

Determinación de polifenoles en smoothies por UHPLC

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

Resumen. Actualmente podemos encontrar en el mercado diferentes bebidas realizadas con frutas tal como son los smoothies, obtenidos a partir de trozos o frutas enteras. Estos productos destacan por sus propiedades funcionales aportadas principalmente por los polifenoles. Para la industria de bebidas de fruta es importante el análisis de los distintos polifenoles presentes en los productos elaborados con frutas y necesitan, por tanto, métodos para autentificar y detectar adulteraciones en este tipo de bebidas. Este trabajo presenta un método de análisis de polifenoles por UHPLC válido para bebidas de frutas que permite separar, identificar y cuantificar los polifenoles presentes en la bebida de fruta en un tiempo de análisis de 28 minutos.

1. Introducción

Los smoothies, elaborados con todo el fruto incluida su pulpa, han supuesto toda una revolución como bebidas saludables con propiedades funcionales. Una amplia variedad, sus propiedades nutritivas y un sabor único los diferencian de otros productos del mercado [1]. Un estudio reciente sobre smoothies, realizado por Global Industry Analysts, indica que el mercado mundial de este tipo de bebidas para el año 2015 llegará a los 9 mil millones de dólares. Todo ello impulsado por las propiedades saludables de los smoothies y las campañas de marketing y desarrollo de nuevos productos en el mercado de bebidas [2].

En este trabajo se presenta la identificación y autentificación de los componentes de un smoothie comercial mediante el uso de un único análisis por UHPLC capaz de detectar los polifenoles mayoritarios presentes en las frutas.

1.1. Definición de smoothies

Los smoothies son bebidas no alcohólicas que deben su nombre a la suavidad del producto resultante diferenciándose del resto de productos del mismo sector por su cremosidad. Se caracterizan por tener una consistencia algo densa, parecida a un batido pero algo más espeso. Se trata de una alternativa energética y vitamínica frente a los refrescos. Este tipo de bebidas se elaboran a base de trozos de frutas naturales y zumos de fruta naturales o concentrados, incluyendo a veces algunos vegetales, mezclados con productos lácteos, hielo, helado, miel y trozos de fruta fresca entre otros ingredientes. De acuerdo con la JASA (Juice and Smoothie Association of U.S.A.) se trata de “un alimento saludable servido en vaso que puede tomarse como merienda o postre” [1].

El consumo de este tipo de bebidas aporta beneficios para la salud, entre ellos los efectos saludables aportados por los polifenoles. La Asociación de la

Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN) les atribuye propiedades beneficiosas frente a diversas enfermedades como las cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas [3].

1.2. Los polifenoles en las frutas

Los polifenoles son metabolitos secundarios vegetales en cuya estructura tienen varios grupos hidroxilo en anillos aromáticos. Las frutas constituyen una de las principales fuentes de polifenoles en la dieta debido a la elevada concentración de estos compuestos en frutos y otros tejidos vegetales. Se han identificado varios cientos de estas moléculas en plantas comestibles, algunas de las cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas, otras son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés hídrico, luminoso o frente a la agresión de patógenos [4].

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 [4]. Los grupos analizados en este estudio son los antocianos, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavanonas y dihidrochalconas.

1.3. Control de calidad y autenticidad

En el Código Alimentario de Zumos (CODEX STAN 247-2005) se presentan los factores esenciales de composición, calidad y autenticidad de los zumos de frutas, encontrándose en dicha clasificación los néctares, zumos concentrados y purés de fruta. Así mismo, el código establece que estas bebidas de frutas deberán tener el color, aroma y sabor característicos del zumo del mismo tipo de fruta de la que proceden y mantener sus características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales [5].

La utilidad del método de análisis por UHPLC desarrollado para la industria de bebidas de frutas permite conocer no solo adulteraciones, sino también errores no intencionados que hayan tenido lugar durante el procesado como son los fallos en la clasificación, insuficiente lavado de las líneas de procesado, etc.

2. Materiales y métodos

En el presente trabajo se estudiaron dos smoothies refrigerados: uno comercial y otro elaborado en nuestro laboratorio a las mismas concentraciones que indica el etiquetado del smoothie comercial. El smoothie comercial pertenece a la marca Hipercor “Smoothie de manzana y frutas del bosque” compuesto según etiquetado por manzana 40%, frambuesa 20%, fresa 18%, arándano 7%, plátano 10% y naranja 5%. A estas mismas concentraciones se obtuvo el smoothie elaborado en el laboratorio con zumos de frutas individuales proporcionados por la empresa J. García Carrión S.A.

El método de análisis utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia (UHPLC). Este método permite **identificar, autenticar y cuantificar** la composición de los smoothies mediante el perfil de polifenoles, sin necesidad de hidrólisis, ni otro tratamiento previo como realizan otros autores [6].

