



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Química y Física

TRABAJO FIN DE GRADO DEL GRADO DE QUÍMICA:

Determinación de fitoquímicos en zumos de manzana
mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia
acoplada a espectrometría de masas en tándem



Autora:

Ana M^a Onieva Jiménez

Tutor:

Roberto Romero González

Septiembre 2014

TRABAJO FIN DE GRADO

El presente trabajo ha sido presentado por Ana M^a Onieva Jiménez, correspondiente al Grado en Química.

Fdo. *Ana M^a Onieva Jiménez*

Tutor:

Fdo. *Roberto Romero González*

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, este es el momento más importante de mi vida. Es el día en que puedo decir con la boca grande “Soy Química”. Y esto es gracias a muchas personas que han estado a mi lado durante estos cinco años, y que sin ellas, nada hubiera sido igual y tampoco hubieran sido los mejores años que he vivido.

Todos mis compañeros han aportado algo importante, pero sin duda, agradecer a mi “piña” (Pepa, Samira, Víctor, Luis y Reche) haber estado ahí siempre, porque si alguno de ellos hubiera faltado, todo hubiera sido diferente, y espero que esta amistad que une a este humilde grupo de seis personas dure mucho tiempo.

A continuación, quería agradecer a Roberto Romero González por todo lo que me ha ayudado y por su paciencia infinita, un profesor que, desde el primer día que lo conocí en clase, me pareció un grandísimo docente. Además, tengo que decir que me he reído muchísimo con cada uno de sus correos, porque aunque el contenido fuera serio, siempre sabía poner un toque de humor.

Agradecer también la dedicación de María Isabel Alarcón Flores y de Antonio José Nieto García, ya que sin su ayuda el cromatógrafo y yo hubiéramos tenido más de un problema, además de haberme hecho pasar muy buenos ratos en el laboratorio.

A mi pareja Carlos Rentero por aguantarme en las etapas más difíciles de la carrera, como son las épocas de exámenes y los días previos a la defensa de este trabajo. Gracias por tu paciencia y por entenderme.

Por último, agradecer a mis padres la confianza que han tenido en mí, aunque mi padre no lo hiciera hasta que pasé el tercer curso, pero después observas que fue una fuente de motivación para demostrar que podía. Ahora soy consciente del orgullo que sienten por mí.

Determinación de fitoquímicos en zumos de manzana mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectroscopía de masas en tándem.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Compuestos fenólicos: importancia biológica y grupos más importantes	10
2.2. Producción y consumo	13
2.3. Legislación	14
2.4. Métodos de análisis de compuestos fenólicos en zumos	14
2.4.1. Extracción.....	14
2.4.2. Determinación de compuestos fenólicos: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC).....	17
2.4.3. Detección de compuestos fenólicos: Espectrometría de masas	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Reactivos	21
3.2. Materiales	21
3.3. Preparación de patrones.....	21
3.4. Equipos	22
3.5. Determinación por espectrometría de masas	22
3.6. Tratamiento de la muestra	23
3.7. Preparación de zumo de manzana casero	24
3.8. Muestras	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Condiciones cromatográficas	25
4.2. Efecto de la dilución de la muestra.....	27
4.3. Validación del método analítico	29
4.4. Aplicación del método al análisis de muestras reales.....	31
4.4.1. Análisis de zumos de manzana comerciales.....	31
4.4.2. Estudio del contenido de fitoquímicos en zumos del mismo lote.....	33
4.4.3. Comparación del contenido de fitoquímico en manzana y zumo de manzana...	34
5. CONCLUSIONES	35
6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	36
7. REFERENCIAS	37

1. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado es conocer la metodología de trabajo en un laboratorio de química analítica, así como el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, para el análisis de compuestos orgánicos.

Para ello, se decidió determinar la presencia de fitoquímicos representativos en zumos de manzana como ácido clorogénico, epicatequina y floridzina, en diversos tipos de zumo de manzana, mediante la aplicación de un método analítico basado en la cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a un analizador de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS), optimizado previamente para el análisis de este tipo de compuestos en otras matrices relacionadas.

En los últimos diez años, los casos de personas con cáncer han aumentado más de un 20% [1]. Esto se debe a la mala alimentación, a la mayor contaminación que hay sobre todo en las grandes ciudades, la falta de ejercicio, etc. Por ello, hoy en día, son tan importantes los fitoquímicos, que tienen conocidas propiedades antioxidantes y que actúan como protectores para la formación de tumores cancerígenos.

Estos agentes fitoquímicos son sustancias naturales que están presentes en las plantas, por ejemplo en la manzana, y su función es proteger a las plantas de agentes patógenos perjudiciales para las mismas, impidiendo la activación y desarrollo de genes cancerígenos, que también están presentes en las células humanas. Los vegetales como tomates, pimientos verdes, etc, contienen ácido clorogénico y p-cumárico los cuales combaten a los agentes promotores de células cancerígenas, previniendo la formación de nitrosaminas en el estómago [1].

Por lo tanto, en el presente trabajo, se pretende llevar a cabo el análisis de fitoquímicos tales como el ácido clorogénico, floridzina y epicatequina en diversos zumos de manzana.

Teniendo en cuenta lo expuesto, los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado son:

- ⇒ Evaluación de la dilución del zumo que permita minimizar el efecto matriz y posibilite una adecuada determinación de los compuestos objeto de estudio.
- ⇒ Validación de la metodología analítica empleada para la determinación de fitoquímicos en zumo de manzana, estudiando diversos parámetros tales como efecto matriz, precisión, veracidad y límites inferiores (límite de detección y cuantificación).
- ⇒ Evaluar la presencia de fitoquímicos en zumos de distinta procedencia.
- ⇒ Determinar el contenido de fitoquímicos en zumos procedentes de la misma marca y lote.
- ⇒ Comparar el contenido de fitoquímicos en manzana y en zumo de manzana.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Compuestos fenólicos: importancia biológica y grupos más importantes

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de plantas debido al desarrollo de la mismas y como consecuencia de las condiciones de estrés a las que pueden estar sometidas, como temperaturas extremas, parásitos, radiaciones UV, presencia de contaminantes, etc,... [2].

En las plantas, las concentraciones de estos compuestos pueden variar en función de algunos factores, tales como la variedad o el estado de maduración, entre otros.

Existen compuestos fenólicos solubles e insolubles. Los compuestos fenólicos solubles se encuentran en las paredes celulares, mientras que los insolubles se encuentran en las vacuolas, por lo que la distribución de estos compuestos en los tejidos celulares no es uniforme. También se puede destacar, que los compuestos fenólicos se encuentran en mayor concentración en el exterior de la planta que en el interior [3].

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Estos compuestos tradicionalmente han sido considerados como antinutrientes, debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios, los taninos, sobre la digestibilidad de las proteínas. Sin embargo, actualmente se ha despertado un reciente interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio [4].

La imagen pública de las frutas y las hortalizas ha mejorado considerablemente debido a los avances de la Nutrición. Los profesionales de la salud, especialmente en los países desarrollados, recomiendan aumentar el consumo de frutas y hortalizas por ser pobres en grasas y ricas en fibra y disminuir el consumo de los alimentos de origen animal. Así mismo, la Fundación Mundial de Investigación contra el Cáncer (WCRF) promueve el consumo de una variedad de verduras y frutas durante todo el año, sugiriendo una ingesta mínima de cinco o más porciones de fruta y verduras al día. En este sentido, los zumos de fruta pueden ayudar a los consumidores a alcanzar este objetivo [5].

De forma general, los compuestos fenólicos se pueden clasificar en distintos grupos como los ácidos fenólicos (benzóicos y cinámicos), flavonoides (antocianinas, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas), estilbenos y lignanos [6], como se pueden observar en la Figura 1.

