



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

“Determinación del contenido fenólico y capacidad antioxidante, en plantas de arvejas (*Pisum sativum* L.) sanas y afectadas por la ceniza proveniente del Volcán Cotopaxi.”

Autora: Narváez Morocho, Janis Anabella

Directora: Mihai Raluca Alexandra, Ph.D.

Sangolquí, 13 de marzo del 2024

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN: 13/12/11

CÓDIGO: GDI.3.1.004

VERSIÓN: 1.0





- Introducción
- Justificación del problema
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

Taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Pisum sativum* L.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Género	<i>Pisum</i>
Especie	<i>Pisum sativum</i> L.

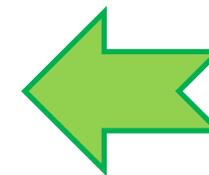
Origen



Cordillera de los Andes

5900 m.s.n.m

--> 117 – 147 años



9500 ha/año

8 ton

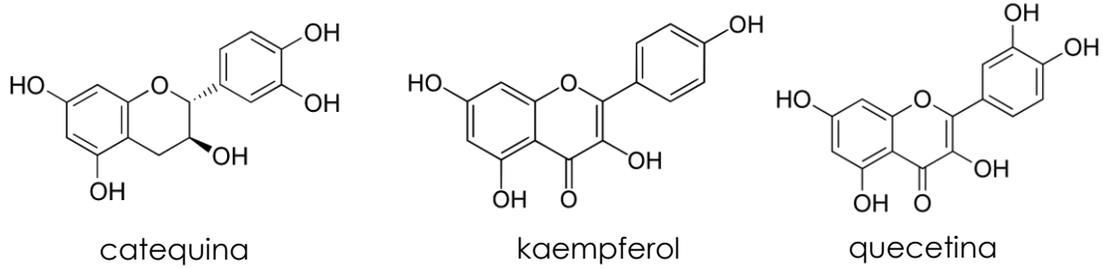
47.5%



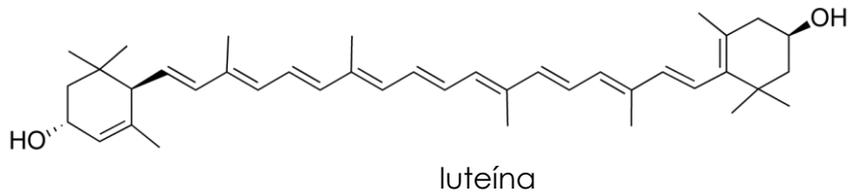
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Actividad Antioxidante

Habilidad de una sustancia o compuesto de inhibir la oxidación de un sustrato en cantidades mínimas.



Flavonoides



Carotenoides



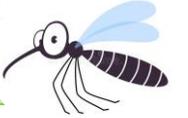
Comp. Fenólicos

Compuestos fenólicos

Presiones ecológicas y fisiológicas.



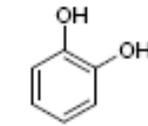
Ataque de patógenos e insectos.



