

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN TOMATES

ALUMNA: Romina Dalma Sanchez

DIRECTORA: Dra. Sonia C. Sgrosso

Prácticas optativas Bioquímica – 2022

Corrientes capital – Argentina

Índice:

• Introducción.....	2
• Materias y métodos	
○ Material vegetal.....	4
○ Tratamientos aplicados.....	4
○ Preparación del extracto etanólico.....	5
○ Determinaciones.....	5
• Resultados y discusión	
○ Fenoles totales.....	6
○ Ácido clorogénico.....	8
• Conclusiones.....	10
• Bibliografía.....	11

Introducción:

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tanto fresco como procesado, es uno de los vegetales más consumidos en todo el mundo. Es parte fundamental de la alimentación y componente básico de la dieta mediterránea. Se encuentra comúnmente disponible en diversos productos procesados como purés, pastas, tomates pelados enteros, productos cortados en cubitos, jugos, salsas y sopas. Es un alimento rico en compuestos bioactivos, como carotenos (lícopeno y β -caroteno), ácido ascórbico, tocoferoles y compuestos fenólicos; siendo una gran fuente de compuestos antioxidantes. Su consumo está fuertemente asociado a la reducción y prevención del desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Ramos Muñoz, Contreras Martínez, Carranza Téllez & Carranza Concha, 2017).

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios importantes en las plantas, los cuales son los principales componentes de las frutas que tienen una fuerte capacidad antioxidante. En los últimos años, los compuestos fenólicos han atraído el interés de los investigadores, porque muestran la promesa de ser poderosos antioxidantes que pueden proteger el cuerpo humano ante la acción de los radicales libres y los fenómenos oxidativos (W. Zhang, F. Han, J. He, & C. Duan, 2008).

Estos compuestos pueden tener en su estructura un único anillo fenol, tales como los ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos, o bien formar moléculas con varios grupos fenólicos (Tarola, Van de Velde, Salvagni, & Preti, 2013). Se los clasifica en: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos. Los ácidos fenólicos se dividen en derivados del ácido benzoico y cinámico, entre los que se incluye al ácido clorogénico.

El ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoil- ácido quínico) (Fig.1) es un éster del ácido cafeico con ácido quínico, tiene efectos biológicos potenciales y una amplia distribución en la naturaleza. Este compuesto es un ácido fenólico considerado un nutracéutico capaz de prevenir y tratar enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, es un inhibidor de cancerígenos, además de ser antioxidante y antimutagénico (<https://es.calameo.com/read/00175220284f5881b728b>).

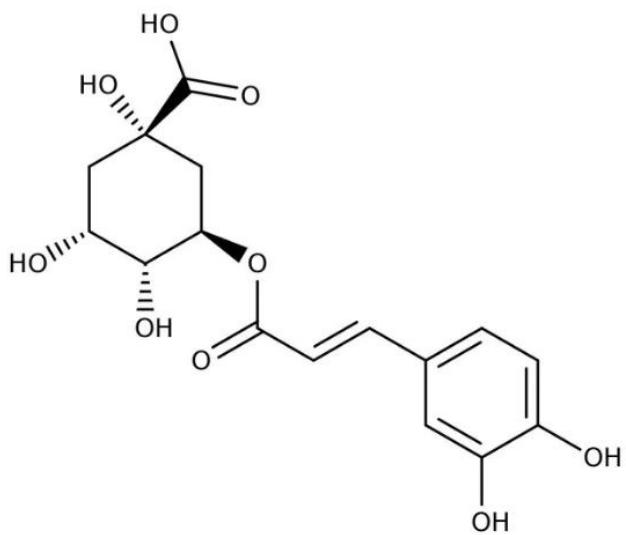


Figura 1. Estructura química del ácido clorogénico.

Recientes trabajos han demostrado que la aplicación de UV-C provoca una respuesta en los vegetales incrementando la capacidad antioxidante y el contenido fenólico, por lo tanto, su aplicación podría ser utilizada por las industrias de procesamiento de alimentos y productos

frescos como una herramienta simple para aumentar las propiedades de promoción de la salud de ciertos vegetales (Surjadinata, Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2017).

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se pueden utilizar distintas técnicas, entre ellas se encuentra la espectrofotometría, que es un método sencillo y económico, pero solo logra cuantificar los compuestos fenólicos totales. Otro de los métodos es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que permite separar, identificar y cuantificar individualmente cada uno de los compuestos fenólicos presentes en la muestra (Manfredi, 2010).

La determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotungstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles que se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva patrón de ácido fenólico. El reactivo de Folin Ciocalteu no es específico y detecta todos los grupos fenólicos que se encuentran en los extractos, incluidos los que se encuentran en las proteínas extraíbles. Una desventaja de este ensayo es la interferencia de sustancias reductoras como el ácido ascórbico en las determinaciones.

En la cromatografía líquida los componentes de una mezcla son llevados a través de una fase estacionaria fijada dentro de una columna mediante el flujo de una fase móvil líquida. Las separaciones están basadas en las diferencias de la velocidad de migración entre los componentes de la muestra, que vienen condicionadas por la naturaleza de los analitos y su interacción con las fases.

Después de haber pasado los componentes de la muestra por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal. Los detectores de absorbancia UV-visible son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda.

Existen dos tipos de fases estacionarias, basadas en grupos orgánicos: -C₈H₁₇ y -C₁₈H₃₇. De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es el más común y es el que se utilizó en este trabajo (ODS o C₁₈). La fase móvil suele consistir en una solución acuosa de ácido (ácido fórmico, acético o trifluoroacético) y un solvente orgánico (acetonaítrilo o metanol) (Tarola y col., 2013).

Una vez inyectada la muestra en el equipo, ésta migra junto a la fase móvil y pasa a través de la fase estacionaria, pero para que esto ocurra, se debe aplicar una elevada presión a la fase móvil para forzarla a pasar por la fase estacionaria, consiguiendo así separaciones de gran resolución y en un plazo corto de tiempo. La separación de los analitos es el resultado de las interacciones entre las moléculas de la muestra y ambas fases, determinado por su afinidad por cada una. Si se mantienen fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán lentamente por la fase móvil, es decir, tendrá mayor afinidad, mientras que los que se retienen débilmente avanzarán más rápido, es decir, tendrá menor afinidad (Hurtado Ulloa, 2017).

Existen diversos detectores que se pueden utilizar en HPLC, UV-visible, electroquímico de fluorescencia y de arreglo de diodos (DAD). Este último detector permite en tiempo real conocer todo el espectro de UV/Visible dentro de un rango de longitud de onda. Su funcionamiento se basa en que el haz de radiación es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos (Hurtado Ulloa, 2017). A partir de dicha información se

puede medir el área y la altura del pico específico de la muestra o analito en las diferentes longitudes de onda en el rango de 190 a 800 nm. El desarrollo de los detectores que cuentan con arreglo de diodos es un gran avance en la espectrofotometría UV, poseen un nuevo sistema óptico e introducen el concepto de integración total del detector, microprocesador y procesamiento de datos.

El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de una técnica para determinar el contenido en polifenoles presentes en muestras de tomate y a su vez evaluar el contenido de ácido clorogénico en dichas muestras. Para ello, se utilizó el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteau y la cromatografía líquida de fase reversa, la cual comprende una fase estacionaria con características apolares y una fase móvil polar formada por una solución acuosa de ácido acético (solvente A) y metanol (solución B, ácido acético en metanol). Además, se trabajó con un gradiente binario de la fase móvil, con lo cual se produjo un cambio continuo en la composición del solvente para incrementar la fuerza eluotrópica. La detección del analito se realizó con un detector UV-DAD.

Materiales y Métodos:

Material vegetal

Se trabajó con tomates de grado de madurez intermedia, seleccionando frutos libres de daño que fueron lavados con agua destilada y secados sobre papel absorbente. A continuación, los tomates se separaron en tres grupos para su tratamiento (Fig. 2)



Figura 2. Tomates seleccionados separados en tres grupos (control, T1 y T2).

Tratamientos aplicados

Se efectuaron ensayos con 3 lotes de frutos de tomate enteros: control y sometidos a un estrés abiótico, aplicando dosis de UV-C de 4 y 8 kJ/m² (T1 y T2) (Fig. 3).