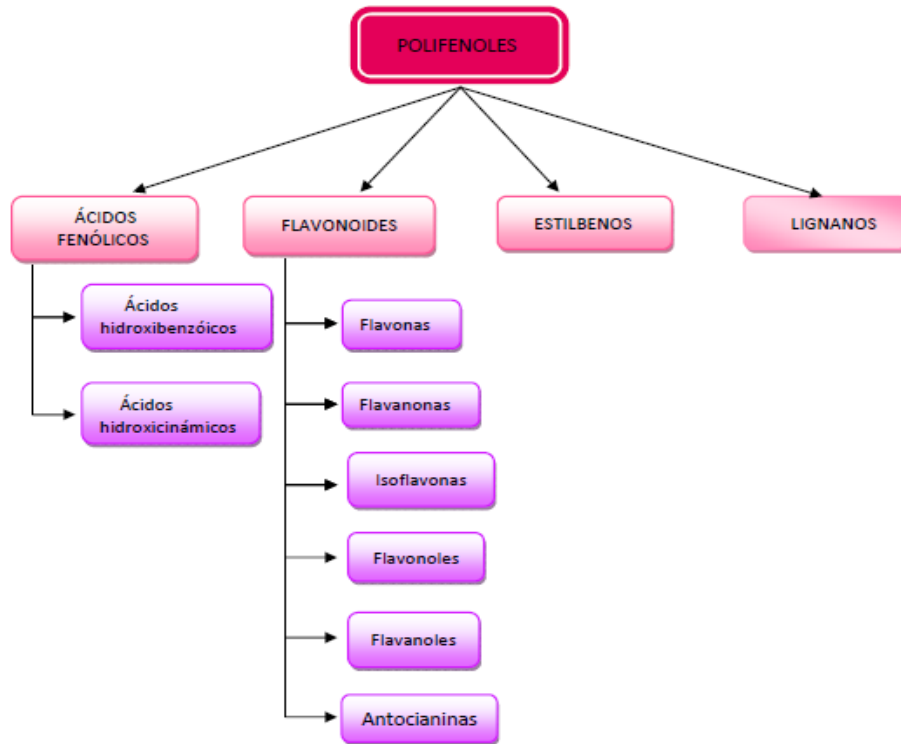
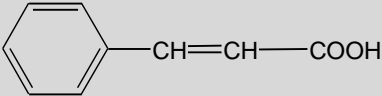
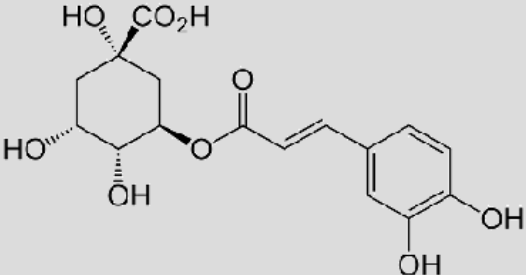
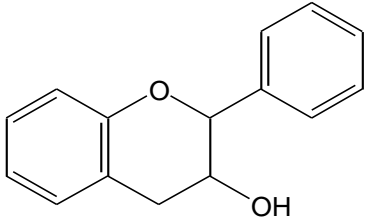
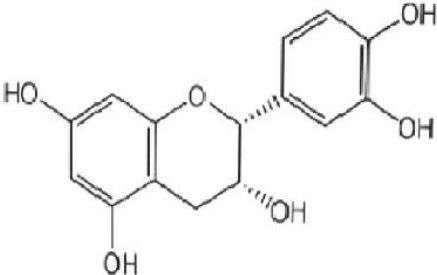
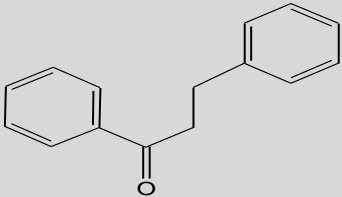
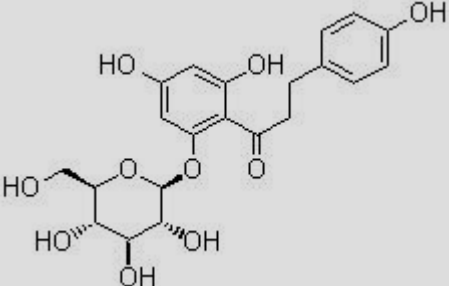


Figura 1.- Clasificación de los polifenoles.

La estructura de los compuestos fenólicos se basa en un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilos generalmente funcionalizados, siendo la vía de síntesis más frecuente del anillo aromático la ruta del sikímico y la del acetato [7].

Los ácidos fenólicos se encuentran en forma de ésteres, glucósidos o amidas, pero rara vez en forma libre (agliconas), diferenciándose en el número y en la localización de los grupos hidroxilo en el anillo aromático [8]. El azúcar que comúnmente se encuentra unido a estos compuestos es la glucosa, aunque hay otros, como galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, ácido glucurónico y ácido galactorúnico, que pueden unirse a la aglicona [9]. En la Tabla 1, se muestra la estructura de cada uno de los compuestos a analizar y la estructura general de la familia de la que proceden.

Tabla 1.- Estructura básica de los compuestos de interés y de su familia de procedencia.

Familia	Estructura general	Compuesto	Estructura
Ácidos hidroxicinámicos		Ácido clorogénico	
Flavanoles		Epicatequina	
Dihidrochalcona		Floridzina	

Los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta son los flavonoides y los ácidos fenólicos [10].

Dentro de éstos, el ácido clorogénico, floridzina y epicatequina se suelen encontrar en mayor proporción en algunas frutas como la manzana por lo que se han elegido para su análisis en el presente Trabajo de Fin de Grado.

La estructura de los ácidos fenólicos, se basa en un anillo aromático con un grupo carboxilo, que a su vez se divide en dos grupos: derivados del ácido benzoico (C₆-C₁) y

derivados del ácido cinámico (C₆-C₃). Algunos ejemplos de los derivados del ácido benzoico, como el ácido gálico, el p-hidroxibenzoico, el ácido vainillínico se encuentran en los helecchos. Sin embargo, los ácidos cinámicos, como el ácido cafeico o el ácido ferúlico, raramente se encuentran libres y en general se encuentran en forma de derivados. De este modo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico, formando el ácido clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico [7]. Los flavanoles y las hidrochalconas, son la subclase de flavonoides (estructura (C₆-C₃-C₆)) estructuralmente más complejos. Estos se pueden encontrar desde monómeros (catequina y epicatequina) a estructuras más complejas como pueden ser procianidinas y proantocianidinas poliméricas, las cuales son conocidas como taninos condensados [11].

2.2. Producción y consumo

La elaboración de los zumos podrá realizarse junto con sus pepitas, semillas y pieles, que normalmente no se incorporan al zumo, aunque serán aceptables algunas partes o componentes de pepitas, semillas y pieles que no puedan ser eliminadas mediante las buenas prácticas de fabricación (BPF) [12].

Los zumos se preparan mediante procedimientos adecuados que mantienen las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de la fruta de la que proceden. Podrán ser turbios o claros y podrán contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y proceder del mismo tipo de fruta. Además, se podrá añadir pulpa y células obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta (CODEX STAN 247-2005) [13].

Aunque el zumo de manzana no es el más consumido por los españoles, existen países como Argentina o China que consumen una gran parte de este tipo de zumo [14]. En la Tabla 2, se puede observar tanto la producción como la exportación de este producto, además del consumo doméstico en algunos países.

Tabla 2.- Producción y utilización del jugo concentrado de manzana en el período 2007-2011 [14].

País	Producción		Exportación		Consumo Doméstico	
	En miles de tn	%	En miles de tn	%	En miles de tn	%
Argentina	57	3	50	5	11	1
Brasil	43	3	43	4	0	0
Chile	35	2	35	3	0	0
China	828	49	796	76	67	4
Resto del mundo	722	43	125	12	1424	95
Total mundial	1.685	100	1.049	100	1.502	100

Se puede observar que el país que más produce con diferencia es China, siendo también el que más consume, con un 4 % del consumo mundial.

2.3. Legislación

El RD 1518/2007 [15], de 16 de noviembre, establece los parámetros mínimos de calidad y autenticidad en zumos y los métodos de análisis aplicables a cada tipo de fruta. Este Real Decreto pone de manifiesto los parámetros mínimos de calidad, que son criterios relevantes de autenticidad y calidad como pueden ser los grados Brix o maltosa, para los siguientes tipos de frutas: naranja, piña, mandarina, albaricoque, pera, manzana y melocotón. Así mismo, se indican los métodos de análisis aplicables a cada fruta. El cumplimiento de estos parámetros mínimos, no implica que no tengan que ajustarse también a otros que afecten a su autenticidad y calidad, y especialmente los recogidos en la Norma del Codex Alimentarius y en el Código de Prácticas para evaluación de zumos de frutas y vegetales de la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN). Esta asociación presenta una guía de referencia para cada tipo de fruta como criterio de evaluación de calidad y autenticidad de los zumos de las diferentes frutas [16].

2.4. Métodos de análisis de compuestos fenólicos en zumos

Los alimentos de naturaleza vegetal (incluyendo frutas, cereales, legumbres y verduras) y bebidas (incluyendo el té, café, zumos de frutas y cacao) son las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta humana.

La preparación y la extracción de compuestos fenólicos a partir de esta amplia gama de muestras dependen sobre todo de la naturaleza de la muestra y las propiedades químicas de los compuestos fenólicos, incluyendo la estructura molecular, polaridad, concentración, número de anillos aromáticos y grupos hidroxilo.

La metodología analítica puede depender de la concentración de compuestos polifenólicos simples y complejos y de las diferentes proporciones que haya de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas o proantocianinas (entre otros).

Por lo tanto, es difícil elegir un solo método de extracción y determinación de compuestos fenólicos para muchos productos vegetales, mostrándose a continuación los principales procedimientos empleados.

2.4.1. Extracción

La finalidad del procedimiento de extracción es aislar los compuestos objeto de estudio del resto de componentes de la matriz, de manera que se obtenga un extracto libre de interferentes y que contenga todos los analitos de interés. Por ello, esta etapa tiene gran importancia dentro del proceso analítico ya que va a influir en los pasos posteriores de detección, identificación y cuantificación. A su vez, la naturaleza de la matriz y el tipo de analito a extraer van a condicionar el procedimiento de extracción.

Durante el tratamiento de la muestra, ésta se puede someter a diversos procedimientos para eliminar o reducir interferentes, aumentar la concentración del analito de interés, o

para transformar el analito en un derivado que pueda ser más fácilmente separado, detectado y/o cuantificado [17].

Dicho tratamiento será diferente según el compuesto que se vaya a determinar, pero sobre todo dependerá del estado físico de la matriz.

