

Determinación de fenoles en Ají Gallinazo (*Capsicum frutescens*) - Ají Rocoto (*Capsicum pubescens*) aplicando Espectrofotometría.

Determination of phenols in Gallinazo Chili pepper
(*Capsicum frutescens*) – Rocoto Chili pepper (*Capsicum
pubescens*) applying Spectrophotometry

Carlos Alberto García González *

María Belén Ayala González

Raquel Elizabeth Cedeño Saritama

Juan Carlos Armijos Aguilar

Universidad Técnica de Machala / cgarcia@utmachala.edu.ec

Conference Proceedings UTMACH

Volumen 2, n° 1

ISSN 2588-056X

Centro de
Investigaciones



UTMACH



Resumen

La mezcla de ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) y fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), produce el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), que se ha venido utilizando en los últimos años para analizar fenoles en extractos vegetales, puesto que al contener fenoles reaccionan con el (FC) mostrando una coloración azul. El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fenoles totales en ají tradicional, que se siembra en la región costa como es el ají gallinazo y el tradicional de la región sierra el ají rocoto, por el método de Folin-Ciocalteu. Se prepararon extractos metanólicos de la muestra, y se preparó la curva de calibración, solución patrón de Ácido Gálico 5mg/ml y se diluye a diferentes concentraciones (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4) mg/ml, aplicando una longitud de onda de ($\lambda = 760$ nm). El contenido de compuestos fenólicos expresados en mg de ácido gálico (mg GAE/g PS) para la muestra del ají gallinazo fue de 60,04 mg GAE/g PS y para la muestra de ají rocoto fue de 39,15 mg GAE/g PS, existiendo una gran diferencia en el contenido de fenoles totales. En conclusión, el contenido de fenoles totales en el ají gallinazo es mayor que en el ají rocoto.

Palabras clave: Espectrofotometría, Fenol, Ají gallinazo, Ají rocoto, Folin

Abstrac

The mixture of phosphomolybdic acids ($H_3PMo_{12}O_{40}$) and phosphotungstic acid ($H_3PW_{12}O_{40}$), produces the Folin-Ciocalteu (FC) reagent, which has been used in recent years to analyze phenols in plant extracts, since when they contain phenols they react with the (FC) showing a blue coloration. The objective of this investigation was to determine the content of total phenols in traditional chili pepper, which is sown in the coastal region such as chili pepper and the traditional one of the sierra rocoto chili pepper region, by the Folin-Ciocalteu method. Methanolic extracts of the sample were prepared, and the calibration curve was prepared, standard solution of Galic Acid 5mg / ml and diluted to different concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0, 4) mg / ml, applying a wavelength of ($\lambda = 760$ nm). The content of phenolic compounds expressed in mg of gallic acid (mg GAE / g PS) for the gallinazo chili pepper sample was 60.04 mg GAE / g PS and for the chili pepper sample was 39.15 mg GAE / g PS, there is a great difference in the content of total phenols. In conclusion, the content of total phenols in gallinazo chili pepper is higher than in rocote chili pepper.

Keywords: spectrophotometry, phenol, chili pepper, red pepper, folin

1.- Introducción

Los compuestos fenólicos son todos aquellos que tienen un grupo fenol, benceno unido a estructuras aromáticas y alifáticas, a su vez estos fenoles pueden ser polifenoles y monofenoles, los fenoles los podemos encontrar en la mayoría de alimentos como la cebolla, tomate, pitahayas, bayas, vino tinto, tunas, guayaba, uvas, frambuesas, pimientos, en el café, cacao, entre otros; aunque unos contienen más fenoles que otros (CREUS, 2004). Estos Fito nutrientes incluyen un numeroso grupo de compuestos que han sido sujeto de una extensiva investigación como agentes preventivos de enfermedades. Los fenoles protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cambio la misma función en el organismo humano. (Chasquibol et al., 2003).

se ha recomendado el consumo de antioxidantes como los compuestos fenólicos, los cuales, además de mostrar una gran capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo, se les atribuye una importante efecto en el metabolismo de los carbohidratos mediante varios mecanismos, entre los que se incluye la inhibición en la digestión de carbohidratos y la absorción de glucosa en el intestino, la estimulación de la secreción de insulina por las células β pancreáticas, la disminución en la producción de glucosa por el hígado y la activación de la cascada de señalización de insulina (Knekt y col, 2002; Asgar, 2013; Zakłós-Szyda y col, 2015).