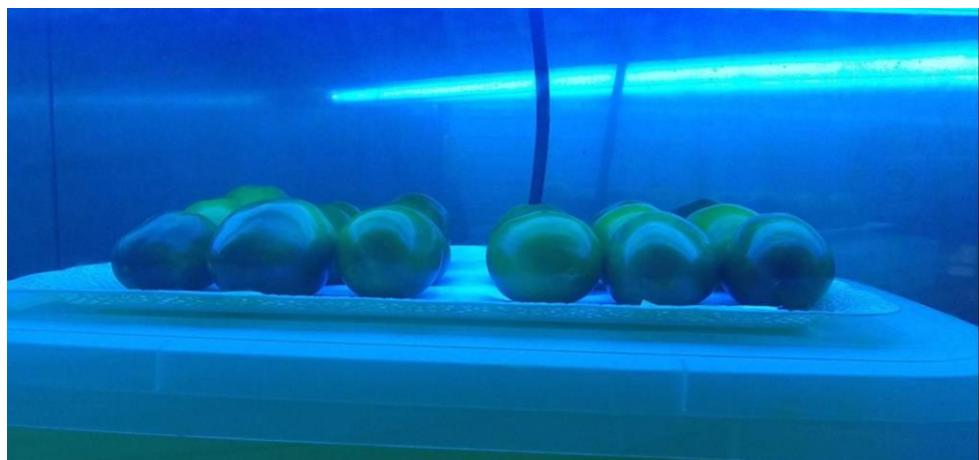


Figura 3. Tomates sometidos a un estrés abiótico, aplicando dosis de UV-C.

El primer grupo (tomate control) se congeló rápidamente a -20°C, el segundo grupo (T1) fue tratado con radiación UV exponiéndolos 20 minutos de cada lado, luego fueron congelados y el tercer grupo (T2) fue tratado con radiación UV exponiéndolos 40 minutos de cada lado y se los congeló. Posteriormente se separaron pulpa y cáscara de cada grupo y se los procesó por separado para preparar los extractos.

Preparación del extracto etanólico

Se prepararon extractos etanólicos de la pulpa y la cáscara del tomate de manera separada, tanto del grupo control como de los tratados, triturando 10 g de muestra con 30 mL de etanol 96°, se colocaron en agitador magnético 20 minutos en baño de hielo tapados con papel aluminio. Posteriormente se centrifugó 15 minutos, se filtró el sobrenadante a través de papel filtrante, se midió el volumen final y se conservó a -20°C hasta el momento de su análisis.

Determinaciones

Equipos:

Las determinaciones de fenoles totales se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU UV-1800 (Japón) con barrido de espectro y celda de termostatización.

Las determinaciones de ácido clorogénico se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC SHIMADZU LC-10AT con detector UV-visible SPD-10A y detector de arreglo de diodos SPD-M20A (Japón).

Determinación de Fenoles Totales:

Los fenoles totales extraídos con etanol se determinaron por espectrofotometría a una longitud de onda de 725 nm utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau (Singleton et al., 1965; Martínez-Valverde et al., 2002). Para ello se tomó una alícuota de 0,6 mL de extracto etanólico y diluyó con 4,5 mL de agua, previa agitación en vortex se adicionó 0,3 mL de reactivo de Folin y se dejó reaccionar 5 minutos. Se agregaron 0,6 mL de solución saturada de carbonato de sodio, se agitó y dejó reaccionar en la oscuridad una hora, posteriormente se leyó la absorbancia del producto de reacción a 725 nm, expresando el resultado en µg ácido clorogénico/g tejido fresco. Se construyó la curva de calibración utilizando patrón de ácido clorogénico 0,2mg/ml y se ajustaron las diluciones en cada caso.

Determinación de ácido clorogénico:

Previo a la determinación de ácido clorogénico los extractos fueron concentrados a sequedad y redissueltos en etanol 96°.

La determinación del contenido de ácido clorogénico se realizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Se inyectaron manualmente 20 µL del filtrado en un equipo de HPLC (Shimadzu LC-10 A, Tokio, Japón) provisto de una columna Thermo Scientific Hypersil ODS C18 (250 mmx 4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 µm y detector Shimadzu SPD-M20A UV-Vis DAD.

La fase móvil utilizada fue con gradiente preparado a partir de ácido acético en agua 1%v/v (disolvente A) y ácido acético en metanol 1%v/v (disolvente B). El gradiente utilizado fue: 0–10 min 10-26% B, 10–25 min 26–40% B, 25.–45 min 40-65%, 45-55 min 65–95% B, 55-58 min 95–10% y 58- 61 min 10% B. El flujo empleado fue de 1 mL/min (W. Zhang, F. Han, J. He, & C. Duan, 2008). Los volúmenes de muestra y patrones inyectados fueron de 20 µL. Longitud de onda: 280-350 nm.