En general, las muestras sólidas como frutas y hortalizas son liofilizadas o secadas al aire y posteriormente sometidas a molienda y homogeneización. Sin embargo, las muestras líquidas como el aceite de oliva, zumos, vino, o el té, necesitan un pretratamiento mínimo como puede ser filtración, centrifugación o dilución para luego llevar a cabo un procedimiento de extracción o bien ser analizadas directamente [18]. En algunos casos, las muestras son sometidas a un tratamiento generalmente ácido, básico o enzimático cuyo objetivo es hidrolizar los glucósidos para así determinar el contenido de agliconas [19].

Si nos centramos en las técnicas de extracción, entre las más aplicadas para la extracción de compuestos fenólicos en frutas y hortalizas destacan la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos (UAE) o por agitador rotatorio (RAE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por microondas (MAE), QuEChERS que es un acrónimo de las siguientes palabras en inglés (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) y extracción en fase sólida (SPE). Sin embargo, para la extracción de compuestos fenólicos en matrices no sólidas como aceite de oliva, por ejemplo, el rango de técnicas empleadas es más reducido, siendo las más utilizadas SPE, extracción líquido-líquido (LLE), y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de extracción para diferentes matrices.

Tabla 3.- Condiciones para la extracción de compuestos fenólicos en frutas y vegetales.

Matriz	Nº de analitos	Familia	Técnica de extracción	Disolvente	Condiciones de extracción	Ref.
Zanahoria	6	Ácidos fenólicos	UAE	Acetona:agua:AA (70:29.5:0.5, v/v/v)	26 min 37 °C	[20]
Tomate, mango, fresa, cebolla, chili, ajo, patata, manzana, naranja	6	Flavonoides	UAE	Metanol:agua (80:20, v/v)	60 min	[21]
Tomate	7	Ácidos fenólicos Flavonoides	UAE	Metanol:agua (50:50, v/v)	60 min	[22]
Lechuga	11	Ácidos fenólicos Flavonoides	UAE	Metanol (4 °C)	25 min	[23]
Tomate	15	Ácidos fenólicos Flavonoides	UAE	Metanol:agua (80:20, v/v)	60 min	[24]
Fresa	16	Ácidos fenólicos Flavonoides	1º UAE 2º SPE (C ₁₈)	1º Acetona:agua:AA (70:29.5:0.5, v/v/v) 2º Metanol	26 min	[25]
Manzana, pera	25	Ácidos fenólicos Flavonoides	UAE	Metanol:agua (80:20, v/v)	120 min	[26]
Manzana	26	Ácidos fenólicos Flavonoides	1º UAE 2º UAE	1º Metanol:agua (80:20,v/v) 2º Metanol:agua:HCl (80:19:1, v/v/v)	40 min	[27]
Manzana	39	Ácidos fenólicos Flavonoides	UAE	1º Metanol:agua (20:80, v/v) 2º Metanol (100 %)	105 min	[28]

Abreviaturas: AA: Ácido acético, RAE: Extracción sólido-líquido asistida por agitador rotatorio, SPE: Extracción en fase sólida; UAE: Extracción asistida por ultrasonidos.

2.4.2. Determinación de compuestos fenólicos: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC)

La técnica preferida para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos es por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) [29]. Este tipo de cromatografía ha evolucionado dando lugar a la cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC), en la que el tamaño de partícula de la fase estacionaria se ha reducido a tamaños inferiores a 2 μm , por lo que se puede trabajar a flujos más altos de fase móvil sin pérdida de resolución cromatográfica. Así se reduce los tiempos de análisis y los volúmenes de disolvente orgánico, mejorando la resolución y la anchura de los picos, al ser comparada con el sistema tradicional (HPLC), aunque las presiones de trabajo son superiores.

Hay varios factores que afectan al análisis por cromatografía de líquidos (LC) de compuestos fenólicos, incluyendo la fase móvil, tipo de columna y detector [30]. En general, los compuestos fenólicos extraídos de la matriz se separan utilizando una columna de fase reversa C_{18} [31].

En cuanto a los disolventes empleados como fase móvil, normalmente se utiliza metanol [32], aunque en alguna ocasión se ha utilizado la mezcla metanol:agua en distintas proporciones (20:80, v/v) [33] y (50:50, v/v) [34], o acetonitrilo [35].

Normalmente el pH de la fase móvil se debe mantener en el intervalo de pH de 2-4 para evitar la ionización de compuestos fenólicos durante la identificación. Por lo tanto, las fases móviles acuosas se acidifican, generalmente, con ácido acético o una pequeña proporción de ácido fórmico [36].

Normalmente se aplica un gradiente para una adecuada elución de los compuestos en lugar de una elución en modalidad isocrática, debido a las diferentes propiedades físico-químicas de los compuestos a separar, y así poder reducir el tiempo de análisis.

La selección de una columna apropiada es otro factor crítico en la identificación de compuestos fenólicos. En general, diferentes clases de compuestos fenólicos pueden ser separados usando una columna de fase reversa de C_{18} , con una longitud de 10-30 cm, 3.9 a 4.6 mm de diámetro y 3-10 μm de tamaño de partícula [37].

Sin embargo, nuevos tipos de columnas, como por ejemplo las monolíticas, de 3-25 cm longitud, 1 a 4.6 mm de diámetro y de 1.7 a 10 μm de tamaño de partícula, son las empleadas en algunas aplicaciones [38].

Por último, indicar que otras técnicas como la cromatografía de líquidos a alta temperatura (HTLC) y la cromatografía de líquidos de dos dimensiones ($\text{LC} \times \text{LC}$) [39,40], también se han utilizado para la determinación de compuestos fenólicos en matrices vegetales y relacionadas.

En la Tabla 4, se muestra un resumen de los parámetros cromatográficos en algunas aplicaciones relacionadas con la determinación de compuestos fenólicos en manzana.

Tabla 4.- Condiciones cromatográficas para la determinación de compuestos fenólicos en alimentos.

Muestra	Compuestos	Columna	Fase móvil, Velocidad de flujo	Tiempo de análisis (min)	Ref.
Manzana	Taninos (1)	RP C ₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 4 µm)	A: ACN (1% TFA) B: Agua (1% TFA) Velocidad de flujo: 1 mL/min.	40	[41]
	Ácidos hidroxicinámicos (3)				
	Flavonoides (7)				
	Dihidrochalcona (1)				
	Flavanoles (1)				
Antocianinas (1)					
Manzana	Taninos (1)	C ₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 µm)	A: ACN B: Agua (0.1% AF) Velocidad de flujo: 0.4 mL/min.	35	[42]
	Ácidos hidroxicinámicos (3)				
	Flavonoides (7)				
	Dihidrochalcona (1)				
	Flavanoles (1)				
Antocianinas (1)					
Manzana	Ácidos fenólicos	BEH C ₁₈ (50 x 2.1mm, 1.7 µm)	A: MeOH B: Agua (0.1 % AF) Velocidad de flujo: entre 0.20 y 0.75 mL/min	10	[43]
	Flavanoles (11)				

Abreviaturas: ACN: acetonitrilo; TFA: ácido trifluoroacético; MeOH: metanol; AF: ácido fórmico.

Como se puede observar, se separan fitoquímicos pertenecientes a distintas familias, mostrándose la versatilidad de la cromatografía de líquidos para la determinación simultánea de distintas familias. Por otra parte, difieren bastante en el gradiente aplicado, así como, en las dimensiones de la columna empleada. Sin embargo, las fases móviles son similares, ya que la fase móvil acuosa se encuentra acidificada en los tres

casos pero con ácidos diferentes, (ácido trifluoroacético y ácido fórmico), pero el último caso difiere en la fase móvil orgánica, empleando metanol en lugar de acetonitrilo. Sin embargo conviene indicar que ambos disolventes orgánicos, metanol y el acetonitrilo, son bastantes comunes en este tipo de análisis.

2.4.3. Detección de compuestos fenólicos: Espectrometría de masas

Los compuestos fenólicos se identifican con frecuencia utilizando detectores clásicos como UV-VIS (PDA, empleando longitudes de onda que oscilan entre 190-380 nm) [44,45], detección fluorimétrica (FLD) que es muy interesante para el análisis rutinario de lignanos [46] y colorimétricos [47]. Sin embargo en los últimos años, los detectores basados en la espectrometría de masas (MS) han sustituido a estos detectores tradicionales ya que ofrecen una mayor sensibilidad y capacidad de detección, así como permiten simplificar la etapa de tratamiento de muestra, empleándose distintos tipos de ionización como electronebulización (ESI-MS) [48, 49], desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS) [50,51] y bombardeo por átomos rápidos (FAB-MS) [52,53].

El analizador de masas forma parte del corazón de un espectrómetro de masas. Dicho analizador tiene dos misiones fundamentalmente:

- Separar los iones según su relación m/z .
- Focalizar los iones separados hacia un punto.

Los distintos analizadores aprovechan las propiedades de energía cinética, la velocidad o momento de fuerza provocado por el movimiento de partículas cargadas, para separar los iones de distinta masa.