En las coloraciones azules, azul-rojo y violetas característicos de ciertas variedades de cerezas y uvas y el color púrpura de la berenjena se deben al contenido fenólico de estos vegetales. La característica principal de los compuestos fenólicos es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación. Los fenoles también modifican los pasos metabólicos de las prostaglandinas, y, por lo tanto, protegen la aglomeración de plaquetas (Hertog, et al, 1993). Basados en los datos obtenidos de estudios experimentales, parece que existen algunos posibles mecanismos para la acción de los fenoles. Estos inhiben la activación de carcinógenos, y por lo tanto, bloquean la iniciación del proceso de carcinogénesis. (Arellano et al., 2015; García, Fernández, & Fuentes, 2015; Muñoz-velázquez et al., 2012; Nieves, Kiaraa, Riera, Astrida, Vega & obalb, Manganiello, Lisbeth*, 2015; Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

Los fenoles son también antioxidantes y como tales atrapan radicales libres, y previenen que éstos se unan y dañen las moléculas de ácido deoxiribonucleico (DNA), un paso crítico en la iniciación de los procesos carcinogénicos. Como antioxidantes, los fenoles también previenen la peroxidación de lípidos, los cuales, siendo radicales libres pueden causar daño estructural a las células normales. El daño estructural a las membranas de las células normales interfiere con el transporte de moléculas a través de éstas afectando el crecimiento y proliferación celular. (Creus, 2004; Quiñones et al., 2012). El grupo de los fenoles incluye a los flavonoides y sus subgrupos las antocianidinas, las catequinas, los ácidos gálicos y las isoflavonas. (Chasquibol et al., 2003).

Los compuestos fenólicos se encuentra en toda la naturaleza y es por ello que indispensable el uso ya que además el consumo de compuestos fenólicos principalmente de los flavonoides que es el más extendido y de este grupo los flavonoides que son los que tienen capacidad antioxidante, estos nos permiten prevenir numerosas enfermedades cardiovasculares, también neurodegenerativas, a disminuir el colesterol y según estudios se ha determinado que tendría gran utilidad en la prevención de cáncer (CREUS, 2004).

Efecto antioxidante de los Fenoles

Los fenoles son muy susceptibles a la oxidación, por lo tanto, tienen un carácter marcadamente antioxidante, ya que experimentarán la oxidación antes que otras especies susceptibles de ser oxidadas y en consecuencia las protegerán frente a esos ataques

oxidantes (p.ej., luz, radicales libres, químicas, entre otros). (Andrés, Zea, & Patricia, 2012; Beltrán Delgado, Morris Quevedo, de la Cruz, Quevedo Morales, & Bermúdez Savón, 2013; Figueroa-Cares et al., 2010; Frontela, Canali, & Virgili, 2010; García et al., 2015; López-Blancas et al., 2014; Quiñones et al., 2012; Ramos-gómez, 2016; Stewart et al., 2014).

Por otra parte, las estructuras fenólicas complejas tienen la capacidad de recuperar su estado reducido mediante un equilibrio redox muy favorecido por las interacciones de otros grupos funcionales de sus estructuras químicas con distintos metabolitos presentes en el medio. Con lo cual una vez oxidadas van a recuperar su hidroxilo recuperando su capacidad antioxidante, evitando nuevamente la oxidación de otros elementos de interés del medio (p.ej., proteínas, nutrientes, azúcares, etc.) (Copyright Infoagro Systems, S.L., 2017). Para determinar fenoles se utiliza el método de Folin-Ciocalteu (Galvez, Sanchez, Ruiz, Molina, & De la Torre, 2013; García et al., 2015; López-Blancas et al., 2014; Muñoz-velázquez et al., 2012; PNT, 2010; Rincon, Gomez, & Montoya, 2016; Valenzuela-Bustamante, 2015).

Folin-Ciocalteu este método se originó en los años 1927 donde los fenoles al ser oxidados, mediante molibdotungstato, produce coloración con una absorbancia máximo de 745-750 nm (Prior et al., 2005). Los años pasaron, Rossi y Singleton (1965) optimizaron el método analizando vino detectando fenoles totales; a partir de ese experimento se lo aplico en varias investigaciones con diferentes aplicaciones (Huang et al., 2005).

