que la mayoría de las antocianinas ingeridas no se absorban por el organismo, ya que recientemente, se ha demostrado que las antocianinas pueden ser metabolizadas por la microflora intestinal, o simplemente estar químicamente degradadas, dando lugar a un conjunto de nuevos compuestos que aún no se han identificado totalmente pero sí se ha determinado que son derivados de ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido siríngico, ácido vanílico,...

De hecho, los estudios existentes sobre la biodisponibilidad de las antocianinas en los seres humanos, han demostrado que para un total de antocianinas ingeridas de 0,05-1,9 g, la concentración de antocianinas en plasma de 0,001-0.2  $\mu\text{M}$  se alcanzó 0,5-4 horas después de la ingestión de la misma, con una excreción en la orina que en ningún caso superó el 5% de la dosis ingerida (De Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

Las antocianinas son relativamente inestables y se oxidan fácilmente, debido a que son sensibles a diferentes factores que afectan a su estabilidad y color como el pH, la temperatura, y la radiación ultravioleta. También se ven afectados por la presencia de dióxido de azufre, ácido ascórbico o iones metal en el medio en el que se encuentran.

Las antocianinas son hidrofílicas y éstas son más estables en disoluciones acuosas con pH bajo. Esto se debe a transformaciones que sufre la estructura química de estas moléculas dependiendo del pH de la disolución acuosa.

Dependiendo de este valor de pH de la disolución y de la estructura de una pigmentación en particular, varían las cantidades relativas de cada forma de equilibrio en el medio (De Pascual-Teresa *et al.*, 2010). Debido a la mayor estabilidad de los antocianos a pH bajos, éste se suele mantener durante análisis realizados en valores inferiores a 2 por adición de ácidos.

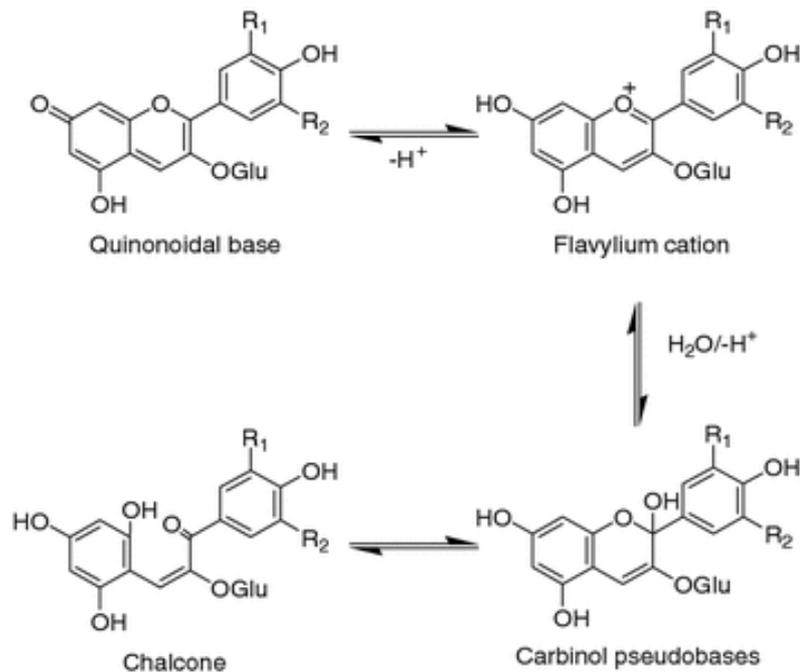


Figura 1.10. Transformaciones químicas de antocianinas en disoluciones acuosas. (De Pascual-Teresa *et al.*, 2010)

### 1.2.1.3. Estilbenos

Esta familia de polifenoles naturales incluye a los derivados hidroxi- y metoxi- del estilbeno simple, así como sus formas glicósido y polímeros. Se encuentran en muchas plantas superiores.

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). El estilbeno con mayor interés nutricional es el resveratrol.

Los estilbenos permiten comprender por qué algunas variedades de vid son más o menos resistentes a los ataques de hongos.

Sus hojas inicialmente sintetizan resveratrol en cantidades diversas dependiendo de la variedad de vid de la que se trate, y seguido de ellos los monómeros de este compuesto se polimerizan.

Esto ocurre debido a la propiedad de los monómeros estilbenos, que pueden polimerizarse para dar muchos oligoestilbenos naturales. La mayoría de ellos son polímeros de resveratrol como la (-)- $\epsilon$ -viniferina.

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, un estilbeno presente en la uva y que se transmite al vino. En concreto, han logrado concentrar en una cápsula los beneficios aportados por 45 botellas de vino.

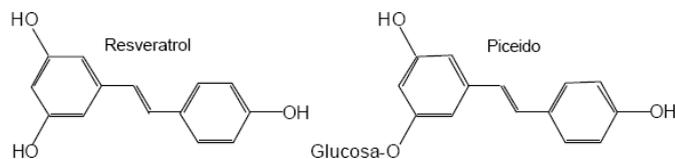


Figura 1.11. Estructura de los estilbenos.

#### 1.2.1.4. Lignanos

Los lignanos son metabolitos secundarios de las plantas encontrados en una gran variedad de ellas. Aunque están ampliamente distribuidos, sus cantidades son muy reducidas, del orden de  $\mu\text{g}$  por cada gramo de producto seco.

Químicamente son sustancias relacionadas con el metabolismo de la fenilalanina a través de la dimerización de alcoholes cinámicos sustituidos por un esqueleto de dibencilbutano.

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

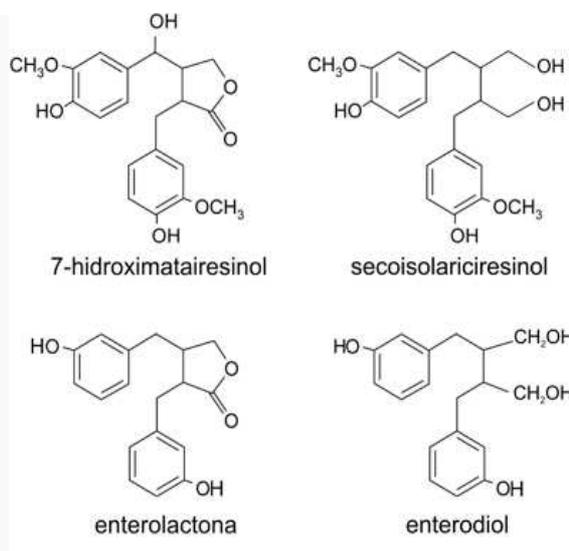


Figura 1.12. Estructuras de Lignanos

Figura 1.12. Estructura química de algunos lignanos.

Se atribuyen a los lignanos efectos antioxidantes que ayudan a combatir los efectos de los dañinos radicales libres. La estructura química de algunos lignanos se muestra en la Figura 1.12.

Los lignanos secoisolariciresinol diglucósido (SDG) y sus metabolitos de lignanos mamáticos: enterodiol (ED) y enterolactona (EL), son compuestos fitoquímicos

antioxidantes con potencial actividad anticancerígena que pueden imitar las funciones de las hormonas humanas, sin los efectos dañinos de éstas (Bylund et al., 2005).

### 1.2.1.5. Chalconas

Las chalconas e dihidrochalconas son unos tipos de compuestos que se pueden encontrar además de en flores, también en otras tejidos diferentes de las plantas.

Son estructuralmente uno de los grupos de flavonoides más diversos, ya que existen una amplia gama de dímeros, oligómeros y conjugados de diversos tipos. Al mismo tiempo, tienen una gran importancia en la biosíntesis al ser precursores inmediatos de los demás tipos de flavonoides (Nigel *et al.*, 2006). El primer flavonoide sintetizado por la "vía biosintética de los flavonoides" es una chalcona, cuyo esqueleto es un anillo bencénico unido a una cadena propánica que está unida a su vez a otro anillo bencénico.

La característica fundamental que diferencia las chalconas e dihidrochalconas de otros flavonoides, es la estructura de 3 carbonos de cadena abierta enlazando los anillos A y B, en lugar de un heterociclo.

Las chalconas están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen al desarrollo de colores en el espectro de lo visible y en el UV que atraen a insectos (mariposas y abejas).

Verhoeven *et al.*, 2002, realizó un experimento con tomates y como conclusión indica que en el tejido externo del tomate, la actividad de la enzima chalcona isomerasa, conduce a un gran aumento en el nivel de acumulación de quercetina-glucósido, y por lo tanto, un aumento en la actividad antioxidante de este alimento.

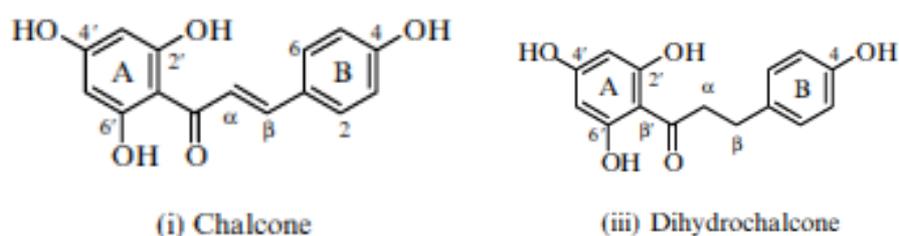


Figura 1.13. Estructura química de chalconas e dihidrochalconas (Fuente: *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. 2006).

### 1.2.2.- *Análisis de polifenoles*

En la actualidad, se han desarrollado numerosos métodos para la caracterización de polifenoles, 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 polifenoles” que sirve como huella dactilar en la autenticación de frutas y productos elaborados a partir de frutas. En el caso concreto de las frutas rojas se trabaja con el perfil de antocianos, que son los polifenoles responsables del color de estas frutas.

Para proporcionar a los consumidores información y seguridad, es importante garantizar la autenticidad y la calidad de las bebidas de frutas rojas o vegetales (Fúgel *et al.*, 2005). La Comisión de Codex Alimentarius fue creada por la FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados tales como códigos de prácticas, con el objetivo principal de proteger la salud de los consumidores y asegurar prácticas equitativas en el comercio de alimentos.

CODEX STANDART 247-2005 es un código general que incluye métodos de análisis para verificar la composición, calidad y autenticidad de los zumos de frutas y néctares (Obón *et al.*, 2011).

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 resolución (HPLC).

Recientemente en nuestro grupo de investigación ha optimizado una modificación de este método de análisis que permite el análisis simultáneo de distintos tipos de polifenoles y la determinación cuantitativa de polifenoles totales individuales, mediante UHPL-PDA-Fluorescencia (Díaz-García *et al.*, 2013)

En la actualidad, existen muchos laboratorios analizando zumos de frutas y néctares a través del perfil de antocianos de las frutas correspondientes, para verificar su autenticidad y controlar la calidad de los mismos. Para ello, existen numerosos trabajos de investigación determinando el perfil de antocianos de numerosas frutas rojas, que se utilizan para evitar fraudes y la adición de colorantes no permitidos en bebidas que deben carecer de ellos.

Además de las técnicas de HPLC también son habituales las determinaciones de estos compuestos mediante técnicas espectrofotométricas en las que se puede cuantificar el conjunto de polifenoles totales. En ellas se recurre a reactivos específicos que interactúan con todos los polifenoles, o con un grupo en concreto, para dar un producto coloreado que permite la cuantificación a una longitud de onda fija. En estos casos, normalmente el método se calibra con un estándar que es un polifenol de referencia perteneciente al grupo de polifenoles que se está analizando. Se han desarrollado así distintos métodos para la determinación de proantocianidinas, flavonoides, antocianos y

polifenoles en su conjunto. Los valores cuantitativos se expresan con referencia al estándar utilizado en cada caso (Tsao & Yang, 2003).

Una medida muy habitual en zumos, sobre todo porque es requerida en el etiquetado según la legislación de muchos países, es el contenido total de polifenoles (TP). En este caso, el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu es uno de los más utilizados para determinar los polifenoles totales en frutas y vegetales (Kanner *et al.*, 1994; Spanos & Wrolstad, 1990; González-SanJose & Diez, 1992).

El reactivo de Folin-Ciocalteu (FCr) o reactivo de Folin-Denis es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Con este método se mide la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo (Vinson *et al.*, 2005).

Sin embargo, este reactivo no mide sólo los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos.

Debido a que la gran mayoría de las sustancias reductoras de estos productos son compuestos fenólicos, se puede realizar una medida rutinaria, sencilla y poco costosa para determinar una cantidad de fenoles totales en una muestra que tenga valores muy similares o ligeramente superiores a los obtenidos realizando un análisis por HPLC.

Para evitar el error que se produce en la medida de fenoles y polifenoles con este método, actualmente se utiliza una modificación del mismo efectuada por Singleton y Rossi en 1965. La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianion fosfórico de molibdeno y tungsteno, que oxida los fenoles con mayor especificidad.(Almajano, 2009).

La oxidación de los fenoles presentes en la muestra analizada, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, pero que aún así presenta numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes investigadores, fundamentalmente debido a los volúmenes utilizados de la muestra, concentración de reactivos y tiempo y temperatura de incubación (Almajano, 2009).

El ensayo de los fenoles totales se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta. Así, cuando se evalúan las propiedades antioxidantes de estos alimentos, el análisis de fenoles proporciona información valiosa a la hora de seleccionar variedades con mayor potencial antioxidante.

### **1.3.- MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ZUMOS, NÉCTARES Y SMOOTHIES DE FRUTAS ROJAS.**

Son muchos los productos elaborados a partir de mezclas de frutas que se encuentran en el mercado. Para el presente estudio se han utilizado un total de nueve productos comerciales constituidos por una mezcla de algunas de las frutas que a continuación se describen.

En concreto, se han estudiado 2 zumos antioxidantes de frutas rojas, 3 néctares de frutas rojas y 4 smoothies.

Así, aunque son muchas las frutas rojas de las cuales se pueden obtener zumos para su posterior comercialización, este estudio se centra en 10 frutas, de las más utilizadas en la producción de zumos. Tres de ellas no contienen pigmentos rojos (naranja, manzana y plátano), se incluyen por su presencia en la mayoría de los zumos de frutas y su uso en la elaboración de smoothies.

El resto de frutas descritas deben su color rojo a la presencia de las antocianinas que confieren el color rojo a los productos obtenidos. A continuación se describen las características principales de estas diez frutas.

### 1.3.1.- Naranja (Orange)

La naranja es el fruto del naranjo dulce, árbol que pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. Esta familia comprende más de 1.600 especies. El género botánico *Citrus* es el más importante de la familia, y consta de unas 20 especies con frutos comestibles todos ellos muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. Los frutos, llamados hespérides, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de zumo.

El naranjo dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) es el más cultivado de todos los cítricos, siendo la especie más importante del género *Citrus*.

El naranjo dulce procede de las regiones surorientales de Asia, en concreto de la zona sureste de China y el archipiélago malayo, sin embargo, no comenzó a cultivarse hasta los siglos XV-XVI. En la segunda mitad del siglo XIX se descubrió en Bahía (Brasil) una naranja que era más dulce, jugosa y hermosa, sin pepitas y con un ombligo en el extremo opuesto al pedúnculo. Fue llevada a California, donde se convirtió años más tarde en la reina de las naranjas, la variedad conocida hoy como Navel Washington.

Actualmente, el naranjo es uno de los frutales más extendidos por todo el mundo, siendo los principales países productores: Brasil, Estados Unidos, España (Valencia, Murcia, Sevilla y Huelva), Italia, México, India, Israel, Argentina y China.

Se conocen dos especies de naranjas, cada una con numerosas variedades que se diferencian entre sí sobre todo en el sabor. Las naranjas dulces son las naranjas de mesa por excelencia, mientras que las naranjas amargas tienen un sabor tan ácido y amargo que no se suelen consumir en crudo y se reservan para la elaboración de mermeladas y la obtención de aceites esenciales.

De su composición nutritiva, destaca su escaso valor energético, gracias a su elevado contenido en agua y su riqueza de vitamina C, ácido fólico y minerales como el potasio, el magnesio y calcio. Contiene cantidades apreciables de beta-caroteno, responsable de su color típico y conocido por sus propiedades antioxidantes; además de los ácidos málico, oxálico, tartárico y cítrico. La cantidad de fibra es apreciable y ésta se encuentra sobre todo en la parte blanca entre la pulpa y la corteza.



Figura 1.14. Frutos del naranjo y distribución geográfica mundial del cultivo.  
(www.consumer.com)

### 1.3.2.- Manzana (Apple)

El fruto de la manzana pertenece al árbol de la familia de las Rosáceas, que incluye más de 2.000 especies de plantas herbáceas, arbustos y árboles distribuidos por regiones templadas de todo el mundo.

Se puede decir que el cultivo de la manzana es tan antiguo como la humanidad, siendo el árbol del manzano el árbol frutal más cultivado a nivel mundial. Hace miles de años que se recolectan estas frutas, que incluso sin conocer su composición química, la sabiduría popular siempre le ha atribuido virtudes saludables.

En el siglo XII a.C. el manzano era cultivado en los valles del Nilo. Fue en el siglo XVI, cuando los conquistadores españoles extendieron el cultivo de la manzana al nuevo mundo y, cien años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del Norte y posteriormente a África septentrional y Australia.

La manzana fue introducida en la península por los romanos y los árabes y hoy en día, España es uno de los principales países productores. Cataluña produce el 40% del total de la producción nacional seguida de Aragón, La Rioja y Navarra.

Otros países productores son: China, Estados Unidos, Alemania, Italia, Polonia, Francia, Irán, Rusia, India, Brasil, Bélgica, Países bajos y Austria. La facilidad de adaptación de este árbol a diferentes climas y suelos, el valor nutritivo de sus frutos y la resistencia a las más bajas temperaturas permiten cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente frío.

Desde el punto de vista nutritivo, la manzana es una de las frutas más completas y enriquecedoras en la dieta. Un 85% de su composición es agua y el resto en gran parte es azúcares, sobretodo fructosa y en menor proporción, glucosa y sacarosa. Es fuente discreta de vitamina E o tocoferol y aporta una escasa cantidad de vitamina C.



Figura 1.15. Manzana y la distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

### 1.3.3.- Plátano (Banana)

Esta fruta pertenece a la familia de las Musáceas, la cual incluye los plátanos comestibles crudos (*Musa cavendishii*), los bananitos o plátanos enanos (*Musa x paradisiaca*) y los plátanos machos o para cocer (*Musa paradisiaca*). Al plátano macho también se lo conoce como "plátano de guisar o hartón", más grande y menos dulce que el resto de variedades de su misma familia.

En los países tropicales y caribeños es un alimento fundamental, siendo allí la variedad por excelencia el plátano macho. En cambio, en Europa tomamos plátanos crudos (plátano enano), como postre. Desde Canarias empieza a comercializarse a partir de finales del siglo XIX.

El plátano es el cuarto cultivo de frutas más importante del mundo. Los países latinoamericanos y del Caribe producen el grueso de los plátanos que entran en el comercio internacional, unos 10 millones de Tm, del total mundial de 12 millones de Tm.

Es considerado el principal cultivo de las regiones húmedas y cálidas del sudoeste asiático.

Del plátano destaca su contenido de hidratos de carbono, por lo que su valor calórico es elevado. Los nutrientes más representativos del plátano son el potasio, el magnesio, el ácido fólico y sustancias de acción astringente; sin despreciar su elevado aporte de fibra, del tipo fruto-oligosacáridos.

Podemos encontrar esta fruta en el mercado durante todo el año, ya que son recolectados durante todas las estaciones del año, y su gran comercio internacional e importación de países tropicales hacen que se abastezca el mercado durante todo el año de este producto.

La forma en que se comercializa esta fruta es en forma de puré o zumo de fruta.



Figura 1.16. Plátano enano (*Musa x paradisiaca*), y distribución geográfica mundial de todas las variedades de este fruto. (www.consumer.com)

### 1.3.4.- Fresa (Strawberry)

Las fresas (*Fragaria vesca* L.) o los fresones crecen en el fresal, planta que pertenece a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria*. Estas frutas son unas de las más apreciadas y evocan el inicio de la primavera, ya que la temporada de las mismas va desde marzo hasta julio. En el mundo se conocen más de 1.000 variedades de fresas, fruto de la gran capacidad de hibridación que tiene esta especie, y a su poliploidía.

La fresa que conocemos actualmente fue introducida en Europa por los primeros colonos de Virginia (Estados Unidos). Más tarde se realizaron cruces entre ésta y una variedad Chilena.

En España, la provincia de Huelva es la más especializada en el cultivo de fresas y fresones, hasta el punto de lograr un reconocimiento mundial.

Hoy en día, las más comercializadas son fresas de cultivo intensivo que con la ayuda de invernaderos consiguen tener presencia todo el año en el mercado de nuestro país.

El fresón se considera un tipo de fresa de mayor tamaño, con forma de corazón y de color rojo vivo cuando está maduro.

En cuanto a las propiedades nutritivas de esta fruta, éstas aportan pocas calorías y su componente principal después del agua son los hidratos de carbono, en concreto fructosa, glucosa y xilitol.

También destaca su aporte de fibra, que mejora el tránsito intestinal, y en lo que se refiere a otros nutrientes, las fresas y los fresones tienen una composición elevada de vitamina C (con acción antioxidante) y ácido cítrico (con acción desinfectante y alcalinizadora de la orina, también potencia la acción de la vitamina C), ácido salicílico (de acción antiinflamatoria y anticoagulante), ácido málico, oxálico, potasio y en menor proporción contienen vitamina E (que además de su acción antioxidante, también interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad).

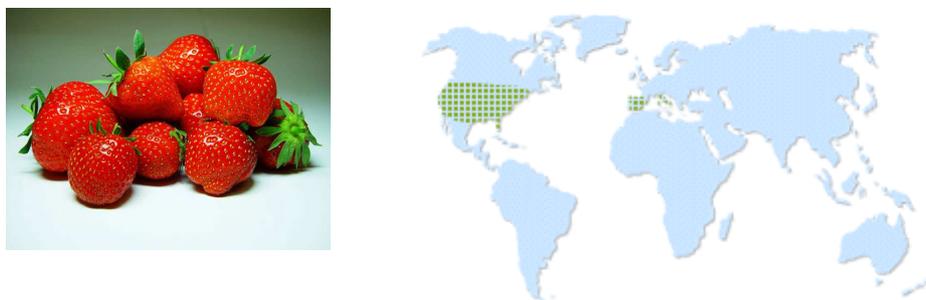


Figura 1.17. Fruto de la fresa y distribución geográfica mundial del cultivo.  
(www.consumer.com)

### 1.3.5.- Grosella negra (Blackcurrant)

La grosella (*Ribes rubrum L.*) es el fruto de las distintas variedades de groselleros, arbustos de hasta 2 metros de altura, de la familia de las Saxifragáceas, plantas herbáceas y leñosas que crecen espontáneas en regiones templadas y frías.

Los países productores de grosella negra más importantes son: Italia, Bélgica, Holanda e Inglaterra. ([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

Dentro de esta especie, se encuentran 3 variedades más destacadas.

La grosella roja (*Ribes rubrum L.*). Son bayas globulosas que crecen en racimos. Su sabor varía del ácido al agrio y pueden llegar a ser insípidas. La grosella negra (*Ribes nigrum L.*).

No suelen consumirse crudas y su sabor también es muy variable, oscilando entre amargo y muy ácido. La grosella blanca (*Ribes rubrum*) son variedades de color blanquecino poco cultivadas.

Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso aporte de hidratos de carbono. Las grosellas negras y las rojas son especialmente ricas en vitamina C, y tienen cantidades mayores que algunos cítricos.

Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante.

En la alimentación humana, este tipo de frutas constituyen una de las fuentes más importantes de antocianos, que les confieren su color característico y que están junto con ácidos orgánicos tales como el ácido oxálico o el ácido málico, responsables también de su sabor.

La vitamina C tiene acción antioxidante, al igual que los antocianos y carotenoides. Dicha vitamina interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones.



Figura 1.18. Grosella negra y su distribución geográfica mundial. ([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

### 1.3.6.- Frambuesa (Raspberry)

El fruto de la frambuesa, (*Rubus idaeus L.*), conocido también como fresa del bosque, pertenece a la familia de las Rosáceas, que incluye más de 2.000 especies de plantas herbáceas, arbustos y árboles que crecen por las regiones templadas de todo el mundo.

Las principales frutas europeas, además del rosál, pertenecen a esta gran familia.

Procede del monte Ida, en Grecia, desde donde se extendió a Italia, Países Bajos, Inglaterra y posteriormente a América del Norte.

En España son zonas productoras Huelva, Asturias, Cáceres y la comarca del Maresme en Barcelona. El mercado español se nutre también de importaciones realizadas desde Chile y Centroamérica ([www.consumer.com](http://www.consumer.com)).

Las frambuesas, según la variedad, maduran de forma escalonada durante los meses de verano y entrado el otoño, por lo que las podemos degustar durante los meses de julio, agosto, septiembre y octubre.

La frambuesa es una fruta que aporta una cantidad destacable de fibra, que mejora el tránsito intestinal. También constituye una fuente importante de vitamina C, ácido cítrico y ácido elágico, flavonoides y folatos, minerales como el potasio, el magnesio y el calcio.

Por su abundancia de ácido fólico, vitamina imprescindible en los procesos de multiplicación celular que tienen lugar en los primeros meses de gestación, su consumo resulta adecuado para las mujeres embarazadas para prevenir la espina bífida, alteración en el desarrollo del sistema nervioso del feto.

La forma en que se comercializa esta fruta, al igual que la fresa, es en forma de puré. El puré de frambuesa se utiliza para elaborar las mezclas de zumos de fruta.



Figura 1.19. Fruto de la frambuesa y su distribución geográfica mundial.  
([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

### 1.3.7- Arándano (Blueberry)

El arándano (*Vaccinium oxycoccus L.*) procede de un pequeño arbusto que alcanza de 25 a 50 cm de altura. Es una baya que pertenece a la familia de las Ericáceas del género *Vaccinium*, formado por 12 plantas que producen bayas de color oscuro, ricas en antocianos y pigmentos vegetales.

Tiene su origen en Asia y Europa. Crecen en terrenos húmedos y se pueden encontrar a 1.500 m de altura, madurando en los meses de verano y otoño.

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.

Normalmente el aroma acompaña al aspecto del alimento y suelen ser frutas muy perfumadas.

Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso aporte de hidratos de carbono. Son especialmente ricas en vitamina C, que tienen cantidades mayores que algunos cítricos.

En general, las bayas silvestres son buena fuente de fibra; que mejora el tránsito intestinal, y de potasio, hierro y calcio. Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante.

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.

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



Figura 1.20. Racimo de arándanos y su distribución geográfica mundial.  
([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

### 1.3.8.- Mora silvestre (Mulberry)

Esta fruta pertenece a la familia de las Rosáceas, la cual incluye más de 2000 especies y donde se encuentran las principales frutas europeas, entre ellas la mora silvestre *Morus nigra*. Conviene diferenciar entre la mora y la zarzamora, dos frutos que pertenecen a dos géneros distintos con rasgos fenotípicos diferentes, el género *Morus* (mora silvestre) y el género *Rubus* (zarzamora). Ambos géneros dan moras, pero no son la misma fruta. Además de la mora silvestre o mora negra *Morus nigra*, se incluye en este género la mora de la morera o mora blanca *Morus alba*, y la mora roja *Morus rubra*.

Es un fruto constituido por pequeñas drupas o granos que se agrupan entre sí. Primero son de color verde, después rojas y cuando están maduras, adquieren un color negro brillante. Existen más de 300 especies de mora, creciendo silvestres en zonas, llanuras, montañas, claros de bosques, aunque sólo nueve de estas especies tienen valor comercial.

Es un fruto pequeño (2 cm), redondo y compuesto por pequeños glóbulos que contienen en su interior una semilla diminuta. Su sabor cuando está maduro es dulce con matices ácidos

Son frutas de bajo valor calórico, debido a su escaso aporte de hidratos de carbono. Aunque si son una buena fuente de fibra, que mejora el tránsito intestinal, de potasio, hierro y calcio. Sin embargo, lo que caracteriza a estas frutas es su abundancia en pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante. Estas propiedades pueden dar lugar a efectos fisiológicos muy diversos; efectos antiinflamatorios y acción antibacteriana de los antocianos, entre otros. Estas frutas además contienen otros antioxidantes como la vitamina C.

La ingesta dietética de estas sustancias potencia nuestro sistema inmunológico o de defensas del organismo y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer.



Figura 1.21. Mora silvestre (*Morus nigra*), y distribución geográfica mundial de este fruto. (www.consumer.com)

### 1.3.9.- Cereza (Cherry)

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. Sus frutos son las cerezas.

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).

En España, las variedades dulces cultivadas tradicionalmente son: Napoleón, muy difundida en España y muy estimada como fruta para mesa y para la elaboración de confituras; Ambrunesa, muy tardía, de consistencia crujiente y sabor dulce; Burlat, una variedad de fruto grueso, pulpa roja, firme, jugosa y azucarada, de maduración muy precoz y medianamente resistente al agrietado ([www.consumer.com](http://www.consumer.com)).

Esta fruta es originaria del mar Negro y del mar Caspio, difundiéndose después hacia Europa y Asia, a través de aves y migraciones humanas. Hoy en día, se cultiva cereza en numerosas regiones y países del mundo con climas templados; Rusia, EEUU, Alemania, Italia, Francia y España, entre otros.

Esta fruta es rica en hidratos de carbono, en su mayoría fructosa, aunque en comparación con otras frutas podemos decir que su aporte calórico no es muy alto.

Aporta cantidades significativas de fibra y pequeñas cantidades de provitamina A y vitamina C. Aunque lo que caracteriza a esta fruta es su elevado contenido en flavonoides (sobre todo antocianos), y ácido elágico como polifenol, ambos excelentes compuestos antioxidantes.



Figura 1.22. Frutos del cerezo y la distribución geográfica mundial del cultivo. ([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

### 1.3.10.- Uva tinta (Purple grape)

La uva (*Vitis vinifera L.*) 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 púrpuro dependiendo de las variedades. Su pulpa es jugosa y dulzona.

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](http://www.consumer.es)).

El valor nutricional de la uva tinta 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.

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.

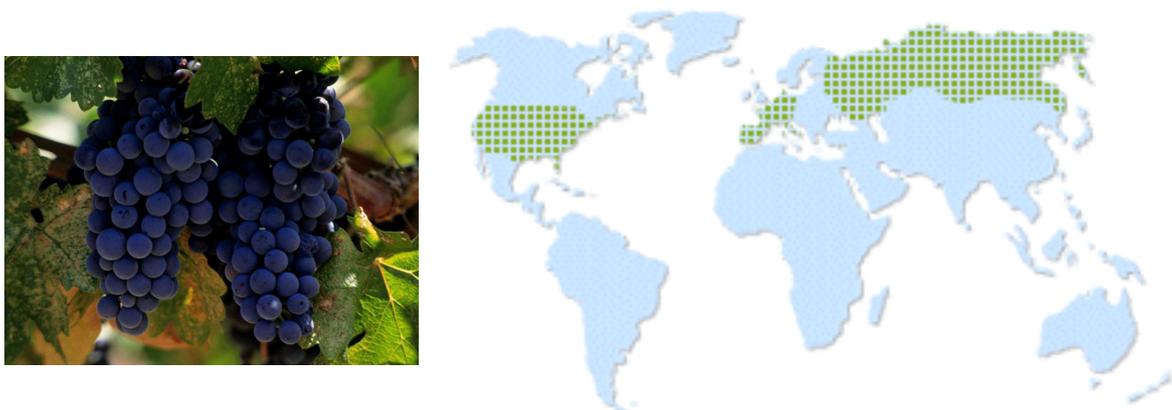


Figura 1.23. Racimo de uva tinta y la distribución geográfica mundial del cultivo. ([www.consumer.com](http://www.consumer.com))

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, los métodos analíticos desarrollados en el análisis de polifenoles, la importancia comercial del mercado de zumos y bebidas de frutas, el interés de los consumidores por conocer la composición de los productos que consumen con la pretensión de llevar una dieta saludable y la necesidad de un correcto etiquetado de los productos comerciales; en el presente trabajo se plantea el análisis de polifenoles en productos comerciales elaborados a partir de frutas rojas y otras frutas.

Así se estudia la composición en polifenoles en zumos, smoothies y néctares de distintas marcas comerciales elaborados con las frutas anteriormente descritas.

## **CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

En relación al consumo de productos alimenticios, en los últimos años se viene observando un cambio de actitud del consumidor que se inclina hacia una preocupación en la calidad de los alimentos consumidos.

De hecho, este cambio se caracteriza por la aparición del trinomio Alimentación-Salud-Bienestar, pasando de la búsqueda de un estado de mantenimiento de la salud (supervivencia), a la búsqueda de un estado óptimo de salud con garantía de mantenimiento a largo plazo (longevidad). Como consecuencia, se produce un cambio en los hábitos dietéticos de los consumidores, que demandan productos saludables ricos en compuestos beneficiosos (funcionales) (Rivas Gonzalo y García Alonso, 2002).

Por ello, la industria alimentaria ofrece alimentos con compuestos que presentan propiedades biológicas sólidamente establecidas, como por ejemplo los zumos de frutas rojas con actividad antioxidante. En este momento, el consumidor asocia un potencial beneficio para la salud al consumo de estos zumos.

Los zumos de frutas rojas son productos de gran interés, por sus propiedades beneficiosas para la salud, debido a la presencia de polifenoles en su composición, entre los que se incluyen las antocianinas que son las responsables del color rojo.

Debido al aumento de valor económico de estos productos por poseer propiedades beneficiosas para la salud, se produce una situación propicia para incluir frutas de menor coste en estas bebidas y tener lugar fraudes alimenticios o adulteraciones mezclando frutas del zumo original con frutas de menor coste. Para informar y proteger al consumidor, es importante garantizar tanto la autenticidad, como la calidad de las bebidas de frutos rojos (Obón *et al.*, 2011).

Se han desarrollado varios métodos para determinar la capacidad antioxidante de frutas y verduras, pero los resultados generalmente dependen del tipo de producto y del método utilizado (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado en la introducción existen varios métodos descritos, colorimétricos y cromatográficos. En este trabajo se van a utilizar ambos tipos de métodos, centrando el estudio en la preparación de la muestra con el fin de determinar todos los polifenoles presentes.

### Objetivos

En este proyecto, se pretende determinar cualitativa y cuantitativamente, los polifenoles presentes en bebidas comerciales de frutas rojas para conocer así, la capacidad antioxidante de las mismas. Para ello, el objetivo fundamental de este trabajo es optimizar el método de preparación de las muestras y extracción de polifenoles, a fin de llegar a una determinación precisa que permita informar de la composición y autenticar las bebidas de frutas analizadas.

Así el **objetivo general** ha sido el análisis de bebidas comerciales multifrutas: zumos, néctares y smoothies, para determinar su contenido en polifenoles totales (TP) y en polifenoles totales individuales (TIP). El estudio se ha centrado en el procedimiento de preparación de la muestra para la correcta cuantificación de los polifenoles presentes.

Este objetivo general se ha concretado en los siguientes **objetivos parciales**:

1. Caracterizar y optimizar la extracción de polifenoles presentes en zumos, zumos concentrados y néctares de una sola fruta, que utiliza la industria de zumos como materias primas para la elaboración de bebidas de frutas.
2. Caracterizar y optimizar la extracción de polifenoles presentes en bebidas multifruta comerciales, zumos, néctares y smoothies, de frutas rojas y otras frutas.
3. Determinación de polifenoles totales (TP) en zumos, néctares y smoothies, por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.
4. Análisis cualitativo de polifenoles en zumos y smoothies por cromatografía líquida de alta presión, UHPLC-PDA-Fluo.
5. Determinación y cuantificación de polifenoles totales individuales (TIP) en zumos y smoothies por UHPLC-PDA-Fluo.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- MATERIALES

#### 3.1.1.- Zumos, zumos concentrados y purés de una sola fruta.

En este proyecto se han estudiado 10 zumos de frutas individuales: naranja, manzana y plátano; y siete frutas rojas: fresa, frambuesa, arándano, cereza, grosella, mora y uva tinta. El material de partida en el que se encontraban estas frutas ha sido en forma de puré, zumo concentrado o zumo. Éstas son las materias primas habituales de las que se abastece la industria para la elaboración de zumos y bebidas de fruta. La Tabla 3.1 recoge las características de los materiales analizados.

Tabla 3.1. Purés, zumos concentrados y zumos de una sola fruta analizados.

ESPECIFICACIONES	FRUTA	CASA COMERCIAL	IMAGEN
PURÉ	<b>Fresa</b> (Strawberry) <i>Fragaria vesca L.</i>	HUDISA (Huelva Desarrollo Industrial, S.A., Lepe)	
PURÉ	<b>Frambuesa</b> (Raspberry) <i>Rubus idaeus L.</i>	HUDISA (Huelva Desarrollo Industrial, S.A., Lepe)	
ZUMO CONCENTRADO	<b>Arándano europeo</b> (European Cranberry) <i>Vaccinium oxycoccus L.</i>	Grünewald Fruchtsaft	
ZUMO CONCENTRADO	<b>Cereza agria</b> (Sour Cherry) <i>Prunus cerasus L.</i>	Mondi Food.	
ZUMO CONCENTRADO	<b>Grosella negra</b> (Blackcurrant) <i>Ribes nigrum</i>	J. García Carrión S.A.	

<b>ZUMO CONCENTRADO</b>	<b>Mora</b> (Black mulberry) <i>Morus nigra</i>	J. García Carrión S.A.	
<b>ZUMO CONCENTRADO</b>	<b>Uva tinta</b> (Purple grape) <i>Vitis vinifera L.</i>	J. García Carrión S.A.	
<b>ZUMO</b>	<b>Manzana</b> (Apple) <i>Malus Domestica L.</i>	AMC. Para CARREFOUR	
<b>ZUMO</b>	<b>Naranja</b> (Orange) <i>Citrus Sinensis L.</i>	Don Simón.	
<b>ZUMO</b>	<b>Plátano</b> (Banana) <i>Musa paradisiaca L.</i>	J. García Carrión S.A. para Dia	



Figura 3.1. Variedad de frutas rojas

### 3.1.2.- *Bebidas multifrutas*

En este trabajo, se han estudiado nueve bebidas multifruta comerciales, adquiridas en supermercados locales y fabricadas utilizando parte de las frutas indicadas en la tabla anterior. Dentro de las nueve muestras analizadas, se encuentran dos zumos, tres néctares y cuatro smoothies. A continuación, se detallan sus características con una

descripción de su composición, se indica el contenido en zumo y la marca que las comercializa.

### **ZUMOS**

- 1) ZUMO ANTIOXIDANTE EXPRIMIDO. EROSKI. Con un contenido en zumo del 100% y fabricado para Eroski por AMC grupo de alimentación S.A.

Composición: Uva tinta (73%), Frambuesa (20%), Cereza (7%).

- 2) ZUMO DE UVAS ROJAS Y FRUTOS DEL BOSQUE. HIPERCOR. Con un contenido en fruta del 100% y fabricado para Hipercor por AMC grupo de alimentación.

Composición: Uva tinta (48), Manzana (16%), Frambuesa (18%), Fresa (18%).

### **NECTARES**

- 1) NECTAR DON SIMON ANTIOXIDANTE DE NARANJA-MORA-UVA-FRAMBUESA. Con un contenido mínimo en fruta del 60%. Bebida de zumo de frutas con extractos antioxidantes. Elaborado por JGC S.A.

Composición: Zumo de frutas a base de concentrado 60% (Naranja, Mora, Uva y Frambuesa), agua, azúcar, extracto de zanahoria y extracto de frutas rojas.

- 2) NÉCTAR FRUTAS DEL BOSQUE. EROSKI. Con un contenido mínimo en zumo del 50% y fabricado para Eroski por AMC grupo de alimentación.

Composición: Zumo a base de concentrado 50% (Zumo de Uva, Fresa, Frambuesa, Mora y Cereza en proporciones variables), agua, puré de fresa (10%), jarabe de glucosa-fructosa, corrector de acidez: ácido cítrico, antioxidante: vitamina C.

- 3) NECTAR DE ZUMO DE FRUTAS CON ANTIOXIDANTES NATURALES DE LA FRUTA. EROSKI. Con un contenido mínimo en zumo del 50%. Néctar de uva tinta, frambuesa y cereza parcialmente a base de concentrados. Fabricado para Eroski por AMC grupo de alimentación, S.A.

Composición: Zumo de uva tinta a base de concentrado (42%), agua, jarabe de glucosa-fructosa, puré de frambuesa (5%), zumo de cereza a base de concentrado (3%), corrector de acidez: ácido cítrico, antioxidante: ácido ascórbico.

### **SMOOTHIES**

- 1) SMOOTHIE MANZANA Y FRUTAS DEL BOSQUE. HIPERCOR. Con un contenido en fruta del 100%. Fruta licuada, sin colorantes ni conservantes ni azúcares añadidos. No procede de concentrado. Elaborado para Hipercor por AMC grupo de alimentación.

Composición: Manzana (40%), Frambuesa (20%), Fresa (18%), Plátano (10%), Arándano (7%) y Naranja (5%).

- 2) SMOOTHIE MACEDONIA. HIPERCOR. Con un contenido en fruta del 100%. Fruta licuada, sin colorantes, ni conservantes, ni azúcares añadidos. No procede de concentrado. Elaborado para Hipercor por AMC grupo de alimentación.

Composición: Manzana (40%), Fresa (35%), Plátano (20%), Naranja (5%)

- 3) SMOOTHIE EROSKI. Con un 100% de contenido en fruta natural licuada. Mezcla de purés y zumos de frutas. Sin azúcares añadidos. Fabricado en Europa para Eroski por AMC grupo de alimentación, S.A.

Composición: Zumo de manzana, frambuesa (18%), fresa (15%), puré de arándano, plátano (14%) y zumo de naranja.

- 4) SMOOTHIE BEBEFRUTA PLÁTANO Y FRUTAS ROJAS. HACENDADO. Contiene un 100% de fruta. Sólo contiene azúcares naturalmente presentes. Está fabricado por DAFSA para Hacendado.

Composición: Puré de 3 manzanas, 9 fresas, 2 moras, 3/2 cereza, 5/2 grosellas rojas, 8 uva blanca, 1/2 plátano

En la Tabla 3.2 se resumen las características de las nueve bebidas de fruta comerciales analizadas.

Tabla 3.2. Bebidas multifruta: smoothies, zumos y néctares estudiados

<b><u>Antioxidante exprimido. Eroski</u></b>	<b>Zumo 1 (100%)</b>
Zumo de uva tinta (73%), puré de frambuesa (20%), puré de cereza (7%).	
<b><u>Zumo de uva roja y frutas del bosque. Hipercor</u></b>	<b>Zumo 2 (100%)</b>
Zumo de manzana (16%), zumo de uva tinta (48%), puré de frambuesa (18%), y puré de fresa (18%).	
<b><u>Don Simón antioxidante de naranja-mora-uva-frambuesa</u></b>	<b>Néctar 1 (60%)</b>
Zumo de frutas a base de concentrado 60%(naranja, mora, uva y frambuesa) y extracto de frutas rojas.	
<b><u>Néctar frutas del bosque. Eroski</u></b>	<b>Néctar 2 (50%)</b>
Zumo de uva, fresa, frambuesa, mora y cereza a base de concentrados en proporciones variables, y un 10% de puré de fresa.	
<b><u>Néctar de zumo de frutas con antioxidantes naturales de la fruta. Eroski</u></b>	<b>Néctar 3 (50%)</b>
Zumo de uva tinta a base de concentrado (42%), puré de frambuesa (5%), zumo de cereza a base de concentrado (3%)	
<b><u>Smoothie manzana y frutas del bosque. Hipercor</u></b>	<b>Smoothie 1</b>
Naranja (5%), manzana (40%), fresa (18%), arándano (7%), Frambuesa (20%) y plátano (10%)	

<b><u>Smoothie macedonia. Hipercor</u></b>	<b>Smoothie 2</b>
Naranja (5%), manzana (40%), fresa (35%), plátano (20%).	
<b><u>Smoothie Eroski</u></b>	<b>Smoothie 3</b>
Manzana, frambuesa (18%), fresa (15%), plátano (14%), arándano y naranja.	
<b><u>Smoothie bebefruta plátano y frutas rojas. Hacendado</u></b>	<b>Smoothie 4</b>
9 fresas, ½ plátano, 2 moras, 1 y ½ cerezas, 3 manzanas, 2 y ½ grosellas rojas y 8 uvas.	

### 3.1.3.- Productos químicos utilizados

En los análisis realizados por UHPLC se utilizaron los siguientes compuestos para la preparación de las fases móviles:

- ❖ **Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN)** (Acetonitrile for HPLC-Super Gradient). Procedente de los laboratorios Panreac (Barcelona, España).
- ❖ **Ácido trifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOH)** (Trifluoroacetic acid for synthesis) Procedente de Sigma-Aldrich (Madrid, España)
- ❖ **Agua purificada** en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Consistiendo cada una de las fases en:

- **Fase móvil A:** Agua ultrapura y ácido trifluoroacético (99,5v/0,5v)
- **Fase móvil B:** Acetonitrilo, agua ultrapura y ácido trifluoroacético (50v/49,5v/0,5v)

Para la preparación de muestras se han utilizado agua purificada, y otros productos químicos como etanol y metanol (reactivo análisis) de Panreac, España.

Para el análisis de los fenoles totales por espectrofotometría, se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteau Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y el ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico "ácido gálico" (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) de la casa comercial Fluka analytical (Alemania), como reactivo de referencia para calibrar el método.

Para la cuantificación de los Polifenoles Individuales Totales por UHPLC, se utilizaron los siguientes compuestos estándar como referencia dentro de cada grupo de compuestos fenólicos (Díaz García *et al.*, 2013) que se enumeran a continuación.

Para los ácidos hidroxibenzoicos se utilizó ácido gálico (ensayo por HPLC al 99.0%). Para los ácidos hidroxicinámicos se utilizó ácido p-cumárico (ensayo por HPLC al 98.0%). Para los flavan-3-oles monoméricos se utilizó (+)-catequina hidrato (ensayo por HPLC al 99.0%). Para la cuantificación de los estilbenos se utilizó resveratrol (ensayo al 99.0%), suministrados por Sigma–Aldrich (Madrid, España).