Existen varios tipos de analizadores, siendo los más utilizados los siguientes: de sector magnético, de cuadrupolo, de trampa de iones, trampa de iones lineal, de tiempo de vuelo (TOF), o analizadores Orbitrap. Hay casos que un solo analizador no es capaz de dar una respuesta a las expectativas analíticas que se requieren para muestras más complejas, por lo que hay que recurrir al acoplamiento de dos analizadores para obtener los resultados requeridos [54].

El analizador de cuadrupolo (Q) fue en su momento, el más extendido y el usado. Esto se debe a que los cuadrupolos ofrecen un buen compromiso con el rango de masas (de 40 a 4000 uma), precisión y reproducibilidad para la cuantificación, además de una alta sensibilidad, así como un precio muy económico.

Un cuadrupolo está compuesto por cuatro barras que están dispuestas en paralelo, encontrándose los polos espaciados alrededor de los llamados ejes centrales. Si se aplica una corriente continua a las barras en posición opuesta junto con un voltaje de radiofrecuencia, los iones describen una trayectoria que va a depender directamente de su relación masa/carga (m/z). Este fenómeno se produce por la vibración de los iones en un campo eléctrico de alta frecuencia, generado entre los dos polos del cuadrupolo.

Para poder mencionar el analizador de triple cuadrupolo (QqQ), primero hay que indicar que la espectrometría de masas en tándem se basa en la unión de dos analizadores de masas de tipo cuadrupolo a través de uno intermedio, el cuál actúa como celda de colisión (q).

De este modo, permite la posibilidad de aislamiento de un ión en el primer cuadrupolo, descartando otros iones que puedan interferir. A continuación, se lleva a cabo la fragmentación del ión, mediante la colisión de dicho ión con moléculas de gas inerte, mediante la disociación inducida por colisión (CID, *Collision Induced Dissociation*) en la celda de colisión. Este proceso se suele dividir en dos etapas, donde las reacciones producidas están ligadas directamente con la composición química y la estructura de la molécula:

1. Tras colisionar con la molécula de gas inerte, la energía traslacional del ión pasa a ser energía interna.
2. La energía interna formada se transforma en energía de fragmentación, donde el ión se divide en distintos fragmentos.

Posteriormente, en el tercer cuadrupolo se monitoriza uno o dos de los iones producto generados en la celda de colisión.

El funcionamiento interno consiste en que el primer cuadrupolo (Q_1) selecciona el ión con la relación m/z de interés, denominándose ión precursor, y este atraviesa la celda de colisión (q) para su fragmentación. Por último los iones producto son separados por el segundo cuadrupolo (Q_2). A este tipo de instrumentos se le denomina triple cuadrupolo (QqQ), aunque actualmente suele ser desde un hexapolo a un octapolo, ya que lo que se pretende llevar a cabo es potenciar su eficiencia de transmisión de iones desde q hasta Q_2 [55].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Floridzina y epicatequina fueron adquiridos en Extrasynthese (Genay Cedex, Francia) con una riqueza del 95 y 99 % respectivamente, mientras que el ácido clorogénico se consiguió en Sigma-Aldrich (Madrid, España) con una pureza del 95 %. El metanol y el ácido fórmico, ambos de grado HPLC, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El acetato amónico se adquirió en JT Baker (Deventer, Holanda).

El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de gradiente de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.2. Materiales

Se usaron filtros de 0.20 μm de Nylon de VWR (Barcelona, España) y 0.45 μm GVHP de Millipore (Carrigtwohill, Irlanda) para el filtrado de los extractos de las muestras y fases móviles respectivamente. Además, se utilizaron los siguientes materiales:

- Agitador rotatorio de Heidolph, modelo Reax 2 (Schwabach, Alemania)
- Granatario de Mettler Toledo (Greifensee, Suiza)
- Trituradora de Heidolph
- Vortex de Heidolph
- Pipetas automáticas de 10-100 μL , 100-1000 μL y 1-5 mL suministradas por Thermo Scientific (Madrid, España)
- Pipetas Pasteur
- Espátulas

3.3. Preparación de patrones

Partiendo de disoluciones patrón de 200 mg/L de cada uno de los compuestos en metanol, primero se preparó una disolución intermedia de los tres compuestos objeto de estudio, de 20 mg/L de cada fitoquímico en metanol. A partir de la misma, se prepararon dos disoluciones intermedias de 5 mg/L y 0.1 mg/L, empleando metanol como disolvente. Cada disolución se almacenó a -20°C y en la oscuridad, debido a que estos compuestos son fotosensibles.

3.4. Equipos

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema 1290 RRLLC de Agilent (Santa Clara, EEUU) empleando una columna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 µm tamaño de partícula) de Agilent. La columna fue termostatada a 30 °C. Los analitos fueron separados con una fase móvil formada por metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.01% v/v, (eluyente B) a un flujo de 0.2 mL/min. El gradiente de elución empleado se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5.- Gradiente de elución empleado para la separación de los fitoquímicos.

<i>Tiempo (min.)</i>	0.0	3.0	5.0	5.5	6.0
<i>% Eluyente A</i>	5	100	100	5	5

3.5. Determinación por espectrometría de masas

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo usando un analizador de triple cuadrupolo (6460A, Agilent). La adquisición de datos se realiza con el software Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition y para el tratamiento de datos se utilizaron los programas informáticos MassHunter Qualitative Analysis y MassHunter Quantitative Analysis.

Para llevar a cabo la detección de los compuestos objeto de estudio, se utilizó una fuente de ionización Jet Stream (ESI) en modo positivo, para la determinación de ácido clorogénico y epicatequina, y en modo negativo para la determinación de floridzina, empleando los siguientes parámetros:

- Voltaje del capilar: 4000 V en modo positivo y 3500 V en modo negativo.
- Temperatura del gas de secado: 325 °C.
- Temperatura del gas de cortina: 400 °C.
- Flujo del gas de secado (nitrógeno): 7 mL/min.
- Flujo del gas de cortina (nitrógeno): 12 mL/min.
- Presión del nebulizador: 40 psi.

La colisión se llevó a cabo con nitrógeno (pureza > 99.99 %). Los parámetros específicos MS/MS de los fitoquímicos incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Parámetros de UHPLC-QqQ-MS/MS para los fitoquímicos analizados.

Compuesto	VTR (min) ^a	Ión precursor (voltaje fragmentación) ^b	Iones producto (energía de colisión, eV) ^c	Relación de iones (%)
Ácido clorogénico	2.63-2.68	355.1 (80)	163.0^d (4) ; 89.1 (64)	42
Epicatequina	2.76-2.80	291.1 (98)	139.0 (12) ; 122.9 (8)	46
Floridzina	2.99-3.02	435.1 (200)	273.1 (8) ; 167.1 (24)	36

^a VTR: Ventana de tiempo de retención.

^b Voltaje de fragmentación indicado entre paréntesis.

^c Energía de colisión indicada entre paréntesis (eV).

^d El ion producto señalado en negrita se empleó con fines de cuantificación.

3.6. Tratamiento de la muestra

A continuación se describen los distintos procedimientos utilizados para el tratamiento de muestra.

a) Manzana

Para la extracción de los fitoquímicos objeto de estudio de manzana, se utilizó un procedimiento de extracción previamente desarrollado en el grupo de investigación donde se ha llevado el presente Trabajo Fin de Grado [56,57], describiéndose brevemente a continuación: se pesan 150 mg de muestra liofilizada en un tubo de polipropileno de 15 mL, donde se añaden 3 mL de una mezcla de metanol:agua (80:20, v/v). Se agita el tubo en un vórtex durante 20 segundos, y posteriormente, se traslada a un agitador rotatorio durante 30 minutos. A continuación, se recoge el sobrenadante y se filtra con una jeringa, utilizando un filtro de 0.20 µm de nylon. A partir de ese extracto se realiza el calibrado por adición de patrón.

b) Zumo de manzana

Para el análisis de zumos comerciales, se diluye la muestra 50 veces, añadiendo 1 mL de zumo en un matraz aforado de 50 mL enrasando con metanol calidad HPLC.

3.7. Preparación de zumo de manzana casero

Para la preparación de zumo de manzana casero, en primer lugar se trituraron 100 g de manzana. Del puré de manzana obtenido se toman 10 g, que se diluyen con 10 mL de agua para obtener el zumo. Posteriormente, se filtra 1 mL y se le aplica la dilución 1:50 (v/v) igual que a los zumos comerciales previamente descrita para su análisis cromatográfico.

3.8. Muestras

Se analizaron 18 muestras de seis marcas diferentes de zumo de manzana, adquiridos en diferentes supermercados. Los zumos solo contienen zumo de manzana, es decir, no contiene zumo de ninguna otra fruta como puede ser la uva. Los zumos se analizaron mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Por otro lado, en el análisis utilizando manzana original, se analizaron un tipo de manzana (variedad fuji) por triplicado, así como el zumo procedente de dichas manzanas (también por triplicado).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo es el análisis de distintos fitoquímicos tales como el ácido clorogénico, epicatequina y floridzina en distintos zumos de manzana, utilizando un método analítico de UHPLC-QqQ-MS/MS, desarrollado previamente en el grupo de investigación [56], comentándose a continuación los principales resultados obtenidos.