Folin-Ciocalteu (RF-C) este reactivo está compuesto por una combinación del ácido fosfomolibdico (H3PMo12O40), y ácido fosfotúngstico (H3PW12O40) esta reacción, cuando se produce la oxidación fenólica, se reduce a óxidos azules de tungsteno (W8O23) y molibdeno (Mo8O23), (Galili y Hovav, 2014).

Los compuestos fenólicos reaccionan con el RF-C bajo condiciones alcalinas (ajustadas por la solución de carbonato de sodio a pH > 10). La disociación del protón fenólico permite la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el RF-C, lo que apoya la idea de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones (Huang et al., 2005).

Los compuestos resultantes de color azul tienen un máximo de absorbancia en la región de los 760 nm, la cual es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra (Galili y Hovav, 2014), (Valenzuela-Bustamante, 2015).

El reactivo de Folin-Ciocalteu (RF-C) está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico (H3PW12O40) y ácido fosfomolibdico (H3PMo12O40), la cual, a través de la oxidación de los fenoles, es reducida a óxidos azules de tungsteno (W8O23) y molibdeno (Mo8O23), respectivamente (Galili y Hovav, 2014). Los compuestos fenólicos reaccionan con el RF-C bajo condiciones alcalinas (ajustadas por la solución de carbonato de sodio a pH > 10). La disociación del protón fenólico permite la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el RF-C, lo que apoya la idea de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones (Huang et al., 2005). Los compuestos resultantes de color azul tienen un máximo de absorbancia en la región de los 760 nm, la cual es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra (Galili y Hovav, 2014). La metodología utilizada en este trabajo se basó la descrita en el trabajo de Ciccoet al. (2009), la cual se modificó parcialmente (adaptando la metodología para un volumen final de los reactivos de 1300 µL) con el fin de implementar el método en el espectrofotómetro de microplacas, para la determinación de Fenoles se puede trabajar con ácido tánico, cafeico, ferúlico, gálico.

2.- Materiales y Métodos

Ubicación geográfica donde se efectuó la Investigación. Este trabajo experimental, se realizó en las instalaciones de los laboratorios de investigación de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, ubicado en el km 5 ½ vía Pasaje.

Longitud 79°54'46,17"

Latitud 3°17'07,19"

Tipo de investigación. Se trata de un estudio descriptivo, experimental y aplicativo. Se empleó la metodología de Espectrofotometría (García, Fernández, & Fuentes, 2015; Osorio Vélez & Sandino Vargas, 2012; Rodríguez, 2015; Valenzuela-Bustamante, 2015).

2.1. Equipos, Reactivos y materiales

Para este experimento se utilizó reactivos de grado analítico. El ácido gálico (C₇H₆O₅), el carbonato de sodio (Na₂CO₃), el Metanol (CH₃-OH), el reactivo de Folin Ciocalteu (C₁₀H₅NaO₅S)

2.2. Material Vegetal

Los ajís Gallinazo (*Capsicum frutescens*), Rocoto (*Capsicum pubescens*) han sido obtenidas de cultivos de Machala y Cuenca.

2.3. Preparación de los Extractos

Los frutos seleccionados de los ajís fueron secados eliminando su pedúnculo, semillas, para luego colocar en la estufa a 55°C durante tres días, después se tritura estos frutos con un molinillo hasta obtener un polvo fino de ajís, se mezclaron 0,025 g de polvo con 5 ml de metanol (100%) y se pusieron en agitación durante 1 hora. Posteriormente se incubó a 60 °C en una hora con agitación continua, después se filtró con ayuda de una geringa de 1 cm³ y con un filtro millipore nylon de 0,45 µM luego se agrega a refrigeración a 4°C

2.4. Preparación de la Recta de Calibración

A partir de la solución madre de ácido gálico 5mg/ml, se hace diluciones con agua destilada hasta obtener concentraciones diluidas de (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4) mg/ml. Para ello se colocó en Eppendorfs protegidos de la luz, 50 uL de las soluciones diluidas de Ácido Gálico, luego se añadió a cada tubo 200 uL de la dilución de Folin-Ciocalteu (1:4), adicional 50 uL de agua destilada se agito y espero de 4-5 minutos y luego se agregó 1000 uL de Carbonato de Sodio 10% posterior a ello se esperó y dejó reposar 2h para leer en el espectrofotómetro, se debe leer frente al blanco primero, el mismo que tendrá los mismos reactivos en las mismas proporciones con excepción que no se añade ácido gálico (Quispe, Cabala, Paz, & Silva, 2017).