El compuesto estándar para cuantificar las antocianinas fue la pelargonidina 3-O-glucósido (Callistephin chloride). Para los flavonoles, se utilizó hesperidina (ensayo por HPLC al 98.5%). Para los flavolones se utilizó quercetina 3-O-glucósido (ensayo por HPLC al 90.0%), para las dihidrochalconas el compuesto estándar fue floridzina (ensayo por HPLC al 95.0%). Estos compuestos estándar fueron suministrados por Extrasynthèse (Genay, Francia).

## 3.2.- MÉTODOS

### ***3.2.1 - Optimización del método de extracción de polifenoles.***

#### ***3.2.1.1. Selección de disolvente óptimo para la extracción de polifenoles***

Para conseguir la máxima exactitud y precisión en la determinación de polifenoles se estudia el procedimiento de extracción de los mismos. Así, se realizaron extracciones a todos los zumos individuales con 3 disolventes distintos: agua, etanol y metanol, para determinar cuál resulta más eficaz en la extracción.

Se realizaron dos series de experimentos con todas las frutas individuales y los tres disolventes en presencia y ausencia de ácido clorhídrico. Se añadió un 10% de HCl 0,01 N al disolvente, es decir, en una de las series se utilizó un volumen total de disolvente de 1,5 ml, mientras que en las otras series se utilizó un disolvente formado por 1,35 ml de agua, etanol o metanol, y 0,15 ml de HCl 0,01N.

Se realizó una re-extracción para cada una de las muestras y con cada uno de los disolventes para averiguar si resulta conveniente realizar una 2º extracción además de la 1º, que permita extraer más polifenoles y obtener así una mayor exactitud en su determinación. Cada re-extracción suponía centrifugar la muestra y añadir el disolvente sobre los sólidos precipitados.

La cantidad de polifenoles extraída se determinó por espectrofotometría midiendo absorbancia en un espectrofotómetro Agilent, Modelo 8453, de la empresa Waldbronn (Alemania). La Figura 3.2 muestra una imagen del aparato. Se tomaron valores de absorbancia a longitudes de onda de 280 nm, que permite detectar polifenoles en general, y a 520 nm para la detección de antocianinas.



Figura 3.2. Espectrofotómetro Agilent, Modelo 8453 (Waldbronn, Alemania).

El procedimiento empleado en la selección del disolvente fue:

- Añadir 1,5 ml de muestra de zumo de fruta en un tubo eppendorf de 2 ml.
- Centrifugar en una centrífuga de eppendorf (modelo Z383K Hermle, Wehingen, Alemania) a 13.000 rpm durante 1 h, para eliminar los sólidos en suspensión.
- Separar el sobrenadante del precipitado.
- Añadir al precipitado 1,5 ml del disolvente correspondiente: agua, etanol o metanol en presencia y ausencia de 0,15 ml de ácido clorhídrico (0,01 N).
- Resuspender el precipitado en el disolvente añadido mezclando por agitación con un agitador de tubos.
- Centrifugar nuevamente en la centrífuga de eppendorf durante 1 hora a 13.000 rpm.
- Separar el sobrenadante y realizar una re-extracción utilizando el mismo procedimiento
- Se dispone de los 3 sobrenadantes de cada ensayo (zumo, 1<sup>er</sup> extracto y 2<sup>o</sup> extracto). Se procede a medir la absorbancia de cada una de las muestras (6 por cada zumo) en el espectrofotómetro a 280 nm (polifenoles) y a 520 nm (antocianos).

### 3.2.1.2. Optimización del procedimiento de extracción de polifenoles

Una vez conocido el mejor disolvente para extraer los polifenoles, se procede a estudiar procedimiento de extracción que permita obtener el máximo de polifenoles, para un correcto análisis de las muestras.

Para este estudio se utiliza una sola muestra de los productos comerciales que se van a analizar. Se selecciona el Smoothie de manzana y frutas del bosque (100% fruta) de Hipercor, fabricado por AMC (Smoothie nº1, Tabla 3.1). Se opta por utilizar un smoothie porque al tener más sólidos que un zumo, tiene una mayor cantidad de polifenoles retenidos en la pulpa, o restos de material vegetal. El motivo de utilizar este smoothie de los 4 estudiados en este proyecto, es debido a que esta muestra está compuesta de una mayor variedad de frutas y resulta más representativa para el resto de bebidas que se analizarán por el procedimiento escogido.

Con esta muestra, se ensayan los siguientes protocolos de extracción:

**Protocolo nº1:** extracción en agua:HCl, reextracción en metanol:HCl

- Añadir 1,5 ml de muestra de zumo de fruta en un tubo eppendorf.
- Centrifugar en la centrífuga de eppendorf, anteriormente referenciada, a 13.000 rpm durante 1 h.
- Separar el sobrenadante del precipitado (sobrenadante 1)
- Extraer del precipitado, con 1,5 ml de agua:HCl agitando 5 min en agitador de tubos (1º extracción).
- Centrifugar en las mismas condiciones anteriores y retirar de nuevo el sobrenadante (Sobrenadante 2).
- Reextraer por segunda vez del precipitado, añadiendo 1,5 ml de metanol:HCl y agitando 5 min en agitador de tubos, como se hace en la primera extracción.
- Centrifugar nuevamente durante 1 hora a 13.000 rpm y a continuación se vuelve a retirar el sobrenadante obtenido (Sobrenadante 3).
- Mezclar los Sobrenadante 1, 2 y 3 (se asume un volumen final próximo a 4,5 ml, la suma de los tres sobrenadantes).
- Analizar en espectrofotómetro a 520 nm (antocianos) y a 280 nm (polifenoles).

**Protocolo nº2:** extracción en metanol:HCl, reextracción en agua:HCl

- Añadir 1,5 ml de muestra de zumo de fruta en un tubo eppendorf.
- Centrifugar en la centrífuga de eppendorf a 13.000 rpm durante 1 h.
- Separar el sobrenadante del precipitado (sobrenadante 1)
- Extraer del precipitado, con 1,5 ml de metanol:HCl agitando 5 min en agitador de tubos (1º extracción).
- Centrifugar en las mismas condiciones anteriores y retirar de nuevo el sobrenadante (Sobrenadante 2).
- Reextraer por segunda vez del precipitado, añadiendo 1,5 ml de agua:HCl y agitando 5 min en agitador de tubos, como se hace en la primera extracción.

- Centrifugar nuevamente durante 1 hora a 13.000 rpm y a continuación se vuelve a retirar el sobrenadante obtenido (Sobrenadante 3).
- Mezclar los Sobrenadantes 1, 2 y 3 (se asume un volumen final próximo a 4,5 ml, la suma de los tres sobrenadantes).
- Analizar en espectrofotómetro a 520 nm (antocianos) y a 280 nm (polifenoles).

**Protocolo nº3:** extracción en agua:HCl, reextracción en metanol:HCl, en la mitad de volumen:

- Añadir 1,5 ml de muestra de zumo de fruta en un tubo eppendorf.
- Centrifugar en la centrífuga de eppendorf a 13.000 rpm durante 1 h.
- Separar el sobrenadante del precipitado (sobrenadante 1)
- Extraer del precipitado, con 0,75 ml de agua:HCl agitando 5 min en agitador de tubos (1º extracción).
- Centrifugar en las mismas condiciones anteriores y retirar de nuevo el sobrenadante (Sobrenadante 2).
- Reextraer por segunda vez del precipitado, añadiendo 0,75 ml de metanol-HCl y agitando 5 min en agitador de tubos, como se hace en la primera extracción.
- Centrifugar nuevamente durante 1 hora a 13.000 rpm y a continuación se vuelve a retirar el sobrenadante obtenido (Sobrenadante 3).
- Mezclar los Sobrenadantes 1, 2 y 3 (se asume un volumen final próximo a 3 ml, la suma de los tres sobrenadantes).
- Analizar en espectrofotómetro a 520 nm (antocianos) y a 280 nm (polifenoles).

**Protocolo nº4:** extracción en metanol:HCl + agua:HCl.

- Añadir 1,5 ml de muestra de zumo de fruta en un tubo eppendorf.
- Centrifugar en la centrífuga de eppendorf a 13.000 rpm durante 1h.
- Separar el sobrenadante del precipitado (sobrenadante 1)
- Extraer del precipitado, con 0,785 ml de metanol:HCl + 0,75 ml de agua:HCl, agitando 5 min en agitador de tubos.
- Centrifugar en las mismas condiciones anteriores y retirar de nuevo el sobrenadante (Sobrenadante 2).
- Mezclar los Sobrenadante 1 y 2 (se asume un volumen final próximo a 3 ml, la suma de los tres sobrenadantes).
- Analizar en espectrofotómetro a 520 nm (antocianos) y a 280 nm (otros polifenoles).

Se determina así cuál es el mejor procedimiento de extracción de polifenoles atendiendo a los valores de absorbancia obtenidos.

### **3.2.2 - Caracterización general de las muestras**

Tanto para la caracterización de cada uno de los zumos de una sola fruta (zumos, zumos concentrados y purés), como para la caracterización de las bebidas multifrutas comerciales estudiadas (zumos, néctares y smoothies), se determinaron los siguientes parámetros empleando los métodos explicados a continuación:

#### 3.2.2.1. Determinación de los grados Brix

Los grados Brix se cuantificaron con un refractómetro manual que se muestra en la Figura 3.3. Éste se calibra con agua destilada a 0%. Encima de la superficie se pone una gota de la muestra a analizar se lee directamente el valor de grados Brix de la misma en una escala de 0 a 32.



Figura 3.3. Refractómetro de mano modelo Zeiss Opton (Jana, Alemania).

#### 3.2.2.2. Determinación de pH

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidronio  $[H_3O^+]$  presentes en determinadas sustancias.

La escala de pH va de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7 y alcalinas las que tienen pH mayores a 7. El pH igual a 7 indica que la disolución es neutra (en la disolución, el disolvente es agua).

El pH de una disolución se mide con rapidez y exactitud por medio de un pH metro. Éste se compone de un par de electrodos conectados con un dispositivo capaz de medir pequeñas diferencias de potencial, del orden de los milivoltios.

Cuando los electrodos se introducen en una disolución se genera una diferencia de potencial, que varía con el pH. El pH metro lee esta diferencia de potencial la cual se expresa como una lectura de pH. Se utiliza un pH-metro de la casa Crison, que permite

obtener medidas con una precisión de 0,01 unidades de pH. Una imagen del mismo se muestra en la Figura 3.4.



Figura 3.4 pH-metro GLP-22 de la casa comercial Crison (Barcelona, España).

### 3.2.2.3. Determinación de Acidez Valorable

La acidez valorable informa del contenido total de ácido de la muestra. Se ha valorado con hidróxido sódico y fenolftaleína como indicador. En primer lugar se prepararon los reactivos: hidróxido sódico 0,01 M y biftalato potásico 0,01 M.

Posteriormente se realiza la factorización del hidróxido sódico, para ello se añadió NaOH en la bureta hasta llenarla y en un vaso se añadieron 20 ml de biftalato potásico 0,01M con unas gotas de fenolftaleína. En el vaso fue cayendo el NaOH hasta que el biftalato del vaso viró a un color rosa. Esto nos indica que hemos ajustado el pH hasta 8,1. Se mide el NaOH gastado con la bureta y se realiza la siguiente operación:

$$\text{NaOH (N)} = (20\text{ml} \cdot 0,01\text{M}) / \text{ml de NaOH gastados}$$

Al realizar esta operación obtenemos el valor real de la normalidad del NaOH. Una vez realizada la factorización ya podemos proceder a la realización de la determinación de la acidez valorable. Para realizarla seguimos los siguientes pasos:

1. Llenamos la bureta de NaOH.
2. Añadimos en un vaso 1 ml de zumo, 39 ml de agua y unas gotas de fenolftaleína.
3. Vamos añadiendo NaOH al vaso que contiene el zumo hasta que el zumo vire a color rosa.
4. Una vez que ha virado se mide con la bureta el volumen de NaOH gastado.

5. A continuación se calcula la acidez valorable con la siguiente fórmula.

La acidez valorable,  $C_H^+$  se calcula con la siguiente fórmula:

$$C_H^+ = (V_{NaOH} * N) / (V_{zumo} * \rho_{zumo}) = \text{meq/kg}$$

Donde:

- $V_{NaOH}$ : es el volumen, en mililitros, de hidróxido sódico usado para la determinación de la acidez valorable.
- $V_{zumo}$ : es el volumen, en litros, de zumo utilizado, que es de 1 ml (el resto hasta 40 ml, es agua).
- $C$ : es la Normalidad, en moles por litro, de la solución de hidróxido sódico.
- $\rho_{zumo}$ : Es la densidad del zumo (kg/l)

Por lo tanto, ésta se expresa como moles equivalentes de NaOH por kg de bebida. Para ello, resumiendo se puede afirmar que, se mide el volumen de hidróxido sódico utilizado para ajustar el pH de 1 ml de zumo hasta 8,1. Con este dato, la normalidad del NaOH, y conociendo la densidad de la muestra se obtiene la acidez valorable de cada uno de los preparados.

### **3.2.3- Análisis de polifenoles.**

#### 3.2.3.1. Análisis de polifenoles totales (TP) por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

La determinación de compuestos fenólicos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu según el método descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós, 1999, Se emplearon 0,5 mL de muestra de zumo al que se añadieron 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces en agua.

Tras un intervalo de tiempo de 0,5 a 8 min, se añadieron 2 mL de  $Na_2CO_3$  (75 g/L). La muestra se incubó durante 5 min a 50 °C y se enfrió rápidamente. Se midió la absorbancia a 760 nm frente a un blanco con agua. Las medidas cuantitativas se refieren a una recta patrón realizada con ácido gálico.

El valor de polifenoles total (TP) se expresó en mg GAE (Equivalentes de Ácido Gálico) por 100 mL de zumo. El ácido gálico se seleccionó como referencia de la medida de polifenoles totales porque se encuentra a alta concentración en frutas y verduras y por ser el habitualmente utilizado en la determinación de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

### 3.2.3.2. Medidas por UHPLC de Polifenoles Individuales Totales

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica analítica más utilizada en investigación para la separación de pigmentos, por presentar ciertas ventajas como su idoneidad para su separación, su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, su alta sensibilidad, y sobre todo la versatilidad de condiciones con las que se puede trabajar que permiten el análisis de un gran número de compuestos presentes en una misma muestra. Así es una técnica de gran aplicación en la industria alimentaria donde se analizan muchas muestras con matrices complejas como es el caso de los zumos de frutas.

La técnica analítica que permite una separación de los componentes presentes en las muestras analizadas, se basa en la distribución de dichos componentes entre dos fases líquidas, una estacionaria unida covalentemente a la columna y otra móvil que fluye a través de la columna.

Al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria se logra una mayor eficiencia en las separaciones, pero necesita utilizar altas presiones para que fluya la fase móvil.

Un equipo de cromatografía líquida de alta resolución está compuesto por cuatro elementos básicos:

- 1) Un sistema de impulsión que sea capaz de impulsar y controlar la fase móvil. El equipo dispone de una bomba que impulsa 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 de acero inoxidable 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.

Existe un horno termostático que permite la mayor estabilidad en las separaciones, manteniendo la temperatura de la columna constante. De esta forma, permite reproducir las separaciones realizadas logrando mayor afinidad entre una medida y su reproducción.

- 3) Un inyector en el cuál se insertan las muestras a analizar, el cuál inyecta una cantidad fija y determinada de una muestra en el sistema, asegurando así la exactitud y repetitividad de las medidas
- 4) Un sistema de detección que informa al usuario del resultado de la separación, de la presencia de especies que abandonan la columna, produciendo señales o respuestas analíticas para cada caso. Los detectores pueden utilizarse

simultáneamente colocándolos en serie. Además también consta de un sistema de adquisición de datos, tarea de la cual se encargan los ordenadores asociados al cromatógrafo, 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.

En este trabajo se ha utilizado un UHPLC con una columna C-18 de fase reversa, que contiene una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada.

La diferencia en la polaridad de cada una de las fases permite que el tiempo de retención de cada compuesto en la columna sea mayor para las moléculas de naturaleza apolar y que éste sea menor en las moléculas de carácter polar (que fluyen más rápidamente por la columna).

La metodología en la que se basa esta técnica, tiene su fundamento en las interacciones hidrofóbicas resultantes de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar.

La fuerza de atracción del compuesto a la fase estacionaria se corresponde con la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente.

El efecto hidrofóbico producido se corresponde con la minimización de la interfase "Compuesto – Disolvente polar", y por ello con la adición de un disolvente apolar a la fase móvil, este efecto hidrofóbico disminuye. Esto produce que el compuesto se mueva por la columna y fluya, aunque siempre debe tenerse en cuenta que las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención.

La hidrofobicidad de la fase móvil se asocia, de forma genérica, con un tiempo de retención mayor, por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca cierta polaridad, confiriéndole a la fase móvil carácter hidrofóbico con respecto a la fase estacionaria y tiende a aumentar el tiempo de retención.

#### Equipo y condiciones de análisis por UHPLC

En el presente trabajo análisis se realizaron con un UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) de Agilent Technologies (Alemania), compuesto por una bomba binaria (Binary Pump serie 1200), un detector de fotodiodos (PDA) con detección de longitud de onda múltiple (G1315C/D y G1365C/D serie 1200), un compartimento de termostatzado de la columna, un detector de fluorescencia (G1321A) y un inyector automático preparativo y estándar. Todos ellos de la casa Agilent (Alemania). Una imagen del equipo se muestra en la Figura 3.5.



Figura 3.5. UHPLC, Agilent

El análisis de datos obtenidos por UHPLC se realizó con el sistema de datos de Agilent ChemStation for LC & LC/MS Systems.

La columna empleada fue una Zorbax SB-C18 (80 Å poro, 180 m<sup>2</sup>/g, carbón load: 10%, estable a pH < 2). (ref: 880975-902), con un tamaño de partícula de 5 µm y de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de la casa Agilent (USA).

El método empleado se basa en el empleo de un UHPLC con detección de PDA y fluorescencia simultáneamente. Ha sido modificado a partir del método IFU nº 71 de 1998 para obtener no solo el perfil de antocianos sino también el perfil de otros grupos de polifenoles.

Las condiciones óptimas de análisis de este método por UHPLC-PDA-Fluorescencia fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua ultrapura/Ácido trifluoroacético (99,5v/0,5v).
- Fase móvil B: Agua ultrapura/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5v/50v/0,5v).
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Volumen de inyección: 2 µL de cada muestra.
- Detección: por PDA a unas longitudes de onda de 260, 280, 320, 360 y 520 nm, y por fluorescencia a unas condiciones de excitación de 290 nm y emisión de 350 nm.
- El gradiente de elución se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Gradiente de elución del método UHPLC-PDA-Fluorescencia.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	92	8
1,2	92	8
14	82	18
28	68	32
34	44,4	60
38,8	44,4	100
39,2	92	100
40	92	8

Como estándar interno se empleó pelargonidina 3-O-glucósido, por lo que se realizaron los análisis de cada muestra con y sin adición del estándar interno. En el primer análisis se realizó la inyección simultánea de 2  $\mu$ L de muestra de zumo y 2  $\mu$ L del patrón estándar (pelargonidina 3-O-glucósido) a una concentración de 0,05 mg/mL con la finalidad de obtener el tiempo de retención relativo de cada uno de los compuestos respecto al del patrón estándar.

En un segundo análisis, solo se inyectaron 2  $\mu$ L de muestra. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y su tiempo de retención y área de pico fue obtenida como la media de todos los análisis.

Los diferentes compuestos fenólicos se identificaron en el cromatograma según el tiempo de retención de los compuestos puros, las características de UV-Visible o espectros de fluorescencia, su orden de elución y la comparación con los datos de la bibliografía.

Los polifenoles se clasificaron en distintos grupos seleccionando un compuesto como estándar dentro de cada grupo, la cuantificación se realizó por comparación entre los valores de área obtenidos para los componentes de cada zumo de fruta analizado y el área del patrón seleccionado como estándar para cada grupo del polifenoles como se describe en Díaz-García *et al.*, 2013.

Así, los cálculos de Polifenoles Individuales Totales (Total Individual Polyphenol, TIP) se realizó de la siguiente manera: se sumaron las áreas que corresponden a cada compuesto dentro de cada uno de los grupos de polifenoles en su longitud de onda óptima, y este valor se usó para la cuantificación con la curva de la calibración realizada con el polifenol de referencia de cada grupo. Los valores se expresaron en mg/100 mL de zumo de fruta.

### 3.2.3.3. Preparación de muestras para su análisis por UHPLC

Todas las muestras comerciales de zumos, néctares y smoothies, a analizar se almacenaron a -20°C. Las muestras se dejan descongelar durante unos 30 min antes de su análisis. Una vez descongeladas se homogeneizan.

Se toman 10 ml de cada una de las muestras para su posterior análisis. En este trabajo, se han determinado los Polifenoles Individuales Totales presentes en el Smoothie 3 (Según la Tabla 3.2) "Smoothie Eroski", y el Zumo 1 (Según la Tabla 3.2) "Antioxidante exprimido, Eroski".

Se ha optado por analizar estas muestras, entre las 9 bebidas multifrutas presentadas, debido a que presentan mayor precipitado y un porcentaje de extracción de polifenoles en el método de Folin-Ciocalteu menor.

Ambas muestras de zumos se analizan por medio de 2 procedimientos diferentes: Uno con el zumo centrifugado en el cuál se analiza el sobrenadante del propio zumo, y otra realizando el procedimiento de mayor extracción de aquellos que se estudian en el experimento segundo.

Antes de introducir en el HPLC cada una de las muestras que se indican, éstas se filtran a través de un filtro de nylon de 0,45 µm, para eliminar posibles impurezas que puedan quedarse retenidas en la columna cromatográfica y obturarla.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este Capítulo se describen los experimentos realizados y los datos obtenidos con los que, finalmente se elaborarán las conclusiones de las hipótesis planteadas.

El objetivo es el análisis de polifenoles en bebidas comerciales de frutas rojas, dada, la importancia de estos compuestos por su capacidad antioxidante y la necesidad de indicar su contenido en el etiquetado de zumos y bebidas de frutas, según la normativa de algunos países.

Los métodos analíticos utilizados también permitirán autentificar el tipo de fruta o frutas que componen los zumos, néctares de frutas rojas y smoothies, disponibles en el mercado.

Para ello, inicialmente se analizan las frutas en forma de zumo, zumo concentrado y puré de fruta, de una sola fruta. La industria de zumos se abastece de estos materiales para preparar sus productos comerciales, que se presentan en el mercado como productos de una sola fruta o multifrutas.

Los polifenoles están presentes tanto en disolución, en los componentes líquidos de la materia prima, como asociados a los sólidos en suspensión, por lo que es necesario estudiar la extracción de los mismos para una correcta determinación.

Se obtiene así información básica que se aplicará en la segunda parte del proyecto en los análisis de las bebidas comerciales multifrutas, atendiendo a las frutas de partida que las componen. Se realiza el análisis tanto de polifenoles totales, por métodos colorimétricos, como de polifenoles totales individuales por técnicas de cromatografía líquida de alta presión.

Así, este Capítulo de Resultados y Discusión se divide en 3 bloques: inicialmente se estudia la extracción de polifenoles de zumos, zumos concentrados y purés de una sola fruta; en segundo lugar se realiza el análisis colorimétrico de los polifenoles totales en bebidas comerciales multifruta, y finalmente se aborda el análisis de polifenoles totales individuales por UHPLC que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de polifenoles en estos productos.