4.1. Condiciones cromatográficas

Aunque se partió de las condiciones desarrolladas previamente [57], se decidió modificar la composición de la fase móvil, ya que en estudios previos se observó que dependiendo del tipo de compuesto a determinar, la fase móvil óptima podría ser diferente. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una serie de pruebas con distintos tipos de fases móviles para observar su influencia sobre la elución de los compuestos.

Al principio se preparó un vial con una concentración de 1 mg/L de los tres compuestos objeto de estudio, preparado en una mezcla de metanol:acetato amónico 30 mM pH 5 con fórmico, 50:50 v/v, mostrándose en la Figura 2 el cromatograma de los tres compuestos con la fase móvil descrita y empleando el gradiente mostrado en la Tabla 5.

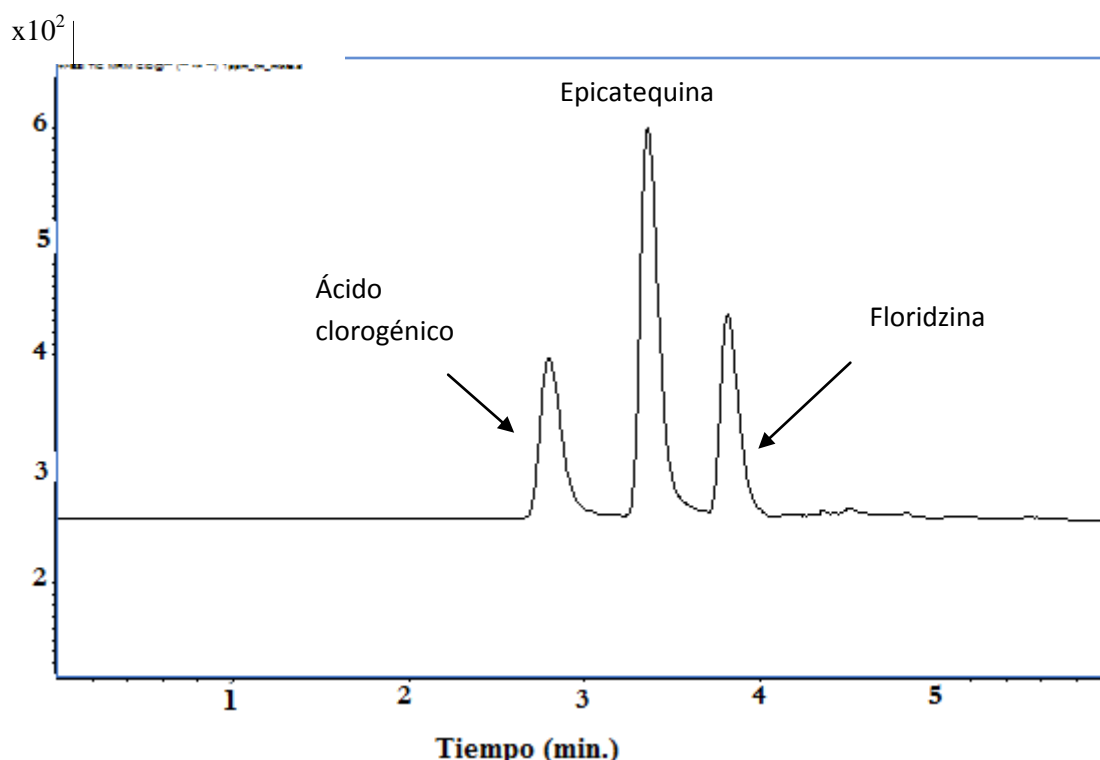


Figura 2.- Cromatograma iónico total, utilizando como fase móvil una mezcla de metanol y una disolución acuosa de acetato amónico 30 mM (pH 5).

En principio, la fase móvil con acetato amónico, podría ser la adecuada para el análisis de los tres compuestos a determinar, pero se decidió realizar pruebas con otras fases móviles que puedan ser más sencillas de preparar, ya que para preparar esta fase móvil acuosa es necesario el uso de un pH-metro, disolución de la sal, etc....

A continuación, se probó con una fase móvil en la que se sustituye el acetato amónico por ácido fórmico al 0.01%, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3. Este tipo de fase móvil acuosa es más sencilla de preparar, ya que simplemente, se añade una cantidad exacta de ácido fórmico al agua con ayuda de una micropipeta. Para la prueba, se preparó un vial con una concentración de 1 mg/L de los tres compuestos objeto de estudio, estando preparado en una mezcla de metanol y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.01%, (50:50 v/v).

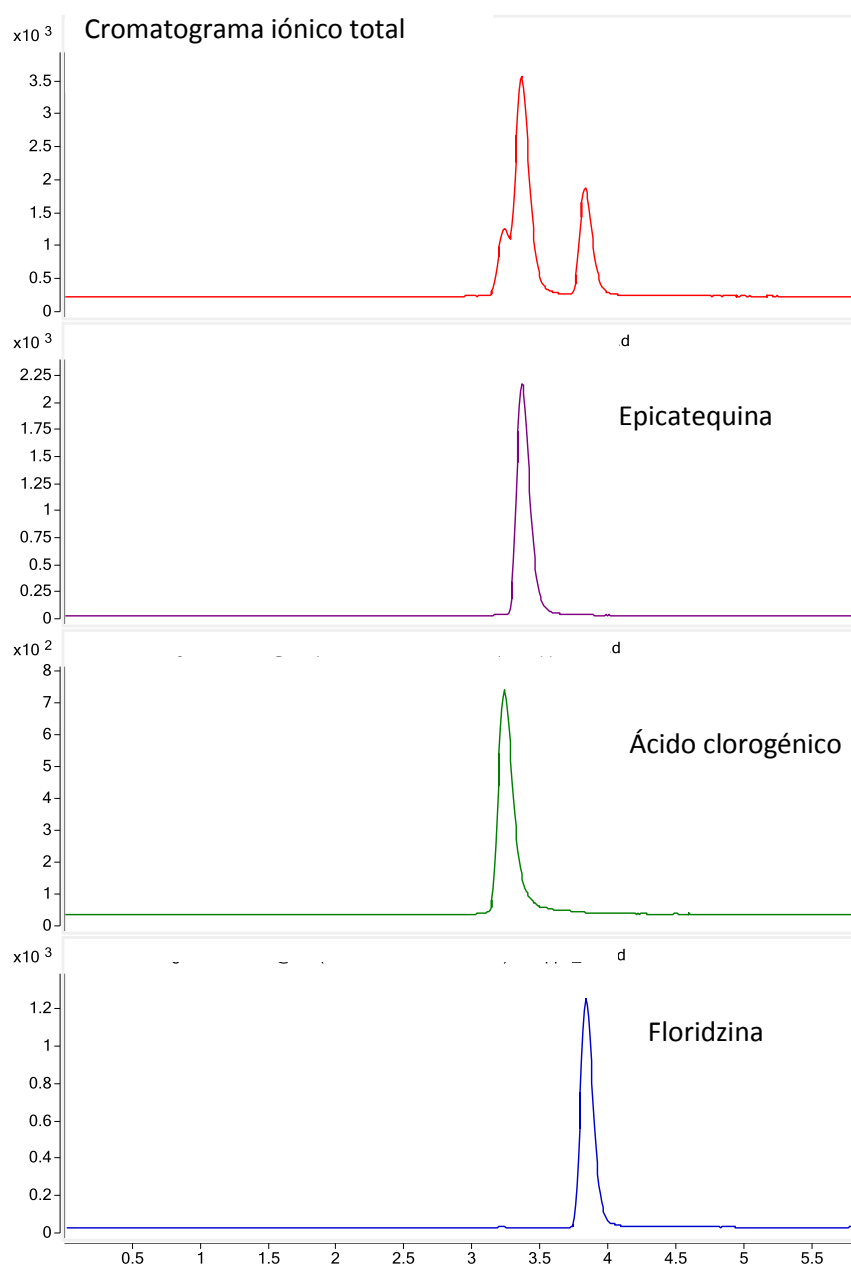


Figura 3.- Cromatograma iónico total y extraído de cada compuesto, empleando ácido fórmico en la fase móvil.

Utilizando la fase móvil ácida (0.01% fórmico), se observa que hay dos compuestos que coeluyen (epicatequina y ácido clorogénico), pero sus iones precursores son diferentes, por lo que pueden diferenciarse sin problema. Además, si se comparan las señales obtenidas con ambas fases móviles, se puede observar que la sensibilidad cuando se emplea ácido fórmico es mayor que cuando se utiliza acetato amónico. Por esta razón se empleará en la fase móvil una disolución acuosa que contenga ácido fórmico, ya que mejora la sensibilidad de los compuestos a determinar.

4.2. Efecto de la dilución de la muestra

Debido a la concentración de los compuestos objeto de estudio en las muestras de zumo de manzana, se decidió minimizar la etapa de extracción de la muestra, y realizar una simple dilución de la misma y posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Sin embargo, el problema principal del análisis por LC-MS o LC-MS/MS cuando se emplea una fuente de ionización de ESI, es que la ionización de los analitos puede verse afectada en mayor o menor medida por efectos de competencia debido a la presencia de componentes procedentes de la matriz. El resultado es una reducción o un aumento de la señal de los analitos en comparación con la señal producida por los patrones en disolvente.

