



Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha
ISSN: 1665-0204
rbaez@ciad.mx
Asociación Iberoamericana de Tecnología
Postcosecha, S.C.
México

Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu

Cortez, Juan D.; Faicán, María A.; Pirovani, María E.; Piagentini, Andrea M.

Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu

Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 19, núm. 2, 2018

Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C., México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541002>

Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu

Determination of polyphenols in fruits added with vitamin C: methodology to improve the specificity of the Folin-Ciocalteu test

Juan D. Cortez¹
Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541002>

María A. Faicán²
Universidad Nacional del Litoral, Argentina
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
Argentina

María E. Pirovani³
Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Andrea M. Piagentini⁴
Universidad Nacional del Litoral, Argentina
ampiagen@fiq.unl.edu.ar

Recepción: 19 Septiembre 2018

Aprobación: 24 Octubre 2018

Publicación: 10 Diciembre 2018

RESUMEN:

El método más usado para la cuantificación de fenoles totales en alimentos es Folin-Ciocalteu (F-C) por ser simple y rápido, sin embargo, puede presentar inconsistencias debido a compuestos interferentes, entre los cuales están el ácido ascórbico (AA) y enediolos como el ácido dehidroascórbico (DHA). El reactivo de F-C reacciona con fenoles formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos que a pH básico se reducen formando óxidos cromógenos de color azul. La vitamina C (AA + DHA), en condiciones ácidas reacciona rápidamente con el polifosfotungstato, dando color azul antes de la adición del álcali, por tanto, la medición espectrofotométrica mide la absorbancia de todos los compuestos azules formados tanto provenientes de la reacción con los fenoles como los formados por reacción de AA y DHA. Se propone una metodología para mejorar la especificidad del ensayo de F-C en la determinación de fenoles totales por sustracción de la actividad reductora de la vitamina C y aplicar dicha metodología para determinación de fenoles totales en manzanas impregnadas bajo vacío (IV) con alto contenido de vitamina C. Se combinaron metodologías espectrofotométricas y cromatográficas (HPLC) para obtener una ecuación general para la determinación del contenido de fenoles totales corregido por la interferencia de vitamina C. La sobrevaloración del contenido de fenoles totales por F-C por interferencia de vitamina C en manzanas tratadas por IV representó entre el 4,9 al 44,6%, para muestras con un contenido de vitamina C entre 6,5 a 608,4 mg Kg⁻¹, obteniéndose los mayores valores de sobrevaloración en las

NOTAS DE AUTOR

- 1 Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina
- 2 Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina. ampiagen@fiq.unl.edu.ar
- 3 Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina
- 4 Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina

muestras con mayor contenido en vitamina C. La metodología propuesta para mejorar la especificidad de F-C sirve como base para su aplicación en la determinación de fenoles totales en diferentes matrices vegetales con diferentes contenidos de ácido ascórbico. **PALABRAS CLAVE:** Fenoles totales, ácido ascórbico, determinación, interferencia.

ABSTRACT:

The most used method for the quantification of total phenols in foods is Folin-Ciocalteu (FC) because it is simple and fast, however it can present inconsistencies due to interfering compounds, among which are ascorbic acid (AA) and ene-diols as dehydroascorbic acid (DHA). The reagent of F-C reacts with phenols forming phosphomolybdic-phosphotungstic complexes that at basic pH are reduced, forming chromogenic oxides of blue color. Vitamin C (AA + DHA), under acidic conditions, reacts rapidly with the polyphosphotungstate, giving a blue color before the addition of alkali, therefore, the spectrophotometric measurement measures the absorbance of all the blue compounds formed both from the reaction with the phenols as those formed by reaction of AA and DHA. A methodology is proposed to improve the specificity of the F-C assay in the determination of total phenols by subtracting the reducing activity of vitamin C and apply this methodology for the determination of total phenols in apples impregnated under vacuum (VI) with high vitamin content. C. Spectrophotometric and chromatographic methodologies (HPLC) were combined to obtain a general equation for the determination of the total phenol content corrected for the interference of vitamin C. The overestimation of the content of total phenols by F-C by interference of vitamin C in apples treated by VI represented 4,9-44,65%, for samples with a vitamin C content between 6.5-608.4 mg Kg⁻¹, obtaining the highest values of overestimation in the samples with the highest vitamin C content. The methodology proposed to improve the specificity of F-C serves as a basis for its application in the determination of phenols to different plant matrices with different ascorbic acid contents.

