

Determinación de Fenoles Totales en Extractos de Cáscara de Tuna (*Opuntia ficus-indica* (L) miller) y Cáscara de Xoconostle (*Opuntia matudae*)

Ariadne García Marcial ¹, Raquel García-Barrientos ² y Hugo Minor Pérez¹



Acerca de los autores...

¹ División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

² Universidad Politécnica de Tlaxcala.

Resumen

Los fenoles son compuestos aromáticos, entre los cuales se encuentran los derivados del ácido gálico (taninos) y los flavonoides. Algunos fenoles contribuyen a la pigmentación de muchas partes de las plantas (antocianos) y actúan como fitoalexinas. Además, varias moléculas de los fenoles poseen una estructura química que les permite tener actividad antioxidante. Estos compuestos tienen uno o más grupos hidróxilo (OH) unidos directamente al anillo aromático, lo cual permite que sean solubles en ciertos compuestos polares orgánicos e inorgánicos. El agua, metanol y etanol son algunos de los solventes utilizados para la extracción de fenoles totales de muestras de vegetales. En este estudio se analizaron los extractos de la cáscara de tuna verde y roja (*Opuntia ficus-indica* (L) miller) y los extractos de la cáscara de xoconostle (*Opuntia matudae*) para determinar los fenoles totales como equivalentes de ácido gálico, por lo que se empleó un método de oxidación-reducción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que la mayor concentración de Fenoles totales (FT) se observó en los extractos etanólicos (EE) para los tratamientos analizados. En los extractos acuosos (EA) se obtuvo la segunda mayor concentración de FT y por último los extractos etanólicos tuvieron los valores menores. Las concentraciones de FT fueron aproximadamente de 100 µg de ácido gálico/mL a 650 µg de ácido gálico/mL en los tratamientos evaluados. Las cáscaras de tuna o xoconostle pueden ser una fuente de antioxidantes naturales para el diseño de alimentos funcionales como las emulsiones.

Palabras clave: fenoles, flavonoides, tuna ácida, tuna dulce, fitoalexinas.



Abstrac

Phenols are aromatic compounds, among which are the derivatives of gallic acid (tannins) and flavonoids. Phenols contribute to the pigmentation of many parts of plants (anthocyanins) and act as phytoalexins. Some molecules of phenols have a chemical structure that allows them to have antioxidant activity. These compounds have one or more hydroxyl groups (OH) attached directly to the aromatic ring which allows them to be soluble in certain polar organic and inorganic compounds. Water, methanol and ethanol are some of the solvents used for the extraction of total phenols from vegetable samples. In this study extracts of prickly pear cactus peel (*Opuntia ficus-indica* (L) miller). Were studied green and red fruits. Also, the extracts of the xoconostle peel (*Opuntia matudae*) were analyzed to determine the total phenols as gallic acid equivalents, so that an oxido-reduction method was used with the Folin-Ciocalteu reagent. The results showed the highest concentration of total phenols (TP) were observed in the ethanolic extracts (EE) for the three samples analyzed with ofprickly pear cactus or xoconostle peel. The aqueous extracts (AE) had the second highest concentration of TP and finally the methanolic extracts (EE) had the lowest values of TP. Values were obtained between 100 µg of gallic acid/mL and 650 µg of gallic acid/mL in the treatments. The peels ofprickly pear cactus or xoconostle can be a source of natural antioxidants for the design of functional foods such as emulsions.

Key words: phenols, flavonoids, prickly pear cactus, peel, phytoalexins

Introducción

La familia de las Cactaceae se encuentra constituida por alrededor de 2,000 especies, siendo México el principal centro de diversidad de la familia, con aproximadamente 850. Muchas especies tienen importancia económica, entre las que destacan algunas pertenecientes a los géneros *Opuntia*, *Hylocereus* y *Selenicereus* (Ochoa y Guerrero, 2010).

Una de las especies más conocidas es la *Opuntia ficus indica*, también denominada como tuna o higo de la india. Esta familia es nativa del continente Americano, y se pueden encontrar desde el sur de Canadá hasta el sur de Argentina. Los frutos de *Opuntia ficus indica* (L) miller (tuna) son de color verde, amarillo, rojo o morado con abundante pulpa carnosa; son frutas ovaladas de 5 a 10 cm de largo por 4 a 8 cm de diámetro y tienen un sabor dulce (Ochoa y Guerrero, 2010).

