



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu

Apellidos, nombre	García Martínez, Eva (evgamar@tal.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	ETSIAMN. Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

El análisis del contenido en compuestos polifenólicos de un alimento es importante debido a la gran variedad de actividades biológicas que estos compuestos presentan, considerándose uno de los fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana. La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante. Además de los efectos sobre la salud, muchos compuestos polifenólicos tienen un efecto sobre la calidad de los alimentos que los contienen, puesto que son responsables de algunas propiedades sensoriales.

Su determinación puede realizarse por medio de diversos métodos. En este artículo se describe el ensayo Folin-Ciocalteu que 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 a 765 nm.

2 Introducción

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Se trata de compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Tradicionalmente se han considerado como sustancias antinutritivas debido al efecto adverso de uno de sus componentes principales, los taninos, en la digestibilidad de proteínas. Sin embargo, actualmente existe gran interés en estos compuestos debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana. La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante, el cual es debido a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres. De hecho, diversas organizaciones internacionales, en el ámbito de la nutrición, recomiendan un consumo diario como mínimo de cinco raciones de fruta o verdura, para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Existen numerosos estudios que proporcionan datos que apoyan la correlación negativa entre la ingestión de compuestos fenólicos y el riesgo de padecer ciertas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer, cataratas y otras disfunciones relacionadas con la edad. Además de estos efectos beneficiosos para la salud, también se ha estudiado su efecto antiinflamatorio y su efecto preventivo en el tratamiento de asma.

La cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de almacenamiento, etc.



Los compuestos polifenólicos presentan en su estructura química uno o más anillos de benceno y uno o más grupos hidroxilados con algún elemento común, como los grupos funcionales de ésteres, ésteres de metilo, glicósidos, etc. Se trata de moléculas muy reactivas que normalmente se encuentran combinadas con azúcares, como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramosa, xilosa o los ácidos glucorónicos y galacturónicos. También pueden unirse con ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos. Aunque pueden encontrarse distintas clasificaciones de polifenoles, dependiendo de su complejidad química, pueden agruparse en C_6 , C_6-C_n , $C_6-C_n-C_6$, siendo $n \leq 3$. La tabla 1 muestra los diferentes grupos de polifenoles y algunos ejemplos de cada grupo y la figura 1 muestra la estructura química del grupo fenol.

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles y ejemplos de ellos.

Estructura química	Tipo	Ejemplo de polifenol
C_6	Fenol simple	Eugenol
C_6-C_1	Ácido fenólico Ácido benzoico	Ácido gálico Ácido elágico
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables	
C_6-C_2	Ácido fenil acético	
C_6-C_3	Ácido hidroxicinámico Cumarinas	Ácido cafeico Ácido ferúlico
$(C_6-C_3)_2$	Lignanos	
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas Xantonas	
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	Resveratrol
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides Chalconas	Antocianinas Flavonoles Flavonas Flavanonas Isoflavonas Flavanoles
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianinas (taninos $4 \leq n \leq 11$)	

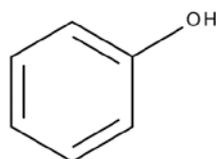


Figura 1. Estructura química del grupo fenol

Además de los efectos sobre la salud, muchos compuestos polifenólicos tienen un efecto sobre la calidad de los alimentos que los contienen, puesto que son responsables de algunas propiedades sensoriales. Por ejemplo, las antocianinas son pigmentos responsables del color rojo-azulado de muchas frutas como las fresas, uva, ciruelas, etc., los flavonoles aportan el color amarillo característico de algunas partes externas de frutas o vegetales, las flavanonas son responsables del sabor amargo de algunos cítricos (por ejemplo, la naringina en el pomelo o la neohesperidina en la naranja), el eugenol caracteriza el intenso aroma de los plátanos o los taninos que confieren la astringencia a algunas frutas. Otros polifenoles, como los ácidos hidroxicinnámicos y sus derivados, pueden ser oxidados por enzimas presentes en los tejidos vegetales, dando lugar a productos de color pardo.

3 Objetivos

Con este artículo se persigue que los alumnos adquieran la capacidad de:

- Aplicar el método de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido en polifenoles totales de productos vegetales.
- Cuantificar los compuestos polifenólicos totales de una muestra a partir de la construcción de una recta patrón de ácido gálico.