KEYWORDS: Total phenols, ascorbic acid, determination, interference.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos constituyen la mayor fuente de antioxidantes en frutas y hortalizas, siendo su cuantificación una práctica común al momento de seleccionar genotipos, etapas de maduración, condiciones de almacenamiento y de procesamiento, con el objetivo de obtener alimentos frescos y procesados con alto potencial de protección contra radicales libres (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Por ejemplo, la presencia de estos compuestos fitoquímicos en manzanas ha mostrado beneficios importantes sobre la salud, es así que se le han atribuido propiedades como capacidad antioxidante y acción anti-proliferativa de células anticancerígenas, además de prevenir enfermedades crónicas en humanos (Boyer y Rui, 2004).

El ensayo de Folin-Ciocalteu nos da una buena estimación del contenido de fenoles totales para la mayoría de matrices vegetales. Se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) contiene sales de molibdeno y tungsteno que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotungstico. La transferencia de electrones a pH básico transforma (reduce) los complejos fosfomolibdico-fosfotungsticos en óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃) siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La coloración azul se puede determinar espectrofotométricamente a 760nm (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Asami *et al.*, 2003; Vrhovsek *et al.*, 2004) (Figura 1)

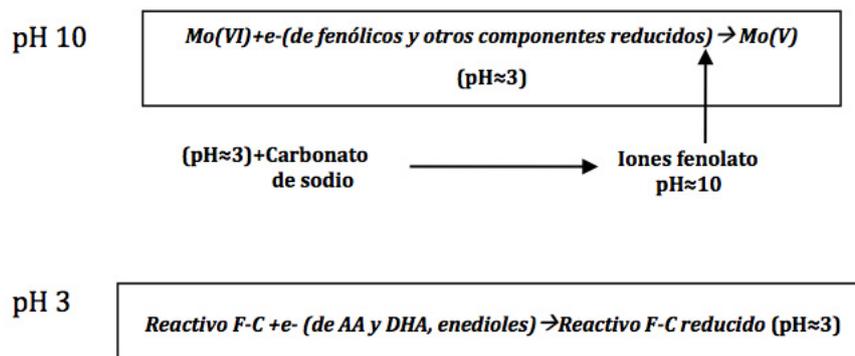


FIGURA 1

Efecto del pH en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu

Sin embargo este método experimenta interferencias debido a la presencia de diferentes sustancias (particularmente azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico y otros enedíoles y reductoras, y hierro (II)) por lo tanto se debería realizar una corrección que considere las sustancias interferentes, con la finalidad de obtener exclusivamente la concentración de fenoles totales (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Escarpa y González, 2001; Prior *et al.*, 2005; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013; Singleton y Rossi, 1965).

El ácido ascórbico (AA), el ácido dehidroascórbico (DHA) y los azúcares reductores (glucosa y fructosa) tienen el mayor impacto en obstaculizar la precisión del ensayo especialmente en frutas y hortalizas mínimamente procesadas donde se incorpora ácido ascórbico como agente antioxidante.

Se han desarrollado algunos factores de corrección por interferencia de AA y DHA (vitamina C) utilizando ensayos específicos para esta vitamina y métodos de extracción que eliminan la mayoría de la vitamina C (Prior *et al.*, 2005). En ese sentido se han propuesto diferentes metodologías para mejorar la especificidad del ensayo de F-C, dentro de los cuales se encuentra el cálculo de la corrección del valor de fenoles totales sustrayendo la actividad reductora del ácido ascórbico (AA) (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

Exponiendo el reactivo F-C a condiciones ácidas (pH ≈ 3), el AA y DHA reaccionan rápidamente con el polifosfotungstato, dando un color azul justo después de mezclar la muestra con el reactivo. La observación de color azul antes de la adición del álcali indica la presencia de AA, DHA u otros compuestos reductores que no requieren la forma de fenolato para reducir el reactivo F-C (Figura 1).

El DHA es el primer producto de oxidación de AA y está naturalmente presente en frutas y hortalizas, especialmente en aquellas donde la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) es alta se utiliza AA como agente para reducir las quinonas. El DHA es un enediol y por lo tanto también produce color azul en condiciones ácidas durante la reacción de F-C (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

La presencia de AA es generalmente un problema al determinar el contenido de fenoles totales de frutas tales como naranja, kiwi y frutilla, que tienen concentraciones significativas de vitamina C (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Este inconveniente también se presenta en todos aquellos productos, como las frutas mínimamente procesadas, en que se incorpora AA como agente antioxidante.

