

# Análisis composicional de polifenoles en el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus L. wild*)

Miriam Cristina Díaz García; José María Obón de Castro; María Rosario Castellar Rodríguez  
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Universidad Politécnica de Cartagena  
Paseo Alfonso XIII, nº 52. 30203 Cartagena (Murcia)  
Teléfono: 968-325564  
E-mail: mediazgarcia@hotmail.com

**Resumen.** En el mercado podemos encontrar zumos de frutas rojas, como el mirtilo, que destacan por las propiedades funcionales aportadas por los polifenoles. Este trabajo presenta un método de análisis por HPLC de los polifenoles de zumos como alternativa al método IFU nº 71 empleado para antocianos (CODEX STAN 247-2005). El método propuesto utiliza una columna de alta resolución de 1,8 micras y fases móviles con ácido trifluoroacético 0,5% en sustitución del ácido fórmico 10%. Dicho método logra separar e identificar 29 polifenoles del mirtilo en 28 minutos. Para la industria de zumos esta identificación es importante para autentificar y evitar adulteraciones en los zumos de frutas.

## 1 Introducción

El fruto del mirtilo (*Vaccinium myrtillus L.*) pertenece a la Familia de las Ericáceas, especie nativa de los Estados Unidos. Crece como un pequeño arbusto caducifolio de ramas leñosas y hojas ovales con borde aserrado, las flores tienen la corola de color rosado y los frutos son bayas redondeadas de color negro azulado. Su consistencia es suave, contiene pequeñas semillas y su sabor es astringente.

Actualmente podemos encontrar en el mercado zumos de frutas rojas con propiedades antioxidantes que utilizan mirtilo. Estos zumos suman a sus propiedades nutritivas las funcionales aportadas por los polifenoles que en concreto para los zumos de frutas rojas, mayoritariamente consumidos, son los antocianos. El contenido de antocianos del mirtilo es uno de los mayores encontrados en las frutas rojas, teniendo una gran variedad en su composición. El consumo de estos zumos aporta beneficios para la salud. Entre los numerosos efectos saludables de los polifenoles, la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN) les atribuye dicho efecto beneficioso frente a diversas enfermedades como las cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas [1].

Los polifenoles son constituyentes bioactivos no nutricionales de los alimentos de origen vegetal, y constituyen un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen en su estructura varios grupos fenólicos. Estos compuestos pueden clasificarse entre: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos, en función del número de anillos fenólicos que contienen y los elementos estructurales que unen unos anillos con otros [2].

La identificación y cuantificación de los polifenoles se realiza habitualmente por métodos de HPLC.

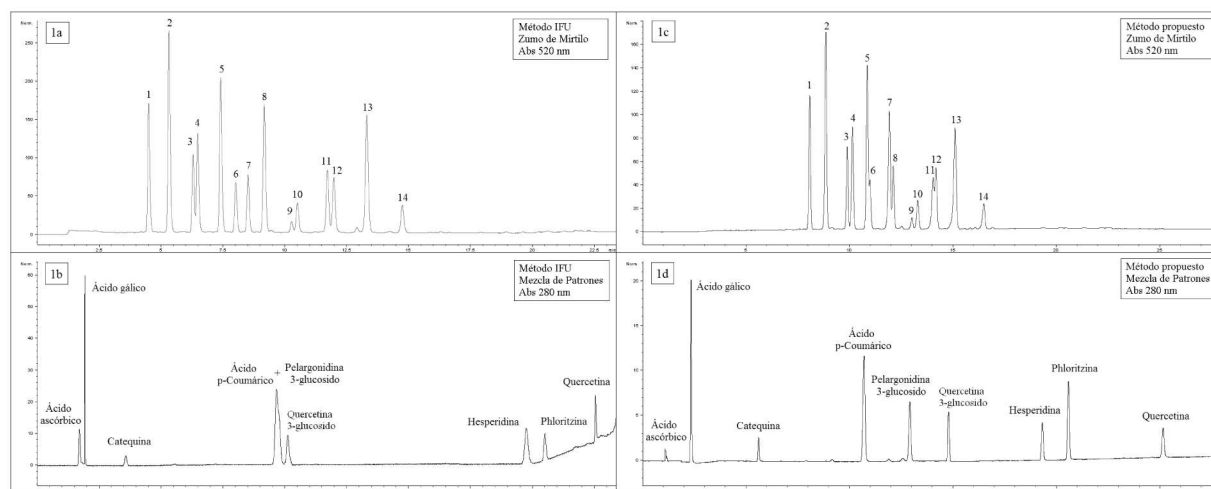
El método IFU nº 71 se emplea para el análisis de antocianinas y utiliza detección con fotodiodos. Con este análisis se obtiene el perfil de antocianos característico de cada zumo y se puede conseguir su autentificación. El resto de polifenoles se analizan siguiendo diferentes métodos de HPLC.

En este trabajo se presenta la propuesta de un único método de HPLC que sea capaz de analizar tanto los antocianos como el resto de los polifenoles mayoritarios del zumo de mirtilo, y cuyo uso pueda extenderse al resto de zumos de frutas.