#### **4.1.- EXTRACCION Y ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN: ZUMOS, ZUMOS CONCENTRADOS Y PURÉS, DE UNA SOLA FRUTA.**

Se estudiaron un total de 10 frutas, dos en forma de zumo, seis como zumo concentrado y dos en forma de puré; como se indica en el apartado correspondiente de *Materiales y Métodos*. Previo al análisis de polifenoles en estas bebidas de una sólo fruta, se procedió a la caracterización las mismas determinando diferentes parámetros que los definen y diferencian.

##### ***4.1.1.-Características de los zumos, zumos concentrados y purés, de una sola fruta.***

En la caracterización de estos productos se determinaron:

- 1) El contenido en polifenoles, según los valores de absorbancia a las longitudes de onda propias de los polifenoles (520 nm para antocianinas y 280 nm para polifenoles en general).
- 2) El contenido de sólidos en suspensión, mediante la determinación del peso fresco del precipitado tras centrifugar.
- 3) Los valores de pH y los de sólidos solubles determinados por refractometría y expresados como °Brix.

##### ***- Contenido en polifenoles***

Aunque la determinación de polifenoles por absorbancia no es exacta, sí que da una idea del contenido relativo de estos compuestos en cada fruta. Para su determinación las muestras se centrifugaron y se midió el valor de absorbancia del sobrenadante frente a un blanco con agua.

En la Tabla 4.1, se muestran los datos de absorbancia de los sobrenadante de las muestras analizadas.

Así, con un análisis simple, se puede observar el nivel relativo de polifenoles presentes en cada una de las muestras.

En todas las Tablas mostradas en este punto, se incluye una columna con el tipo de bebida de la que se trata en cada caso, para tener constancia en todo momento de si se refiere a un puré, a un zumo concentrado o a un zumo. Estos resultados serán determinantes en la extracción de polifenoles a partir de los sólidos que presente cada muestra.

Tabla 4.1. Absorbancia del sobrenadante de los zumos, zumos concentrados y purés, de una sola fruta a 520 nm y 280 nm.

ZUMOS	Tipo de bebida	Absorbancia	
		520 nm	280 nm
Naranja	Zumo	0	31,01
Manzana	Zumo	0	27,17
Plátano	Zumo	0	34,30
Grosella	Zumo concentrado	<b>58,28</b>	<b>310,93</b>
Arándano	Zumo concentrado	21,12	<b>524,57</b>
Cereza	Zumo concentrado	27,77	213,74
Uva tinta	Zumo concentrado	10,64	107,34
Fresa	Puré	1,12	43,57
Mora	Puré	8,71	53,82
Frambuesa	Puré	4,43	24,42

En la Tabla 4.1, se aprecia en primer lugar la ausencia de antocianos en naranja, manzana y plátano, como es de esperar en estas frutas, carentes de coloración roja. También son estas muestras las que menor contenido en polifenoles tienen, junto con el puré de frambuesa. Ésta observación se explica por tratarse de zumos, por ello están más diluidos que los zumos concentrados y que los purés de fruta.

Los zumos concentrados presentan las mayores cantidades de antocianos y polifenoles, entre ellos destacan la grosella, con el máximo de antocianos y el arándano con el máximo de polifenoles. Las diferencias de antocianos y polifenoles entre los distintos zumos concentrados se pueden atribuir al grado de concentración, y a la naturaleza propia de cada fruta.

El principal aspecto que se observa en la Tabla 4.1, es la correlación directa de la absorbancia que muestra la bebida analizada, con el tipo de bebida de la que se trate. Se observa con claridad como los valores de absorbancia más elevados lo muestran los zumos concentrados, debido a que en su composición presentan un porcentaje de agua menor, y por tanto una mayor concentración de los compuestos presentes; los zumos, presentan valores inferiores que los zumos concentrados, y los purés se encuentran en rangos muy similares a los zumos.

Los purés, aunque en su composición presenten un mayor contenido en pulpa de fruta que los zumos, muestran una absorbancia del mismo rango debido a que se analiza el sobrenadante de cada bebida, descartando el precipitado de cada muestra, que puede contener también polifenoles.

Los purés contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos que no se están extrayendo del precipitado, y por ello el resultado de absorbancia es más bajo del esperado, llegando a estar en rangos algo superiores a los zumos en el caso de los purés de fresa y mora.

- Sólidos en suspensión

La cantidad de sólidos en suspensión presentes se determinó centrifugando una cantidad conocida de cada muestra y pesando el precipitado. Los sólidos en suspensión se recogen en el precipitado tras centrifugar y contienen distintos compuestos, entre ellos parte de los polifenoles, sobre todos los menos solubles en agua, que pueden estar asociados a estructuras celulares que sedimentan.

Como se pretende estudiar la extracción de polifenoles de estos precipitados, es interesante determinar qué cantidad de sólidos en suspensión tiene cada muestra, para conocer el potencial de extracción que tendrá cada una de ellas.

En la Tabla 4.2 y en la Figura 4.1 se recogen los resultados obtenidos. Para los purés, se observa claramente la correspondencia entre el porcentaje en peso del precipitado y la naturaleza de la muestra. Estas son las que tienen un mayor contenido de sólidos en suspensión, con valores que oscilan entre el 15% del puré de fresa y el 26% del puré de mora.

Le seguirían los zumos concentrados, sin embargo, se observa como el zumo de plátano tiene niveles más altos de sólidos en suspensión que los zumos concentrados estudiados. Esto se explica dada la textura del plátano y su contenido en agua que hacen un zumo con más sólidos que los zumos de otras frutas.

El zumo de manzana es el que menor contenido de sólidos en suspensión, ya que suele producirse clarificado, libre de pectinas, dado el alto valor comercial de éstas. El zumo de manzana estudiado no está clarificado.

Tabla 4.2. Porcentaje en peso de sobrenadante, y de precipitado de los zumos, zumos concentrados y purés de una sola fruta.

FRUTA	Tipo de bebida	Contenido en sólidos	
		Sobrenadante (%)	Precipitado (%)
Naranja	Zumo	93,51	6,49
Manzana	Zumo	<b>98,03</b>	1,97
Plátano	Zumo	89,29	10,71
Grosella	Zumo concentrado	94,60	5,40
Arándano	Zumo concentrado	91,70	8,30
Cereza	Zumo concentrado	91,77	8,23
Uva tinta	Zumo concentrado	92,65	7,35
Fresa	Puré	84,83	15,17
Mora	Puré	74,00	<b>26,00</b>
Frambuesa	Puré	87,38	12,62



Figura 4.1 Porcentaje en peso de sólidos en suspensión, de las muestras de una sola fruta estudiadas.

Además de la fresa, las muestras de frambuesa y mora con las que se ha trabajado también son purés. En estas muestras cobra más interés realizar una segunda extracción, por el remanente de compuestos fenólicos que pueden quedar retenidos en el precipitado de la muestra.

Cabe mencionar que además de existir la relación ya comentada entre el tipo de bebida de partida (zumo, zumo concentrado o puré) y el porcentaje en peso de sólidos solubles de cada bebida, también existe una relación entre el tipo de fruta de la que se componga dicha bebida.

Esta relación se observa en la Figura 4.1, por ejemplo en el plátano y la naranja. Ambos son zumos de la misma tipología pero sin embargo, la bebida de plátano presenta un porcentaje en peso de sólidos en suspensión significativamente mayor que la naranja, e incluso que algunos zumos concentrados. Aquí se observa como el plátano es una fruta con un contenido en pulpa mayor que la naranja, que queda incluida en el zumo final cuando se elabora esta bebida a partir de plátano.

#### - Valores de pH y sólidos solubles

Los resultados de los otros dos parámetros estudiados para la caracterización de las muestras, pH y ° Brix, se muestran en la Tabla 4.3.

En estos resultados se aprecia el bajo valor de pH en frutos del bosque (grosella, arándano y frambuesa), que son frutos más ácidos que el resto. Estos frutos presentan valores inferiores a 3, que contrastan con el resto de bebidas que presentan un pH por encima de 3 en todos los casos.

Respecto a los sólidos solubles, que se utilizan como indicativo del contenido en azúcares, los valores más bajos de °Brix se observan en los purés de fruta, que a su vez son las muestras que mayor sólidos en suspensión.

Puede ser que el alto contenido en sólidos en solubles esté relacionado con un menor contenido de sólidos en suspensión ya que para una misma cantidad en peso de muestra el contenido en agua sería menor para los purés. También hay que considerarla naturaleza propia de cada fruta.

Tabla 4.3. Valores de pH y ° Brix de los zumos y purés de una sola fruta.

FRUTA	Tipo de bebida	pH	° Brix
Naranja	Zumo	3,50	10,8
Manzana	Zumo	3,38	11,1
Plátano	Zumo	3,48	12,8
Grosella	Zumo concentrado	<b>2,29</b>	64,4
Arándano	Zumo concentrado	<b>2,30</b>	62,2
Cereza	Zumo concentrado	3,13	60,2
Uva tinta	Zumo concentrado	3,86	<b>65,6</b>
Fresa	Puré	3,32	<b>6,8</b>
Mora	Puré	3,08	10,1
Frambuesa	Puré	<b>2,92</b>	7,2

Tanto el Codex Alimentarius en el CODEX STAN 247, como la A.I.J.N. en sus "Reference Guideline for Juice", indican como uno de los parámetros de calidad a cumplir en los zumos comerciales es el contenido en sólidos solubles, y marcan el nivel mínimo que debe tener cada zumo.

En el caso concreto de las muestras analizadas, no deben cumplirse estos valores de forma taxativa, debido a que no se trata de productos comercializados, sino preparados de una sola fruta para la elaboración de zumos comerciales.

Aún así, los datos se encuentran en el mismo orden de magnitud que los observados en dicha legislación. Por ejemplo, según el Codex Stan 247 el zumo de manzana debe contener un mínimo de 11.5 ° Brix, mientras que nuestra muestra de zumo de manzana tiene un nivel de °Brix de 11.1°Brix. Según la misma legislación, el pure de fresa debe tener un mínimo de 7.5 °Brix, mientras que la muestra utilizada en este trabajo tiene un nivel de 6.8°Brix.

#### **4.1.2.- Optimización de la extracción de polifenoles en zumos, zumos concentrados y purés, de una sola fruta.**

En este apartado, se aborda la selección del disolvente más adecuado para la extracción de polifenoles de los distintos preparados de fruta, así como el procedimiento de extracción.

A partir de los datos obtenidos, se optimizará el proceso de preparación de la muestra para el análisis de polifenoles en las bebidas multifrutas comerciales analizadas posteriormente.

Se van a ensayar distintos sistemas de extracción y se va a estudiar la necesidad o no de hacer una segunda extracción, para comprobar la cantidad de polifenoles que quedan retenidos en el precipitado de las muestras al centrifugarlas.

El procedimiento de extracción se realiza como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se ensayan tres disolventes: agua, etanol y metanol, en ausencia y presencia de HCl, respectivamente. Se obtienen así seis extractos de cada una de las muestras, en una primera extracción y otros seis como reextracción.

Los ensayos en presencia de ácido clorhídrico se realizan debido a que son muchos los estudios previos realizados por otros investigadores en los que se describe la extracción de polifenoles en medio acidificado con HCl.

La presencia de polifenoles en los extractos obtenidos se evidencia por los valores de absorbancia de los mismos, que se determinan a 520 nm para detectar los antocianos y a 280 nm para los polifenoles en general.

#### 4.1.2.1. Absorbancia a 520 nm (antocianos)

Las Tablas 4.4 y 4.5 recogen los valores de absorbancia a 520nm en presencia y ausencia de ácido clorhídrico, respectivamente. Muestran por tanto la extracción de antocianinas, es decir, de los pigmentos rojos presentes en las frutas.

Tabla 4.4. Absorbancia a 520 nm de los extractos obtenidos en presencia de HCl.

FRUTA	Agua + HCl		Etanol + HCl		Metanol + HCl	
	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)
<b>Zumos</b>						
Naranja	0	0	0	0	0	0
Manzana	0	0	0	0	0	0
Plátano	0	0	0	0	0	0
<b>Zumos Concentrados</b>						
Grosella	<b>5,1487</b>	0,1094	<b>4,0421</b>	0,1885	2,1467	0,1029
Arándano	1,3272	0	2,386	0	<b>3,0106</b>	0
Cereza	<b>2,8713</b>	0,1371	2,1450	0,1072	1,7382	0,122
Uva tinta	0,8633	0	0,5490	0	0,6557	0
<b>Purés</b>						
Fresa	0,5241	0,2314	0,7347	0,3331	0,6291	0,1943
Mora	<b>3,4480</b>	1,9428	<b>8,0350</b>	3,5535	<b>8,3873</b>	6,9341
Frambuesa	0,5632	0,3433	0,5274	0,1432	0,4539	0,1719

Tabla 4.5. Absorbancia a 520 nm de los extractos obtenidos en ausencia de HCl.

FRUTA	Agua		Etanol		Metanol	
	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)
<b>Zumos</b>						
Naranja	0	0	0	0	0	0
Manzana	0	0	0	0	0	0
Plátano	0	0	0	0	0	0
<b>Zumos Concentrados</b>						
Grosella	<b>5,2066</b>	0	0,8904	0,4571	1,6671	0
Arándano	<b>2,1346</b>	0	0,8775	0,1291	1,9446	0
Cereza	<b>2,8871</b>	0	0,7552	0	0,7686	0
Uva tinta	0,9538	0	0,2603	0	0,5630	0
<b>Purés</b>						
Fresa	0,4925	0,1474	0,6541	0,1816	0,8357	0,5317
Mora	0,9288	1,0315	<b>3,1569</b>	0,8459	<b>2,9150</b>	0,9174
Frambuesa	0,5923	0,2088	0,3211	0	0,4104	0,1596

Los datos recogidos en las Tablas 4.4 y 4.5 muestran en primer lugar como los extractos de naranja, plátano y manzana, no muestran absorbancia a 520nm. Esto es de esperar ya que son frutas carentes de pigmentos rojos, no contienen antocianinas ni otros compuestos detectables a esta longitud de onda.

Para una mejor visualización de los resultados, se han representado en las Figuras 4.2-4.4 los datos de absorbancia obtenida a 520 nm con cada uno de los disolventes ensayados comparando los resultados obtenidos en función de utilizar o no HCl en el sistema de extracción. En estas graficas se ha representado solamente los resultados de la primera extracción.

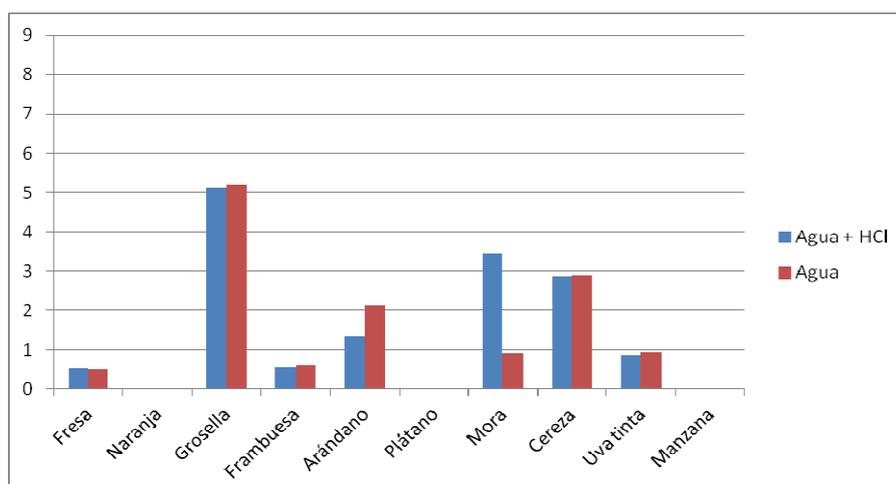


Figura 4.2. Absorbancia a 520 nm de las muestras de una sólo fruta, en la primera extracción con agua en presencia de HCl y en ausencia de éste.

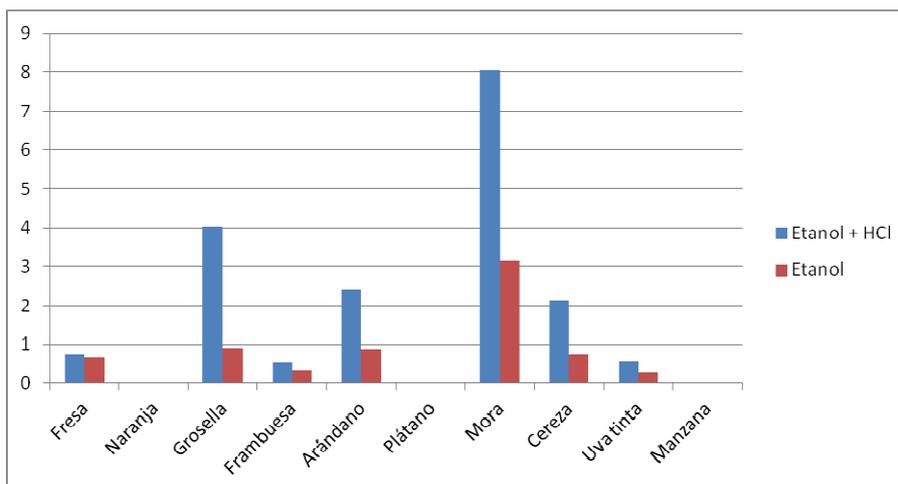


Figura 4.3. Absorbancia a 520 nm de las muestras de una sola fruta, en la primera extracción con etanol en presencia de HCl y en ausencia de éste.

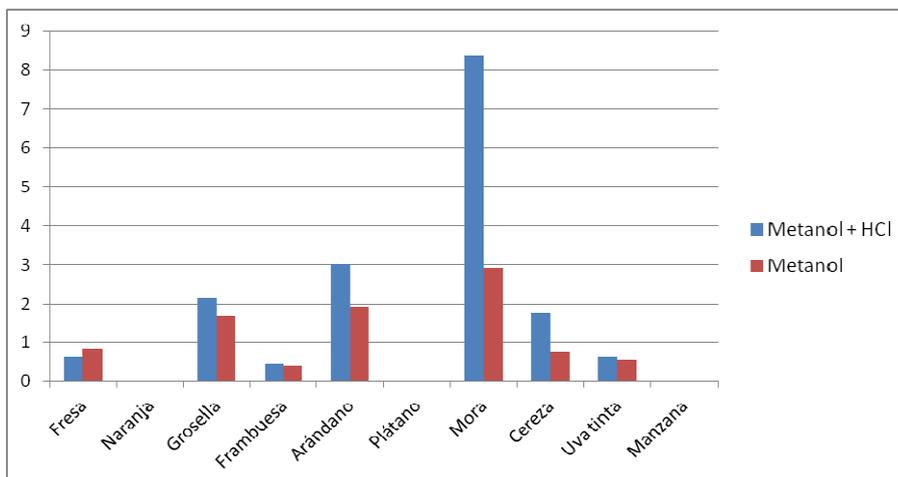


Figura 4.4. Absorbancia a 520 nm de las muestras de una sólo fruta, en la primera extracción con metanol en presencia de HCl y en ausencia de éste.

En estos resultados se aprecia que con agua como disolvente la presencia de HCl no influye de manera significativa, solo en el caso del arándano la extracción es mejor con agua, mientras que en la mora ocurre al contrario y el mejor extractante es agua-HCl, atendiendo a la mora.

En las demás muestras con agua no afecta de manera importante la presencia o ausencia del medio ácido. Aunque está descrita una mejor extracción en presencia de HCl por causar la rotura celular, en este caso al tratarse de zumos y purés la rotura celular ya se ha producido por métodos físicos y por choque osmótico durante la obtención de estos productos.

Probablemente por esta causa no se observan grandes diferencias entre la extracción con agua o con agua acidificada.

Sin embargo con alcoholes como disolvente, etanol y metanol, los valores son mayores en presencia del ácido que en su ausencia, en todos los casos (Fig 4.3 y 4.4).

Esta observación coincide con los datos encontrados habitualmente en la bibliografía, donde en la mayoría de los casos se utiliza metanol-HCl como sistema de extracción de polifenoles. Hay que destacar que muestras como la cereza y la grosella, dan valores de absorbancia más altos con agua que con alcoholes. En el resto de muestras, sobre todo en la mora se extrae mayor cantidad de antocianos con metanol-HCl.

En alcohol se van a extraer los polifenoles menos hidrofílicos que van a estar más asociados a los restos de tejido vegetal, en este caso el medio ácido puede favorecer la disrupción de los restos de tejido y la liberación de los compuestos asociados.

También se observa como para la mayor parte las muestras el agua es el mejor disolvente de extracción. A 520 nm se detectan principalmente los antocianos que son solubles en agua, de ahí que para la mayoría de las muestras el disolvente más apropiado sea el agua.

El etanol dio los valores más altos que los otros sistemas de extracción en el caso del puré de fresa en medio acidificado. En el resto de las muestras el etanol fue el peor extractante. Así con estos resultados el etanol se presenta como el disolvente menos apropiado para la extracción de antocianos.

De forma genérica, se puede decir que un proceso de extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del sistema de extracción (polaridad de los disolventes y presencia de ácido), de la textura y del tamaño de partícula de la muestra que también puede influir; además hay sustancias en la matriz que pueden ejercer un efecto de interferencia (otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferencias (grasas, vitaminas, aminoácidos) (Arranz Martínez, 2010, Georgé *et al.*, 2005).

Las condiciones de extracción y selección del disolvente dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos que queramos extraer. Por ejemplo, Shahidi *et al.*, (1991) y Naczki *et al.*, (1992) encontraron que la extracción en dos pasos secuenciales con acetona al 70% era suficiente para la extracción de taninos.

Aunque está descrito que las antocianidinas se extraen con disolventes orgánicos acidificados, normalmente metanol que destruye las membranas celulares (Moore *et al.*, 1982), en este caso resultó mejor el agua sin acidificar para extraer las antocianinas.

Existen diversos autores que utilizan disolventes acidificados (metanol/HCl) para lograr una mayor extracción y estabilidad de compuestos extraídos en el caso de las antocianinas (Cacace y Mazza, 2002; Sharif *et al.*, 2010).

#### 4.1.2.2. Absorbancia a 280 nm (polifenoles)

A continuación, se estudiará del mismo modo que en el apartado anterior, la selección del mejor disolvente de extracción a partir de los datos de absorbancia obtenidos esta vez a 280 nm. Es necesario indicar que a 280 nm absorben no solo los polifenoles, sino otros muchos componentes presentes en las células y por tanto en las muestras estudiadas, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos, nucleótidos, etc.

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 4.6-4.7. La primera observación es que a esta longitud de onda todas las muestras absorben, como era de esperar, y a diferencia de lo que ocurre a 520 nm en los que sólo muestran valores de absorbancia las frutas rojas.

Estos datos se recogen también en las Figuras 4.5-4.7., para una mejor visualización de los resultados obtenidos. Según estos resultados se obtiene una mayor absorbancia a 280 nm en un medio ácido y utilizando como disolvente metanol.

También se aprecia que el agua resulta un buen disolvente, mientras que el etanol sería el disolvente menos apropiado.

Tabla 4.6. Absorbancia a 280 nm de los extractos obtenidos en presencia de HCl.