El ácido clorogénico se detectó a 320 nm con un detector UV-DAD (Shimadzu SPD-M20A) utilizando un patrón de ácido clorogénico en metanol 0,2mg/ml, analizando el tiempo de retención y por comparación de espectros (Vallverdú-Queralt et al., 2011).

Análisis estadístico:

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados que se presentan corresponden al valor medio y desviación estándar de repeticiones efectuadas. Con los datos se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5%. Se aplicó la prueba de Tukey para confirmar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos después del ANOVA ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software InfoStat versión 2020.

Resultados y discusión:

Fenoles totales

Para realizar la determinación de fenoles totales por Folin Ciocalteau, se puso a punto la técnica propuesta por Singleton et al. (1965) modificada.

En el caso de la pulpa se utilizó 0,3 ml del extracto, es decir la mitad de la cantidad establecida en la técnica operatoria antes mencionada. En el caso de la cáscara se utilizó 0,15 ml del extracto, completando en cada caso el volumen final de reacción con agua destilada.

La curva de calibración se construyó utilizando un patrón de ácido clorogénico 0,2mg/mL, realizando distintas diluciones de la solución madre (Fig. 4).

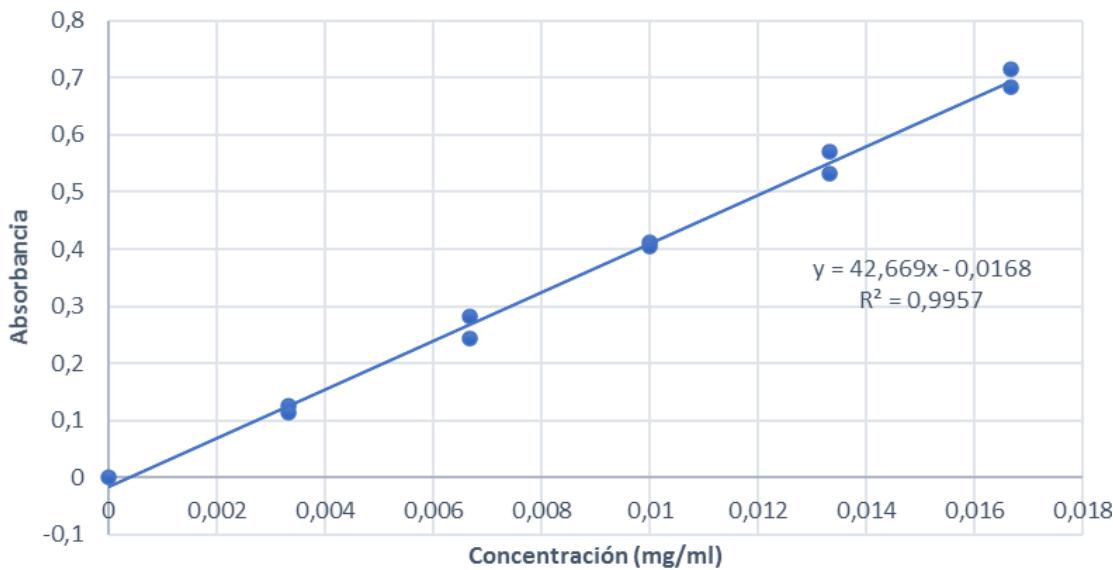


Figura 4. Curva de calibración de ácido clorogénico por espectrofotometría.

Luego, se cuantificaron los fenoles totales en la pulpa y cáscara de los frutos control y sometidos a T1 y T2.

La pulpa de los tomates tuvo contenidos de 532,95 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco, los cuales se vieron afectados luego de los tratamientos aplicados, tal como puede observarse en la Fig. 5. Los niveles de fenoles totales incrementaron un 19,1% y 30% respectivamente para T1 y T2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) en el contenido de fenoles totales entre los frutos control y tratados, no habiendo diferencia significativa entre ambos tratamientos T1 y T2.