## 2 Materiales y métodos

Las muestras analizadas en el presente trabajo fueron el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus L. wild*), procedente de un concentrado de la casa comercial Grünewald (Stainz, Austria), y una mezcla de patrones de los grupos de polifenoles más representativos presentes en los zumos de frutas: ácido gálico y ácido p-coumárico (ácidos fenólicos), pelargonidina 3-glucósido, quercetina, (+)-catequina, hesperidina, quercetina 3-glucósido y phloridzina (flavonoides). Los patrones están a una concentración final de 0,1 mg/mL, y se prepararon con ácido ascórbico 0,4 mg/mL.

Para los análisis se empleó un equipo de HPLC de altas presiones, serie 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), compuesto por una bomba binaria (G1312B), un detector de fotodiodos con detección de longitud de onda múltiple (G1315C), un detector de fluorescencia (G1321A) y un inyector automático termostatzado (G1329B). Las columnas cromatográficas de análisis fueron: Zorbax SB-C18 (ref: 863953-902) con tamaño de partícula de 3,5 µm y 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno y Zorbax SB-C18 (ref: 828975-902) con tamaño de partícula de 1,8 µm y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, ambas de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).



**Figura 1:** Comparación del método IFU y el método propuesto.

Para los análisis por HPLC se utilizaron dos métodos. El primero es el método IFU nº 71 (1998) de análisis de antocianinas por HPLC definido por el Código Alimentario de zumos (CODEX STAN 247-2005). Este método se realizó con la columna de 3,5 micras, empleando como fase móvil (A) Agua/Ácido fórmico (90/10) (v/v) y como fase móvil (B) Agua/Acetonitrilo/Ácido fórmico (40/50/10) (v/v/v), y el programa gradiente de elución que se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Gradiente de elución. Método IFU.

Tiempo (minutos)	0	0,7	17,3	23,3	25,3	28,6	30,6
% B	12	12	30	100	100	12	12

Estudios previos han demostrado que con esta columna de 3,5 micras se han conseguido la mejor resolución y el menor tiempo de cromatograma.

El método propuesto como alternativa emplea una columna de 1,8 micras, una fase móvil (A) Agua/Ácido trifluoroacético (99,5/0,5) (v/v) y una fase móvil (B) Agua/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5/50/0,5) (v/v/v), y el gradiente de elución que se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Gradiente de elución. Método propuesto.

Tiempo (minutos)	0	1,2	14	28	34	38,8	39,2	40
% B	8	18	32	60	100	100	8	8

En ambos métodos se analizó el mirtilo de manera simultánea con el detector de fotodiodos y el de fluorescencia. La detección con el detector de fotodiodos (PDA) se realizó a 520 nm para la identificación de los antocianos, 360 nm para flavonoles, 320 nm para ácidos hidroxicinámicos y 260 nm para ácidos hidroxibenzoicos. En la detección de los flavonoles se empleó el detector de fluorescencia a unas condiciones de excitación de 290 nm y de emisión de 350 nm. La temperatura de análisis fue 25°C con un flujo de trabajo de 1 mL/min. El concentrado de mirtilo se diluyó

cinco veces en agua y se filtró con un filtro de nylon de 0,45 micras antes del análisis. La cantidad de muestra inyectada fue de 4 µL para el método IFU y 2 µL para el método propuesto.

### 3 Resultados

En este trabajo se propone un método único de análisis de polifenoles, con la posibilidad de extender el método IFU para el análisis de polifenoles distintos a los antocianos. En la Figura 1 se presentan los perfiles a 520 nm de los antocianos y un conjunto de patrones representativos de polifenoles a 280 nm. El método propuesto permite separar e identificar catorce antocianos del mirtilo (Fig. 1c), al igual que el método IFU (Fig. 1a). Comparando ambos, el método IFU es el más adecuado, por su mejor resolución, para el control de calidad y verificación de la autenticidad en los productos alimentarios preparados con frutas rojas.

Sin embargo, si atendemos al análisis de otros polifenoles se puede observar que en el cromatograma obtenido con el método IFU para el caso de la mezcla de patrones (Fig. 1b), algunos de los compuestos aparecen juntos en un mismo pico, la línea base se eleva a concentraciones altas de acetonitrilo y además son necesarias mayores concentraciones de acetonitrilo para eluir compuestos como la quercetina. En el método propuesto con ácido trifluoroacético se obtiene una mejor línea base, los compuestos eluyen antes y con una menor concentración de acetonitrilo (Fig. 1d). Además, al trabajar con una fase móvil de menor acidez y menor concentración de ácido, se protege al equipo de HPLC de problemas de corrosión, y es posible obtener mejores señales en los espectros a longitudes de onda más bajas.

Atendiendo a lo anterior, se utilizó el método propuesto para analizar los polifenoles presentes en el zumo de mirtilo, mostrándose en la Figura 2 los cromatogramas obtenidos con el detector de fotodiodos (PDA) y el detector de fluorescencia, ambos con las mejores condiciones de detección.