FRUTA	Agua + HCl		Etanol + HCl		Metanol + HCl	
	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)
<b>Zumos</b>						
Naranja	1,3301	0,3117	2,8764	0,7922	3,1594	2,1871
Manzana	0,5569	0,2866	0,8342	0,1981	1,0968	0,1733
Plátano	1,1670	0,3074	0,9090	0,1399	1,2663	0,2065
<b>Zumos Concentrados</b>						
Grosella	<b>24,280</b>	0,5426	16,563	1,4014	16,298	1,0198
Arándano	<b>37,847</b>	1,6517	<b>68,712</b>	0,5098	<b>71,786</b>	1,3817
Cereza	3,6560	0,844	17,206	0,5233	<b>20,586</b>	0,5035
Uva tinta	13,504	0,4877	9,9415	0,5210	17,693	0,7853
<b>Purés</b>						
Fresa	8,4619	2,3773	<b>22,893</b>	4,4241	19,467	4,6491
Mora	<b>15,479</b>	7,9969	<b>41,625</b>	12,349	<b>64,226</b>	23,702
Frambuesa	3,6560	3,7265	17,206	4,6817	<b>20,586</b>	7,1904

Tabla 4.7. Absorbancia a 280 nm de los extractos obtenidos en ausencia de HCl.

FRUTA	Agua		Etanol		Metanol	
	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)	1º Extr. (UA)	2º Extr. (UA)
<b>Zumos</b>						
Naranja	3,1747	0,4072	1,6768	0,6813	4,2449	1,9100
Manzana	0,7115	0,1014	0,6593	0,1171	1,0531	0,1551
Plátano	4,3672	2,140	0,8673	0,1645	1,2981	0,2062
<b>Zumos Concentrados</b>						
Grosella	<b>29,1600</b>	0,5295	5,7076	3,2301	<b>24,870</b>	1,7550
Arándano	<b>53,5770</b>	1,7156	<b>33,936</b>	4,4867	<b>56,264</b>	3,5859
Cereza	3,4027	0,6899	5,7001	2,4098	18,870	0,5017
Uva tinta	<b>16,8990</b>	0,7390	5,0704	1,8412	12,863	0,5202
<b>Purés</b>						
Fresa	8,7893	1,8884	19,347	3,9760	26,260	8,9797
Mora	12,0620	8,3043	<b>34,151</b>	6,8847	<b>36,305</b>	14,1210
Frambuesa	3,4027	1,9817	5,7018	0,9928	18,871	4,0464

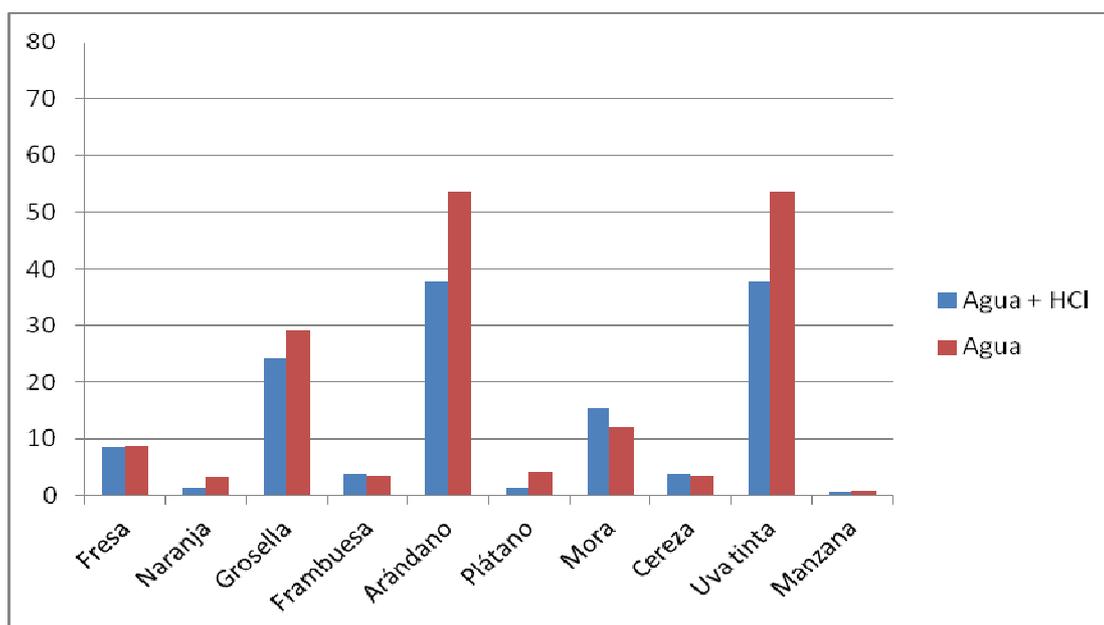


Figura 4.5. Absorbancia a 280 nm de las muestras de una sola fruta, en la primera extracción con agua en presencia de HCl y en ausencia de éste.

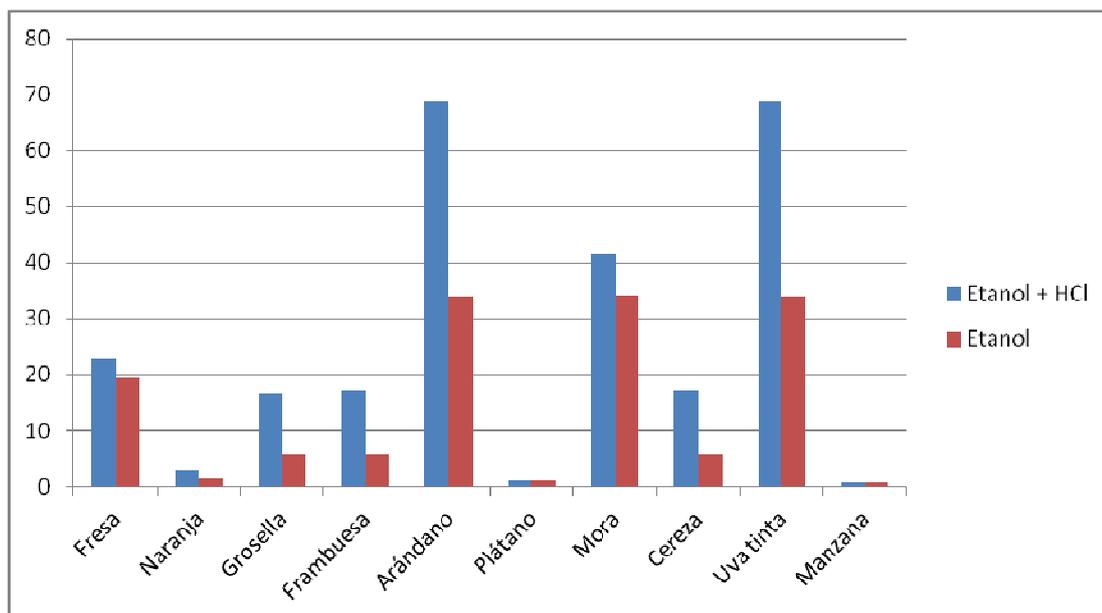


Figura 4.6. Absorbancia a 280 nm de las muestras de una sola fruta, en la primera extracción con etanol en presencia de HCl y en ausencia de éste.

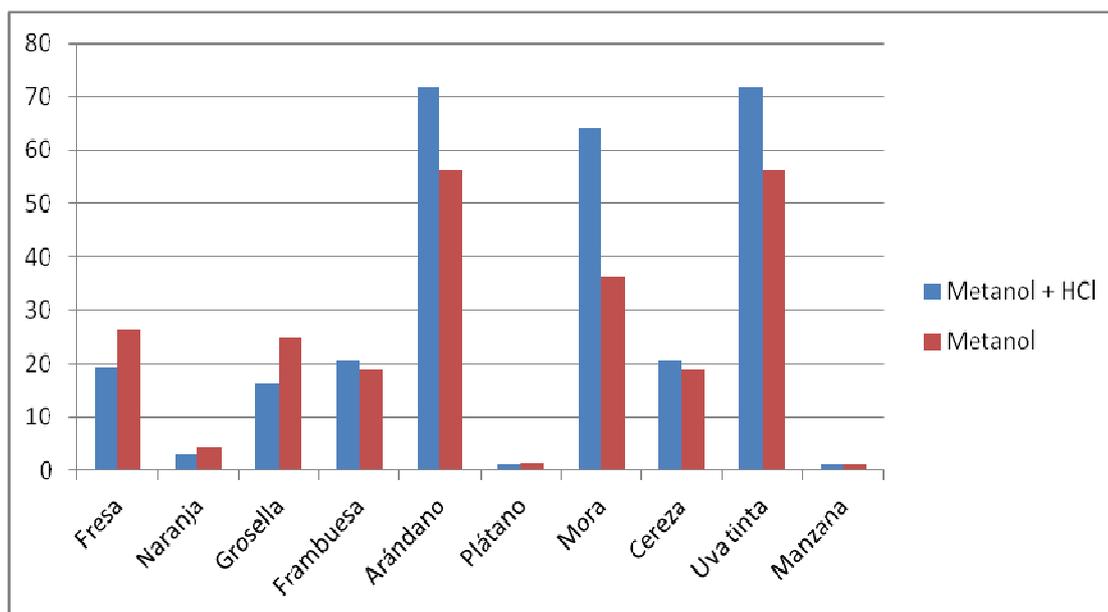


Figura 4.7. Absorbancia a 280 nm de las muestras de una sola fruta, en la primera extracción con metanol en presencia de HCl y en ausencia de éste.

Con agua como disolvente, se obtienen en general mejores resultados que en ausencia de HCl, excepto en la mora. Sin embargo, con etanol se extraen una mayor cantidad de polifenoles en el medio ácido en todos los casos. En metanol, para fresa, naranja, grosella, y plátano se extraen más polifenoles con metanol solo.

En el resto de las muestras es mejor el metanol acidificado. Además con este último disolvente se alcanzan los valores más altos de polifenoles de todos los estudiados, principalmente en arándano, mora, cereza y uva tinta.

Contrastando con otros autores, Mattila *et al.*, 2000, extrajeron flavonoides de material vegetal con metanol acuoso al 62,5% acidificado con HCl (1:4) para hidrolizar los enlaces éster de glucósidos de flavonoides. Por otra parte, Arts *et al.*, 2000, utilizaron metanol acuoso al 70% y al 90% para extraer catequinas.

Para decidir el disolvente y el procedimiento de extracción se van a tener en cuenta los resultados obtenidos a 520 nm y a 280 nm. La comparación del mejor disolvente para cada muestra se muestra en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Clasificación de los disolventes más efectivos a 520 nm y a 280 nm para cada una de las frutas estudiadas.

FRUTA	520 nm (Antocianos)	280 nm (Otros polifenoles)
<b>Zumos</b>		
<i>Naranja</i>	---	Metanol
<i>Manzana</i>	---	Metanol
<i>Plátano</i>	---	Agua
<b>Zumos Concentrados</b>		
<i>Grosella</i>	Agua	Agua
<i>Arándano</i>	Metanol - HCl	Metanol - HCl
<i>Cereza</i>	Agua	Metanol - HCl
<i>Uva tinta</i>	Agua	Metanol - HCl
<b>Purés</b>		
<i>Fresa</i>	Metanol	Metanol
<i>Mora</i>	Metanol - HCl	Metanol - HCl
<i>Frambuesa</i>	Agua	Metanol - HCl

Se observa como en la mayoría de los casos el agua es buen disolvente para extraer antocianos y el metanol para la extracción de polifenoles en general. Así para la extracción de antocianos se selecciona el agua y para la extracción de polifenoles el metanol.

La presencia de HCl se justifica por los resultados obtenidos, por los datos descritos en la bibliografía por otros autores que hacen referencia a la rotura celular en medio ácido para favorecer la liberación de polifenoles, como ya se ha comentado anteriormente.

También se ha tenido en cuenta la necesidad de hacer una segunda extracción. En la Tabla 4.9 se muestran las medidas de absorbancia relativa de cada muestra,

expresadas en tanto por ciento, con respecto a la absorbancia inicial del zumo correspondiente, es decir, del primer sobrenadante obtenido para cada muestra, y cuyos valores están recogidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.9. Porcentaje de polifenoles extraídos en las dos extracciones sucesivas, con respecto al zumo inicial centrifugado.

FRUTA	Agua con HCl				Etanol con HCl				Metanol con HCl			
	520 nm		280 nm		520 nm		280 nm		520 nm		280 nm	
	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)	1ª Ext. (%)	2ª Ext. (%)
<b>Zumos</b>												
<i>Naranja</i>	0	<b>0</b>	6,89	<b>1,61</b>	0	<b>0</b>	14,90	<b>4,10</b>	0	<b>0</b>	16,36	<b>11,33</b>
<i>Manzana</i>	0	<b>0</b>	2,99	<b>1,54</b>	0	<b>0</b>	4,47	<b>1,06</b>	0	<b>0</b>	5,88	<b>0,93</b>
<i>Plátano</i>	0	<b>0</b>	11,67	<b>3,07</b>	0	<b>0</b>	9,09	<b>1,40</b>	0	<b>0</b>	12,66	<b>2,07</b>
<b>Zumos Concentrados</b>												
<i>Grosella</i>	8,57	<b>0,18</b>	8,53	<b>0,19</b>	6,73	<b>0,31</b>	5,82	<b>0,49</b>	3,57	<b>0,17</b>	5,73	<b>0,36</b>
<i>Arándano</i>	5,19	<b>0</b>	5,72	<b>0,25</b>	9,33	<b>0</b>	10,38	<b>0,08</b>	11,78	<b>0</b>	10,85	<b>0,21</b>
<i>Cereza</i>	8,84	<b>0,42</b>	1,79	<b>0,41</b>	6,61	<b>0,33</b>	8,41	<b>0,26</b>	5,35	<b>0,38</b>	10,07	<b>0,25</b>
<i>Uva tinta</i>	6,95	<b>0</b>	25,50	<b>0,33</b>	4,42	<b>0</b>	46,29	<b>0,35</b>	5,28	<b>0</b>	48,36	<b>0,53</b>
<b>Purés</b>												
<i>Fresa</i>	33,55	<b>14,81</b>	21,83	<b>6,13</b>	47,04	<b>21,33</b>	59,05	<b>11,41</b>	40,28	<b>12,44</b>	50,21	<b>11,99</b>
<i>Mora</i>	36,68	<b>20,67</b>	25,95	<b>13,41</b>	85,48	<b>37,80</b>	69,78	<b>20,70</b>	89,23	<b>73,77</b>	97,62	<b>39,74</b>
<i>Frambuesa</i>	12,34	<b>7,52</b>	15,08	<b>15,37</b>	11,56	<b>3,14</b>	70,97	<b>19,31</b>	9,95	<b>3,77</b>	84,91	<b>29,66</b>

Como se puede observar las frutas que presentan un mayor porcentaje de compuestos extraídos en la 2ª extracción son los purés, el de la mora (presentando un porcentaje de extracción que oscila entre el 13% y el 73%), la fresa (con valores que van desde el 6% hasta el 21%), la frambuesa (con valores que oscilan entre el 3,14% y el 29,66%).

Estos valores corroboran lo comentado anteriormente acerca de que las muestras con un mayor contenido en sólidos (mayor precipitado) son aquéllas en las que resulta más interesante realizar una segunda reextracción.

Aunque existe esta particularidad en el caso de los purés en los que sí podría resultar conveniente realizar una segunda extracción, de forma general se observa de resultados de experimentación con bebidas multifruta (se verá en la Tabla 4.12.) como en la mayoría de casos en la segunda extracción no se extrae más del 4% de color.

Por ejemplo, en la grosella todas las segundas reextracciones que se le realizaron con todos los disolventes tuvieron como resultados valores de absorbancia inferiores al 1%.

Es por ello, que no resulta conveniente realizar una segunda extracción, debido a que el porcentaje de color extraído no es significativo y no resulta rentable para afrontar los costes (de tiempo, personal, económicos,...) y la dilución de las muestras que conlleva este proceso.

#### 4.2.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN BEBIDAS MULTIFRUTA.

En esta segunda parte del proyecto se han estudiado 9 bebidas multifruta comerciales: 4 smoothies, 2 zumos y 3 néctares. Las casas comerciales indican su composición y algunas de sus características en el etiquetado.

Debido al nombre tan largo que define cada una de las muestras, y con el objetivo de simplificar el análisis de estas bebidas, se ha establecido una designación indicando el tipo de bebida y un número. En la Tabla 4.10 se recogen los productos estudiados, señalando el nombre comercial, la marca del fabricante y la composición descrita en el etiquetado; así como la designación dada a cada muestra en este estudio.

Tabla 4.10. Nombre y marca comercial, composición y designación de cada muestra.

Nombre y marca comercial, composición	Designación
<b><u>Smoothie manzana y frutas del bosque. Hipercor</u></b> Naranja (5%), manzana (40%), fresa (18%), arándano (7%), Frambuesa (20%) y plátano (10%)	<b>Smoothie 1</b>
<b><u>Smoothie macedonia. Hipercor</u></b> Naranja (5%), manzana (40%), fresa (35%), plátano (20%).	<b>Smoothie 2</b>
<b><u>Smoothie Eroski</u></b> Manzana, frambuesa (18%), fresa (15%), plátano (14%), arándano y naranja.	<b>Smoothie 3</b>
<b><u>Smoothie bebefruta plátano y frutas rojas. Hacendado</u></b> 9 fresas, ½ plátano, 2 moras, 1 y ½ cerezas, 3 manzanas, 2 y ½ grosellas rojas y 8 uvas.	<b>Smoothie 4</b>
<b><u>Antioxidante exprimido. Eroski</u></b> Zum de uva tinta (73%), puré de frambuesa (20%), puré de cereza (7%).	<b>Zumo 1 (100%)</b>
<b><u>Zumo de uva roja y frutas del bosque. Hipercor</u></b> Zum de manzana (16%), zum de uva tinta (48%), puré de frambuesa (18%), y puré de fresa (18%).	<b>Zumo 2 (100%)</b>
<b><u>Don Simón antioxidante de naranja-mora-uva-frambuesa</u></b> Zum de frutas a base de concentrado 60%(naranja, mora, uva y frambuesa) y extracto de frutas rojas.	<b>Néctar 1 (60%)</b>
<b><u>Néctar frutas del bosque. Eroski</u></b> Zum de uva, fresa, frambuesa, mora y cereza a base de concentrados en proporciones variables, y un 10% de puré de fresa.	<b>Néctar 2 (50%)</b>

<p align="center"><b><u>Néctar de zumo de frutas con antioxidantes naturales de la fruta. Eroski</u></b></p> <p>Zumo de uva tinta a base de concentrado (42%), puré de frambuesa (5%), zumo de cereza a base de concentrado (3%)</p>	<p align="center"><b>Néctar 3 (50%)</b></p>
--	---

#### **4.2.1.- Características de las bebidas multifruta comerciales.**

Al igual que con las muestras de una sola fruta, en este caso el estudio también ha comenzado por caracterizar las bebidas multifruta. Los smoothies son puré de fruta que contiene toda la pulpa triturada. Los zumos recogen la porción líquida de la fruta tras exprimirlos, están por tanto libres de tejido vegetal excepto los sólidos que quedan en suspensión. Los néctares se elaboran con un 50-60% de zumo de fruta y el resto agua, azúcares u otros componentes.

La presencia de polifenoles en estos tres tipos de bebida estará condicionada tanto por las frutas que la componen como por el tipo de bebida de la que se trata, ya que su contenido en fruta es diferente.

En la caracterización de estos productos se determinaron los mismos parámetros que en los productos de una sola fruta descritos en el apartado anterior. Se determinaron también la densidad y acidez valorable. Así los parámetros estudiados fueron:

- 1) El contenido en polifenoles, según los valores de absorbancia a las longitudes 520 nm para antocianinas y 280 nm para polifenoles en general.
- 2) El contenido de sólidos en suspensión, mediante la determinación del peso fresco del precipitado.
- 3) Los valores de pH y sólidos solubles medidos por refractometría y expresados como °Brix.
- 4) La densidad y la acidez valorables de las muestras estudiadas.

##### **- Contenido en polifenoles**

A continuación, se exponen los datos de absorbancia inicial, de las bebidas multifruta tras centrifugar las muestras. En este trabajo, se utilizan muestras de bebidas multifruta compuestas fundamentalmente por frutos rojos, por ello se determina de forma específica la absorbancia a 520 nm, longitud de onda a la que absorben los antocianos responsables del color rojo.

Tabla 4.11. Absorbancia inicial de los preparados multifruta clarificados por centrifugación, a 520 nm y a 280 nm.

BEBIDAS MULTIFRUTA	Absorbancia	
	520 nm	280 nm
<i>Smoothie 1</i>	0,687	<b>20,425</b>
<i>Smoothie 2</i>	0,563	19,128
<i>Smoothie 3</i>	0,946	19,281
<i>Smoothie 4</i>	0,709	18,106
<i>Zumo 1</i>	0,781	16,055
<i>Zumo 2</i>	<b>1,300</b>	<b>20,797</b>
<i>Néctar 1</i>	<b>1,397</b>	15,718
<i>Néctar 2</i>	0,432	<b>23,037</b>
<i>Néctar 3</i>	<b>1,130</b>	16,945

A partir de la Tabla 4.11 se puede observar qué muestras a priori, presentan un mayor contenido en polifenoles, datos que deberán ser compatibles con los que se determinen en experimentos posteriores mediante análisis por Folin-Ciocalteu y UHPLC.

Inicialmente, se observa que los preparados multifrutas que más antocianos tienen son el "Zumo 2", y los néctares "Néctar 1" y "Néctar 3".

No hay ningún smoothie que presente valores tan elevados de absorbancia como los zumos y sobretodo los néctares, debido a que los polifenoles presentes en los smoothies se pierden en la gran cantidad de precipitado, que no se ha re-extraído. Es por ello que los valores más elevados se dan en los néctares, lógicamente por carecer de este precipitado que se elimina en los smoothies al centrifugar.

De forma general cabe mencionar que, la absorbancia que presentan las muestras depende de las frutas que la componen.

Con el fin de visualizar la mayor absorbancia de estas muestras en función de la composición de las mismas, se indica a continuación las frutas de componen tanto el Zumo 2, como los néctares mencionados:

1. *Zumo 2: Zumo de uva roja y frutas del bosque. Hipercor* → Zumo de uva tinta (48%), puré de frambuesa (18%) y puré de fresa (18%).
2. *Néctar 1: Don Simón antioxidante de naranja-mora-uva-frambuesa* → A base de concentrado (60%) de naranja, mora, uva y frambuesa.
3. *Néctar 3: Néctar de zumo de frutas con antioxidantes naturales de la fruta. Eroski* → Zumo de uva tinta a base de concentrado (42%), puré de frambuesa (5%) y concentrado de cereza (3%).

Tanto el "Néctar 1" como el "Néctar 3" están compuestos en gran proporción de zumo de uva tinta, que aporta mucho más color que la blanca. El "Néctar 2", es la bebida con menos antocianos de las estudiadas, tiene un mayor contenido en fresa y frambuesa

que no aportan tanto color como la de uva tinta, mora y cereza que tienen los otros dos néctares en su composición a base de concentrado.

Según se aprecia en la Tabla 4.1, las frutas con mayor contenido en polifenoles son la grosella, la mora y la cereza (observamos este aspecto también en las Tablas 4.4 – 4.7). Por ello, resulta lógico que sean estas muestras las que presenten un mayor color, puesto que están compuestas de las frutas con más color.