Otra familia de cactáceas es la *Opuntia joconostle*, la cual crece en las zonas secas de México; su fruto es el xoconostle, su piel es suave y comestible, pero a diferencia de la tuna, tiene un sabor agrio, de ahí su nombre (xococ “agrio” en náhuatl). Recientes estudios han demostrado que la tuna, al igual que el xoconostle, contiene altas concentraciones de compuestos antioxidantes tales como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos y pigmentos betalainicos (Chougui y col. 2015; Morales y col. 2012; Guzmán-Maldonado y col. 2010; Ochoa y Guerrero, 2010).

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 biológicos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Esta actividad biológica de los polifenoles está relacionada también con su carácter antioxidante (Porras y López, 2009).

La cantidad y tipos de compuestos polifenólicos presentes en un alimento varían en función de la especie, variedad y parte (fruto, semillas, brotes, hojas entre otros) del vegetal considerado, así como las horas de exposición solar, grado de madurez,

condiciones de cultivo, procesado y condiciones de almacenamiento (Porras y López, 2009).

Otras de las propiedades de los compuestos polifenólicos están relacionadas con la calidad de los alimentos, debido a 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, tunas, etcétera; 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; el eugenol caracteriza el intenso aroma de los plántanos, o los taninos que confieren la astringencia a algunas frutas (Porras y López, 2009).

La mayoría de productos naturales aromáticos provenientes de las plantas y vegetales son fenoles, compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Entre los principales compuestos fenólicos naturales se encuentran:

1. Los derivados del ácido gálico (taninos: condensados e hidrolizables).
2. Los flavonoides (catequinas, leucoantocianinas, flavanonas, flavanonoles, flavonas, antocianinas, flavonoles, chalconas, dihidrochalconas, auronas, isoflavonas). (Toapanta, 2011).

En este estudio se utilizó un método de oxido-reducción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este proceso utiliza como medida el contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Como se mencionó, 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 las muestras de tuna o xoconostle, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría con base en una curva patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede tener numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García y col. 2010).

El objetivo de este estudio es evaluar el contenido de fenoles totales en extractos metanólicos (EM), etanólicos (EE) y acuosos (EA) en muestras de cáscaras de tuna verde y roja, así como en el xoconostle. Se realizó una comparación estadística (ANOVA y prueba de Duncan) entre las diferentes concentraciones de las muestras, el tipo de cáscara y el solvente utilizado para la extracción de los FT.

Metodología

**Preparación de las cáscaras de tuna y xoconostle*

Se pesaron las muestras de tuna y xoconostle y se realizó la desinfección por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (5%, v/v) durante 30s. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 horas para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Posteriormente, se separó la cáscara de las muestras con un cuchillo estéril. Una vez obtenidas las muestras, se secaron a una temperatura de 40°C/48 horas en un horno de charolas (Felisa FE-294AD, México) y se molieron en una licuadora convencional durante 5 minutos. Luego se tamizaron, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.42 mm. Las harinas se guardaron en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a -20°C hasta su uso.



**Determinación de fenoles totales en tuna y xoconostle*

Se pesaron muestras de cáscara de tuna verde, tuna roja y de xoconostle de 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g y 0.05g en tubos de polietileno. A cada muestra se le agregó 500 μ L de metanol, etanol o agua y se agitaron en un vortex (Labnet, EUA) a 350 rpm durante 10s. Para la determinación de fenoles totales se utilizó una modificación de la técnica reportada por Zeng y Wang (2001) y Kraujalyte y col. (2013). Se tomó un volumen de 100 μ L de los extractos y se le adicionó un volumen de 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (J.T. Baker). Después se agregaron 400 μ L de una solución de carbonato de sodio al 7.5%(p/v, J.T. Baker). Los tratamientos se sumergieron en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller, Cole-Parmer, EUA) a 30°C durante 1.5 horas y se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Las muestras con valores >1.0 se diluyeron con metanol, etanol o agua. Se realizó una curva patrón utilizando ácido gálico a diferentes concentraciones para los tratamientos con metanol, etanol y agua. Los resultados se sometieron a una ANOVA y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA.