4 Desarrollo

A continuación pasamos a describir la determinación del contenido en polifenoles totales empleando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu en una muestra de zumo de naranja.

4.1 Fundamento del método

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. 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 a 765 nm. 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 fosfomolibdotúngstico (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 medimos para evaluar el contenido en polifenoles (Figura 2).

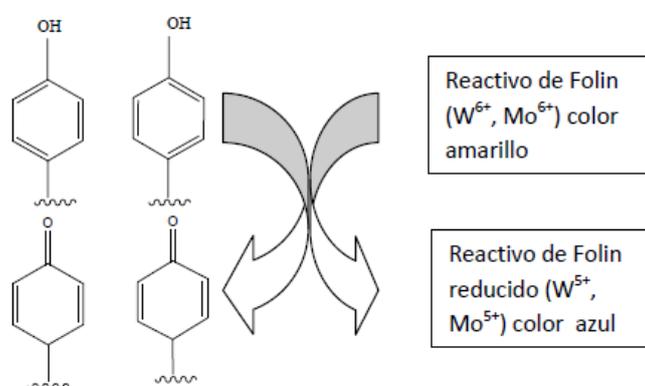


Figura 2. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Figura 3). Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción.

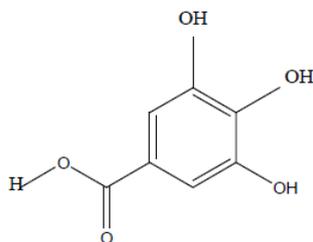


Figura 3. Ácido gálico

También se pueden producir variaciones en el modo de expresar los resultados, sin embargo, el patrón recomendado es el ácido gálico. Este ensayo de análisis de los polifenoles totales, se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta, al tratarse de un parámetro que generalmente, muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante.



4.2 Material y Reactivos

Material e instrumentación

- Espectrofotómetro UV-Visible
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Agita tubos (vortex)
- Matraces aforados de 25 mL y 10 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo con tapón
- Tubos de centrifuga
- Cubetas de plástico de 3 mL para espectrofotometría visible

Reactivos químicos

- Ácido Gálico
- Metanol
- Agua destilada
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato sódico 7,5%
- Fluoruro de sodio

4.3 Procedimiento experimental

Preparación de disoluciones patrón de ácido gálico

En este ejemplo se hará una disolución de ácido gálico de 100 mg/L (disolución concentrada o madre), a partir de esta disolución se prepararán 10 mL de disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 0 y 16 ppm, según se detalla en la tabla 2.

Para ello se procederá de la siguiente manera:

1. Preparar los tubos de ensayo numerados.
2. Añadir a cada tubo la cantidad correspondiente de agua destilada (tabla 2).
3. Añadir a cada tubo la cantidad correspondiente de ácido gálico (tabla 2).
4. Agitar en vortex y mantener en oscuridad y en refrigeración.



Tabla 2. Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 100 mg/L.

Reactivos	Concentración (mg/L) de la curva patrón de ácido gálico								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Ácido gálico (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Agua (mL)	10	9,8	9,6	9,4	9,2	9	8,8	8,6	8,4

Preparación del extracto de polifenoles de la muestra de zumo

Para la extracción de los compuestos fenólicos de la muestra de zumo de naranja se seguirá la metodología propuesta por Tomás-Barberán et al., 2001.

1. En un tubo tomar la cantidad adecuada de muestra de zumo y añadir metanol en relación 1:2.
2. Adicionar NaF 2mM para inactivar la encima polifenol oxidasa y prevenir la degradación de los polifenoles durante el ensayo.
3. Homogeneizar el contenido de los tubos en el vortex y centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 10°C.
4. Recuperar el sobrenadante.

Determinación de polifenoles en la muestra y en los patrones de ácido gálico

1. Tomar 250 μ L de cada disolución patrón de ácido gálico o del sobrenadante procedente de la extracción de los compuestos polifenólicos en la muestra y colocarlos en matraces aforados de 25 mL.
2. Añadir 15 mL de agua destilada y 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu.
3. Homogeneizar el contenido de los matraces y dejar reposar 8 minutos en oscuridad.
4. Transcurrido este tiempo, adicionar a cada matraz 3,75 mL de la disolución de carbonato sódico al 7,5 % y llevar a un volumen de 25 mL con agua destilada.
5. Homogeneizar los matraces y mantener en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Medir la absorbancia a 765 nm.