El contenido promedio de vitamina C en manzanas es de alrededor de 46 mg Kg-1 (Ainsworth y Gillespie, 2007), y la incorporación de vitamina C en manzanas mínimamente procesadas mediante tratamientos de impregnación por vacío puede generar un incremento de este valor, alcanzando por ejemplo valores de hasta 645 mg Kg-1, de ahí la necesidad de definir una metodología que mejore la especificidad del ensayo de F-C para este tipo de productos.

OBJETIVOS

Se propone desarrollar una metodología para mejorar la especificidad del ensayo de F-C en la determinación de fenoles totales por sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico.

Aplicar dicha metodología para determinación de fenoles totales en manzanas mínimamente procesadas impregnadas bajo vacío con alto contenido de vitamina C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Corrección del contenido de fenoles totales por sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico

La metodología propuesta para determinar el contenido de fenoles totales de una muestra sin interferencia del ácido ascórbico se presenta en la Figura 2.

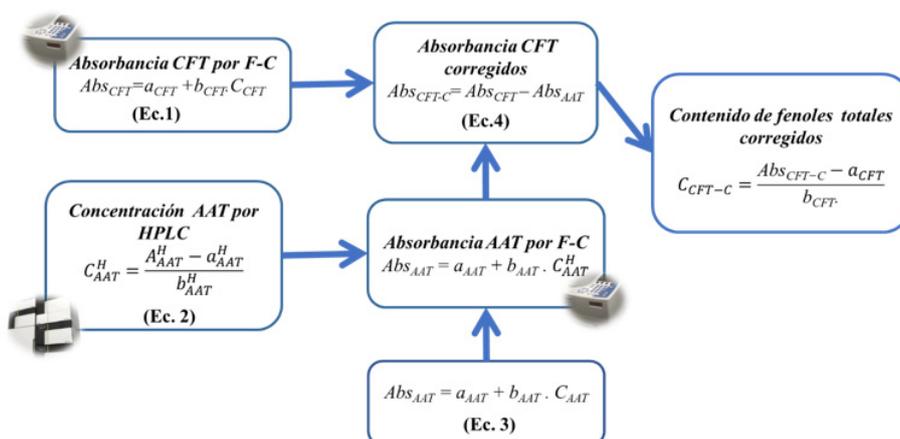


FIGURA 2

Esquema para corrección del contenido de fenoles totales por sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico

Para llevar a cabo dicha metodología es necesario determinar experimentalmente:

- Abs_{CFT} : Absorbancia correspondiente a la muestra por ensayo de F-C (Ec. 1, Figura 2)
- C_{AAT}^H : Concentración de ácido ascórbico total de la muestra determinado por HPLC (mg AAT L⁻¹, Ec. 2, Figura 2)

A continuación, con el valor de C_{AAT}^H y la ecuación 3 (Figura 2) se determina el valor de Abs_{AAT} . Luego se realiza la corrección correspondiente a la actividad reductora del ácido ascórbico realizando la diferencia entre las absorbancias (Ec. 4, Figura 2); donde Abs_{CFT-C} = absorbancia corregida por la actividad reductora del ácido ascórbico.

Con este valor obtenido de Abs_{CFT-C} y la ecuación 1, se determina el contenido de fenoles totales corregidos por la actividad reductora del ácido ascórbico (C_{CFT-C}) en mg de AGE L⁻¹. Con las ecuaciones 1, 2, 3 y 4 (Figura 2), se obtiene una ecuación general (Ec. 5):

$$C^*_{CFT-c} (mg\ AGE\ Kg^{-1}_{fruta}) = \left[\frac{\left(\left(Abs_{CFT} - \left(a_{AAT} + b_{AAT} \left(\frac{A^H_{AAT} - a^H_{AAT}}{b^H_{AAT}} \right) \right) \cdot \frac{1}{d} \cdot \frac{V_{eHPLC}}{m_{fHPLC}} \right) \cdot \frac{m_{fCFT}}{V_{eCFT}} \right) - a_{CFT}}{b_{CFT}} \right] \cdot \frac{V_{eCFT}}{m_{fCFT}} \quad (Ec. 5)$$

Donde:

C^*_{CFC-C} = contenido de fenoles totales corregidos [mg AGE Kg⁻¹]

Abs_{CFT} = Absorbancia de la muestra por F-C

a_{AAT} = ordenada al origen de la curva de calibrado para el contenido de ácido ascórbico total por F-C

b_{AAT} = pendiente de la curva de calibrado para el contenido de ácido ascórbico total por F-C.