Por lo tanto se decidió evaluar cual era la dilución óptima que minimizaba el efecto matriz pero que permitía la correcta detección e identificación de los compuestos objeto de estudio. Para ello, se realizaron diversos calibrados en matriz [58], adicionando cantidades crecientes de fitoquímicos (desde 25 a 5000 $\mu\text{g/L}$), comparando las pendientes con la obtenida mediante un calibrado en disolvente.

El efecto de la dilución se estudió en una primera fase a tres diluciones distintas del zumo (1:20, 1:100 y 1:500 v/v).

Preparadas estas diluciones, se inyectaron los calibrados correspondientes, y se estimó la relación entre las pendientes (calibrado en matriz/calibrado en disolvente), asumiendo que el efecto matriz era despreciable si dicha relación estaba comprendida entre 0.8 y 1.2. Si era inferior a 0.8, se considera que existe supresión de la señal analítica y si por lo contrario, es mayor que 1.2 [59], hay un incremento de la señal analítica.

La Figura 4 muestra los cocientes obtenidos para cada uno de los compuestos evaluados para las tres diluciones comentadas.

Pend. Distintas diluciones /Pend. dvte

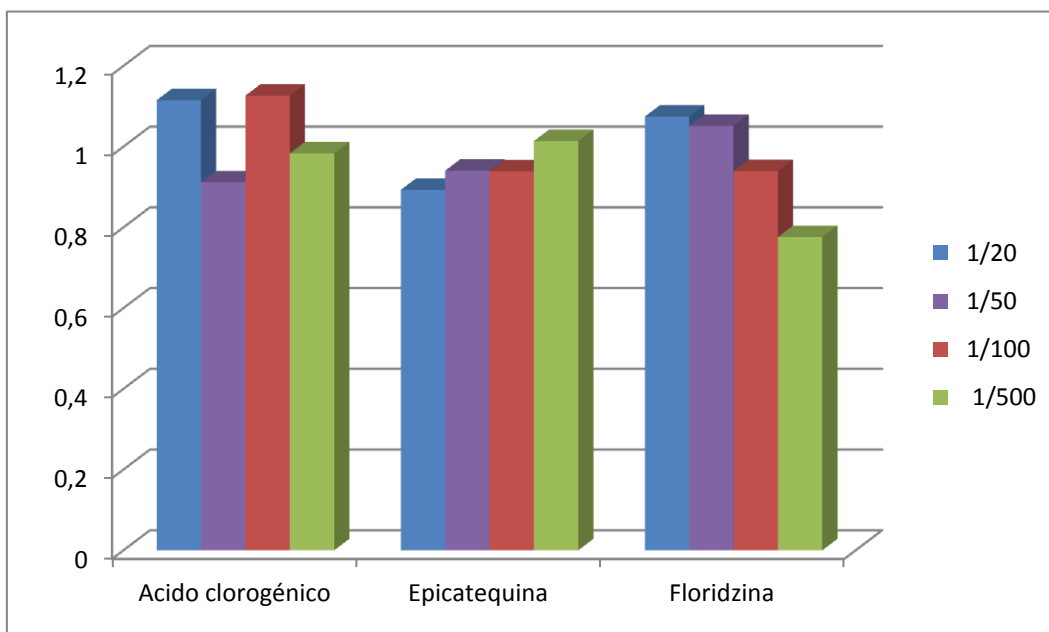


Figura 4.- Relación entre las pendientes de las rectas de calibrado a distinta dilución.

Se puede observar que para las tres diluciones evaluadas en primer lugar no existía un efecto matriz significativo para los tres compuestos objeto de estudio. Sin embargo se apreció que las diluciones 1:100 y 1:500 no permitían la determinación de floridzina y epicatequina a bajas concentraciones, descartándose para posteriores experiencias. Por otro lado, la dilución 1:20 dio buenos resultados en relación a la relación entre las pendientes así como no había problemas de sensibilidad para los tres compuestos.

Con objeto de poder minimizar el posible efecto matriz que pudiera surgir en los distintos zumos de manzana que analizamos, se decidió evaluar una dilución intermedia entre 1:20 y 1:100 como fue la 1:50, evaluando las mismas concentraciones que las indicadas previamente.

Como se muestra en la Figura 4, no se observa efecto matriz para ningún compuesto a dicha dilución, y además se podían detectar a bajas concentraciones, por lo que se decidió emplear dicha dilución para posteriores experiencias.

4.3. Validación del método analítico

A continuación se procede a comprobar la viabilidad de la metodología propuesta, para lo que se estudian algunos parámetros de validación de dicho método en zumo de manzana.

Los parámetros a estudiar fueron:

1. Linealidad.
2. Veracidad.
3. Precisión.
4. Límites inferiores.

Linealidad.

Este parámetro se estudió mediante la construcción de rectas de calibrado, utilizando muestras de zumo a las que se añadían concentraciones de los compuestos comprendidas entre 5 y 250 $\mu\text{g/L}$. Dichas curvas de calibrado se obtienen aplicando la metodología de mínimos cuadrados. Se obtuvieron coeficientes de determinación comprendidos entre 0.989 y 0.999.

Veracidad.

Se realiza un estudio de recuperación a dos niveles diferentes para cada compuesto, fortificando cinco muestras con cada nivel de concentración. Para el ácido clorogénico los niveles fueron 20 y 30 mg/L , para la epicatequina 1 y 2 mg/L y para la floridzina 3 y 5 mg/L . La razón por la que empleamos distintos niveles para cada compuesto es la distinta concentración en la que se encuentran estos compuestos en el zumo de manzana. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7 y se puede observar que los valores de recuperación están comprendidos entre 95 % y 108 %, pudiéndose considerarse aceptable para los niveles de concentración evaluados.

Precisión.

La precisión se determinó mediante la medida de la repetibilidad (precisión intra-día) y precisión inter-día. La repetibilidad se determinó como la variabilidad (medida como desviación estándar relativa, DER) durante la determinación de muestras analizadas en un mismo día, realizando 5 réplicas a los mismos niveles que los evaluados para el estudio de la veracidad, mostrando los resultados en la Tabla 7. Se puede observar que la variabilidad es inferior al 17 %. Por otro lado, la precisión inter-día se estima como la variabilidad de la media de los contenidos de una misma muestra de zumo analizada en diferentes días. En este caso, se analizaron muestras de zumo de manzana fortificadas a los mismos niveles que los descritos anteriormente, durante 5 días. Se puede observar que la variabilidad observada oscilaba entre el 5 y el 19 %.

Tabla 7.- Resultados de la validación del método desarrollado.

Compuesto	Recuperación (%)		Precisión intermedia (%) ^c	
	Nivel bajo ^a	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Ácido clorogénico	95 (10) ^b	97 (13) ^b	7	15
Epicatequina	105 (17)	100 (12)	19	12
Floridzina	108 (4)	95 (8)	5	5

^a Niveles evaluados para cada compuesto: ácido clorogénico 20, 30 mg/L; epicatequina 1, 0 mg/L; floridzina 3, 5 mg/L.

^b DER entre paréntesis (n = 5).

^c Número de réplicas: 5.

Límites inferiores.

A continuación se estimaron los límites inferiores del método, límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs), que se pueden definir como la mínima concentración de analito para la cuál, la relación señal/ruido (S/N) sea de 3 para los LODs y 10 para los LOQs. Dichos límites se calcularon inyectando concentraciones bajas de los compuestos objeto de estudio (0.5, 1, 2, 5, 10 y 25 µg/L). Los resultados mostrados en la Tabla 8 indican los límites inferiores del método expresados como µg de compuesto por L de zumo.

Tabla 8.- Límites de detección y cuantificación.

Compuesto	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Ácido clorogénico	100	250
Epicatequina	50	100
Floridzina	25	50

Se puede observar, que el resultado de los límites inferiores son menores que los resultados de concentración en muestras reales, por lo que no habría problema a la hora de su identificación, ya que estos compuestos se encuentran en la manzana a una alta concentración, mucho mayor que la que nos indican dichos límites.

4.4. Aplicación del método al análisis de muestras reales

Una vez validado el método analítico, se procedió a su aplicación en la determinación de los compuestos objeto de estudio en distintos tipos de zumo de manzana, mostrándose a continuación los principales resultados obtenidos.

4.4.1. Análisis de zumos de manzana comerciales

Se analizaron 18 muestras (6 marcas x 3 réplicas de cada marca), de zumo de manzana de distintos supermercados, tratando de observar la variabilidad en el contenido de fitoquímicos en cada marca. Los resultados de dicho análisis de muestras se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.- Resultados de muestras analizadas.