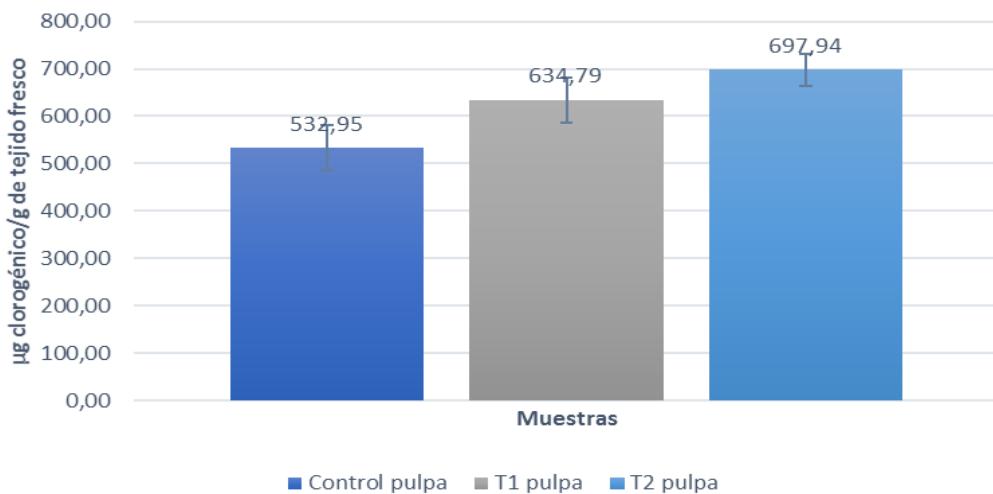


Figura 5. Valores medios y desviación estándar en los fenoles totales presentes en la pulpa del tomate.

En cuanto a los resultados obtenidos para la cáscara (Fig. 6), que inicialmente fue de 1575,16 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco, los tratamientos con luz UV-C modificaron sus contenidos en forma diferencial. Los frutos control y T1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de fenoles totales entre ellas, sin embargo, se determinaron disminuciones estadísticamente significativas respecto del tratamiento T2.

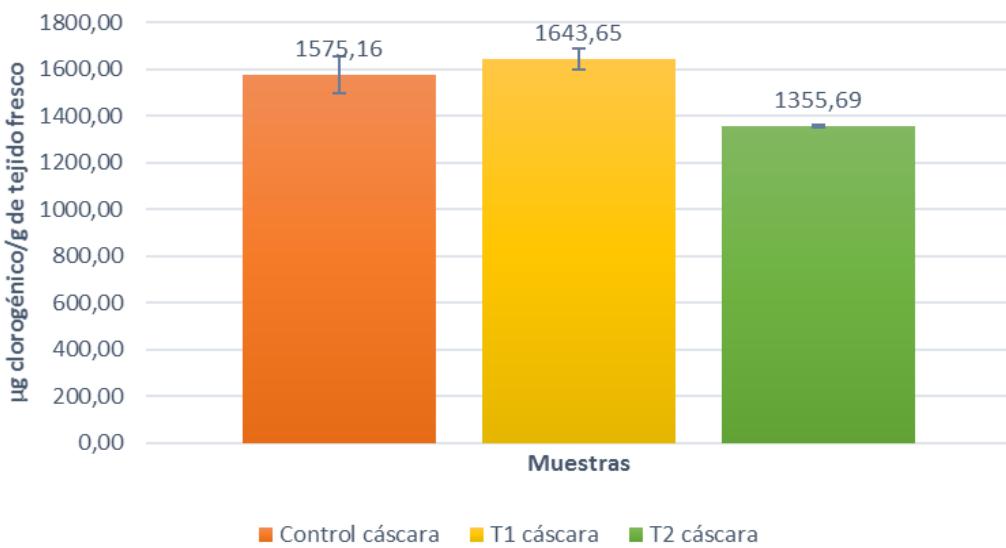


Figura 6. Valores medios y desviación estándar en los fenoles totales presentes en la cáscara del tomate.

Ácido clorogénico

Se inyectaron volúmenes de extractos puros y luego los extractos fueron concentrados a sequedad y redispersados en etanol 96°.

En primera instancia el gradiente utilizado fue: 0,01-10 min: 10-26% B, 10-25 min: 26-40% B, 25-45 min: 40-65%, 45-55 min: 65-95% B, 55-58 min: 95-10% y 58-60 min: 10% B. El flujo empleado fue de 1 mL/min (W. Zhang, F. Han, J. He, & C. Duan, 2008), luego se decidió acortar el tiempo de corrida a 25 minutos, por lo cual el gradiente utilizado en este caso fue: 0,01-10 min: 10-26% B, 10-20 min: 26-40% B, 20,01-24,99 min: 40-10% y 24,99-25 min: 10% B. La curva de calibración se construyó utilizando un patrón de ácido clorogénico 0,2mg/ml, realizando distintas diluciones de la solución madre (Fig. 7).