- Sólidos en suspensión

Se determinan los sólidos en suspensión expresados como porcentajes de peso húmedo de cada muestra. Es en esta fracción sólida en la que se van a estudiar la extracción de compuestos fenólicos.

Tabla 4.12. Porcentaje en peso de sobrenadante y de precipitado de las bebidas multifrutas analizadas.

BEBIDAS MULTIFRUTA	Contenido en sólidos	
	% sobrenadante	% precipitado
<i>Smoothie 1</i>	87,15	12,85
<i>Smoothie 2</i>	87,67	12,33
<i>Smoothie 3</i>	86,70	<b>13,30</b>
<i>Smoothie 4</i>	87,10	12,90
<i>Zumo 1</i>	92,40	7,60
<i>Zumo 2</i>	92,67	7,33
<i>Néctar 1</i>	96,18	3,82
<i>Néctar 2</i>	95,55	4,45
<i>Néctar 3</i>	95,20	4,80

En la Tabla 4.12 se observa como el porcentaje en peso de precipitado está por encima del 12% cuando se trata de un smoothie debido a que estas bebidas contienen también la pulpa de la fruta.

Para los zumos el valor está en torno al 7,5% mientras que para los néctares que tienen un porcentaje de zumo de fruta menor, los sólidos en suspensión quedan por debajo del 5% (aproximadamente el 60% de 7,5%).

Cuanto mayor cantidad de fruta tenga la muestra, y más concentrada sea mayor porcentaje de precipitado presentará. En el procesamiento de la muestra al centrifugar los sólidos en suspensión precipitan arrastrando en el precipitado parte de polifenoles, lo que puede llevar a una cuantificación errónea de estos compuestos si se analizan solo los sobrenadantes obtenidos.

- Valores de pH y sólidos solubles

Se determina el pH de los 9 preparados multifruta con el objetivo de conocer si el valor de pH guarda alguna relación con el tipo de bebida. Del mismo modo se analizan los °Brix presentes en estos preparados para conocer cuáles son los azúcares presentes en los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Valores de pH y °Brix de los 9 preparados multifrutas analizados.

BEBIDAS MULTIFRUTA	pH	° Brix
<i>Smoothie 1</i>	3,77	12,4
<i>Smoothie 2</i>	4,20	12,8
<i>Smoothie 3</i>	3,86	12,1
<i>Smoothie 4</i>	4,05	12,7
<i>Zumo 1</i>	3,97	13,0
<i>Zumo 2</i>	3,71	11,6
<i>Néctar 1</i>	3,66	11,4
<i>Néctar 2</i>	3,64	11,9
<i>Néctar 3</i>	3,72	13,0

En la Tabla 4.13 se aprecia que el valor de pH es independiente del tipo de producto de que se trate y no varía según sea un smoothie, de un zumo, o un néctar. El pH dependerá principalmente del tipo frutas con las que se ha elaborado cada producto. Hay que destacar que todos los valores se encuentran dentro del rango habitual del pH de un zumo (3,5 - 4,5).

Respecto a los grados Brix todos los productos estudiados muestran unos valores entre 11,4 y 13,0, que quedan dentro de los propios de los zumos de frutas. Los smoothies y los zumos, al estar constituidos íntegramente por fruta natural, llevan el contenido de azúcar natural de la fruta. Sin embargo los néctares pueden llevar azúcar adicionado, que no se puede diferenciar entre el azúcar natural y el añadido con este método de medida.

- Densidad y acidez valorable

También se determinaron la densidad y la acidez valorable de los preparados multifruta. La acidez valorable informa del contenido total de ácido de un alimento. Se suele concretar valorando con hidróxido sódico y un indicador. Los resultados se dan en términos del ácido que predomina; por ejemplo, en la leche, como ácido láctico y en el vinagre, como acético. En el caso de los zumos se expresa en términos de equivalencia de peso de un álcali determinado, NaOH en este caso.

Los resultados obtenidos de las muestras analizadas se recogen en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Densidad y acidez valorable de los zumos multifruta analizados.

BEBIDAS MULTIFRUTA	Densidad (kg/l) ó (g/cm <sup>3</sup> )	Acidez valorable (meq NaOH/kg)
<i>Smoothie 1</i>	<b>1,0568</b>	<b>104,960</b>
<i>Smoothie 2</i>	0,9593	92,250
<i>Smoothie 3</i>	1,0542	104,097
<i>Smoothie 4</i>	1,0418	81,550
<i>Zumo 1</i>	1,0558	62,587
<i>Zumo 2</i>	1,0460	<b>107,170</b>
<i>Néctar 1</i>	1,0414	69,118
<i>Néctar 2</i>	1,0392	65,860

Observando los datos de la Tabla 4.14, se aprecia como los smoothies y el Zumo 2 presentan valores de acidez más altos que las demás muestras (en torno a 80 – 110 meq/kg). Las otras muestras presentan un contenido ácido inferior.

Los néctares pueden presentar valores más bajos por tener directamente un menor contenido en zumo de frutas. La baja acidez del Zumo 1 se puede atribuir a su composición, ya que es el único producto de los estudiados que no contiene ni naranja ni fresa, que son dos de las frutas que mayor acidez aportan.

#### **4.2.2.-Determinación de polifenoles totales "TP" en bebidas multifruta comerciales.**

Una vez caracterizados los productos comerciales en estudio se procede a estudiar su contenido en polifenoles. Se utiliza el método colorimétrico basado en el uso de reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método permite obtener un dato de polifenoles totales "TP", que es el habitualmente utilizado en la industria alimentaria.

El protocolo de medida seguido es el descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós, 1999, que se describe en el apartado correspondiente de *Materiales y Métodos*. Se han analizado las 9 muestras comerciales en estudio, en un total de 27 ensayos. Debido a la presencia de sólidos en suspensión que pueden contener polifenoles, se han utilizado tres modos diferentes de preparación de la muestra.

Las formas de preparar la muestra han sido:

- 1) **Sin tratar:** se analizan las muestras directamente sin ningún tratamiento previo.
- 2) **Clarificada:** las muestras se clarifican por centrifugación quedando libres de sólidos en suspensión
- 3) **Reextraída:** las muestras se someten a una doble extracción con metanol-HCl según el procedimiento de extracción de polifenoles seleccionado en el apartado 4.1.

- Preparación de la muestra

Se estudia en primer lugar el mejor procedimiento de preparación de la muestra tratando de extraer al máximo los polifenoles asociados a la materia sólida que contienen las muestras de bebidas multifrutadas. Se tendrán en cuenta los resultados de extracción obtenidos en el apartado 4.1.

Se toma como modelo para este estudio el Smoothie 1: Smoothie de manzana y frutas del bosque (100% fruta) de Hipercor, compuesto por manzana (40%), frambuesa (20%), fresa (18%), arándano (7%), plátano (10%), y naranja (5%). Se opta por este smoothie por estar compuesto de una mayor cantidad de frutas que los demás, y servirnos así de base para poder aplicar los resultados obtenidos a otras muestras que se vayan a estudiar.

En el Apartado 4.1 se descartó el etanol como disolvente de extracción, aquí se estudia el procedimiento de extracción utilizando como disolventes agua-HCl, para extraer los polifenoles solubles en agua y metanol-HCl, para extraer aquellos que son más hidrofóbicos.

Se van a comparar 4 protocolos de extracción en los que se combinan ambos disolventes, utilizando uno en cada una de las extracciones sucesivas, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Inicialmente se centrifuga la muestra obteniendo el zumo. Posteriormente se estudia el orden de adición de disolventes y el volumen que se adiciona. Un resumen de los protocolos de extracción se detalla a continuación:

- Protocolo 1: 1,5 ml zumo → 1,5 ml agua-HCl → 1,5 ml metanol-HCl
- Protocolo 2: 1,5 ml zumo → 1,5 ml metanol-HCl → 1,5 ml agua-HCl
- Protocolo 3: 1,5 ml zumo → 0,75 ml agua-HCl → 0,75 ml de metanol-HCl
- Protocolo 4: 1,5 ml zumo → 0,75 ml agua-HCl + 0,75 ml metanol-HCl (en 1 sola extracción)

Al final, tras la segunda extracción se juntan los sobrenadantes de cada muestra, incluido el zumo correspondiente, y se determina su absorbancia a 280 y 520 nm. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Absorbancia a 520 nm y a 280 nm, del Smoothie 1, con los 4 protocolos de extracción estudiados.

<i>Protocolo</i>	<b>Absorbancia</b>	
	<b>520 nm</b>	<b>280 nm</b>
<i>Protocolo 1</i>	1,540	53,089
<i>Protocolo 2</i>	1,576	40,627
<i>Protocolo 3</i>	<b>1,989</b>	<b>59,884</b>
<i>Protocolo 4</i>	1,258	34,764

Teniendo en cuenta que en los protocolos 1 y 2, el volumen final que se obtiene tras juntar los sobrenadantes es de unos 4,5 ml, mientras que en los protocolos 3 y 4, el volumen final que se obtiene es de 3 ml; los resultados en cada uno de los protocolos estudiados se han multiplicado por su dilución correspondiente, obteniendo valores comparables entre sí, que son los recogidos en la Tabla 4.15.

En estos resultados se observa como los valores más elevados de absorbancia corresponden al protocolo de extracción nº3 tanto a 520 nm como a 280 nm.

Las muestras quedan así con un 50% de zumo clarificado, un 25% de metanol y un 25% de agua. En estudios posteriores para la preparación de las muestras por UHPLC se utiliza el protocolo de extracción nº 3.

Para calibrar el método de análisis colorimétrico, se realizó una recta de calibrado con ácido gálico como patrón.

Se prepararon 6 muestras con distintas concentraciones de ácido gálico, se analizaron y se midió la absorbancia de cada una de ellas a una longitud de onda de 760 nm en la cual se mide la absorción de los pigmentos que se forman en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Los datos de concentración de ácido gálico y absorbancia se representan en una recta de regresión de absorbancia frente a concentración que relaciona ambos parámetros. Se obtiene la ecuación de la recta que se utiliza para determinar la concentración de fenoles totales referidos a ácido gálico, según el valor de absorbancia obtenido para cada muestra analizada.

La Figura 4.8 muestra la calibración del método Folin-Ciocalteu realizado en este proyecto, con una  $R^2 = 0,997$  y una ecuación  $Y = 0,0115 X$ , donde Y es la Absorbancia a 760 nm de cada muestra y X es el contenido en Fenoles Totales expresados, como se indicaba anteriormente, en mg GAE /100 ml de bebida.

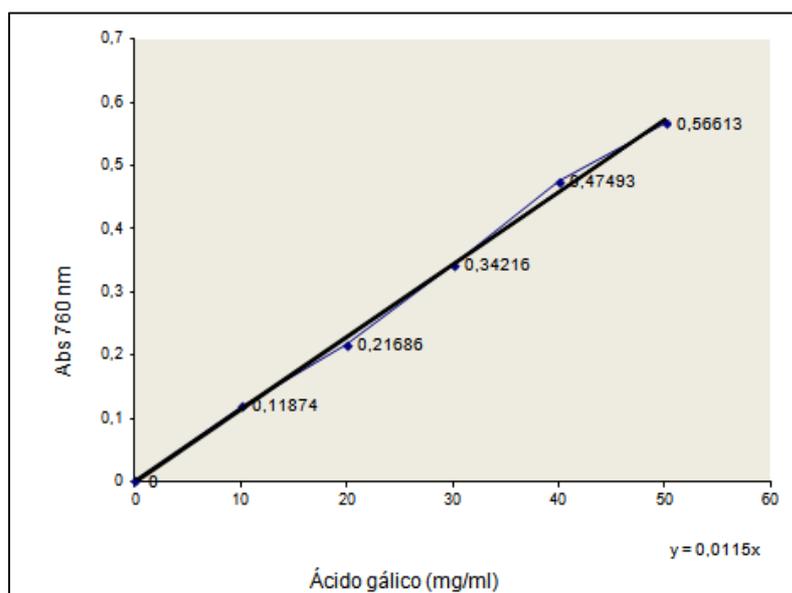


Figura 4.8. Recta de calibrado del análisis de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como patrón.

Una vez calibrado el método de análisis se analizaron las nueve muestras con los tres procedimientos de preparación de la muestra, como se ha indicado. Los resultados obtenidos se expresan como equivalentes en ácido gálico (GAE) en mg/100 ml y se muestran en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Polifenoles totales en productos multifrutas comerciales con distintos procedimientos de preparación de la muestra.

BEBIDAS MULTIFRUTA	Sin tratar (mgGAE/100ml)	Clarificada (mgGAE/100ml)	Reextraída (mgGAE/100ml)
<i>Smoothie 1</i>	161,37	104,11	130,24
<i>Smoothie 2</i>	165,82	97,78	120,58
<i>Smoothie 3</i>	<b>143,41</b>	88,64	128,37
<i>Smoothie 4</i>	167,02	95,53	131,35
<i>Zumo 1</i>	<b>102,90</b>	86,54	92,81
<i>Zumo 2</i>	114,99	89,68	94,31
<i>Néctar 1</i>	60,37	55,54	58,90
<i>Néctar 2</i>	84,03	78,08	84,00

Como resultado de los análisis realizados a las 9 bebidas estudiadas, se puede decir que los smoothies de los que se dispone para este trabajo presentan un contenido en polifenoles en torno a 160 mg/100 ml, los zumos en torno a 110 mg/100 ml, y los néctares sobre 76 mg/100 ml, datos que coinciden con los descritos por otros autores,

Müller *et al.*, 2010, Mahdavi, *et al.*, 2010, Medina 2011, Klimzcak *et al.*, 2007, Mattila *et al.*, 2011.

En los resultados recogidos en la Tabla 4.16 se observa una disminución drástica de los polifenoles totales cuantificados entre las muestras sin tratar y las muestras clarificadas, en todos los casos.

Esto es lógico, debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos asociados a los sólidos en suspensión que quedan en el precipitado y no se analizan en las muestras clarificadas por centrifugación. Esta observación es más importante en los smoothies, bebidas que incluyen la pulpa de la fruta y que tienen por tanto un porcentaje de sólidos en suspensión mucho mayor, como ya se ha indicado anteriormente.

Así, en el caso de los smoothies en las muestras clarificadas se cuantifican en torno a un 40% menos de compuestos fenólicos que las muestras sin tratar. En los zumos esta diferencia es del 20% y en los néctares, al clarificar, se cuantifican en torno a un 13% menos de polifenoles totales.

Estos resultados coinciden con el contenido de sólidos en suspensión de cada uno de los productos, mayor para los smoothies, seguido de los zumos y menor para los néctares debido al porcentaje de agua adicionada que llevan.

A priori, se podría esperar que en la muestra reextraída el contenido en polifenoles totales cuantificados fuese similar al de la muestra sin tratar. Los resultados son contrarios a esta suposición. Si bien para los néctares, las diferencias entre las muestras sin tratar y las reextraídas no son muy importantes, entre 0,04% y 2,8%; en el caso de los zumos las diferencias son del 10% y el 18% para los zumos 1 y 2, respectivamente. Los smoothies varían entre el 10% del Smoothie 3 y el 27% del Smoothie 2.

Con estos resultados se puede suponer que los reactivos del método de cuantificación de polifenoles totales degradan los restos de tejido vegetal presentes en forma de sólidos en suspensión, liberando los polifenoles presentes y permitiendo su cuantificación.

El procedimiento de reextracción con agua y metanol-HCl no consigue liberar todos los polifenoles de la matriz para su cuantificación. Por tanto para el análisis de polifenoles totales (TP) por colorimetría utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu el procedimiento de preparación de la muestra más adecuado es utilizar la muestra sin tratar.

Sin embargo, cuando se quiera hacer un análisis cualitativo y cuantitativo es necesario recurrir a técnicas de cromatografía líquida de alta presión en las que las muestras tienen que estar libres de sólidos en suspensión. En este caso lo habitual es centrifugar y filtrar las muestras y analizar el sobrenadante.

Según los resultados aquí obtenidos si los smoothies, zumos o néctares, se someten a una doble reextracción en agua-HCl y metanol-HCl, en lugar de una simple

clarificación por centrifugación, la cantidad de polifenoles libres para ser cuantificados se incrementa entre un 23% y un 45% para los smoothies, y entre un 5% y un 8% para los zumos y néctares.

Así para analizar por HPLC o UHPLC lo más apropiado es hacer la reextracción de polifenoles de los sólidos en suspensión precipitados tras la clarificación por centrifugación.

### 4.3.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES TOTALES INDIVIDUALES (TIP) POR UHPLC EN BEBIDAS MULTIFRUTA.

En este tercer apartado de Resultados y Discusión se aborda el análisis cualitativo y cuantitativo de polifenoles en dos muestras de bebidas multifrutas: un smoothie y un zumo.

Para este análisis se recurre al método de UHPLC desarrollado previamente por el equipo de investigación del grupo QUIMYTEC de la UPCT (Díaz-García *et al.* 2013). Está basado en una modificación del método IFU nº 71 (1998) para la determinación del perfil de antocianinas por HPLC mediante detección espectrofotométrica. Este último método está admitido por el Codex Stand 247-2005 como método analítico para la verificación de la composición, calidad y autenticidad de zumos de frutas y néctares (<http://www.codexalimentarius.net>).

El método modificado implica el uso de mayores presiones al utilizar un equipo de UHPLC, y la detección sucesiva por PDA y fluorescencia (UHPLC-PDA-Fluo). Estas modificaciones permiten detectar y cuantificar un mayor número de polifenoles. Así un método UHPLC-PDA-Fluo, resulta útil para verificar la autenticidad de bebidas de frutas, cuantificar la composición en polifenoles y calcular el valor de polifenoles totales individuales (TIP).

De las 9 bebidas multifrutas comerciales estudiadas se seleccionan un smoothie y un zumo para estudiar el análisis de polifenoles totales individuales por UHPLC. Las bebidas seleccionadas son el Smoothie 3 (Tabla 4.10), comercializado como "Smoothie Eroski"; y el Zumo 1 (Tabla 4.10) que se vende como "Antioxidante exprimido. Eroski". Esta selección se hace atendiendo al elevado porcentaje de sólidos en suspensión que contienen (Tabla 4.12) y a la menor cuantificación de polifenoles totales determinados por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, para estas dos muestras (Tabla 4.16). Mientras que el zumo 1 tiene tres frutas (uva tinta, frambuesa y cereza), el smoothie 3 es el más completo y contiene 6 frutas diferentes (manzana, frambuesa, fresa, plátano, arándano y naranja).

El método de análisis por UHPLC permite la identificación y cuantificación de los polifenoles agrupados según sus características espectroscópicas. Así se estudian los siguientes grupos de polifenoles:

1. Antocianos detectados por absorbancia a  $\lambda_{\max}$  520 nm
2. Flavonoles detectados por absorbancia a  $\lambda_{\max}$  360 nm
3. Ácidos hidroxicinámicos detectados por absorbancia a  $\lambda_{\max}$  320 nm
4. Flavavonas y dihidrochalconas detectados por absorbancia a  $\lambda_{\max}$  280 nm
5. Ácidos hidroxibenzoicos detectados por absorbancia a  $\lambda_{\max}$  260 nm
6. Flavan-3-oles y estilbenos detectados por fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc.}}$  290 nm y  $\lambda_{\text{emi.}}$  350 nm.

La cuantificación de los polifenoles se realizó seleccionando un patrón estándar de cada grupo de polifenoles al que referir los cálculos. La Tabla 4.17 muestra la relación de los patrones seleccionados y sus características espectroscópicas de detección:

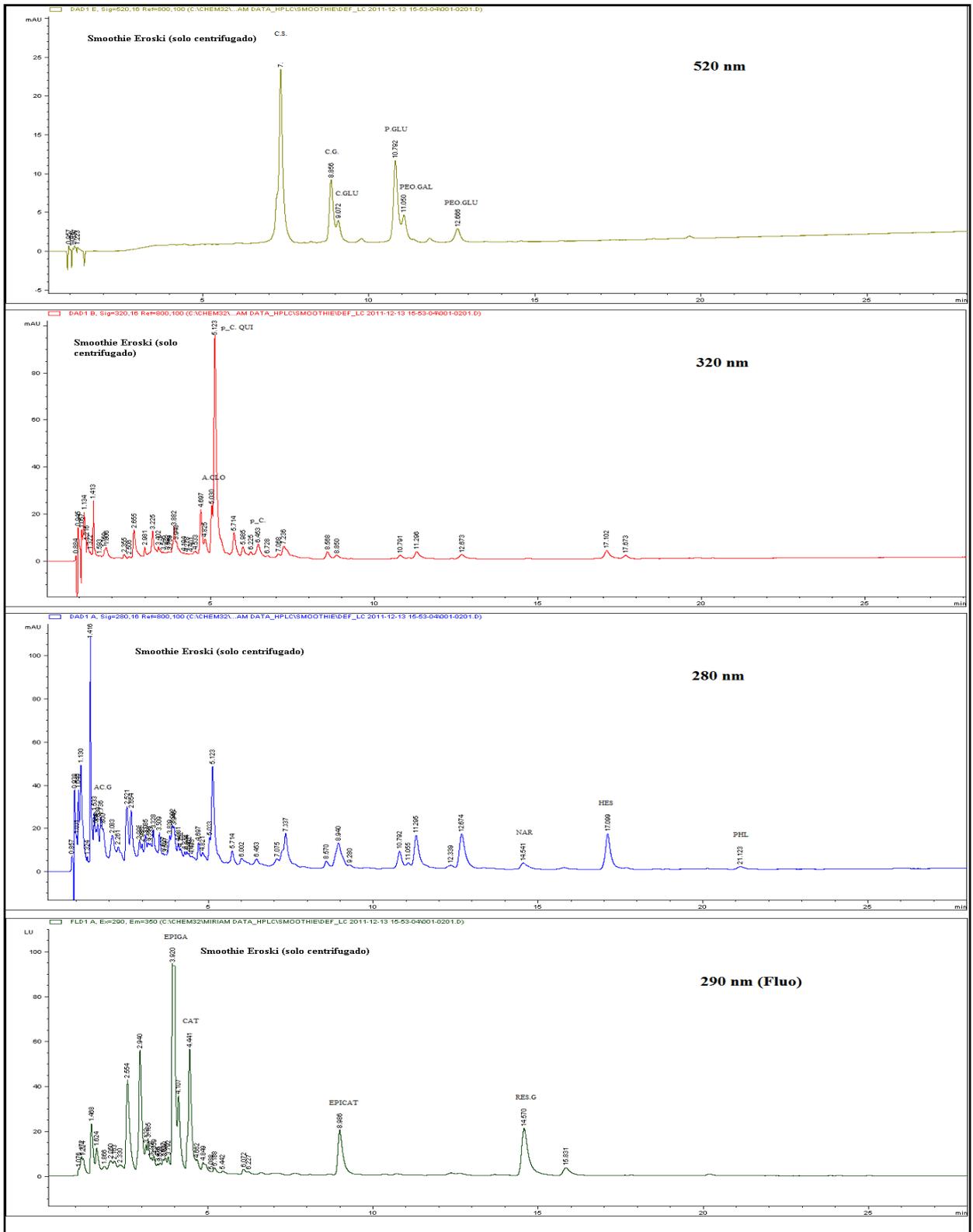
Tabla 4.17. Características de detección de los patrones utilizados.