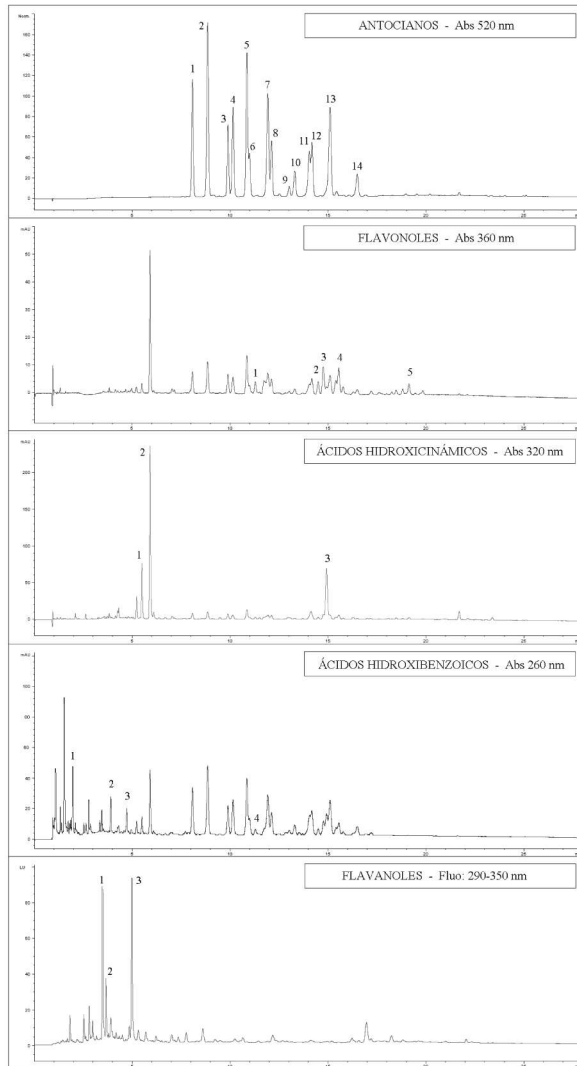


Figura 2: Perfil de polifenoles en el mirtilo.

La Tabla 3 muestra los polifenoles que se han identificado, teniendo en cuenta el tiempo de retención del pico obtenido en relación con el de los patrones, el espectro en ultravioleta-visible o de fluorescencia de los picos en relación con los de los patrones correspondientes y los datos obtenidos por otros autores para este zumo de fruta. [3, 4 y 5]

#### 4 Conclusiones

La modificación del método IFU nº 71 sustituyendo el empleo de ácido fórmico por ácido trifluoroacético y variando el gradiente de eluyentes, muestra una mejora significativa en los cromatogramas, consiguiendo la identificación de un gran número de polifenoles, 29 en el caso del mirtilo, en un mismo cromatograma.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a la “Fundación Séneca” (Murcia, España) por la financiación de la beca 16227/BPS/10 y del proyecto 08702-PI-08, y al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto AGL 2007-60455.

Tabla 3: Identificación de polifenoles del mirtilo.

Número	Tiempo (minutos)	Polifenoles
<b>ANTOCIANOS (Abs 520 nm)</b>		
1	8,07	Dephinidina 3-galactosido
2	8,84	Delphinidina 3-glucosido
3	9,88	Cianidina 3-galactosido
4	10,13	Delphinidina 3-arabinosido
5	10,84	Cianidina 3-glucosido
6	10,97	Petunidina 3-galactosido
7	11,91	Cianidina 3-arabinosido
8	12,10	Petunidina 3-glucosido
9	13,00	Peonidina 3-galactosido
10	13,29	Petunidina 3-arabinosido
11	14,03	Peonidina 3-glucosido
12	14,17	Malvidina 3-galactosido
13	15,09	Malvidina 3-glucosido
14	16,48	Malvidina 3-arabinosido
<b>FLAVONOLES (Abs 360 nm)</b>		
1	11,12	Miricetina 3-O-arabinosido
2	14,45	Quercetina 3-O-galactosido
3	14,82	Quercetina 3-O-glucosido
4	15,62	Quercetina 3-O-arabinosido
5	19,29	Kaempferol 3-O-glucosido
<b>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Abs 320 nm)</b>		
1	5,48	Ácido p-coumárico glucosido
2	5,90	Ácido clorogénico
3	14,91	Ácido sinápico
<b>ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Abs 260 nm)</b>		
1	1,95	Ácido gálico
2	4,30	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	4,64	Ácido 4-hidroxibenzoico
4	11,49	Ácido elágico
<b>FLAVANOLES (Fluo: <math>\lambda_{exc}</math> 290 - <math>\lambda_{emi}</math> 350 nm)</b>		
1	3,46	(+)-Catequina
2	3,65	(-)-Epigallocatequina
3	4,97	(-)-Epicatequina

#### Referencias

- [1] Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN): <http://www.aijn.org>
- [2] Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition; 79, 727- 747.
- [3] Goiffon, J; Mouly, P; Gaydou, E; (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. Analytical Chimica Acta; 382, 39-50.
- [4] Häkkinen, S; Heinonen, M; Kärenlampi, S; (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. Food Research International; 32, 345-353.
- [5] Wu, X; Prior, R; (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common fruits in USA: fruits and berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 53, 2589-2599.