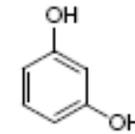
Radiación UV



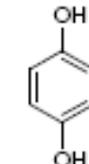
Fenoles simples



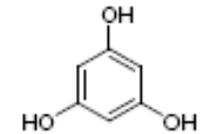
Catechol



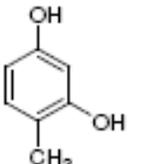
resorcinol



hydroquinone

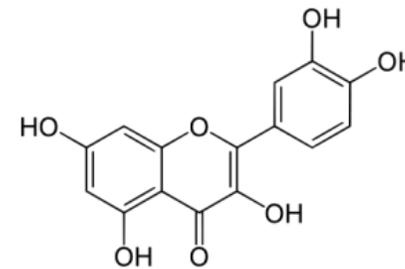


phloroglucinol



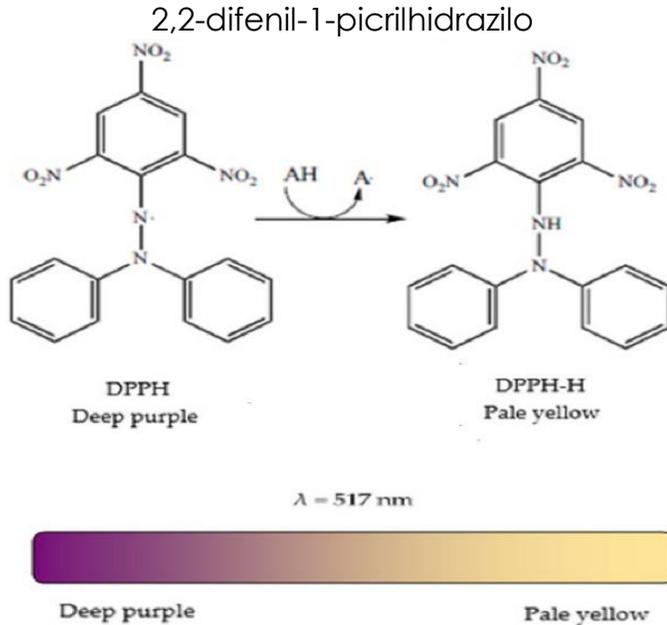
4-methylresorcinol

Polifenoles



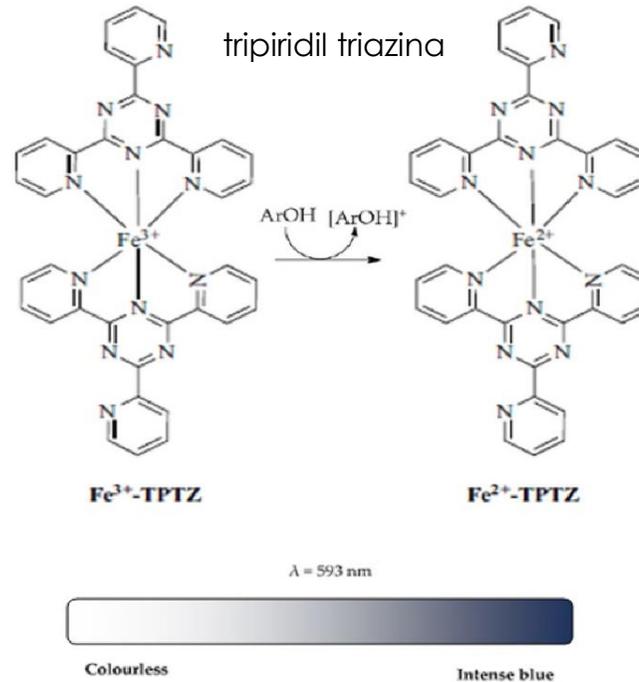
ENSAYOS DE DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

DPPH



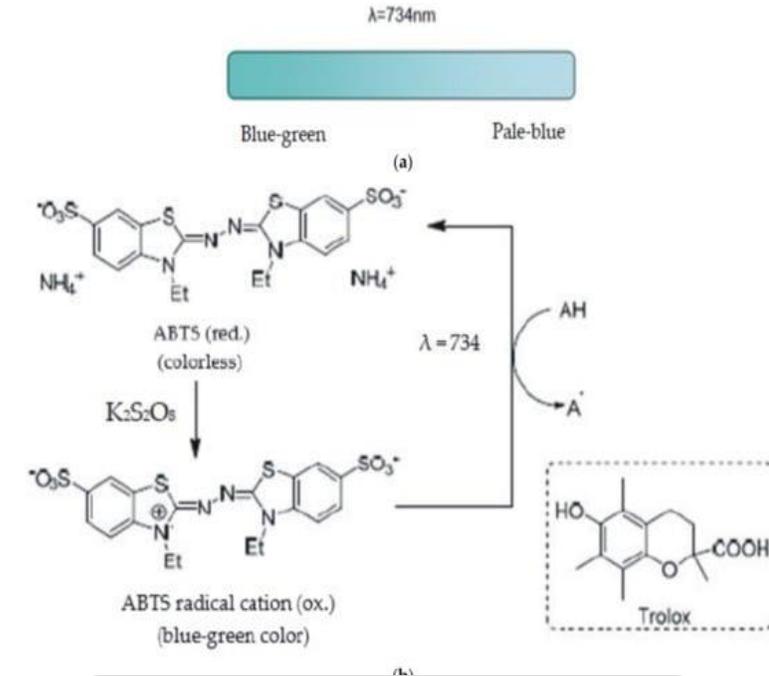
Transferencia de electrones por parte de los antioxidantes con el propósito de contrarrestar el radical DPPH.