2.4. Determinación de Fenoles Totales

El contenido de Fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por (Quispe et al., 2017) con algunas modificaciones, para optimizar el uso de reactivos, se tomaron 50uL de extracto se añadió 200 uL de la dilución de Folin-Ciocalteu (1:4), adicional a esto se agregó 50 uL de agua destilada se agito y espero de 4-5 minutos y luego se agregó 1000 uL de Carbonato de Sodio 10% posterior a ello se esperó y se dejó reposar por 2h para leer en el espectrofotómetro.

Discusión de Resultados

Determinación del contenido de Fenoles Totales

Con las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro de las diluciones de ácido gálico (ver tabla1), se construyó la recta de calibración (Ver figura 1)

Tabla 1. Absorbancias de las diluciones de Acido Gálico a 760nm

Concentración mg/ml	Absorbancia 760nm
0	0/0
0,05	0,1653/0,009
0,1	0,3657/0,006
0,2	0,7603/0,017
0,3	1,1277/0,012
0,4	1,4673/0,007

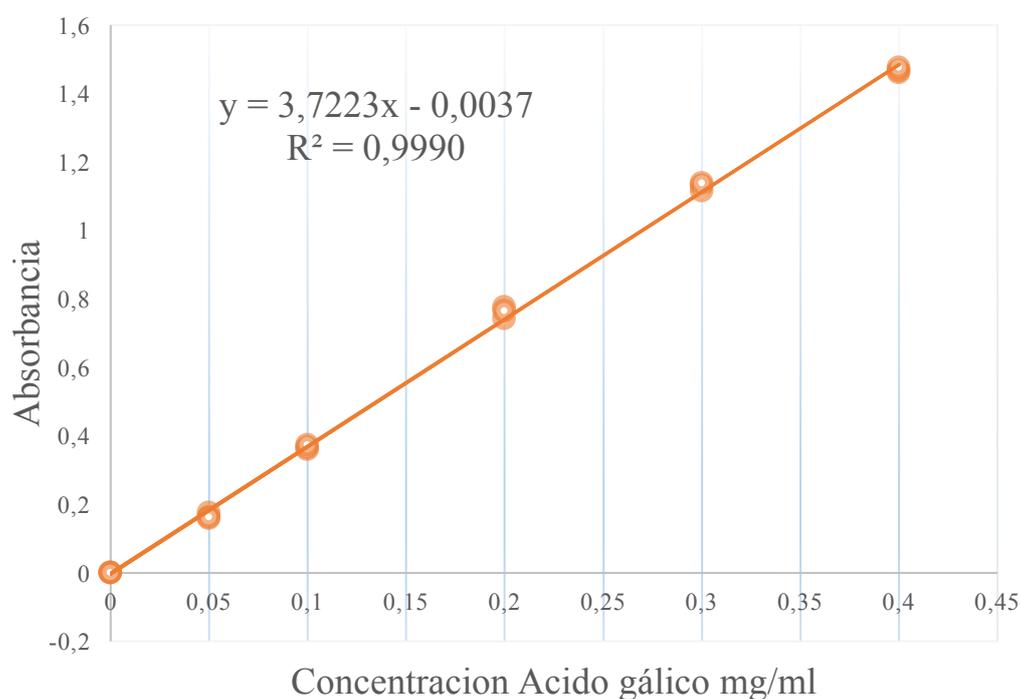


Figura 1. Curva de Calibración de Ácido Gálico

Para calcular la concentración de fenoles en relación con los g de Ácido gálico equivalente se utiliza la ecuación:

$$\text{Conc. Ácido Gálico} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,0037}{3,7223}$$

Los resultados se expresan en mg de ácido gálico (mg GAE/g PS) para la muestra del ají gallinazo fue de 60,04 mg GAE/g PS y para la muestra de ají rocoto fue de 39,15 mg GAE/g PS, existiendo una gran diferencia en el contenido de fenoles totales (ver tabla 2)

Tabla 2. Resultados de los Fenoles Totales en las muestras de Aji

Código (PS)	Media absorbancia	Concentración mg GAE/ml	Concentración Fenoles mg GAE/g PS	Promedio Fenoles mg GAE/g PS	
Rocoto	0,185/0,004	0,186	37,13	39,15	
134C	0,194/0,004	0,195	39,00		
Gallinazo	0,206/0,008	0,207	41,33	60,04	
	60	0,276/0,014	0,277		55,33
		0,312/0,004	0,313		62,60
	0,310/0,010	0,311	62,20		

Al determinar el contenido en fenoles totales de los distintos tipos de ajís observamos que los ajís de Gallinazo son las que poseen una mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguidas de los ajís Rocoto. Estos resultados se mantienen en ambos tipos de cultivos y divergen significativamente como se muestra en la (figura 2).