A^H_{AAT} = Área de ácido ascórbico total obtenida del análisis por HPLC.

a^H_{AAT} = Ordenada al origen de la curva de calibrado para ácido ascórbico total por HPLC

b^H_{AAT} = Pendiente de la curva de calibrado para ácido ascórbico total por HPLC

d = Dilución realizada por el método de HPLC (Extracto: Fase Móvil)

V_{eHPLC} = Volumen de solución extractante usada para determinación de AAT por método HPLC

m_{fHPLC} = masa de muestra usada para determinación de AAT por método HPLC

m_{fCFT} = masa de muestra usada para determinación por método F-C

V_{eCFT} = volumen de solución extractante para determinación de CFT por método F-C

a_{CFT} = ordenada al origen de la curva de calibrado para el contenido de fenoles totales por F-C

b_{CFT} = pendiente de la curva de calibrado para el contenido de fenoles totales por F-C.

Curva de calibrado para la determinación del contenido de fenoles totales (CFT) por el método de F-C

Se preparó una solución madre de ácido gálico (AG) de 100 mg L⁻¹, a partir de esta se prepararon soluciones estándar con concentraciones de 20-80 ppm, se tomaron alícuotas de 250 µL de cada una de las soluciones en tubos falcon y se adicionaron 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), 1500 µL de agua destilada (V1) + 500 µL de Na₂CO₃ al 10% + 2500 µL agua destilada (V2). Se agitaron los tubos en un Vortex V-1 plus BOECO, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min y se dejaron reposar en la oscuridad por 15 min. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS a 760 nm, obteniéndose por regresión lineal la curva de calibrado de absorbancia (Abs_{CFT}) vs concentración de ácido gálico, C_{CFT} [mg AG L⁻¹] (Ec. 1, Figura 2)

Curva de calibrado de ácido ascórbico total (AAT) por HPLC

Se realizó con un cromatógrafo Líquido (HPLC) SHIMADZU serie LC-20A equipado con una columna de fase reversa Gemini 5µ C18 110A de 250 x 4,6 mm, unida a un guarda columna Phenomenex (Phenomenex Inc., CA, USA) y un detector SPD-M20A, jeringa de 100 µL con punta roma, especial para HPLC (Van de Velde *et al.*, 2011).

Se preparó una solución de ácido ascórbico 4 g L⁻¹ a partir de AA, previamente secado durante 1 hr en estufa a 105 °C, disuelto en solución extractante (SE: ácido metafosfórico 30g L⁻¹ + ácido acético 80 g L⁻¹). Se tomó 0,5 mL de esta solución y se diluyó en 10 mL con SE, se tomó 4 mL de esta mezcla y se completó a 10 mL con fase móvil (FM: solución buffer 0,03 M de acetato de sodio/ácido acético pH= 5,8 (95%), metanol (5%)), previamente filtrada con filtros de nylon de 0,45 µm. Posteriormente se agregó 1,3 mL de solución de DL-

ditiotreitól (DTT: 5 g L⁻¹, preparado en fosfato de potasio dibásico, K₂HPO₄ 2,58 M), y se dejó reaccionar por 2 hrs en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se diluyó esta solución con 10 mL de FM.

A partir de esta solución se realizaron las diluciones con FM para obtener soluciones estándares de 0 a 80ppm. Se filtraron dichas soluciones en membranas millipore 0,45 μM y se inyectaron en el HPLC. Se obtuvieron las áreas de cada solución estándar a partir de las cuales se obtuvo una curva de calibrado de área, A^H_{AAT} [mv s] vs concentración de AAT, C^H_{AAT} [mg AAT L⁻¹] (Ec. 2, Figura 2).