FRAP



Capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico tripiridil triazina a la forma ferrosa a un pH bajo.

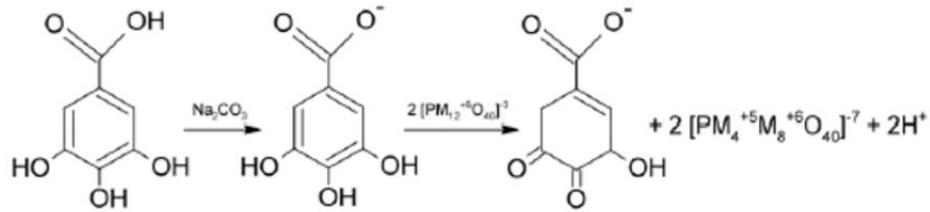
ABTS



Conversión de ABTS a ABTS+ mediante la adición de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. En presencia de compuestos antioxidantes, el catión vuelve a convertirse en ABTS neutro.



ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE CONTENIDO FENÓLICO TOTAL



M = Mo or W

(a)

$\lambda = 765 \text{ nm}$



(b)

**Folin
Ciocalteu**

Se expresan como equivalentes de ácido gálico u otro compuesto fenólico, como ácido cafeico, catequina, ácido ferrúlico.

Posee complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, con adiciones de sulfato de litio y bromo, en un medio fuerte a un pH de 10-12 para generar el anión fenolato.

Algunos compuestos no fenólicos como el ácido ascórbico, aminas aromáticas, dióxido de azufre, iones metálicos (Cu^+ , Fe^{2+}) pueden interferir al reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Justificación del problema



- Pichincha
- Cotopaxi
- Napo
- Tungurahua
- Chimborazo
- Cañar



Pisum sativum L. es el segundo cultivo más importante



10435 ha grano tierno



11600 ha grano seco



Aluminio, Azufre, Hierro, Calcio, Magnesio, Titanio

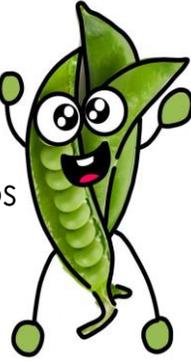


Alteraciones de división celular y fotosíntesis

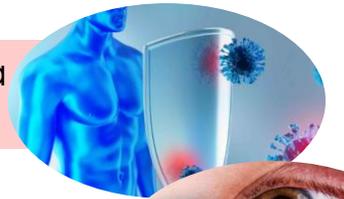


Aporta

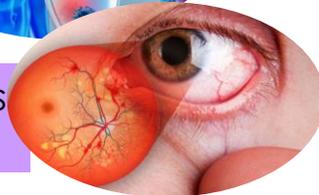
- proteínas
- fibra
- carbohidratos
- vitaminas
- minerales



Fortalece sistema inmune



Previene enfermedades de la vista

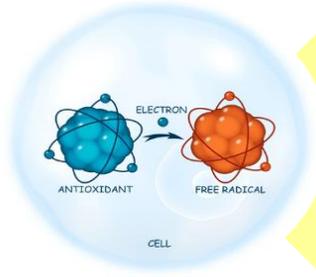


Objetivo General

Determinar el contenido fenólico y capacidad antioxidante, en plantas de arvejas (*Pisum sativum* L.) sanas y afectadas por la ceniza proveniente del Volcán Cotopaxi.