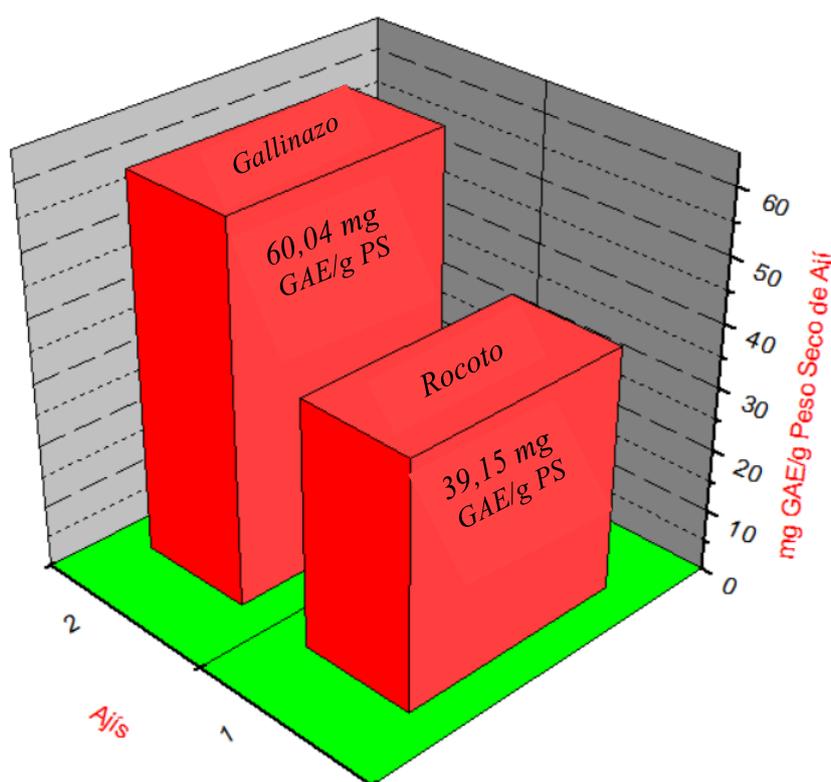


Figura. 2. Contenido de fenoles totales. 1. Ají Rocoto; 2. Ají Gallinazo

Nuestros resultados están de acuerdo con aquellos encontrados por (Muñoz-Bernal et al., 2017; Quispe et al., 2017; Ramos-gómez, 2016), Los resultados muestran que el ají gallinazo y el rocoto tienen fenoles en cantidades significativas. Por lo tanto, la concentración de compuestos fenólicos, a su vez relacionada con la actividad antioxidante, en cada ají es el sostén sobre el cual se fundamenta su uso medicinal por lo que sería adecuado seguir analizando con más detalle estos frutos en relación con los efectos que causan en el ser humano.

Conclusiones

Los resultados de la presente investigación muestran que el método empleado para la determinación de fenoles no está normalizado, sin embargo, el método es bien sustentado tanto en la práctica al darnos el factor de correlación $R^2 = 0,999$ muy aproximado a 1 aplicado en la recta de calibración como en la teoría que ha sido comprobada y adaptada según la amplia bibliografía citada en este trabajo que ayuda a optimizar reactivos en especial el de Folin que por cada muestra se utiliza 40 μL apenas

En el presente trabajo se determinó el contenido de fenoles totales mediante métodos espectrofotométricos, concluyendo que el ají gallinazo es mayor la cantidad presente que en el ají Rocoto

Los fenoles poseen actividades biológicas que incluyen la regulación de mecanismos relacionados con el control de glucosa y otros que ayudan al ser humano por lo tanto se recomienda el consumo de ají gallinazo y rocoto