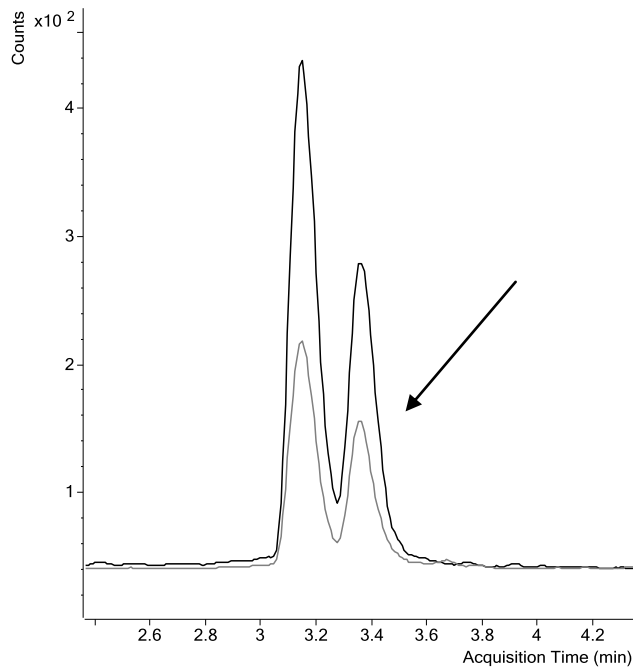
Compuestos	Concentración (mg/L)					
	Marca 1	Marca 2	Marca 3	Marca 4	Marca 5	Marca 6
Ácido clorogénico	14.3 (7) ^a	6.8 (9)	7.4(5)	30.9 (9)	5.0 (8)	30.0 (5)
Epicatequina	0.10 (26)	0.04 (3)	0.11 (4)	0.62 (7)	0.10 (14)	0.13 (16)
Floridzina	2.9 (6)	1.7 (7)	2.0 (9)	6.2 (10)	1.8 (2)	13.1 (6)

^a DER entre paréntesis (n =3).

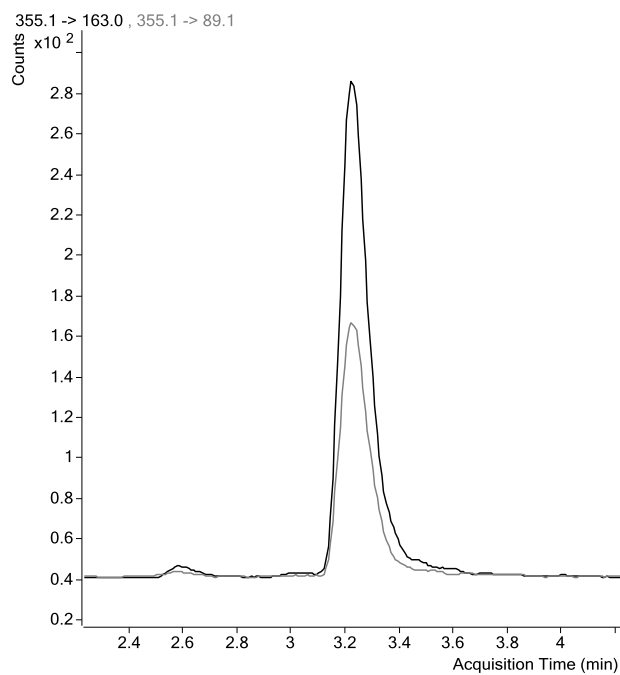
En los resultados se observa que los zumos de la marca 4 tienen un mayor contenido de ácido clorogénico y epicatequina. Por otra parte, la marca 6 es la que contiene mayor concentración de floridzina. Además, podemos observar que el ácido clorogénico, es el compuesto que se encuentra en mayor concentración en los distintos tipos de zumo analizado, habiendo una gran diferencia con respecto a los otros dos compuestos, siendo la epicatequina el compuesto que se encuentra en menor concentración. Por último, desde un punto de vista general, podemos decir que los zumos de las dos marcas mencionadas anteriormente (marca 4 y 6), son las que mayor contenido de fitoquímicos presentan, y esto se traduce a que son de mejor calidad en comparación con los zumos de las demás marcas, ya que estas sustancias son beneficiosas para la salud humana.

A continuación, en la Figura 5, se muestran los cromatogramas iónico extraídos de cada compuesto obtenidos en las muestras analizadas, concretamente de la marca 2, observándose el pico de cuantificación (más intenso) y el pico de confirmación (menos intenso).

A) Epicatequina (Concentración: 0.04 mg/kg)



B) Ácido clorogénico (Concentración: 6.8 mg/kg)



C) **Floridzina** (Concentración: 1.7 mg/kg)

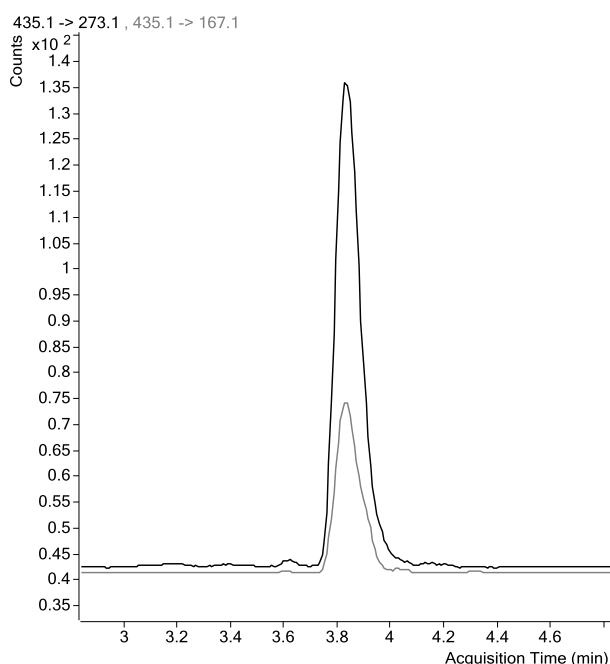


Figura 5.- Cromatogramas iónicos extraídos de los compuestos objeto de estudio tras el análisis de un zumo procedente de la marca 2.

4.4.2. *Estudio del contenido de fitoquímicos en zumos del mismo lote*

Se analizaron 12 muestras de una misma marca (4 envases x 3 réplicas cada envase) y todas ellas del mismo lote. Este ensayo se realizó para observar de qué manera puede cambiar el contenido de los fitoquímicos en un mismo lote de zumos de manzana de una marca en concreto. En este caso se ha analizado la marca 1, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 9.

Tabla 9.- Valor medio de concentración y DER para cada compuesto en zumo.

Compuesto	Concentración (mg/L)
Ácido clorogénico	13.0 (3) ^a
Epicatequina	0.2 (7)
Floridzina	2.4 (1)

^a DER entre paréntesis (n=12)

Se puede observar a partir de la DER obtenida para los compuestos evaluados en los zumos procedentes del mismo lote, que el contenido es bastante homogéneo dentro del mismo lote, presentando una variabilidad inferior al 10 %.

4.4.3. Comparación del contenido de fitoquímico en manzana y zumo de manzana

En este apartado se pretendió evaluar la concentración de los fitoquímicos en manzana y en el zumo derivado de la misma para observar la cantidad de analito que se pierde en el tratamiento de la misma para hacer zumo.

En la primera prueba se trabajó con manzana liofilizada, y de la misma se extrajeron los compuestos de interés, aplicando la metodología desarrollada previamente [57]. Dicho proceso de extracción está optimizado previamente, mostrándose en la Tabla 10 los resultados obtenidos.

Tabla 10.- Concentración de fitoquímicos en manzana y zumo de manzana casero.

Compuesto	Concentración manzana (mg/kg)	Concentración zumo casero (mg/kg)
Ácido clorogénico	94.0 (8) ^a	2.0 (12) ^a
Èicatequina	16.2 (14)	0.6 (18)
Floridzina	63.0 (10)	0.6 (15)

^a Desviación estándar relativa entre paréntesis. Número de réplicas: 3

En primer lugar, si se comparan las concentraciones de la Tabla 10 (manzana) con los resultados obtenidos en la Tabla 9 (zumos de manzana comerciales), se puede observar que la concentración en la manzana es mucho mayor que la cantidad de fitoquímico existente en un zumo de manzana comercial. De esta forma, se podría indicar que en el proceso de fabricación de un zumo de manzana comercial, se pierden una gran cantidad de fitoquímico por kilogramo de manzana utilizado tal y como se ha observado previamente [60].

Por otra parte, en una segunda parte, se prepara zumo tal y como se ha descrito previamente, mostrándose los resultados en la Tabla 10. La concentración de cada uno de los fitoquímicos en el zumo casero, disminuye considerablemente en comparación con la extracción de manzana liofilizada. La razón es que, en la manzana liofilizada, la concentración está en peso seco, que es unas 10 veces más que en peso húmedo. Sin embargo, y a pesar de eso y del proceso de dilución del zumo de manzana, se puede observar que hay una pérdida considerable del contenido de fitoquímicos durante el proceso de elaboración del zumo de manzana.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas a partir de la elaboración del presente trabajo fin de grado son las siguientes:

- El método de análisis utilizado es apropiado para el análisis de fitoquímicos en zumo de manzana mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- Una correcta dilución del zumo (1:50 v/v), permite minimizar el efecto matriz, posibilitando la cuantificación mediante calibrado simple.
- El proceso de validación a los niveles de concentración elegidos fue satisfactorio y se obtuvieron buenos resultados para los parámetros estudiados (linealidad, recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y límites de detección y cuantificación).
- La cantidad de fitoquímicos en diferentes marcas, difieren mucho entre sí, indicando la gran variabilidad en el contenido de estos compuestos entre las distintas marcas evaluadas.
- La concentración de fitoquímicos en zumo de manzana comercial es mucho menor que en la manzana original, por lo que en el proceso de fabricación del zumo, existe una pérdida considerable de fitoquímico.