Hipótesis

Los cultivos de *Pisum sativum* L. adyacentes al volcán Cotopaxi son perjudicados debido a la presencia de la ceniza, resultando en una alteración en la producción de contenido fenólico y su capacidad biológica.



Objetivos Específicos

Recolectar muestras de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) sanas y afectadas por la ceniza volcánica proveniente del volcán Cotopaxi de Ecuador.

Examinar la concentración de compuestos fenólicos implicados en la defensa de las plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) tanto sanas como afectadas por la ceniza volcánica, cultivadas en la provincia de Cotopaxi en Ecuador.

Determinar el carácter antioxidante a través de los métodos DPPH, FRAP y ABTS de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) sanas y afectadas por la ceniza del volcán Cotopaxi en Ecuador.

Muestreo



Cultivos afectados por la ceniza



Figura 1. Cultivos de Cotopaxi afectados.

Cultivos sin afectaciones por la ceniza



Figura 2. Cultivos de Cotopaxi no afectados.

Obtención y manejo del material vegetal

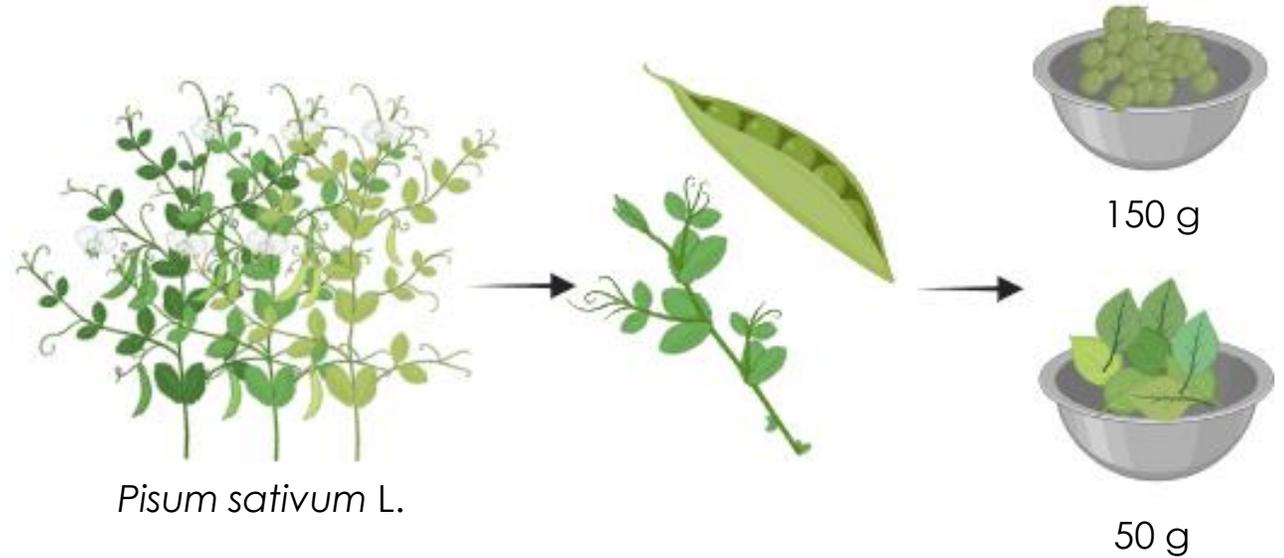
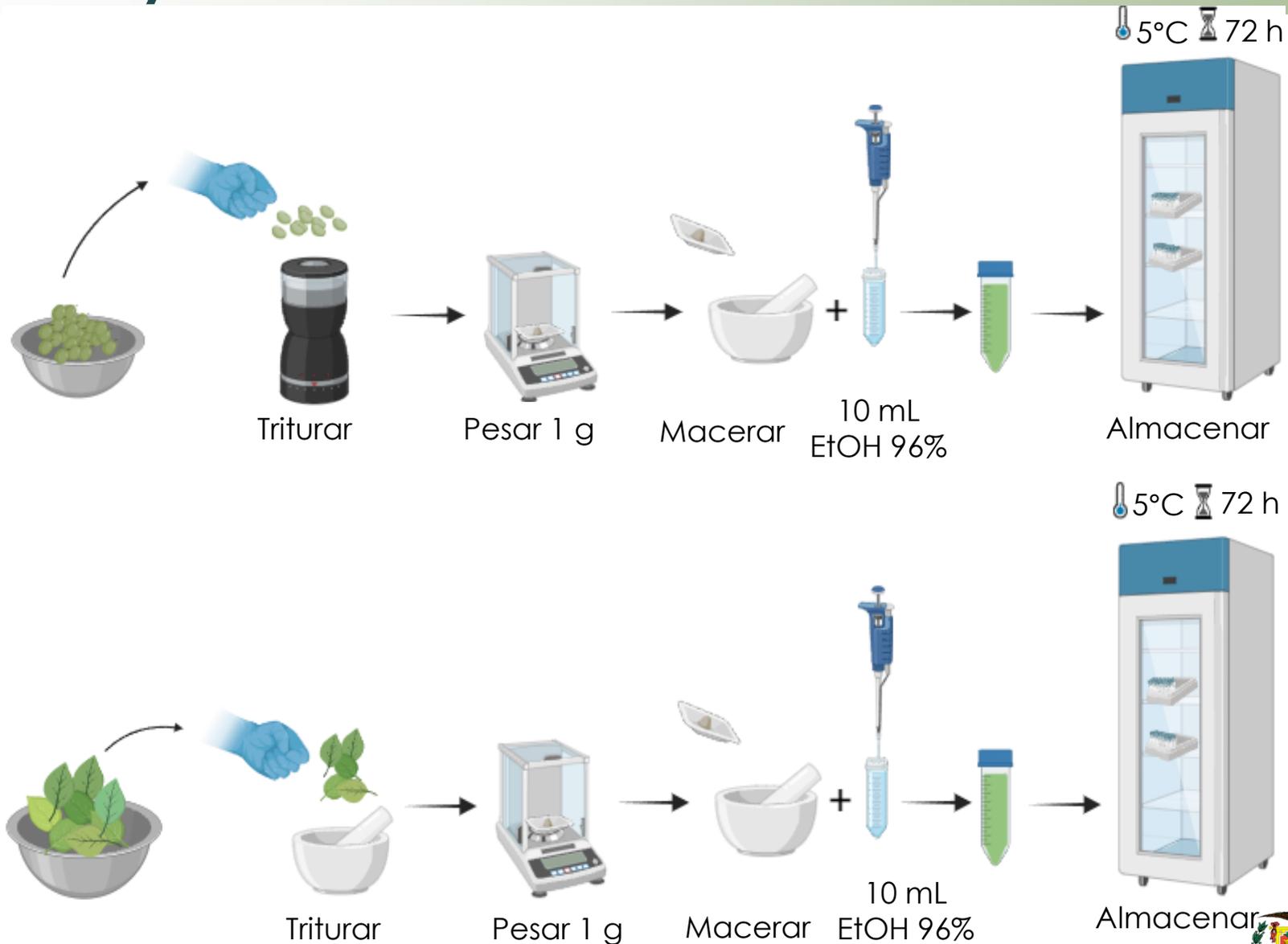


Tabla 2. Nomenclatura para las muestras analizadas.