Resultados y Discusión

El análisis estadístico (Tablas 1 y 2) muestra que los resultados experimentales se ajustaron a un modelo lineal, para el efecto de las variables fijas; solvente (metanol, etanol y agua), tipo de cáscara (tuna verde, tuna roja o xoconostle) y concentración de cáscara (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 g/mL) sobre la variable respuesta (Fenoles totales, μ g de ácido gálico/mL). El modelo describe la influencia de los factores investigados en forma independiente: solvente (A), tipo (B) y concentración de la cáscara (C), y el efecto de las interacciones (A*B, A*C, B*C y A*B*C). Se observó un efecto altamente significativo ($P<0.0001$) del solvente (A), tipo de cáscara (B) y concentración de la cáscara (C) en los tratamientos evaluados, así como en todas las interacciones de estudio. El coeficiente de determinación para el modelo lineal propuesto indica que sólo 1.13% de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por el modelo desarrollado. Los valores F_0 para los parámetros del modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 2). En las condiciones experimentales y considerando los valores de P_r y las F_0 se observó que los parámetros que tuvieron un mayor efecto significativo sobre la variable respuesta (FT) fueron, en primer lugar, la concentración de cáscara de las muestras. La mayor cantidad de FT se encontró en la concentración de 0.05 g/mL. Posteriormente, el segundo parámetro con mayor

significancia fue el tipo de solvente y finalmente el tipo de muestra (tuna verde, tuna roja o xoconostle). Esto significa que los cambios en la variable C (concentración de cáscara) tiene un efecto mayor sobre los FT. Este comportamiento puede ser explicado debido a la relación lineal entre los FT y la concentración de cáscara evaluada. Algunos estudios (Pokorny y col. 2001; Rappoport, 2003) mencionan en relación a los mecanismos de la actividad antioxidante una correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad de captura de radicales libres. Este fenómeno permite sugerir la aplicación de las cáscaras de las muestras estudiadas en el control de la oxidación de los lípidos en alimentos. Las Figuras 1, 2 y 3 muestran las concentraciones de FT en las muestras de tuna verde, tuna roja o xoconostle. Las mayores concentraciones de FT se observaron a las concentraciones de 0.04 g/mL y 0.05 g/mL. El análisis con la prueba de Duncan muestra que la cáscara de tuna verde tiene el más alto valor de FT y presenta una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a las muestras de xoconostle y tuna roja.

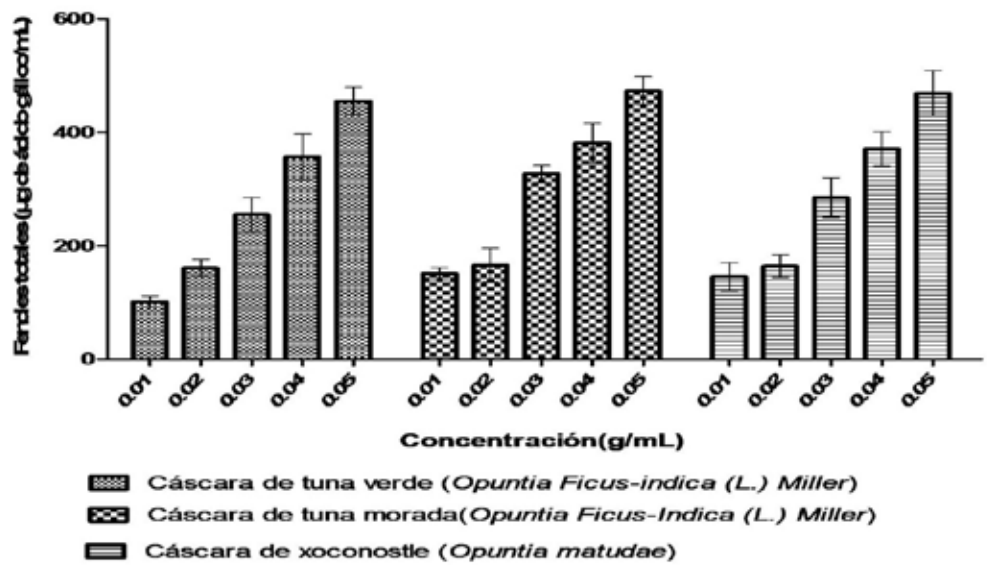


Figura 1

Determinación de Fenoles totales en EE de cáscara de tuna verde, roja o xoconostle.

