

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LEGUMINOSAS

ANA MARÍA MARTÍN¹ y ELDA MARÍA SALMORAL¹

Recibido: 13/11/98

Aceptado: 29/03/99

RESUMEN

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales en semillas de variedades de *Phaseolus vulgaris* provenientes de cultivares de flores coloreadas y blancas obtenidas en el noroeste de la Argentina.

Se encontró que las semillas procedentes de flores coloreadas contienen en sus tegumentos mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (110 – 230) que los tegumentos de semillas provenientes de flores blancas que poseen muy baja concentración (1 – 10). A diferencia de ello el endosperma + embrión de las semillas analizadas presentan un contenido de compuestos fenólicos semejantes en todos los cultivares (50 – 95) expresados como mg de equivalente químico de ácido gálico por cada 100 g de semilla entera.

Palabras clave: Leguminosa, *Phaseolus vulgaris*, compuestos fenólicos.

PHENOLS COMPOUNDS OF LEGUMES BY SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION

SUMMARY

It was determined the total content of phenols compounds in different kinds of *Phaseolus vulgaris* coming from white and colourful flowers crops, obtained in the northwest of Argentina.

It was found that the colourful flowers seeds contain in its teguments the bigger amount of phenols compounds (110 – 230); and the teguments coming from white flowers seeds have a low concentration of these compounds (1 – 10). On the contrary, the endosperm + embryo of all analysed seeds have a similar content of phenols compounds in all the crops (50 – 95), express as mg equivalent gallic acid / 100 g of seeds.

Key words: Legume, *Phaseolus vulgaris*, phenol compounds.

INTRODUCCIÓN

Existen evidencias de la presencia prehistórica del poroto *Phaseolus vulgaris* en Sudamérica y que su domesticación en la Argentina data de aproximadamente 7000 A. C., siendo el noroeste de este país, el lugar geográfico del Centro Andino donde se asienta una gran diversidad genética y se concentra la mayor producción.

Las leguminosas en general son una importante fuente alimenticia por su contenido de proteínas que generalmente supera a los cereales, los hidratos de carbono, así como aceites, vitaminas y minerales. (Boulter, 1978).

Hablar de compuestos fenólicos significa refe-

rirse a sustancias que poseen en común, un anillo aromático con uno ó más hidroxilos y que están presentes en un amplio rango en las plantas con variadas funciones. Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua y muy frecuentemente están combinadas con azúcares formando glicósidos. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales se conocen más de mil estructuras, los flavonoides son el grupo más ampliamente distribuido siguiendo en importancia los fenoles monocíclicos, fenilpropanoides y quinonas fenólicas. (Harbone, 1973).

Para la determinación de compuestos fenólicos totales, la mayoría de los métodos presentes en la

¹Facultad de Ingeniería, Departamento de Química, Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, Universidad de Buenos Aires Av. Paseo Colón 850 (1063) Buenos Aires. E - mail: amartin@fi.uba.ar

bibliografía son espectrofotométricos, y por tanto no cuantifican valores absolutos, sino relativos.

El objetivo de este trabajo fue analizar el contenido de compuestos fenólicos en variedades de cultivares de flores blancas y coloreadas de *Phaseolus vulgaris*. Se realizó un análisis comparativo, entre variedades de cultivares por dos métodos espectro – fotométricos: a) Método de Folin - Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi, 1965. b) Método con el reactivo de Azul de Prusia modificado por Price y Butler, 1977. Se usaron dos métodos colorimétricos en cuanto a su habilidad para cuantificar los compuestos fenólicos totales.

El Método de Azul de Prusia se basa en la reducción del ión férrico a ferroso con la formación del complejo hexacianoferrroso. El Método de Folin modificado utiliza el reactivo fosfomolibdico tungstico que se reduce perdiendo 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno del tungstato y/o molibdato produciendo una o más posibles especies de color azul característico que absorben a un λ_{max} de 760 nm.