Grupo de polifenoles	Patrón seleccionado	Detección	
		Absorbancia ( $\lambda_{\max}$ )	Fluorescencia
<b>Antocianos</b>	Callistetina	520 nm	
<b>Flavonoles</b>	Quercetina-3-O-glucosido	360 nm	
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>	Ácido p-cumárico	320 nm	
<b>Flavanonas</b>	Hesperidina	280 nm	
<b>Dihidrochalconas</b>	Floridzina	280 nm	
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>	Ácido Gálico	260 nm	
<b>Flavan-3-oles</b>	(+) Catequina		$\lambda_{\text{exc}} 290 - \lambda_{\text{emi}} 350$
<b>Estilbenos</b>	Resveratrol		$\lambda_{\text{exc}} 290 - \lambda_{\text{emi}} 350$

Para comparar el efecto de la extracción en el proceso de preparación de la muestra, las muestras se analizaron tras clarificar por centrifugación y tras extraer con el protocolo 3 seleccionado (Tabla 4.15).

La detección se hizo por absorbancia a 520 nm, 320 nm y 280 nm; y por fluorescencia a una  $\lambda_{\text{exc}}$  de 290 nm. Los cromatogramas obtenidos se recogen para el análisis del Smoothie 3 en las Figuras 4.9 y 4.11 y para el Zumo 1 en las 4.13 y 4.15.

4.3.1.a. Smoothie 3 clarificado por centrifugación



En los espectros que se muestran en la Figura 4.9 aparecen destacados los compuestos que se han identificado en las distintas longitudes de onda. Para cada compuesto que se refieren a los siguientes nombres:

Tabla 4.18. Antocianos identificados en el Smoothie 3 clarificado por centrifugación, por detección a 520 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
7.339	C.S.	Cianidin-3-sophorosido	Frambuesa	208.98245
8.856	C.G.	Cianidin 3-galactosido	Arándano (europeo y americano)	66.07917
9.072	C.GLU	Cianidin 3-glucosido	Fresa, frambuesa y arándano europeo	23.94024
10.792	P.GLU	Pelargonidin 3-glucosido	Fresa	96.27139
11.050	PEO.GAL	Peonidin 3-galactosido	Arándano americano	31.83371
12.666	PEO.GLU	Peonidin 3-glucósido	Arándano americano	19.35120

Tabla 4.19. Ácidos hidroxicinámicos identificados en el Smoothie 3 clarificado por centrifugación, por detección a 320 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
5.030	A.CLO	Ácido clorogénico	Frambuesa, Arándano europeo, naranja y manzana	152.36893
5.123	p_C.QUI	Ácido p-cumárico quinico	Fresa, frambuesa y arándano americano.	880.85223
6.453	p_C.	ácido p-cumárico	Fresa y manzana	177.76106

Tabla 4.20. Hidroxibenzoicos, Flavanonas e dihidrochalconas identificadas en el Smoothie 3 clarificado por centrifugación, por detección a 280 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
1.736	AC.G	Acido gálico	Fresa, frambuesa, arándano europeo, naranja y plátano.	214.85722
14.541	NAR	Narirutina	Naranja	43.54704
17.099	HES	Hesperidina	Naranja	180.44260
21.123	PHZ	Floritzina	Manzana	17.29019

Tabla 4.21. Flavanol-3-oles y estilbenos identificados en el Smoothie 3 clarificado por centrifugación, por fluorescencia  $\lambda_{exc}$  290 nm

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.920	EPIGA	Epigallocatequina	Fresa, frambuesa, Arándano (europeo y americano), naranja, manzana y plátano	693.65894
4.441	CAT	Catequina	Fresa, frambuesa, arándano (europeo y americano), naranja, manzana y plátano	415.05878
8.986	EPICAT	Epicatequina	Fresa, arándano (europeo y americano), naranja y manzana	215.35487
14.570	RES.G	Resveratrol 3-glucósido	Fresa, frambuesa y arándano (europeo y americano)	309.82092

Las frutas de las que se compone el smoothie 3 son manzana, frambuesa, fresa, plátano, arándano y naranja. Los componentes de estas frutas se han identificado en la mezcla.

Los cálculos de los Polifenoles Individuales Totales (TIP) se realizó se la siguiente manera: dentro de cada grupo de polifenoles de cuantificaron las áreas de cada pico identificado refiriéndolas al polifenol estándar correspondiente para obtener la cantidad de ese compuesto expresada en mg/100 ml. Después se sumó la cantidad de cada compuesto para obtener el valor de contenido en polifenoles en cada tipo de polifenol y en total.

Tabla 4.22. Cuantificación de polifenoles individuales en el Smoothie 3 clarificado por centrifugado.

Polifenoles	Contenido en polifenoles (mg/100 ml de bebida)
Antocianos	23,79
Flavan-3-oles	33,70
Ácidos hidroxicinámicos	118,38
Estilbenos	14,37
Flavanonas	17,01
Dihidrochalconas	0,40
<b>TOTAL</b>	<b>207,64 mg/100 ml</b>

La Figura 4.10 muestra el porcentaje de cada tipo de polifenoles presentes en el smoothie 3 clarificado por centrifugación.

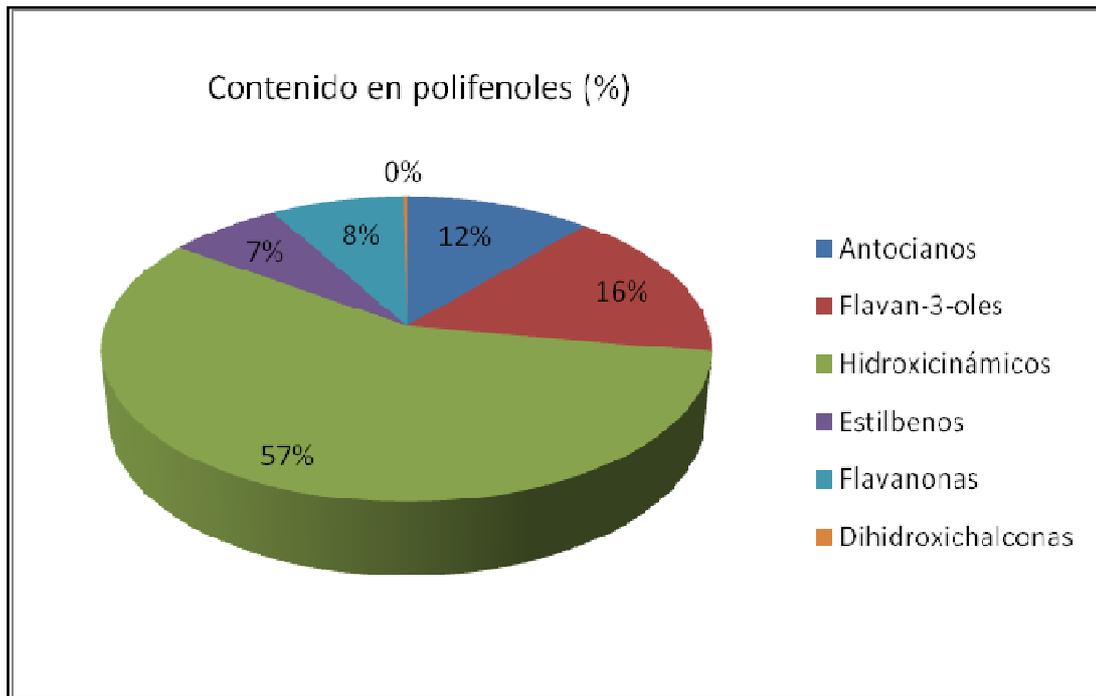


Figura 4.10. Distribución de los diferentes grupos de polifenoles analizados en el Smoothie 3 clarificado por centrifugación.



En los espectros que se muestran en la Figura 4.11 aparecen destacados unos compuestos que se han identificado en las distintas longitudes de onda. Éstos quedan recogidos en las Tablas 4.23.-4.26.

Tabla 4.23. Antocianos indetificados en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 520 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
7.345	C.S.	Cianidin 3-sophorosido	Frambuesa	307.73129
8.864	C.G.	Cianidin 3-galactosido	Arándano (europeo y americano)	161.90065
9.080	C.GLU	Cianidin 3-glucosido	Fresa, frambuesa y arándano europeo	45.19917
10.805	P.GLU	Pelargonidin 3-glucosido	Fresa	253.87946
11.063	PEO.GAL	Peonidin 3-galactosido	Arándano americano	61.63067
12.681	PEO.GLU	Peonidin 3-glucósido	Arándano americano	36.27368

Tabla 4.24. Ácidos hidroxicinámicos identificados en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 320 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
5.029	A.CLO	Ácido clorogénico	Frambuesa, Arándano europeo, naranja y manzana	239.01477
5.122	p_C.QUI	Ácido p-cumaroil quinico	Fresa, frambuesa y arándano americano.	1211.46545
6.452	p_C.	Ácido p-cumárico	Fresa y manzana	229.98553

Tabla 4.25. Hidroxibenzoicos, flavanonas e dihidrochalconas identificadas en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 280 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
1.735	AC.G	Acido gálico	Fresa, frambuesa, arándano europeo, naranja y plátano.	254.13164
14.546	NAR	Narirutina	Naranja	55.74193
17.113	HES	Hesperidina	Naranja	326.03732
21.128	PHZ	Floritzina	Manzana	13.64423

Tabla 4.26. Flavanol-3-oles y estilbenos identificadas en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por fluorescencia  $\lambda_{exc}$  290 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.923	EPIGA	Epigallocatequina	Fresa, frambuesa, Arándano (europeo y americano), naranja, manzana y plátano	844.10785
4.440	CAT	Catequina	Fresa, frambuesa, arándano (europeo y americano), naranja, manzana y plátano	572.21692
8.984	EPICAT	Epicatequina	Fresa, arándano (europeo y americano), naranja y manzana	259.41611
14.564	RES.G	Resveratrol 3-glucósido	Fresa, frambuesa y arándano (europeo y americano)	394.75116

Los cálculos de los Polifenoles Individuales Totales (TIP) se realizaron por el mismo procedimiento en todas las muestras. Los resultados obtenidos para el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl se recogen en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Cuantificación de polifenoles individuales en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl.

Polifenoles	Contenido en polifenoles (mg/100 ml de bebida)
Antocianos	46,18
Flavan-3-oles	42,65
Hidroxicinámicos	164,27
Estilbenos	18,31
Flavanonas	24,65
Dihidrochalconas	0,31
<b>TOTAL</b>	<b>296,37 mg/100 ml</b>

Como cabe esperar, los resultados obtenidos en esta muestra son mucho mayores que la cantidad de polifenoles cuantificada en esta muestra que únicamente se ha sometido a una clarificación. Se observa claramente, la cantidad de polifenoles que se pierden en el centrifugado si no se utiliza una técnica de extracción adecuada. Se confirma así la necesidad de extraer los polifenoles del precipitado para una correcta determinación de los mismos.

La Figura 4.12 muestra el porcentaje de cada tipo de polifenoles presentes en el smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl.

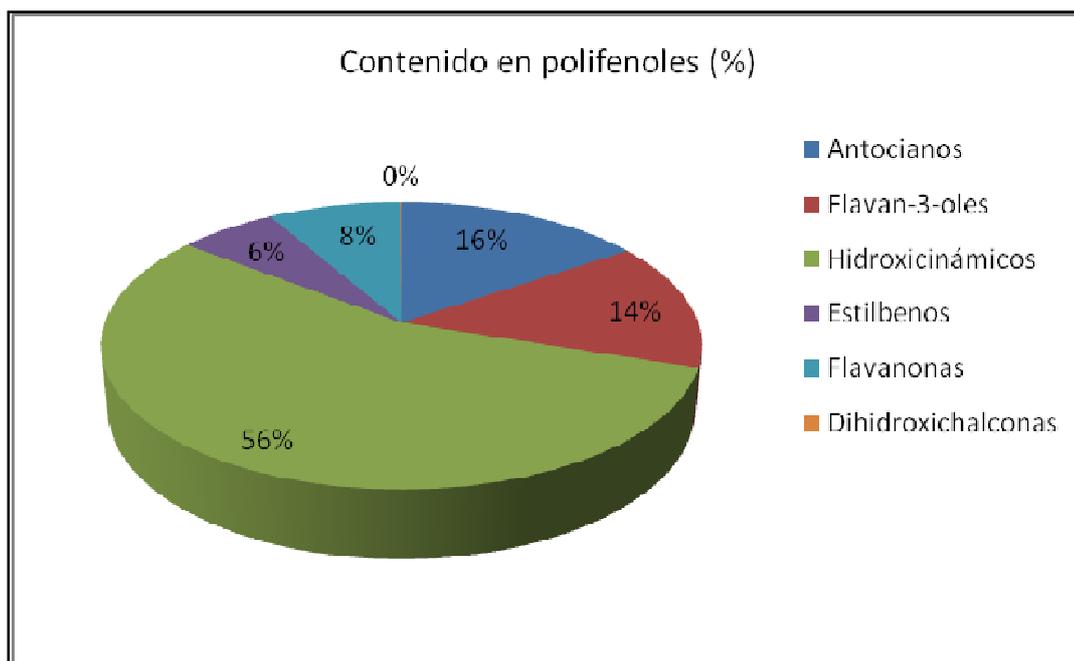


Figura 4.12. Distribución de los diferentes grupos de polifenoles analizados en el Smoothie 3 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl.



En los espectros que se muestran en la Figura 4.13 aparecen destacados unos compuestos que se han identificado en las distintas longitudes de onda. Para cada compuesto que se refieren a los siguientes:

Tabla 4.28. Antocianos identificados en el Zumo 1 clarificado por centrifugación, por detección a 520 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
7.233	D.G.	Delfinidin 3-glucosido	Uva tinta	144.75557
7.345	C.S.	Cianidin 3-sophorosido	Frambuesa	257.64288
8.869	C.G.RUT	Cianidin 3 glucosil-rutinosido	Frambuesa	60.88257
9.089	C.RUT	Cianidin 3-rutinosido	Frambuesa	36.82135
9.789	P.GLU	Petunidin 3-glucosido	Uva tinta	34.59017
11.846	PEO.GLU	Peonidin 3-glucósido	Uva tinta	54.36818
12.683	M.GLU	Malvidin 3-glucosido	Uva tinta	151.79431
19.669	M.A.GLU	Malvidin 3-O-(6"-acetil-glucosido)	Uva tinta	13.46755

Tabla 4.29. Ácidos hidroxicinámicos identificados en el Zumo 1 clarificado por centrifugación, por detección a 320 nm

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.690	A.NEOC	Ácido neoclorogénico	Cereza	306.54181
4.696	CAF	Acido caftárico	Uva tinta	896.15497
4.825	A.CLO	Ácido clorogénico	Frambuesa y cereza.	461.59039
6.459	p_C.TAR	p_cumaroil tartárico	Cereza y uva tinta	645.63043

Tabla 4.30. Acidos hidroxibenzoicos, flavanonas e dihidrochalconas identificados en el Zumo 1 clarificado, por detección a 280 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
1.822	AC.G	Acido gálico	Frambuesa	605.93628

Tabla 4.31. Flavanol-3-oles y estilbenos identificados en el Zumo 1 clarificado por centrifugación, por fluorescencia  $\lambda_{exc}$  290 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.929	EPIGA	Epigallocatequina	Frambuesa, uva tinta y cereza.	142.67264
4.097	CAT	Catequina	Frambuesa, uva tinta y cereza.	652.00946
8.988	EPICAT	Epicatequina	Uva tinta y cereza.	133.83527
14.566	RES.G	Resveratrol 3-glucósido	Frambuesa, uva tinta y cereza.	169.70322

Las frutas de las que se compone el zumo 1 son uva tinta, frambuesa y cereza. Los componentes de estas frutas se han identificado en la mezcla.

Los cálculos de polifenoles individuales totales (TIP) se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.32.

Tabla 4.32. Cuantificación de Polifenoles Individuales en el Zumo 1 clarificado por centrifugación.

Polifenoles	Contenido en polifenoles (mg/100 ml de bebida)
Antocianos	40,19
Flavan-3-oles	23,63
Hidroxicinámicos	146,77
Estilbenos	7,87
Hidroxibenzoicos	23,49
<b>TOTAL</b>	<b>241,95 mg/100 ml</b>

Estos valores se representan porcentualmente en la Figura 4.14.

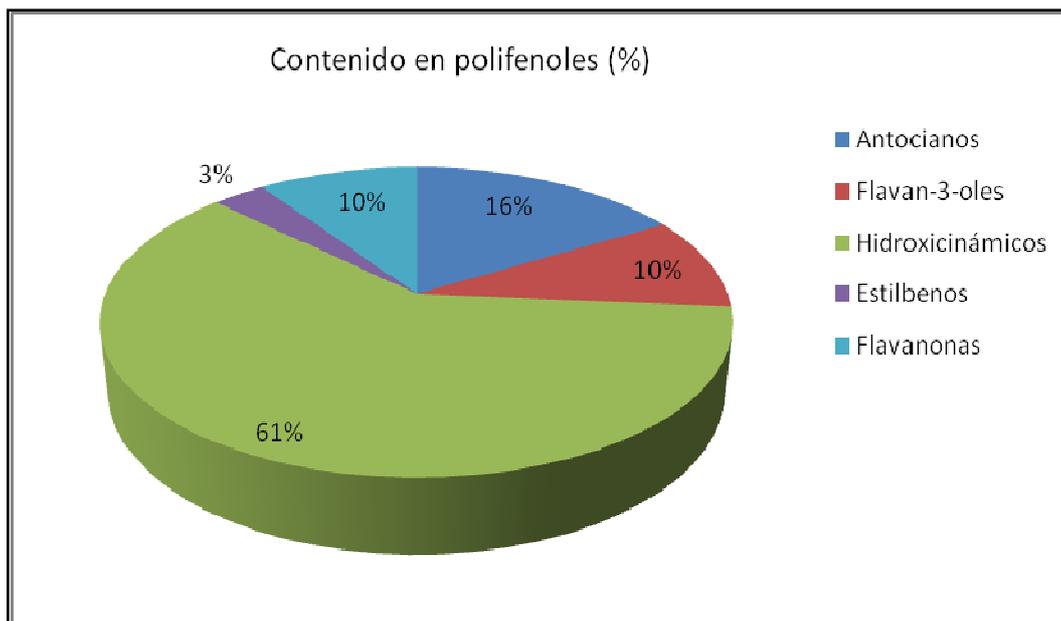


Figura 4.14. Distribución de los diferentes grupos de polifenoles analizados en el Zumo 1 clarificado por centrifugación.

**4.3.2.b. Zumo 1 extraído en agua-HCl y reextraído en metanol-HCl**

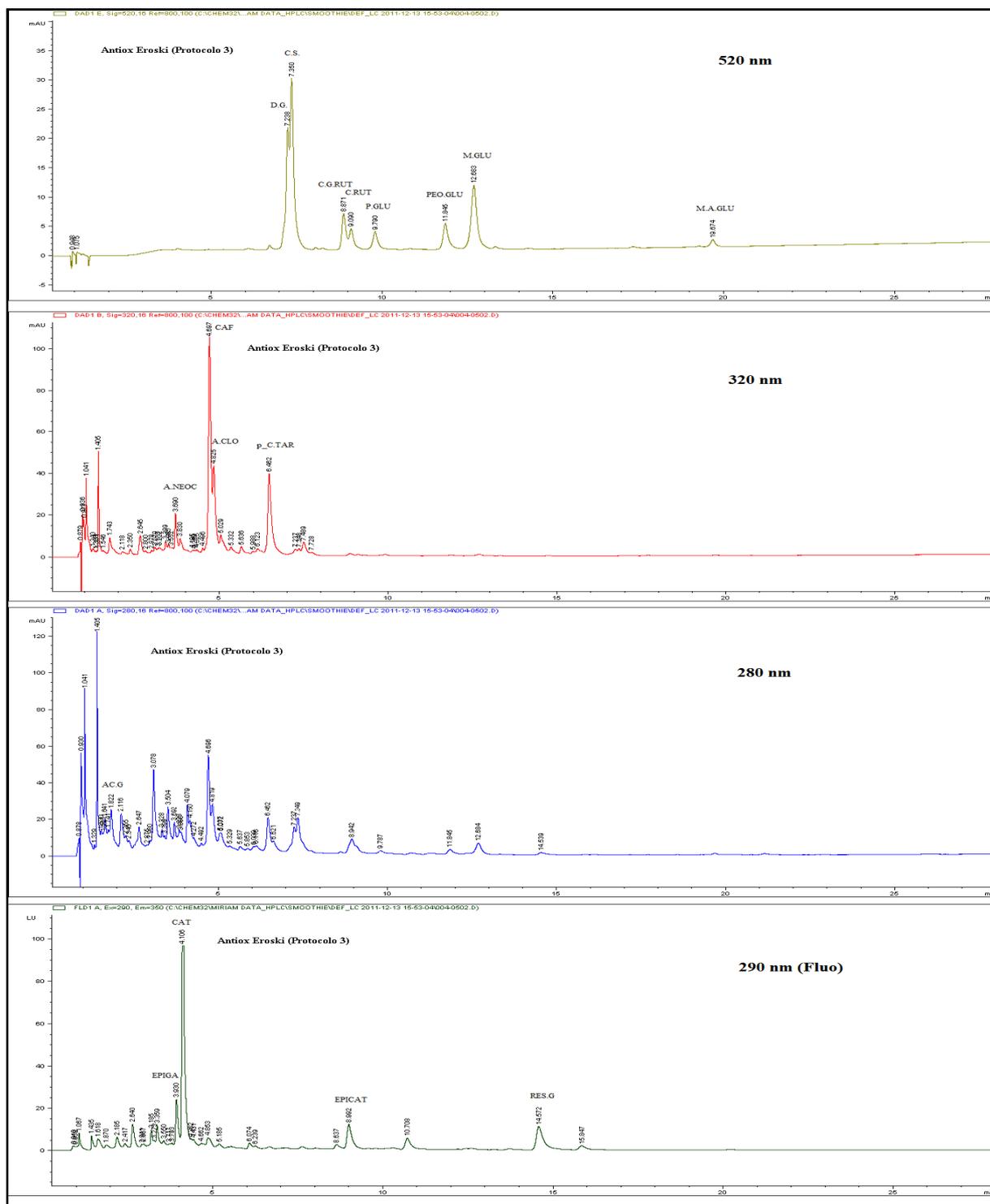


Figura 4.15. Cromatograma obtenido por UHPLC-PDA-Fluo del Zumo 1 extraído en agua-HCl y reextraído en metanol-HCl.

En los espectros que se muestran en la Figura 4.15 aparecen destacados unos compuestos que se han identificado en las distintas longitudes de onda. Éstos quedan recogidos en la Tabla 4.37.