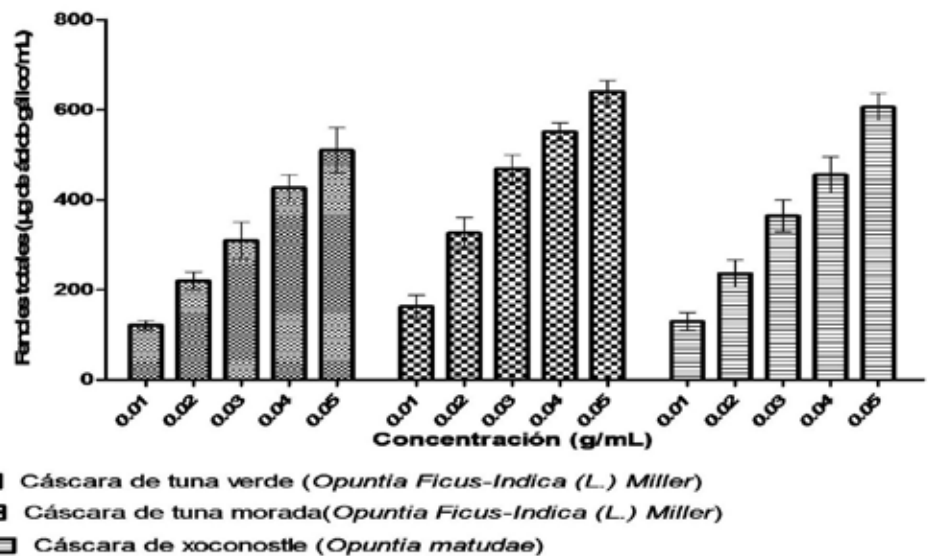


Figura 2

Determinación de Fenoles totales en EM extractos de cascara de tuna verde, roja o xoconostle.

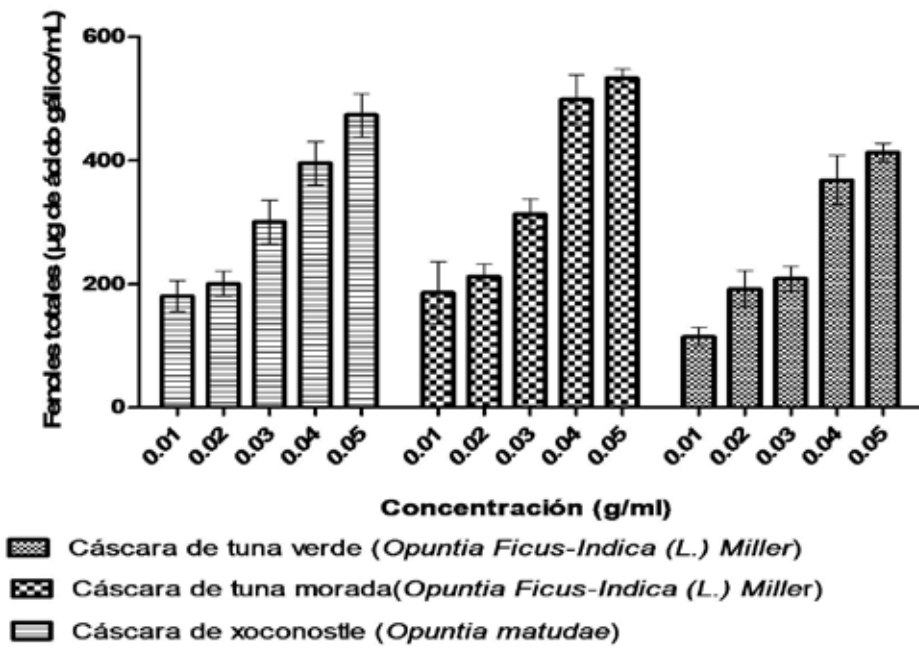


Figura 3

Determinación de Fenoles totales en EA de cáscara de tuna verde, roja o xoconostle.