Los dos métodos utilizan como reactivos agentes oxidantes que no reaccionan en relación estequiométrica, las diferencias son, presumiblemente, debidas a los potenciales redox relativos de los distintos grupos fenólicos. (Snell – Etre, 1970).

Hay posibilidad de ocultamiento de algunos compuestos fenólicos frente a diferentes reactivos químicos, por los variados pesos moleculares de los taninos, según la especie vegetal y la frecuente formación de complejos con proteínas y otros polímeros (Snell – Etre, 1970). Además, existe afinidad de los taninos condensantes por las proteínas y los carbohidratos la que es atribuida a la variación del pH (Oh y Hoff, 1987). Por ambos métodos se estudió el contenido fenólico de componentes estructurales de las semillas de las leguminosas y se compararon los valores obtenidos entre las diferentes variedades.

En este trabajo se ha considerado la posibilidad de que el reactivo fosfomolibdico tungstico, pudiera actuar con las uniones peptídicas presentes, además de hacerlo con los compuestos fenólicos totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Las semillas fueron obtenidas en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, de la localidad de Cerrillos, Provincia de Salta, ubicada al noroeste de la Argentina, generosamente provistas por los Ingenieros C. Pastrana y S. García Medina, en febrero de 1996. Cultivar: *Phaseolus vulgaris*; variedad blanca (Paloma, Perla, Canela), variedad roja (Coral), variedad matizada (Overito, Paulina) y variedad negra (Cambá, Camilo, Nag 12).

Extracción de compuestos fenólicos. Los tegumentos fueron separados por aflojamiento con vapor y pelado mecánico. De las diferentes variedades se pesó exactamente, alrededor de 0,500 g de tegumento y 1,000 g de endosperma + embrión. Todas las muestras fueron maceradas con 4 mL de MeOH, NaHSO₃ 0,005 M (4:1) durante 24 horas a 4 °C y sometidos a centrifugación (5000 rpm). Se realizaron 3 lavados de los residuos con 2 mL cada uno y reunidos los sobrenadantes se llevaron a 10,00 mL con el mismo solvente.

Solución Patrón. Ácido gálico Sigma (3,4,5-trihydroxibenzoic acid), solución 1 mM en MeOH, NaHSO₃ 0,005 M (4:1).

Método de Azul de Prusia. Reactivos: FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1 M y K₃Fe(CN)₆ 8 mM en HCl 0,1 M. (Price, y Butler, 1977) (Bae, 1993).

Se tomó una alícuota de muestra, se llevó a 2,00 mL con agua destilada, se agregó 0,50 mL de solución de FeCl₃, se mezcló y luego se añadió 0,50 mL de solución de K₃Fe(CN)₆. El color azul desarrollado se estabilizó a 30° C durante 30 minutos y se leyó absorbancias en el espectrofotómetro a 720 nm. Las concentraciones del contenido de compuestos fenólicos totales se determinaron por comparación con los valores de absorbancias para diferentes concentraciones de la solución patrón.

Método de Folin modificado. (Singleton y Rossi, 1965) (Snell - Etre, 1970). Reactivos: solución acuosa de tungstato de sodio, ácido fosfomolibdico y ácido fosfórico (Folin, 1912) y solución acuosa de Na₂CO₃ 10%.

Se tomó una alícuota de muestra, se llevó a 9,00 mL con agua destilada, se agregó 0,50 mL del reactivo de Folin, se mezcló y se dejó reposar 5 minutos. Se añadió 0,50 mL de solución de Na₂CO₃ y se dejó evolucionar el color durante 1 hora a 30° C. Se leyó absorbancias en espectrofotómetro a 760 nm.

Para ambos métodos se realizaron las mediciones para la recta de calibración en las mismas condiciones que para las muestras. Se efectuaron las determinaciones por triplicado. Los resultados se expresaron en términos de mg de equivalente químico de ácido gálico por cada 100 g de semilla entera.