Curva de calibrado para la determinación de ácido ascórbico total (ATT), por el método espectrofotométrico de F-C

Se realizó una curva de calibrado para ácido ascórbico en las mismas condiciones que la curva realizada con ácido gálico por el método de F-C. Se prepararon soluciones estándares de ácido ascórbico de concentraciones de 20-140 ppm, se tomaron alícuotas de 250 μL de cada una de las soluciones en tubos falcon y se adicionaron 250 μL del reactivo de Folin-Ciocateu (F-C), 1500 μL de agua destilada (V1) + 500 μL de Na₂CO₃ al 10% + 2500 μL agua destilada (V2). Se agitaron los tubos en un Vortex V-1 plus BOECO, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min y se dejaron reposar en la oscuridad por 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS a 760 nm, obteniéndose por regresión lineal la curva de calibrado de absorbancia (Abs_{AAT}) vs concentración de AAT, C_{AAT} [mg AAT L⁻¹] (Ec. 3, Figura 2)

Determinación del contenido de fenoles totales corregidos en matrices vegetales con diferente contenido de vitamina C

Para evaluar la metodología propuesta, se obtuvieron cinco muestras de manzanas mínimamente procesadas con diferente contenido en ácido ascórbico mediante la tecnología de impregnación por vacío (IV). Posteriormente, en cada una de dichas muestras se determinaron el contenido de ácido ascórbico total, el contenido de fenoles totales sin realizar la corrección, y el contenido de fenoles totales corregidos con sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico (Ec. 5), determinándose el incremento en el valor del CFT determinado por F-C debido a la presencia de AAT (Ec. 6).

$$I_{AAT} [\%] = [(C^*_{CFC} - C^*_{CFC-C}) / C^*_{CFC-C}] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Preparación de muestras de manzanas mínimamente procesadas con ácido ascórbico incorporado por IV

Se emplearon manzanas variedad *Granny Smith*. Las mismas fueron seleccionadas, lavadas, peladas y descorazonadas. Posteriormente se cortaron en cubos de 1.5 cm de lado y sometidas a IV para la incorporación del ácido ascórbico. Se utilizó una solución de sacarosa de 30 °Bx conteniendo 1% de ácido cítrico más 1% de ácido ascórbico. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, a una presión de vacío de 67.7 mbar y tiempos de vacío/relajación entre 1 y 14 min. Finalmente, los cubos de manzanas se escurrieron y se realizaron las determinaciones analíticas correspondientes.



FIGURA 3

Equipo de impregnación por vacío para la obtención de manzanas mínimamente procesadas con alto contenido en vitamina C

Determinación de contenido de fenoles totales (CFT) y del contenido de ácido ascórbico total (AAT) en manzanas frescas cortadas tratadas por IV

Obtención del extracto de las muestras

Para la obtención de los extractos para la determinación de CFT y AAT, se pesaron 2,5 g de cada muestra molida (fruta fresca cortada tratada FT), se adicionó 25 mL de solución de acetona/agua 80:20, y se homogenizó la mezcla en ultrasonido por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 g a 4 °C por 20 min y finalmente se separó el sobrenadante que se usó para la determinación de CFT y AAT.

Determinación del contenido de fenoles totales (CFT) por el método de F-C

La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo usando el reactivo Folin-Ciocateu (F-C) (Rodríguez Arzuaga *et al.*, 2016; Singleton y Rossi, 1965). Las reacciones para FF y FT se realizaron de manera similar a la descrita para la obtención de la curva de calibrado: en tubos falcon de 15 ml, se hicieron reaccionar 250 μ L de extracto + 250 μ L de solución F-C + 1500 μ L de agua destilada (V1) + 500 μ L de Na₂CO₃ al 10% + 2500 μ L agua destilada (V2), se agitaron los tubos en un Vortex V-1 plus BOECO y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min. Se dejaron reposar en la oscuridad por 15 min para finalmente medir la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific a 760 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado, y los resultados obtenidos a partir de la Ec. 1 (Figura 2) se expresaron en mg AGE Kg⁻¹ fruta.

Determinación del contenido de ácido ascórbico total (AAT) por HPLC

Para la obtención de extractos se pesaron 12,5 g de muestra de y se agregaron 25 mL de solución extractante, se homogenizó la mezcla durante 1min en un Vortex V-1 plus BOECO y se sonicó en un ultrasonido TESTLAB por 15 min con agua fría y refrigerante, finalmente se centrifugó a 12000 g durante 20 min en centrífuga refrigerada a 4 °C y se tomaron los sobrenadantes.