Tabla 1

ANOVA para el efecto de las variables: solvente (metanol, etanol o agua), cáscara (tuna verde, tuna roja o xoconostle) y la concentración de cáscara (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 g/mL) sobre la respuesta (Fenoles totales, µg de ácido gálico/mL)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	44	2029439.830	46123.632	89.49	0.0001
Error	45	23193.96	515.421		
Total	89	2052633.791			
R-Square = 0.9887					

*Los valores de "Prob>F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos.

Tabla 2

ANOVA para el efecto de las variables fijas: solvente, tipo y concentración de cáscara sobre la variable respuesta (Fenoles totales, μg de ácido gálico/mL)

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
A-Solvente (metanol, etanol o agua).	102.76	0.0001
B- Tipo de cáscara (tuna verde, roja o xoconostle)	86.73	0.0001
C-Concentración de la cáscara.	838.59	0.0001
A*B	8.57	0.0001
A*C	7.83	0.0001
B*C	6.86	0.0001
A*B*C	3.27	0.0009

*Los valores de Pr >F menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos.

Tabla 3

Prueba de Duncan para la comparación del efecto de las variables fijas: solvente, tipo y concentración de cáscara.

Variable fija	Variable respuesta Fenoles totales (μg de ácido gálico/mL)	Prueba de Duncan ¹
Solvente	Promedio	
Etanol	362.291	A
Agua	314.223	B
Metanol	278.561	C
Tipo de cáscara		
Tuna verde	361.256	A
Xoconostle	307.394	B
Tuna roja	286.425	C
Concentración de cáscara (g/mL)		
0.05	520.460	A
0.04	417.942	B
0.03	307.875	C
0.02	210.043	D
0.01	135.473	E

¹Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

Conclusión

En las condiciones experimentales evaluadas se determinó la concentración de fenoles totales en muestras de cáscara de tuna verde, tuna roja o xoconostle. Todas las muestras tienen fenoles que pueden ser empleados en el control de la oxidación de lípidos en alimentos. El parámetro con mayor efecto significativo sobre la variable respuesta (FT) fue la concentración de cáscara. La muestra de cáscara de tuna verde fue la que tuvo un valor mayor de FT, posteriormente fue la muestra de xoconostle y por último la tuna roja.

Referencias

- Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., & Larbat, R. (2015). Physicochemical properties and storage stability of margarine containing. USA: Elsevier.
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2010). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Noviembre 17, 2017, de ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia, Sitio web: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- Guzmán-Maldonado, S.H., Morales-Montelongo, A.L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F. y Reynoso-Camacho, R. (2010). "Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from central-México region". *Journal of Food Science*.
- Kraujalyte, V., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Cėsonienė, L. y Daubaras, R. "Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes". *Food Chemistry*. 188 (2015): 583-590
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., Sánchez-Mata, M., Carvalho, A.M., & Ferreira I. C.F. R. "Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntiamatudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico". *Food Research International*, 46 (2012), 279-285.
- Ochoa, V.C., & Guerrero, B.A. (2010). La Tuna: Una perspectiva de su producción, propiedades y métodos de conservación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 1, pág. 49-63.
- "*Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant". *Food Chemistry*, 173, 382:390
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (2001). Antioxidantes de los alimentos. Zaragoza, España: Acribia, pp. 141-148, 269.
- Porras, L.A., & López, M.A. (2009). "Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos". *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Vol. 1, pág. 121-134.
- Rappoport, Z. (2003). The chemistry of phenols. Part 1. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Toapanta, P. (2011). Fenoles naturales. Noviembre 17, 2017, de Universidad Central Del Ecuador, Sitio web: https://qorganicauce.wikispaces.com/file/view/Fenoles+Naturales_Trabajo1_Toapanta+Paola.pdf