Tabla 4.33. Antocianos identificados en el Zumo 1 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 520 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
7.238	D.G.	Delphinidin 3-glucosido	Uva tinta	133.20743
7.350	C.S.	Cianidin 3-sophorosido	Frambuesa	235.99763
8.871	C.G.RUT	Cianidin 3 glucosil-rutinosido	Frambuesa	49.45903
9.090	C.RUT	Cianidin 3-rutinosido	Frambuesa	32.12255
9.790	P.GLU	Petunidin 3-glucosido	Uva tinta	30.01518
11.845	PEO.GLU	Peonidin 3-glucósido	Uva tinta	45.77813
12.683	M.GLU	Malvidin 3-glucosido	Uva tinta	132.00676
19.674	M.A.GLU	Malvidin 3-O-(6"-acetil-glucosido)	Uva tinta	10.73015

Tabla 4.34. Ácidos hidroxicinámicos identificados en el Zumo 1 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 320 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.690	A.NEOC	Ácido neoclorogénico	Cereza	293.83099
4.697	CAF	Acido caftárico	Uva tinta	806.13776
4.825	A.CLO	Ácido clorogénico	Frambuesa y cereza.	443.78653
6.462	p_C.TAR	Ácido p_cumaroil tartárico	Cereza y uva tinta	605.80048

Tabla 4.35. Hidroxibenzoicos identificados en el Zumo 1 extraído en agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por detección a 280 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
1.822	AC.G	Acido gálico	Frambuesa	597.48010

Tabla 4.36. Flavanol-3-oles y estilbenos identificados en el Zumo 1 extraído agua-HCl y reextraído con metanol HCl, por fluorescencia  $\lambda_{exc}$  290 nm.

Tr (min)	Abreviatura	Nombre	Fruta a la que pertenece	Área
3.930	EPIGA	Epigallocatequina	Frambuesa, uva tinta y cereza.	132.30305
4.106	CAT	Catequina	Frambuesa, uva tinta y cereza.	649.67554
8.992	EPICAT	Epicatequina	Uva tinta y cereza.	126.61030
14.572	RES.G	Resveratrol 3-glucósido	Frambuesa, uva tinta y cereza.	159.94165

Los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles totales del Zumo 1 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl se recogen en la Tabla 4.37.

Tabla 4.37. Cuantificación de Polifenoles Individuales en el Zumo 1 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl.

Polifenoles	Contenido en polifenoles (mg/100 ml de bebida)
Antocianos	35,67
Flavan-3-oles	23,13
Hidroxicinámicos	210,12
Estilbenos	7,42
Hidroxibenzoicos	23,16
<b>TOTAL</b>	<b>299,49 mg/100 ml</b>

La Figura 4.16 muestra el porcentaje de cada tipo de polifenoles presentes en el zumo 1 extraído con agua-HCl y reextraído con metanol HCl.

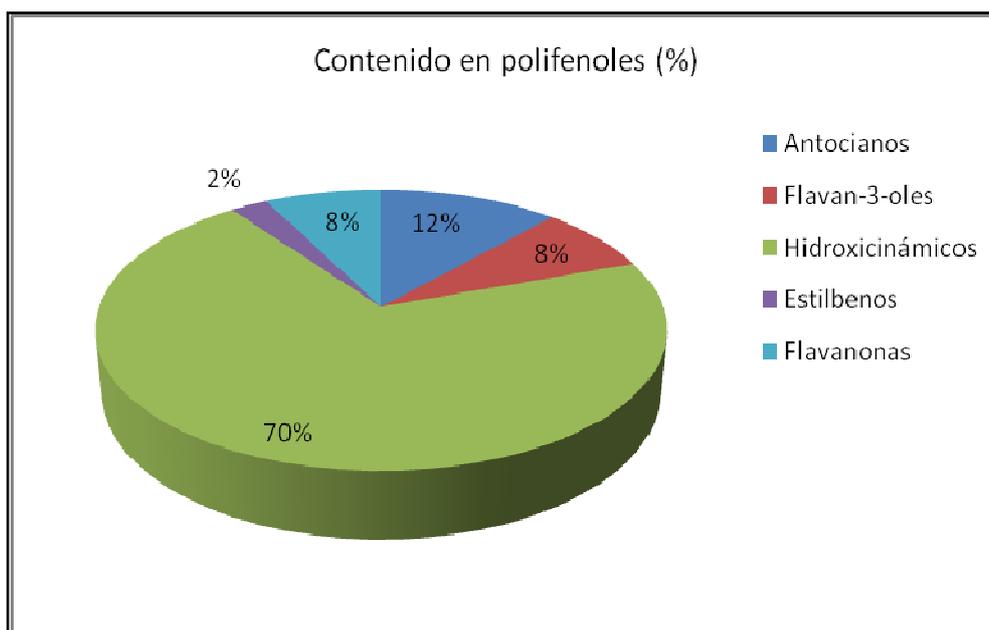


Figura 4.16. Distribución de los diferentes grupos de polifenoles analizados en el Zumo 1 sometido al protocolo de extracción nº3 "Experimento 2".

Los datos de polifenoles totales individuales determinados por UHPLC se comparan con los polifenoles totales determinados colorimétricamente por el método de Folin-Ciocalteu.

Se realizó una nueva recta de calibrado con ácido gálico y se analizaron las mismas muestras de Smoothie 3 y Zumo 1 que por UHPLC, es decir muestras clarificadas por centrifugación y sometidas a una doble extracción en agua-HCl y metanol-HCl. Además como el método de Folin-Ciocalteu permite el análisis de las

muestras sin tratar, también se determinaron los polifenoles colorimétricamente en ambas muestras sin tratar.

La Tabla 4.38 recoge los datos obtenidos en estos análisis. Los datos de polifenoles totales están en el mismo orden que los previamente obtenidos para las mismas muestras en el apartado 4.2.2 y mostrados en la Tabla 4.16.

Tabla 4.38. Cuantificación de polifenoles totales y de polifenoles totales individuales en las muestras Smoothie 3 y Zumo 1.

Método de análisis de polifenoles	Muestra	Tratamiento de la muestra	Polifenoles (mg/100 ml)
<b>Folin-Ciocalteu Polifenoles Totales (TP)</b>	Smoothie 3	Sin tratar	<b>140,52</b>
		Clarificada	106,19
		Reextraída	134,82
	Zumo 1	Sin tratar	<b>96,57</b>
		Clarificada	75,01
		Reextraída	88,16
<b>UHPLC-PDA-Fluo Polifenoles totales individuales (TIP)</b>	Smoothie 3	Clarificada	207,64
		Reextraída	296,37
	Zumo 1	Clarificada	241,95
		Reextraída	299,49

Los resultados muestran como sometiendo la muestra a reextracción la determinación de polifenoles es mayor. Esto ocurre debido a la gran cantidad de polifenoles que quedan en el precipitado tras realizar la centrifugación y que no se determinan si no se realiza una extracción adecuada.

También se aprecia cómo el análisis de polifenoles totales individuales por UHPLC conduce a valores más altos que la determinación de polifenoles totales por colorimetría. A esta observación hay que sumar que el método de UHPLC permite la identificación de compuestos y autenticación de la muestra.

En las Figura 4.17 y 4.18 se muestra la correlación entre los resultados obtenidos con el análisis por UHPLC y el método colorimétrico para las dos muestras analizadas.

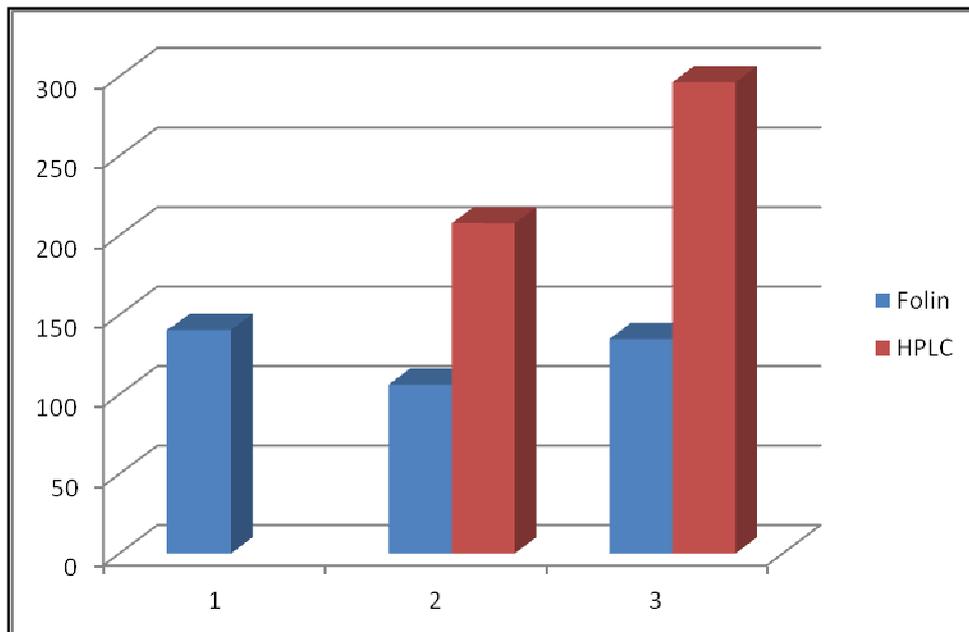


Figura 4.17. Comparación contenido en polifenoles del Smoothie 3 por el método de Folin-Ciocalteu y por UHPLC-PDA-Fluo.

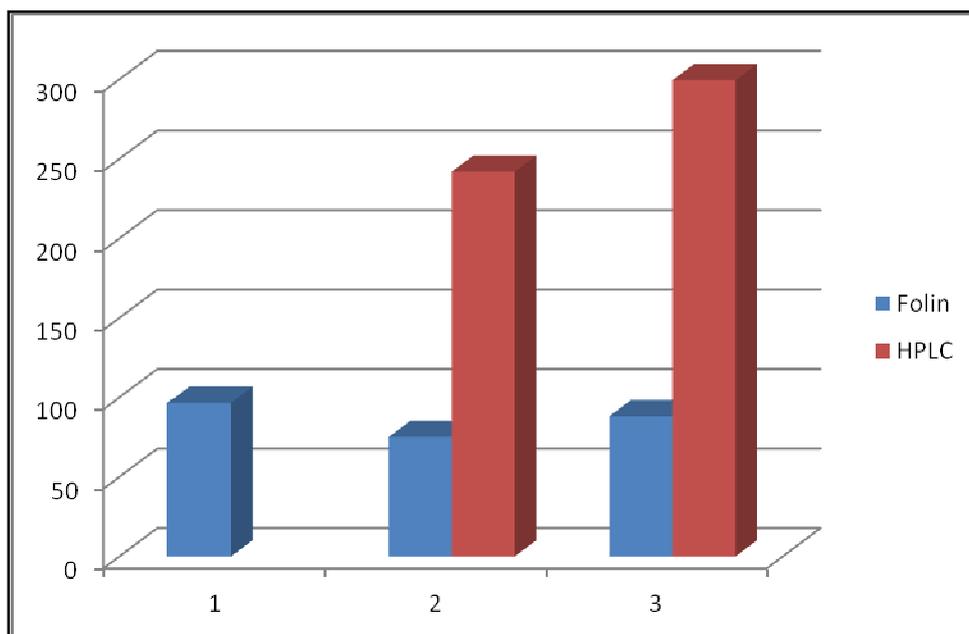


Figura 4.18. Comparación contenido en polifenoles del Zumo 1 por el método de Folin-Ciocalteu y por UHPLC-PDA-Fluo.

Tanto en el Smoothie 3, como en el Zumo 1, se observa la correlación existente entre los 2 métodos utilizados. El método colorimétrico de Folin es habitualmente utilizado en la determinación inespecífica de fenoles totales (TP; Total Polyphenols).

En esta investigación se pone de manifiesto la conveniencia de utilizar un método que determina de forma rápida y sencilla el perfil y contenido en polifenoles individuales totales (TIP; Total Individual Polyphenols), con una efectividad y especificidad mucho mayor que el método más utilizado actualmente (Folin-Ciocalteu).

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

1. Los mejores disolventes de extracción de polifenoles en zumos, zumos concentrados y purés de una sola fruta son el agua para la extracción de antocianos y el metanol-HCl para extracción genérica de polifenoles.
2. En el análisis de polifenoles totales (TP) por colorimetría utilizando el reactivo de Folin-ciocalteu se obtiene la máxima cuantificación de polifenoles cuando se utiliza la muestra sin tratar.
3. Para el análisis por UHPLC de productos multifruta comerciales, en la preparación de la muestra es necesario hacer la extracción de los polifenoles que quedan en el precipitado tras la clarificación de la muestra mediante centrifugación.
4. El mejor procedimiento de extracción de los polifenoles del precipitado tras clarificar por centrifugación es: extraer en agua-HCl y reextraer en metanol-HCl.
5. El método de medida de UHPLC-PDA-Fluo permite determinar los polifenoles totales individuales (TIP) en productos comerciales de bebidas multifruta: smoothies, zumos y néctares, etc.
6. El método de medida de UHPLC-PDA-Fluo también es útil para identificar los polifenoles presentes en productos comerciales de frutas, permitiendo así su autenticación.

## **CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA**

- ❖ Acilu, M.; Berganza, J.; Brettes, P.; Garay, I.; Salas, O.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. (2003). Obtención de antioxidantes a partir de pepitas de uva mediante extracción con fluidos supercríticos. SFE. Residuos 75, 78-82.
- ❖ Arranz Martínez, S. (2010). Compuestos polifenólicos (Extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición y Bromatología II.
- ❖ Arts, I.C.W.; Van de Putte, B.; Hollman, P.C.H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (5), 1746-1751.
- ❖ Bakker, J.; Timberlake, C.F. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extract of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. Journal of the Science of Food and Agriculture. 36, 1325-1333.
- ❖ Bors, W.; Heller, W.; Michael, C.; Saran, M. (1990). *Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies*. Methods Enzymology. 186, 343-355.
- ❖ Bylund, A.; Saarinen, N.; Zhang, J.X.; Bergh, A.; Widmark, A.; Johansson, A.; Lundin, E.; Adlercreutz, H.; Hallmans, G.; Stattin, P. y Mäkela, S. (2005). Anticancer effects of a plant lignin 7-hydroxymatairesinol on a prostate cancer model in vivo. Experimental Biology and Medicine. 230, 217-223.
- ❖ Cacace, J. E.; Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21), 5939-5946.
- ❖ Erika, A.; Plazas, G.; Cuca, S.; Luis, E.; Delgado, A.; Wilman, A. (2008): Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum Kunth* (PIPERACEAE) y derivados acetilados. *Rev.Colomb.Quim.* 37 (2), 135-144.
- ❖ De Pascual-Teresa, S.; Moreno, D.A.; García Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. International Journal of Molecular Sciences. 11, 1679-1703.
- ❖ De Pascual-Teresa, S.; Sánchez-Ballesta, M.T. (2007). Anthocyanins: from plants to health. *Phytochemistry Reviews*. 7, 281-299.
- ❖ Díaz-García, M.; Obón, J.M.; Castellar, M.R.; Collado, J.; Alacid, M. (2013) Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry*, 138, 938-949.
- ❖ Dixon, R.; Steele, C. (1999). "Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering". *Trends Plant Sci* 4, 394-400.
- ❖ Escribano, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 1054, 129-141.

- ❖ Faria, A.; Oliveira, J.; Neves, P.; Gameiro, P.; Santos-Buelga, C.; Freitas, V.; Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6896-6902.
- ❖ Ferreres, F.; Gil, M.I.; Tomás-Barberán, F.A. (1996). Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films. *Food Research International*. 29, 389-395.
- ❖ Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 890-894.
- ❖ Fügél, R.; Carle, R.; Schieber, A. (2005). Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams-A review. *Trends in Food Science & Technology*. 16, 433-411.
- ❖ Gao, L.; Mazza, G. (1995). Characterization, quantification and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 343-346.
- ❖ Garcia-Alonso, M.; De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. (2004) Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry* 84 (1), 13-18.
- ❖ García-Alonso, F.J. (2005). Tesis Doctoral Europea. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes.
- ❖ García-Alonso, M.; Rimbach, G.; Rivas-Gonzalo, J.C.; De Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A-Studies in platelets, monocytes and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3378-3384.
- ❖ García, M.; Rimbach, G.; Sasai, M.; Nakahara, M.; Matsugo, S.; Uchida, Y.; Rivas-Gonzalo, J.C.; De Pascual-Teresa, S.C. (2005). Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecular Nutrition and Food Research*. 49 (12), 1112-1119.
- ❖ García Medeiro, J.M.; Ferruelo Alonso, A.; Páez Borda, A.; Luján Galán, M.; Angulo Cuesta, J.; Chiva Robles, V.; Berenguer Sánchez, A. (2005). Efecto de polifenoles de la dieta mediterránea sobre la proliferación y mediadores de la invasividad "in vitro" de la línea de cáncer vesical murino MB-49. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. Servicio de Urología. *Actas Urológicas Españolas*. 29 (8), 743-749.
- ❖ Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (5), 1370-1373.
- ❖ Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Lölliger, R.; Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33, 601-617.
- ❖ Harbone, J.B.; Hall, E. (1964). Plant polyphenols-XIII. The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisaccharides. *Phytochemistry*. 3, 453-463.

- ❖ Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal Research*. 113, 287-299.
- ❖ Katsube, T.; Tabata, H.; Yamazaki, Y.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. (2003). Low-density lipoprotein antioxidant activity from edible plant products. *Atherosclerosis Supplements*. 4 (2), 338.
- ❖ Kawsar, S.M.A.; Huq, E.; Nahar, N.; Ozeki, Y. (2008). Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by Reversed Phase-HPLC. *American Journal of Plant Physiology* 3 (4); 165-172.
- ❖ Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynsk-Swiglo, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C, and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 313-322.
- ❖ Koponen, J.M.; Happonen, A.M.; Mattila, P.H.; Törrönen, R.A. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem*. 55, 1612-1619.
- ❖ Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Dietet*. 24, 117-191.
- ❖ 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.
- ❖ Lopes da Silva, F.; Escribano-Bailón, M.T.; Pérez Alonso, J.J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT* 40, 374-382.
- ❖ Magalhaes, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C.; Rangel, A.O.S.S. (1996). Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in foods products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5241-5246.
- ❖ Mahdavi, R.; Nikniaz, Z.; Rafrat, M.; Jouyban, A. (2010). Determination and comparison of Total Polyphenol and vitamin C contents of natural fresh and commercial fruit juices. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9 (10), 968-972.
- ❖ 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 Flores, F.; González Gallego, J.; Culebras, J.M. y Tuñón, M<sup>a</sup>.J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. Universidad de León y Hospital de León. *Nutrición Hospitalaria*. 6, 271-278.
- ❖ Martínez M., A. (2005). Flavonoides. Tesis doctoral en la facultad de química farmacéutica, en la Universidad de Antioquia.
- ❖ Mattila, P.; Astola, J.; Kumpulainen, J. (2000). Determination of flavonoids in plant material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (12), 5834-5841.

- ❖ Mattila, P.H.; Hellström, J.; McDougal, G.; Dobson, G.; Matti Pihlava, J.; Tiirikka, T.; Stewart, D.; Karjalainen, R. (2011). Polyphenol and vitamin C contents in Europeans commercial blackcurrant juice products. *Food Chemistry*. 127, 1216-1223.
- ❖ Mazza, G. and Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. CRC Press, Boca Raton. 3, 29-56.
- ❖ Medina, M.B. (2011). Determination of total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*. 3, 79-87.
- ❖ Moore, A.B.; Francis, J.F.; Clydesdale, F.M. (1982). Changes in chromatography profile of anthocyanins of red onion during extraction. *J. Food Protect.* 45, 738-743.
- ❖ Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P. y Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechins, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemycal Pharmacology*. 45, 13-19.
- ❖ Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *Food Science and Technology*. 43, 992-999.
- ❖ Muntha Reddy, K.; Ruby, L.; Lindo, A.; Muraleedharan Nair, G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 53 (23), 9268-9273
- ❖ Naczki, M., Shahidi, F., & Sullivan, A. (1992). Recovery of rapeseed tannins y various solvent systems. *Food Chemistry*, 45(1), 51-54.
- ❖ Niki, E.; Packer, L., y Cadenas, E. (1996).  $\alpha$ -Tocopherol, en: "Handbook of antioxidants". Marcel Dekker. New York. P.p.3-25.
- ❖ Obón, J.M.; Díaz-García, M.C.; Castellar, M.R. (2011). Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 760-771.
- ❖ Paredes-López, O.; Cervantes-Ceja, M.L.; Vigna-Pérez, M.; Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life – A Review. *Plant Foods Hum Nutr.* 65, 299-308.
- ❖ Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Taberner, M.; Díaz-Rubio, M.E.; Serrano, J.; Goni, I. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41(3), 274-285.
- ❖ Pescarmona, G.P. (2008). Resveratrol. *Phytochemicals*. 12, 11.
- ❖ Peterson, J.; Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr.Res.* 18, 1995-2018.
- ❖ Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A.M.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.; Freitas, V. (2005). Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments. *Food Chemistry* 90, 81-87.

- ❖ Rivas Gonzalo, J.C. y García Alonso, M. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales. Estructura y actividad antioxidante. *Nutrición y bromatología*. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Alimentación Nutrición y Salud. Vol 9. Nº2. p.p.31-38.
- ❖ Shahidi, F.; Naczk, M.; Pegg, R. B. y Synowiecki, J. (1991). Chemical composition and nutritional value of processing discards of cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 42(2), 145-151.
- ❖ Sharif, A.; Naim, N.; Jasmani, H. y Ahmad, W.Y.W. (2010). Effects of solvent and temperature on the extraction of colorant from onion (*Allium cepa*) skin using Pressurized Liquid Extraction. *Asian Journal of Applied Sciences* 3(4), 262-268.
- ❖ Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- ❖ Sreekanth, D.; Arunasree, M.K.; Roy, R.K.; Chandramohan Reddy, T.; Reddy V. G.; Reddanna, P. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*. 14 (11), 739-746.
- ❖ Strack, D.; Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*. 62 (3), 247-269.
- ❖ Teissedre, P.L.; Landrault, N. (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*. 33, 461-467.
- ❖ Timberlake, C.F. (1998). The biological properties of anthocyanins compounds. *NAT-COL. Quart.Bull.* 1, 4-15.
- ❖ Verhoeven, M.E.; Bovy, A.; Collins, G.; Muir, S.; Robinson, S.; de Vos, C.H.R.; Colliver, S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*. 53, 2099-2106.
- ❖ Vinson, J.; Zubic, L.; Bose, P.; Samman, N.; Proch, J. (2005). Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 24 (1), 44-50.
- ❖ Wang, S.Y., y Lin, S.H. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 140-146.
- ❖ Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485-493.
- ❖ Winkey-Shirley, B. (2001). It takes a Garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* 127, 1399-1404.
- ❖ Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4069-4075.

**Trabajos y libros consultados:**

- ❖ *Valoración nutricional positiva de los zumos y vigilancia tecnológica del sector de zumos.* (1998).Elaborado por: AZTI (Instituto Tecnológico Pesquero y Alimentario) con la colaboración de: ASOZUMOS (Asociación Española de Fabricantes de Zumos).
- ❖ *Zumos y néctares. La fruta líquida.* (2012). Elaboración por ASOZUMOS (Asociación Española de Fabricantes de Zumos).
- ❖ *Market Report. Liquid Fruit.* (2010). Elaboración por European Fruit Juice Association (AIJN).
- ❖ *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications.* Editado por Andersen, M. Ø y Markham, K.R. (2006). ISBN 0-8493-2021-6

**Páginas web consultadas:**

- ❖ [www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu)
- ❖ [www.infoalimentacion.com](http://www.infoalimentacion.com)
- ❖ [www.euroresidentes.com](http://www.euroresidentes.com)
- ❖ [www.consumer.com](http://www.consumer.com)
- ❖ [www.aijn.org](http://www.aijn.org)
- ❖ [www.alimarket.com](http://www.alimarket.com)
- ❖ [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)
- ❖ [www.asozumos.org](http://www.asozumos.org)
- ❖ [www.salud.com](http://www.salud.com)