Órgano	Condición	Nomenclatura
Fruto Fresco	Ausencia ceniza	FAC
Fruto Fresco	Presencia ceniza	FPC
Hoja Fresca	Ausencia ceniza	HAC
Hoja Fresca	Presencia ceniza	HPC

Materiales y Métodos

Extracción de principios activos



Frutos *Pisum sativum* L.



Figura 3. Tubos Falcon con extractos de principios activos.

Hojas *Pisum sativum* L.

Dilución 1:2

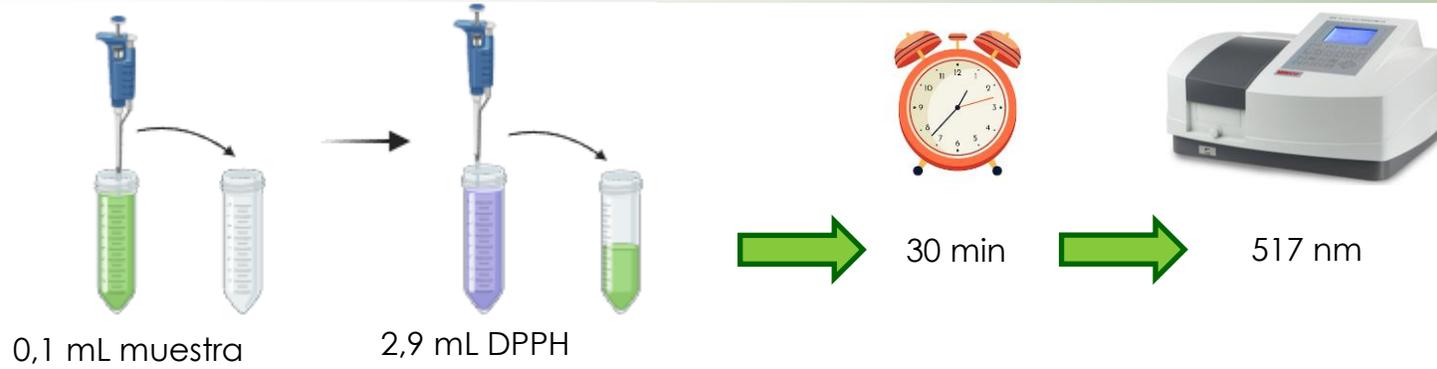


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

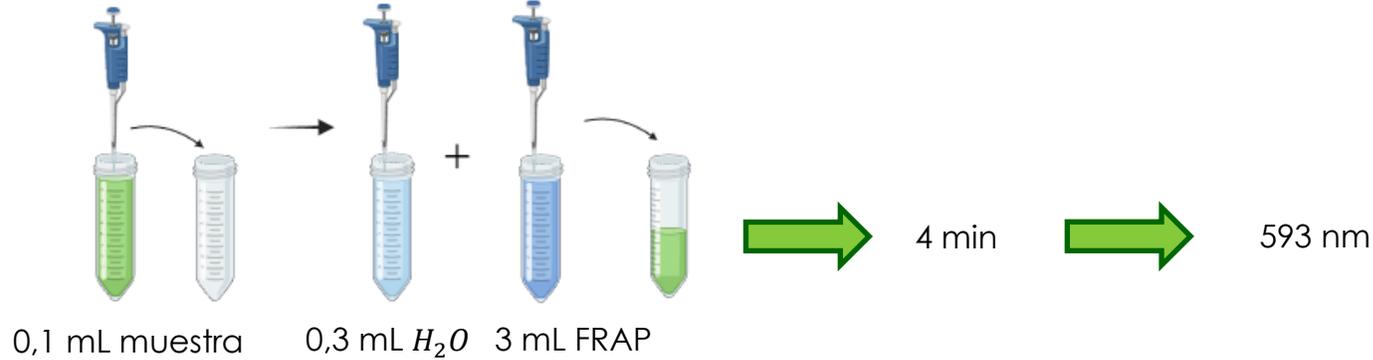
Determinación de actividad antioxidante total