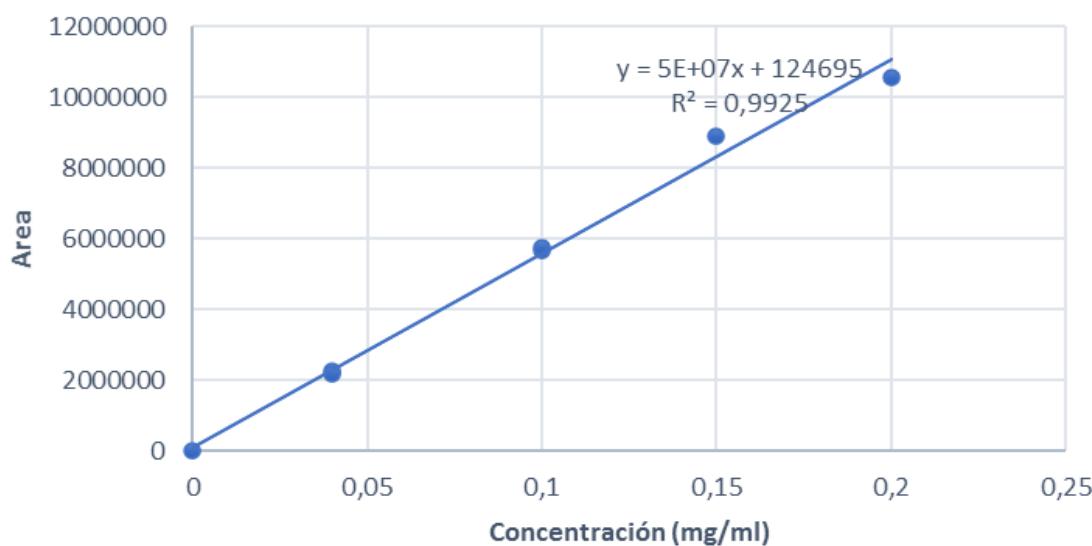


Figura 7. Curva de calibración de ácido clorogénico por HPLC.

La identificación del pico de ácido clorogénico se realizó comparando el tiempo de retención y las características espetrales del patrón utilizado. El compuesto en estudio se detectó a los 17 minutos (Fig. 8).

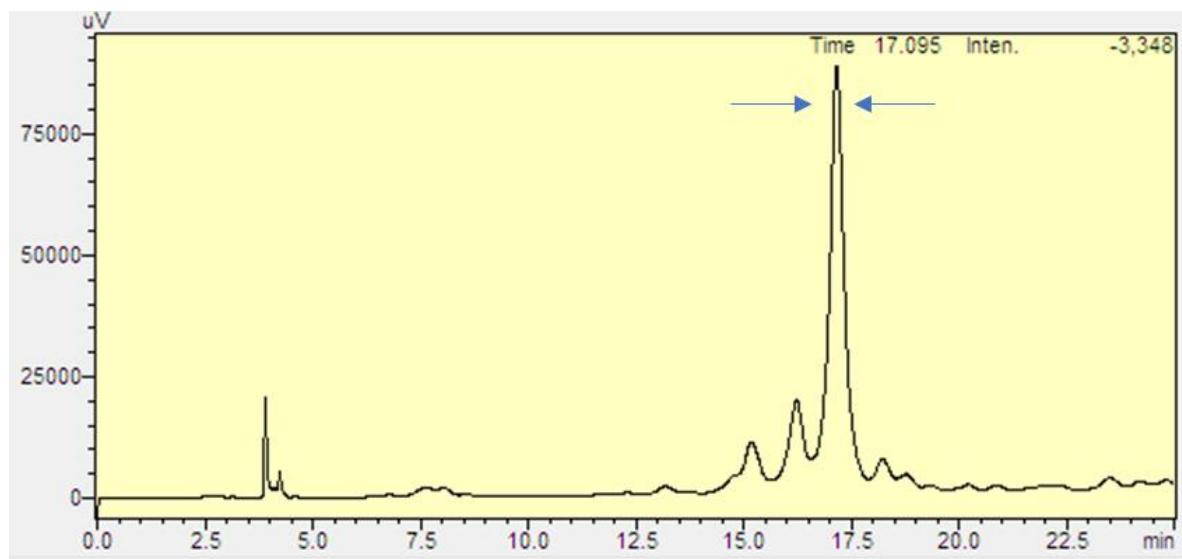


Figura 8. Cromatograma a 320 nm de la muestra. Identificación del pico de ácido clorogénico.