Espectrofotómetro BECKMAN DU - 600

Cuadro N° 1. Contenido de compuestos fenólicos totales en variedades de *Phaseolus vulgaris*

Semilla	Tegumento		Endosperma y Embrión	
	Reactivo Folin	R. Azul de Prusia	Reactivo Folin	R. Azul de Prusia
Blanca				
Paloma	4,6	1,8	50,7	63,2
Perla	5,4	2,8	51,2	77,1
Canela	7,3	3,8	64,1	76,2
Roja				
Coral	148,8	125,6	63,7	71,6
Matizada				
Overito	143,8	128,5	57,6	84,0
Paulina	127,1	111,6	66,7	83,8
Negra				
Cambá	167,3	158,1	59,4	72,5
Camilo	206,2	210,8	60,3	77,4
Nag 12	223,0	229,1	57,7	93,5

Expresado como mg de equivalente químico de ácido gálico por cada 100 g de semilla entera.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del contenido de compuestos fenólicos totales. Las rectas de calibración para ambos métodos, se realizaron como curvas de regresión (Miller, 1993) Figuras 1 y 2.

Por los dos métodos empleados se presentan, en el cuadro N° 1, los valores de contenido de compuestos fenólicos totales para tegumento y para endosperma + embrión, expresados en mg de equivalente químico de ácido gálico por cada 100 g de semilla entera.

En tegumento de las variedades de semillas

rojas, como matizadas y negras el contenido de compuestos fenólicos totales oscila entre 120 a 225, según el Método de Folin modificado, con un error relativo de 2,5%; y 110 a 230 según el Método de Azul de Prusia modificado, con un error relativo del 4%.

Por otro lado las variedades de semillas blancas presentan en sus tegumentos valores que oscilan entre 4,5 a 7,5 y 1,5 a 4,0, por cada método respectivamente.

Los resultados correspondientes a endosperma + embrión presentan valores semejantes de contenido de compuestos fenólicos en todos los cultivares,