6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Atendiendo a los resultados obtenidos previamente, se señalan a continuación las posibles líneas de continuación del presente trabajo:

- Aumentar el número de compuestos a analizar, ya que existen una gran cantidad de fitoquímicos, diferentes a los analizados, en el zumo de manzana como pueden ser la cianidina, el ácido cafeico o quercetina.
- Se pueden utilizar otro tipo de matrices, como pueden ser zumos de otras frutas que contengan este tipo de polifenoles y poder compararlos entre sí.

7. REFERENCIAS

- [1] http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/enfermedades/cancer/preven_alimentos_prote.htm (Julio 2014)
- [2] M. I. Alarcón Flores, Evaluación de la calidad de alimentos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, Tesis Doctoral, Universidad de Almería, 2014.
- [3] M. Naczka, F. Shahidi. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 1523-1542.
- [4] S. Karaman, E. Tutem, Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay, *Food Chemistry*, **2010**, 120, 1201-1209.
- [5] <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31952/cilla.pdf;jsessionid=9220D7D1DE201AC1F43E76CFBDE6E94E.tdx2?sequence=1> (Julio 2014)
- [6] <http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/2015/1/tfm86.pdf> (Julio 2014)
- [7] E. Castillo-García, I. Martínez-Solís. Manual de fitoterapia. Ed. *Elsevier Masón*. España, **2007**.
- [8] D.M. Pereira, P. Valentão, J.A. Pereira, P.B. Andrade: Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, **2009**, 2202–2211.
- [9] L. Bravo. Polyphenols: Chemistry, dietary source, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **1998**, 56, 317-333.
- [10] C. Santos Buelga. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. V *Congreso Internacional sobre Alimentación, Nutrición y Dietética*. Madrid **2001**.
- [11] M. J. Motilva, A. Serra, A. Macià. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1292, 66-82.
- [12] www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_050s (Julio 2014)
- [13] <http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/3577/1/pfc5409.pdf> (Julio 2014)
- [14] http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/productos/JugoConcentradoManzana_2012_06Jun.pdf (Agosto 2014)
- [15] REAL DECRETO 1518/2007, de 16 de noviembre, por lo que se establecen parámetros mínimos de calidad de zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. Boletín Oficial del Estado, 8/12/2007.
- [16] <http://www.agrodigital.com/PIArtStd.asp?CodArt=95003> (Agosto 2014)
- [17] D.L. Luthria. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, 86, 2266-2272.

- [18] C.D. Stalikas. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 3268-3295.
- [19] M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, D. Ryan. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*, **2000**, 125, 989-1009.
- [20] A.D.N. Simões, A. Allende, J.A. Tudela, R. Puschmann, M.I. Gil. Optimum controlled atmospheres minimise respiration rate and quality losses while increase phenolic compounds of baby carrots. *LWT-Food Science Technology*, **2011**, 44, 277-283.
- [21] A. Taskken, I. Naeem, S. Bakhtawar, T. Mehmood. A comparative study of flavonoids in fruits and vegetables with their products using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 9, 1372-1378.
- [22] E. Sánchez-Rodríguez, D.A. Moreno, F. Ferreres, M.M. Rubio-Wilhelmi, J.M. Ruiz. Differential response of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, **2011**, 72, 723-729.
- [23] A. Ribas-Agustí, M. Gratacós-Cubarsí, C. Sárraga, J.A. García-Regueiro, M. Castellari. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochemical Analysis*, **2012**, 22, 555-563.
- [24] S-H. Choi, H-R. Kim, H-J. Kim, I-S. Lee, N. Kozukue, C.E. Levin, M. Friedman. Free amino acid and phenolic contents and antioxidative and cancer cell-inhibiting activities of extracts of 11 greenhouse-grown tomato varieties and 13 tomato-based foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 12801-12814.
- [25] B. Buendía, M.I. Gil, J.A. Tudela, A.L. Gady, J.J. Medina, C. Soria, J.M. López, F.A. Tomás-Barberán. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 3916-3926.
- [26] A. Escarpa, M.C. González. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 897, 161-170.
- [27] L. Jakobek, R. García-Villalba, F.A. Tomás-Barberán. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2013**, 31, 199-211.
- [28] D. De Paepe, K. Servaes, B. Noten, L. Diels, M. De Loose, B. Van Droogenbroeck, S. Voorspoels. An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. *Food Chemistry*, **2013**, 136, 368-375.
- [29] M. Naczki, F. Shahidi. Review. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1054, 95-111.
- [30] C.D. Stalikas. Review: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 3268-3295.

- [31] I. Ignat, I. Volf, V.I Popa. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **2011**, *126*, 1821–1835.
- [32] B. Bayram, B. Ozcelik, G. Schultheiss, J. Frank, G. Rimbach. A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column. *Food Chemistry*, **2013**, *138*, 1663–1669.
- [33] J. J. Berzas Nevado, G. Castañeda Peñalvo, V. Rodríguez Robledo, G. Vargas Martínez. New CE–ESI-MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin olive oil. *Talanta*, **2009**, *79*, 1238–1246.
- [34] A. Carrasco-Pancorbo, A.M. Gómez-Caravaca, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra virgin olive oil. *Journal of Separation Science*, **2006**, *29*, 2221–2233.
- [35] F.M. Pirisi, P. Cabras, C. Falqui Cao, M. Migliorini, M. Muggelli. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, *48*, 1191–1196.
- [36] R.J. Robbins. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 2866–2887.
- [37] D. Lopes-Lutz, J. Dettmann, C. Nimalaratne, A. Schieber. Characterization and quantification of polyphenols in Amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius). *Molecules*, **2010**, *15*, 8543–8552.
- [38] K. M. Kalili, A. de Villiers. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, **2011**, *34*, 854–876.
- [39] B. Klejdus, J. Vacek, L. Benesova, J. Kopecky, O. Lapcik, V. Kuban. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, *389*, 2277–2285.
- [40] M.I Churchwell, N.C. Twaddle, L.R. Meeker, D.R. Doerge. Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **2005**, *825*, 134–143.
- [41] N.T.T. Hoang, J.B. Golding, M.A. Wilkes. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on ‘Cripps Pink’ apple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, **2011**, *127*, 1249–1256.
- [42] S-S. Hu, L. Yi, X-Y Li, J. Cao, L-H. Ye, W. Cao, J-H. Da, H-B Dai, X-J. Liu. Ionic liquid-based one-step micellar extraction of multiclass polar compounds from Hawthorn fruits by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**, *62* (23), 5275–5280
- [43] M. Ceymann, E. Arrigoni, H. Schärer, A. Bozzi Nising, R.F. Hurrell. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2012**, *26*, 128–135.

- [44] A. de Villiers, K.M. Kalili, M. Malan, J. Roodman. Improving HPLC separation of polyphenols. *LCGC Europe*, **2010**, *23*, 466–478.
- [45] E. Cicchetti, A. Chaintreau. Comparison of extraction techniques and modeling of accelerated solvent extraction for the authentication of natural vanilla flavors. *Journal of Separation Science*, **2009**, *32*, 3043–3052.
- [46] R. Selvaggini, M. Servili, S. Urbani, S. Esposito, A. Taticchi, G. Montedoro. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, *54*, 2832–2838.
- [47] T. Kraushofer, G. Sontag. Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology*, **2002**, *215*, 529–533.
- [48] C. Wang, Y. Zuo. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, **2011**, *128*, 562–568.
- [49] F.P. do Amaral, A. Napolitano, M. Masullo, L.C. dos Santos, M. Festa, W. Vilegas, C. Pizza, S. Piacente. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. *Journal of Natural Products*, **2012**, *75*, 547–556.
- [50] L. Zhang, J. Chen, Y. Wang, D. Wu, M. Xu. Phenolic extracts from *Acacia mangium* bark and their antioxidant activities. *Molecules*, **2010**, *15*, 3567–3577.
- [51] S.-D. Wei, H.-C. Zhou, Y.-M. Lin, M.-M. Liao, W.-M. Chai. MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins with potent antioxidant activity from the leaf, stem bark and root bark of *Acacia confuse*. *Molecules*, **2010**, *15*, 4369–4381.
- [52] J. Lee, C. Rennaker, R.E. Wrolstad. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, **2008**, *110*, 782–786.
- [53] R. Edenharder, G. Keller, K.L. Platt, K.K. Unger. Isolation and characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 2767–2773.
- [54] <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1066/1063> (Julio 2014)
- [55] http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/9455/Nuevas_aportaciones_L_C-MS.pdf?sequence=3 (Julio 2014)
- [56] M.I. Alarcón-Flores, R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich. Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2013**, *141*, 1120–1129
- [57] M. I. Alarcón Flores, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich. Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Food Analytical Methods* (doi: 10.1007/s12161-014-9931-6).

[58] Daniel C. Harris. Análisis químico cuantitativo (6ª edición), *Editorial Reverté*, **2007**, página 88.

[59] B. Kmellar, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martínez Uroz, A. Valverde, A.R. Fernández-Alba. Document Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal Chromatography*, **2008**, 1215, 37-50.

[60] A. Van der Sluis, M. Dekker, G. Skrede, W. M. F Jongen. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 7211-7219.