Los valores de contenido de ácido clorogénico en los frutos control fueron de 2,58 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco para la pulpa y de 8,04 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco para la cáscara.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la pulpa (Fig. 9) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la muestra control y la muestra sometida al T1 ($P > 0,05$).

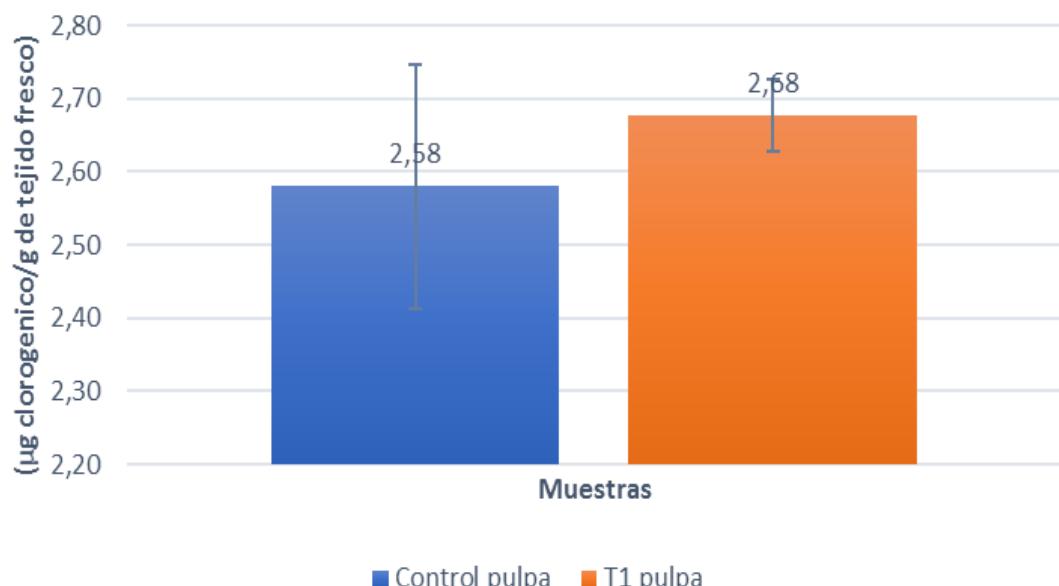


Figura 9. Valores medios y desviación estándar del ácido clorogénico presente en la pulpa del tomate.

En cuanto a los resultados obtenidos para la cáscara (Fig. 10), se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) en el contenido de ácido clorogénico entre el control y las muestras tratadas, no existiendo así una diferencia significativa entre ambos tratamientos.