Referencias Bibliográficas

1. Andrés, J., Zea, O., & Patricia, L. U. Z. (2012). Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE GUAYABA Study of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Guava in Different Stage of Ripening. *Acta Biológica colombiana*, 17(3), 611–624.
2. Arellano, J. R., Escamilla, E., Ruiz, O., Astoviza, M. B., Suárez, M. M. S., De, A., ... Ruiz, O. (2015). Contenido de fenoles, cafeína y capacidad antioxidante de granos de café verdes y tostados de diferentes estados de México. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 100.
3. Ayala-Camarillo, K. C., Gallardo-Velázquez, T., & Beltrán-Orozco, M. del C. (2008). Determinación del contenido de fenoles totales y de la capacidad antioxidante de tres especies del fruto de la pitaya (*Stenocereus griseus* H.). V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, (5).
4. Beltrán Delgado, Y., Morris Quevedo, H. J., de la Cruz, E. R., Quevedo Morales, Y., & Bermúdez Savón, R. C. (2013). Content of total phenols in *Pleurotus* sp. extracts obtained with solvents of different polarity . *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 32(2), 121–129.
5. Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., & Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química E Ingeniería Química*, 6(2), 9–20. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2009000800010>
6. Cherry, P., Evolucion, C., Ascorbico, A., & El, D. (2007). FRESH-CUT CHERRY PEPPERS . PHENOLS AND ASCORBIC ACID, 2007, 634–642.
7. Creus, E. V. A. G. (2004). Development of sample handling systems for determination of phenol and pentachlorophenol in drinking water, 23, 80–84.
8. Figueroa-Cares, I., Martínez-Damián, M. T., Rodríguez-Pérez, E., Colinas-León, M. T., Valle-Guadarrama, S., Ramírez-Ramírez, S., & Gallegos-Vázquez, C. (2010). Pigment content, other compounds and antioxidant capacity in 12 cactus pear cultivars (*Opuntia* spp.) from Mexico. *Agrociencia*, 44, 673–771.
9. Fitó Colomer, M. (2008). Efecto del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos en la reducción del estrés oxidativo y los factores de riesgo cardiovascular. *Endocrinología Y Nutrición*, 55(6), 239–242. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(08\)70676-4](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(08)70676-4)

10. Frontela, C., Canali, R., & Virgili, F. (2010). Empleo de compuestos fenólicos en la dieta para modular la respuesta inflamatoria intestinal. *Gastroenterología Y Hepatología*, 33(4), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.09.006>
11. Galvez, J. Q., Sanchez, C. R. T., Ruiz, Y. C., Molina, Y. Q., & De la Torre, C. M. H. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenolicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 201–215.
12. García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu, 2–8.
13. Gracia Nava, M. A. (2006). Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. Universidad Autonoma de Querétaro, 1–4. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200015>
14. López-Blancas, E., Martínez-Damián, M. T., Colinas-León, M. T., Bautista-Boñuelos, C., Martínez-Solis, J., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2014). Actividad antioxidante y enzimática de albahaca “Nufar” (*Ocimum basilicum* L.) almacenada en refrigeración. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 255. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15428>
15. Muñoz-velázquez, E. E., Rivas-díaz, K., Loarca-piña, M. G. F., Mendoza-díaz, S., Camacho-Reynoso, R., & Ramos-Gómez, M. (2012). Comparación del contenido fenólico , capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 481–495.
16. Nieves, Kiarra, Riera, Astrida, Vega, C., & obalb, Manganiello, Lisbeth*, C. (2015). Development of sample handling systems for determination of phenol and pentachlorophenol in drinking water.
17. PNT. (2010). Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, 19(Revisión 3), 1–7.
18. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrici??n Hospitalaria : Organo Oficial de La Sociedad Espa??ola de Nutrici??n Parenteral Y Enteral*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
19. Ramos-gómez, M. (2016). FENÓLICOS PARA EL CONTROL DE LA GLUCOSA Biological Properties of phenolic ..., (February).
20. Rincon, C. T. S., Gomez, G. L. C., & Montoya, J. E. Z. (2016). Extraccion de compuestos fenolicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 133–144.
21. Stewart, J. J. P., Santacoloma-Varón, L. E., Granados, J. E., Sampedro, M. P., Salido M., Abásolo L., Bañares, a., Pérez, A., ... Tovar, C. F. (2014). Capítulo II. *Revista Cubana De Cardiología Y Cirugía Cardiovascular*, 22(1), 61–104.
22. Sun, T., Xu, Z., Wu, C. T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., & No, H. K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annum* L.). *Journal of Food Science*, 72(2), 98–102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>
23. Valenzuela-Bustamante, P. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz., 83.