Se tomaron 2 mL del extracto de FT, se adicionaron 0,5 mL de solución de DTT y se dejó reaccionar por 2 h en la oscuridad, pasado este tiempo se tomó 1 mL de esta mezcla y se agregó 5 mL de fase móvil para

llegar a la dilución 1/5; finalmente se filtró la muestra para inyectar en HPLC. Con los valores de las áreas bajo el pico correspondiente y la curva de calibrado (Ec. 5) se determinó la concentración de AAT en mg AAT Kg⁻¹ Fruta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de calibrado

Los coeficientes para las ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibrado para CFT y AAT por el método espectrofotométrico de F-C y para AAT por HPLC se pueden observar en la tabla 1, y las curvas de calibrado en las figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

TABLA 1
 Coeficientes de las curvas de calibrado correspondientes a las ecuaciones obtenidas para CFT y AAT por el método de F-C y para AAT por el método de HPLC

Coeficientes	Abs_{CFT} (Ec. 1)	A^H_{AAT} (Ec. 2)	Abs_{AAT} (Ec. 3)
a_i	0,0455	83144	0,0203
b_i	0,0133	27186	0,0037
R²	0.9989	0,9995	0,9952

ai: ordenada al origen, bi: pendiente; R2: coeficiente de determinación

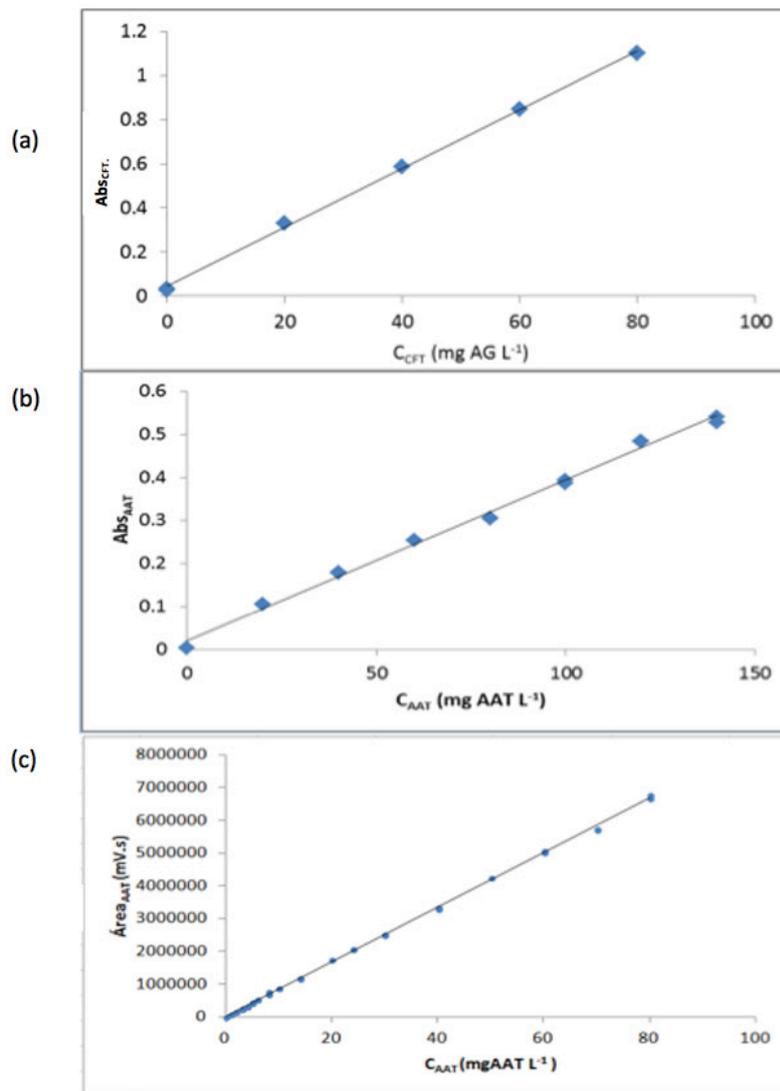


FIGURA 4

Curvas de calibrado de: ácido gálico (AG) obtenida por el método de espectrofotométrico de F-C (a); ácido ascórbico total (AAT) obtenida por el método espectrofotométrico de F-C (b); de ácido ascórbico total (AAT), determinada por HPLC (c)

Determinación del contenido de fenoles totales corregidos por sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico

A partir de la ecuación 6, se efectuaron los cálculos de corrección de fenoles totales por sustracción de la actividad reductora del ácido ascórbico. Se evidenció que existe interferencia del ácido ascórbico en la determinación del CFT presentes en las muestras de manzanas con ácido ascórbico incorporado, obteniéndose valores superiores al CFT real en 4,9 al 44,6% (Tabla 2).