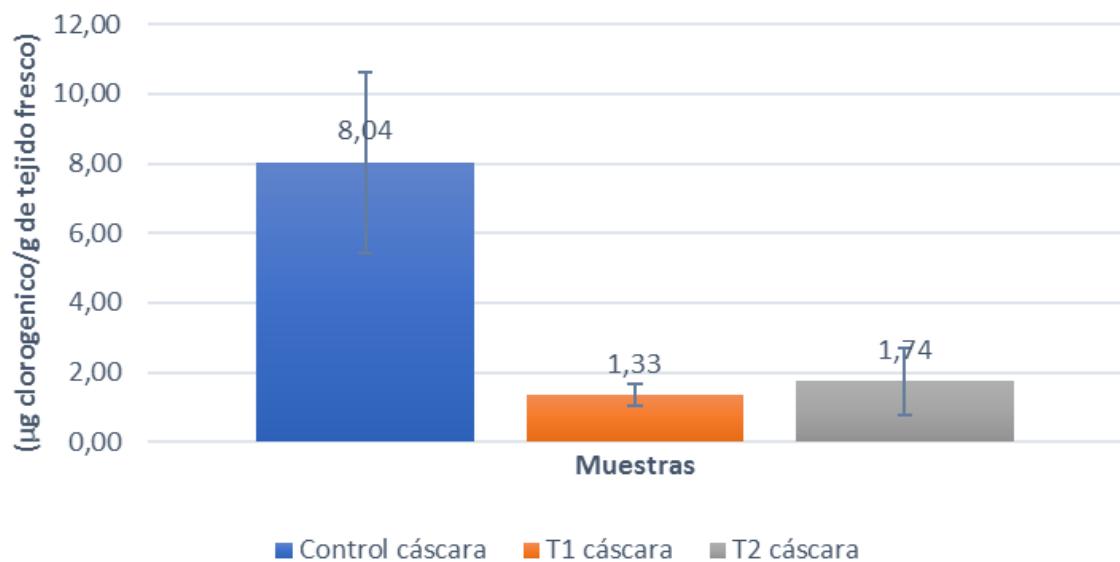


Figura 10. Valores medios y desviación estándar del ácido clorogénico presente en la cáscara del tomate.

Conclusiones:

Se puso a punto la técnica espectrofotométrica para determinación de fenoles totales y establecieron los contenidos de fenoles totales en pulpa y cáscara. Se encontraron niveles de 532,95 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco para la pulpa y de 1575,16 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco para la cáscara en los frutos control, mientras los tratados mostraron incrementos notorios después del tratamiento en el caso de la pulpa, en tanto que para la cáscara se evidenció una disminución.

Por otra parte, se desarrolló un método de cromatografía líquida para cuantificar el contenido de ácido clorogénico en tomate, siendo sus valores de 2,58 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco y 8,04 µg ácido clorogénico/g de tejido fresco para pulpa y cáscara respectivamente. Asimismo, se observó que el tratamiento con luz UV-C en las dosis ensayadas no modificó su contenido en pulpa, mientras que en la cáscara provocó disminuciones.

Se evidenció una mejoría en la separación y determinación de ácido clorogénico por HPLC previa concentración de la muestra, y con la modificación del gradiente se disminuyó el tiempo de trabajo.

A partir de estos resultados se puede inferir que el incremento en fenoles totales producido por el estrés abiótico a estos frutos de tomate, se debería a la presencia de otros compuestos diferentes al ácido clorogénico.

Bibliografía:

1. <https://es.calameo.com/read/00175220284f5881b728b> [Accedido: 1 de julio de 2022].
2. Hurtado Ulloa, N. I. (2017). Comparación entre metodologías analíticas por HPLC con detectores de arreglo de diodos y fluorescencia para la determinación de eritromicina en plasma de salmónidos (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile.
3. Manfredi, A. P. (2010). Evaluación del contenido de flavonoides en cáscara de cinco variedades de citrus limón de Tucumán. IV Jornadas de Jóvenes Investigadores UNT – CONICET. Tucumán.
4. Martinez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 323–330.
5. Medina Vargas, Óscar J., Garzón Salcedo, L. C. A., & Espinosa Manrique, W. E. (2017). Efecto del tiempo sobre la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu. *I3+*, 3(2), 10–25.
6. Ramos Muñoz L. G., Contreras Martínez C. S., Carranza Téllez J. & Carranza Concha J. (2017). Capacidad antioxidante, contenido en licopeno y fenoles totales en tomate de huerto familiar - Ciencia UANL. <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=7234>
7. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. (1965). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-153.
8. Surjadinata, B. B., Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2017). UVA, UVB and UVC Light Enhances the Biosynthesis of Phenolic Antioxidants in Fresh-Cut Carrot through a Synergistic Effect with Wounding. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(4), 668. <https://doi.org/10.3390/molecules22040668>
9. Tarola, A. M., Van de Velde, F., Salvagni, L., & Preti, R. (2013). Determination of phenolic compounds in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) by high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 227-237.
10. Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Martínez-Huélamo, M., Jauregui, O., Andres-Lacueva, C., & Lamuela-Raventos, RM (2011). Perfil fenólico y capacidad antioxidante hidrofílica como marcadores quimiotaxonómicos de variedades de tomate. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria* , 59 (8), 3994-4001.
11. Zhang, W., Han, F., He, J. y Duan, C. (2008). Análisis HPLC-DAD-ESI-MS/MS y actividades antioxidantes de fenólicos de no antocianina en morera (*Morus alba* L.). *Revista de ciencia de los alimentos*, 73: C512-C518.