4.4 Cuantificación e interpretación de los resultados

A partir de los valores de absorbancia obtenidos de cada concentración de ácido gálico se construirá la correspondiente recta de calibrado.

Así, siguiendo con el ejemplo anterior, supongamos que se ha obtenido la recta de calibrado que aparece en la Figura 4.

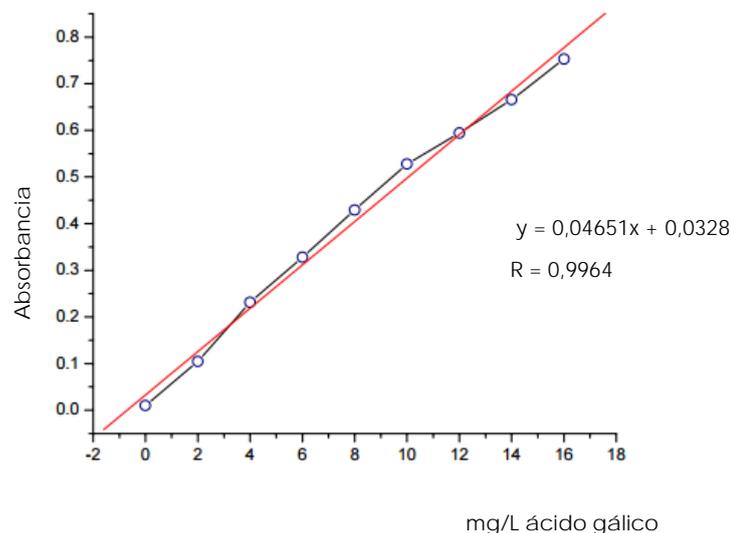


Figura 4. Ejemplo de recta de calibrado de ácido gálico

¿Cómo se pueden cuantificar los polifenoles en la muestra de zumo con los datos de la recta patrón?

Para ello hay que sustituir el valor de la absorbancia obtenida para la muestra de zumo en la ecuación de la recta de calibrado (valor de la ordenada, "y") y despejar "x" que corresponde a la concentración de ácido gálico en el zumo.

Veámoslo con un ejemplo: si hemos obtenido un valor de absorbancia de 0,3 → $x = (0,3 - 0,0328) / 0,04651 = 5,74$ mg/L de ácido gálico en el extracto de zumo.

Para poder expresar los resultados en mg de ácido gálico por 100 mL de zumo, hemos de tener en cuenta la cantidad de disolvente empleado en la extracción y la cantidad de muestra que hemos tomado para realizar el análisis.

Así, en nuestro ejemplo: si se tomaron 5 mL de zumo y se emplearon 10 mL de metanol en la extracción, se procedería de la siguiente manera:

$$\frac{\text{mg ácido gálico}}{100 \text{ mL zumo}} = \frac{5,74 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ mL disolvente}}{5 \text{ mL zumo}} \times 100 = 1,15$$



5 Cierre

En este objeto de aprendizaje se ha descrito el fundamento y el procedimiento experimental del análisis de compuestos polifenólicos empleando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Con ayuda de un ejemplo se ha determinado la concentración de estos compuestos en una muestra de zumo de naranja.

6 Bibliografía

- [1] Andrés-Lacueva, C; Medina-Rejon, A; Llorach, R; Urpi-Sarda, M; Khan, N; Chiva-Blanch, G; Zamora-Ros, R; Rotches-Ribalta, M; Larnuela-Raventós, R. M. (2010). "Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables", en L. A De la Rosa; E. Alvarez-Parrilla; G. A González-Aguilar Eds. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability* (first edition), Blackwell Publishing Iowa, USA.
- [2] Kaur, C. y Kapoor, H. C. (2001). "Antioxidants in fruits and vegetables-The millennium's health". *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 36, nº. 7, pp. 703-725,
- [3] Klein, P. y Kurilich, A. C. (2000). "Processing Effects on Dietary Antioxidants from Plant Foods". *HortScience*, vol. 35, nº4, p.580.
- [4] Pandey, K. B. y Rizvi, S. I. (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease". *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. vol.2, nº5, p.270.
- [5] Tomás-Barberán, FA.; Gil, M.I.; Peadar Cremin, A L.; Waterhouse, B.; Hess-Pierce, L.; Kader. A. (2001). "HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol.49, pp.4748-4760.