Para los análisis se empleó un equipo de UHPLC 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) y un inyector automático termostatzado (G1329B). La columna cromatográfica de análisis fue una Zorbax SB-C18 con tamaño de partícula de 1,8 µm y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Los análisis por UHPLC se realizaron con el siguiente método que emplea dos fases móviles: fase móvil (A) Agua/Ácido trifluoroacético (99,5/0,5) (v/v) y fase móvil (B) Agua/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5/50/0,5) (v/v/v). El gradiente de elución que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Gradiente de elución

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

Para identificar los polifenoles se utilizó el detector de fotodiodos (PDA) a las siguientes longitudes de onda: 520 nm para determinar el perfil de antocianos, 320 nm para el perfil de ácidos hidroxicinámicos y 280 nm para los perfiles de ácidos hidroxibenzoicos, flavanonas y dihidrochalconas.

La temperatura de análisis fue 25°C con un flujo de trabajo de 1 mL/min. Las muestras se clarificaron por centrifugación durante una hora a 13.000 r.p.m. en una centrifuga Z383K Hermle (Wehingen, Germany), posteriormente se analizaron los sobrenadantes una vez filtrados con filtros de 0,45 µm. La cantidad de muestra inyectada fue de 2 µL.

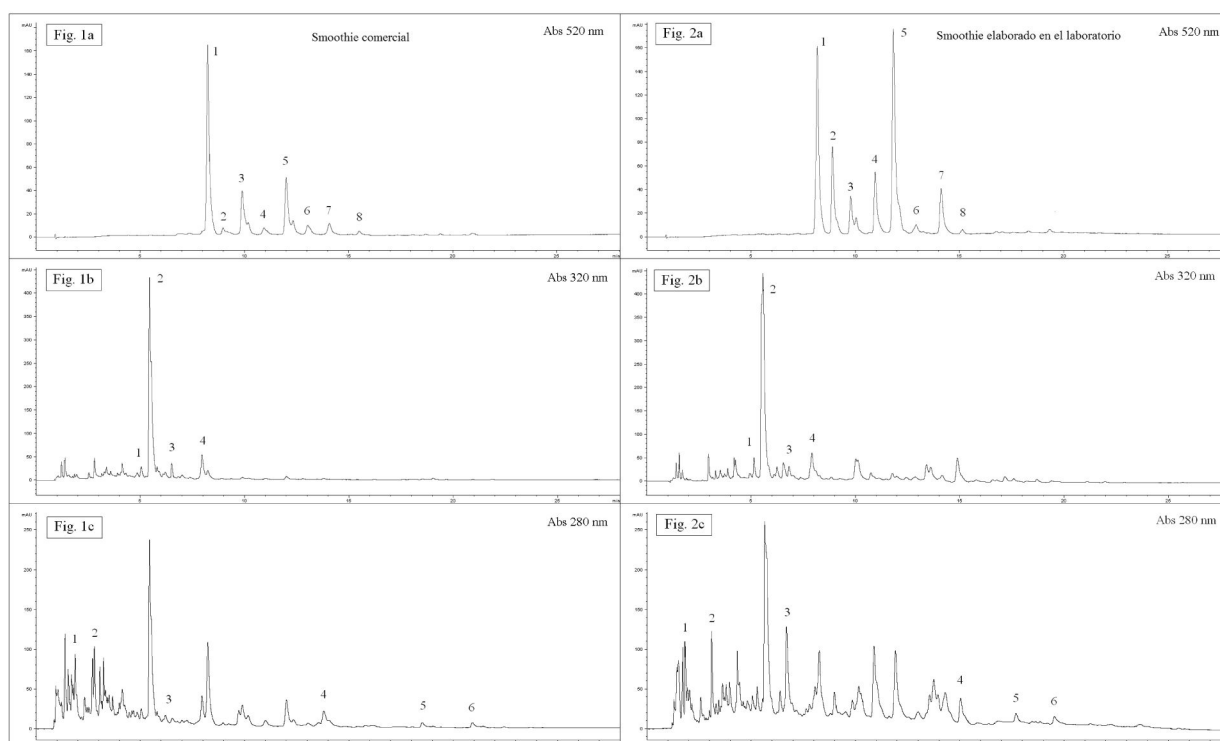


Figura 1: Perfil de polifenoles presentes en el smoothie comercial.

Figura 2: Perfil de polifenoles presentes en el smoothie elaborado en el laboratorio.

3. Resultados

Este trabajo tiene la finalidad de autenticar, con un único análisis de polifenoles, la composición de los smoothies estudiados mediante la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes.