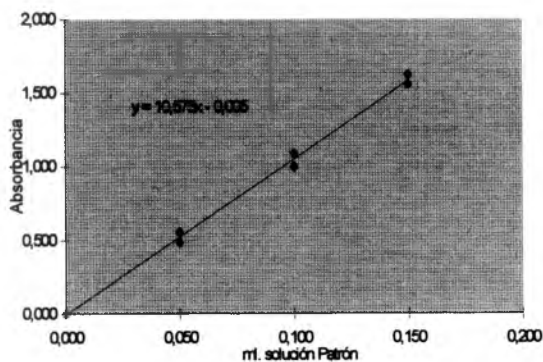


Figura 1. curva de calibración para el Método de Azul de Prusia Modificado

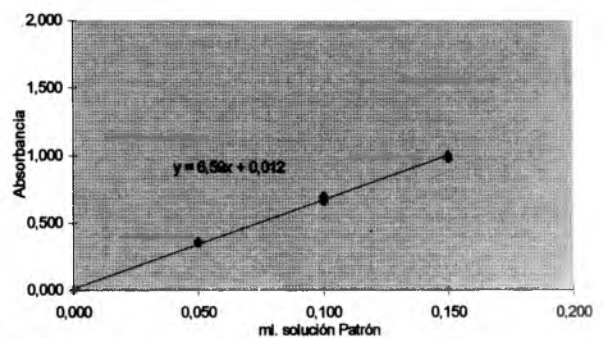


Figura 2. curva de calibración para el Método de Folin Modificado

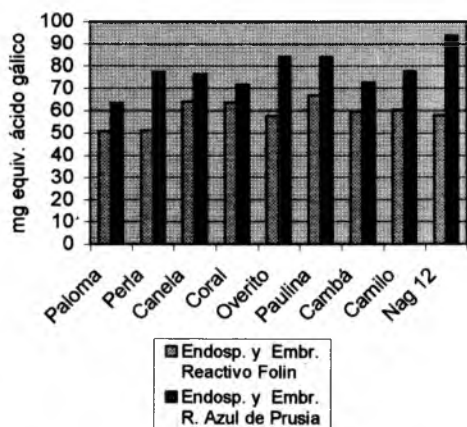


Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos en endosperma y embrión

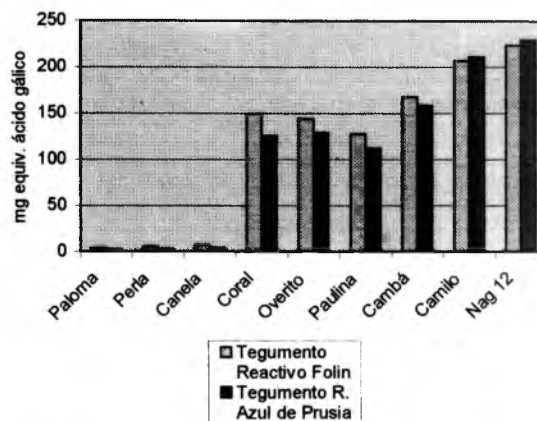


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos en tegumento

50 a 70 con el reactivo de Folin y 60 a 95 con el reactivo hexacianoférrico.

En todos los casos, se observa correlación entre los dos métodos, que se pone de manifiesto en las Figuras 3 y 4.

Se comprobó que después del proceso extractivo, la dilución del extracto conducente a obtener el volumen adecuado del ensayo colorimétrico, debía ser realizado preferentemente con agua destilada, pues se ha detectado variaciones en las absorbancias cuando se utilizaron otros solventes como: metanol - NaHSO₃ 0,005 M; etanol - NaHSO₃ 0,005 M; metanol o etanol puros.

Se logró evitar los procesos de oxidación enzimática por el agregado de NaHSO₃ en la etapa de extracción.

CONCLUSIONES

Se concluye que las semillas procedentes de flores coloreadas cargan en sus tegumentos el pre-

dominio de compuestos fenólicos: 110 a 230 mg de equivalente químico de ácido gálico / 100 g de semilla; valor que disminuye considerablemente en las semillas provenientes de flores blancas: 1 a 10 y el endosperma + embrión presenta un contenido: 50 a 95 en todos los cultivares.

Los resultados no difieren significativamente por los dos métodos empleados, lo cual indica que no hay ocultamiento de algunos compuestos fenólicos frente a diferentes reactivos químicos para las variedades estudiadas de *Phaseolus vulgaris*.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Investigación y Doctorado de la Facultad de Ingeniería. UBA.

A la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Cerrillos, Salta.

BIBLIOGRAFÍA

- BAE, H. D.; T. A. MC ALLISTER; A. D. MUIR; L. J. JAUKE; K. A. BASSENDOWSKI and K. J. CHENG, 1993, Selection of a method of condensed tannin analysis for studies with Rumen Bacteria. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1256 - 1260.

- BOULTER, D.** 1978, *Advances in Legume Science*. Ed. R. Sumerfield y A. Bunting. Royal Bot. Gardens, K. Richmond, Sunney, England.
- FOLIN, O. and W. DENIS,** 1912, On phosphotungstic – phosphomolybdic compounds as colour reagents, *Journal Biological Chemistry*. 12, 239.
- HARBONE, J. B.** 1973, *Phytochemical Methods*. Capítulo 2. Ed. Chapman and Hall London.
- MILLER, J. C. y J. N. MILLER,** 1993, Errores en análisis instrumental; regresión y correlación. Estadística para Química Analítica. 2º Edición. Addison – Wesley. Iberoamericana.
- OH, H. and J. E. HOFF,** 1987, pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. *Journal Food Sciences*. 52, 1267 - 1269
- PRICE, M. L. and L. G. BUTLER,** 1977. Rapid visual estimation and spectrofotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 25, 1268 – 1273.
- SNELL – ETRE** 1970, Analysis of green tea leaf. *Encyclopedia Industry Chemistry Analysis*. 10, 456 – 476.
- SINGLETON, V. L. and J. A. ROSSI,** 1965, A colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture* 16, 144 – 158.