TABLA 2
Concentración de Fenoles Totales (C^*_{CFT}) y concentración corregida (C^*_{CFT-C}) para muestras de manzana fresca cortada con distinto contenido de ácido ascórbico (C^H_{AAT}).

Muestra	C^*_{CFC} (mg AGE kg ⁻¹)	C^H_{AAT} (mg AAT kg ⁻¹)	C^*_{CFC-C} (mg AGE kg ⁻¹)	I_{AAT} (%)
1	328,87	6,47	313,59	4,9
2	358,74	12,69	338,00	6,1
3	560,68	445,16	437,11	28,3
4	624,76	519,33	465,02	34,4
5	599,41	608,42	414,95	44,6

IAAT (%): incremento en el valor del CFT determinado por F-C debido al AAT

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede indicar que para realizar la valoración del contenido de fenoles totales a través del método espectrofotométrico de F-C en muestras de frutas con alto contenido de AAT, como las manzanas impregnadas con ácido ascórbico mediante la tecnología de IV, es necesario realizar la corrección por interferencia de AAT en base a la metodología propuesta en el presente trabajo.

Se debe tener en cuenta que tanto el contenido de fenoles totales como el de ácido ascórbico total en las muestras de frutas deben estar en el rango de concentraciones en que se realizaron las respectivas curvas de calibrado, ya que en ese rango las mismas son lineales. Si las muestras exceden dichas concentraciones, se deberán realizar las diluciones correspondientes de los extractos, para poder aplicar la ecuación 5.

Se determinó que el porcentaje de interferencia en el contenido de fenoles totales se incrementa a medida que la concentración de ácido ascórbico presente en la muestra es mayor, observándose porcentajes de sobrevaloración entre 4,9 y 44,6% para muestras con contenido de ácido ascórbico de 6,5 y 608,4 mg Kg⁻¹ de fruta, respectivamente. La metodología desarrollada en el presente trabajo permite obtener el contenido de fenoles totales corregido por la interferencia de vitamina C, y sirve como base para futuras investigaciones con incorporación de ácido ascórbico en diferentes matrices vegetales.

REFERENCIAS

- Ainsworth, E. A. y Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protoc*, 2, 875–877.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A. Y Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., Larnuela-Raventós, R. (2010). Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. En: De la Rosa, L., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, E. (Eds). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. USA: Blackwell Publishinglowa.
- Asami, D., Hong, Y., Barret D. & Alyson E. (2003). Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237-1241
- Boyer, J. y Rui Hai L. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3:5.
- Escarpa, E. y Gonzáles, M. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427. 119–127

- Piagentini, A. M. y Pirovani, M. E. (2017). Total phenolics content, antioxidant capacity, physicochemical attributes and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. *International Journal of Fruit Science*: 1(17), 102-116. DOI: 10.1080/15538362.2016.1262304
- Prior, R., Wu, X. y Schich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 4290-4302.
- Rodríguez Arzuaga, M. Salsi, M. S., Piagentini, A. M. (2016). "Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas Granny Smith". *Revista Del Laboratorio Tecnológico del Uruguay INNOTEC*, 12, 7- 14. ISSN 1688-6593.
- Sanchez-Moreno, C., De Pascual, S., De Ancos, B. & Cano, P. (2010). En: Hui, Y. H (Ed). *Nutritional values of fruits. Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. (pp. 34). USA: Blackwell Publishing
- Sánchez-Rangel, J., Benavides, J. & Basilio, J., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velazquez, D. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*, 5, 5990.
- Singleton, V y Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Van de Velde, F., Pirovani, M., Cámara, M.S., Güemes, D., Bernardi, C.M. del H. (2011). Optimization and Validation of a UV-HPLC method for vitamin C determination in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), using experimental designs. *Food analytical Methods*, 5:1097-1104.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004). Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem*, 52 (21), 6532–6538.