La Figura 1 muestra los perfiles del smoothie comercial y la Figura 2 los perfiles correspondientes al smoothie elaborado en el laboratorio. En dichas Figuras se presentan los perfiles de polifenoles de los smoothies analizados.

El método de análisis nos ha permitido separar e identificar un total de 18 polifenoles de los cuales, ocho son antocianos (Fig. 1a y 2a) procedentes de las frutas rojas de fresa, frambuesa y arándano; cuatro ácidos hidroxicinámicos (Fig. 1b y 2b), tres ácidos hidroxibenzoicos, dos flavanonas procedentes de la naranja y una dihidrochalcona procedente de la manzana (Fig. 1c y 2c).

Comparando las Figuras 1 y 2 se han conseguido identificar los mismos compuestos en ambos smoothies. Aunque las áreas de cada uno son diferentes debido a la procedencia y madurez diversa de las frutas de partida.

Inicialmente, pensamos que la bebida comercial podía contener trazas de zumo de uva tinta en la mezcla de frutas (su etiquetado no lo indica) debido a que, tal y como se observa en la Figura 1a, se aprecian pequeños picos correspondientes a antocianos en torno a los minutos 18–22. Estudios previos nos indican que la fruta roja que presenta antocianos en esos tiempos de retención es la uva tinta [7]. Esta suposición finalmente quedó descartada al analizarse por fluorescencia y no observarse en el smoothie presencia de resveratrol, polifenol presente en la uva tinta.

Tabla 2: Identificación de polifenoles en el smoothie analizado

ANTOCIANOS			
Abs 520 nm	nº	Identificación	Fruta de procedencia
	1	Cianidin-3-sophoroside	Frambuesa
	2	Cianidin 3-galactoside	Arándano americano
	3	Cianidin 3-glucoside	Fresa y frambuesa
	4	Pelargonidin 3-glucoside	Fresa
	5	Peonidin 3-galactoside	Arándano americano
	6	Cianidin 3-rutinoside	Frambuesa
	7	Peonidin 3-glucoside	Arándano americano
	8	Peonidin 3-arabinoside	Arándano americano
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS			
Abs 320 nm	nº	Identificación	Fruta de procedencia
	1	p-Coumaric quinic	Fresa, frambuesa y arándano americano
	2	Chlorogenic acid	Fresa, arándano americano, naranja y manzana
	3	Caffeic acid	Fresa y arándano americano
	4	p-Coumaric acid	Fresa y manzana
ÁC. HIDROXIBENZOICOS, FLAVANONES y DIHIDROCHALCONAS			
Abs 280 nm	nº	Identificación	Fruta de procedencia
	1	Gallic acid	Fresa, frambuesa, arándano, naranja y plátano
	2	3,4-dihydroxibenzoic acid	Arándano americano
	3	Vanillic acid	Arándano americano
	4	Narirutin	Naranja
	5	Hesperidin	Naranja
	6	Phloritizin	Manzana

La Tabla 2 muestra los polifenoles identificados en ambos smoothies clasificados por grupos polifenólicos. Dicha identificación se realizó teniendo en cuenta el tiempo de retención del pico obtenido, el espectro en ultravioleta-visible y los datos obtenidos por otros autores para estas frutas [7].

4. Conclusiones

El empleo de un único análisis por UHPLC capaz de analizar los polifenoles mayoritarios supone una mejora para la autenticación e identificación de los componentes presentes en bebidas densas de frutas como son los smoothies, además de su posible cuantificación en un tiempo de análisis relativamente corto de 28 minutos.

Con estos datos llegamos a la conclusión de que el smoothie comercial analizado de la marca Hipercor contiene las frutas que su etiquetado indica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la “Fundación Séneca” (Murcia, España) por la financiación de la beca 18476/BPS/11 y del proyecto 08702-PI-08; y a la empresa de zumos J. García Carrión S.A. (Jumilla, España) por la aportación de bebidas de fruta.

Referencias

- [1] Asociación de Zumos y Smoothies (JASA): <http://www.smoothiecentral.com>
- [2] Global Industry Analysts (2010) Smoothies: a global strategic business report. http://www.prweb.com/releases/smoothies_market/frozen_mix_smoothie/prweb3808804.htm
- [3] Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la U. Europea (AIJN): <http://www.aijn.org>
- [4] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 79, 727–747.
- [5] Código Alimentario de Zumos: <http://www.codexalimentarius.net>
- [6] Mattila, P.H.; Hellstrom, J.; McDougall, G.; Dobson, G.; Pihlava J.M. (2011) Polyphenol and vitamin C contents in European commercial blackcurrant juice products. *Food Chemistry*, 127, 1216–1223.
- [7] Obón, J.M.; Díaz-García, M.C.; Castellar, M.R. (2011) Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal Food Composition Analysis*, 24, 760–771.