Blancos: etanol en lugar de muestra

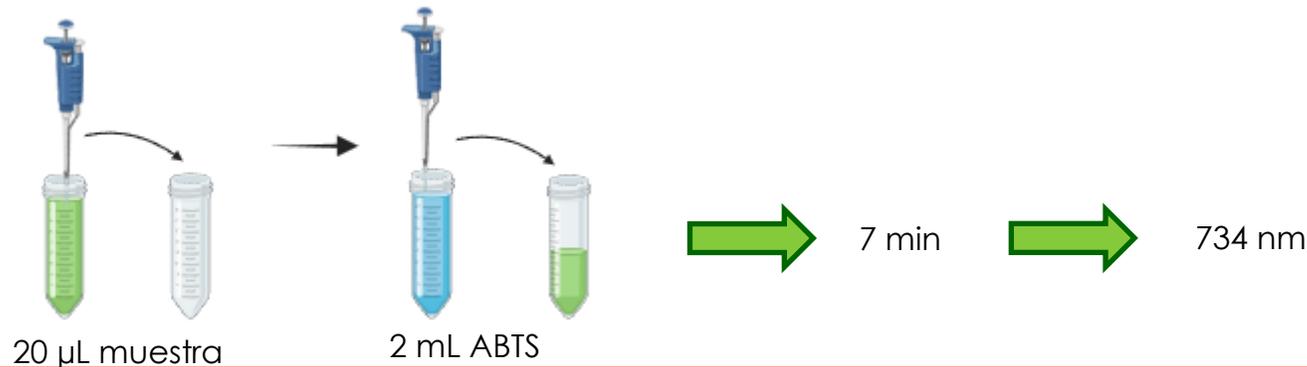
DPPH



FRAP



ABTS



Reacción

Antes

Después



Figura 4. Antes y después de la reacción de DPPH.

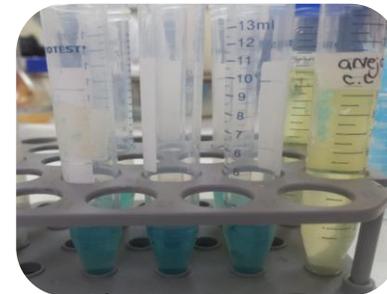


Figura 5. Antes y después de la reacción de FRAP.

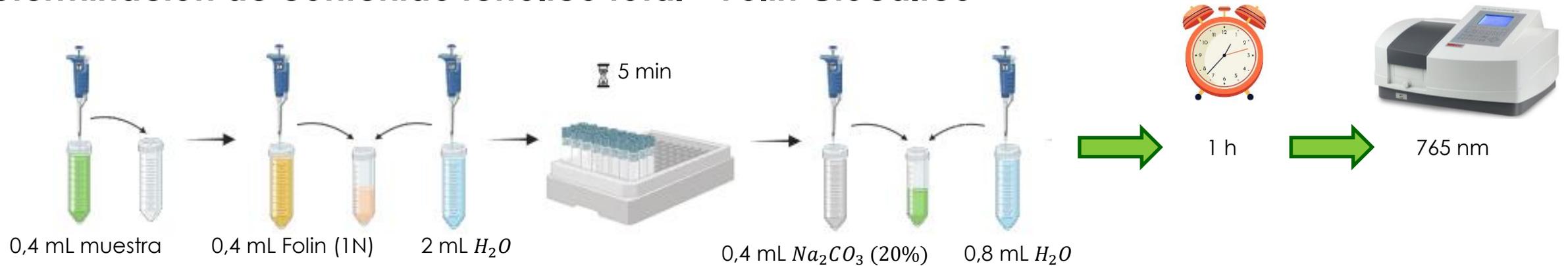


Figura 6. Antes y después de la reacción de ABTS.



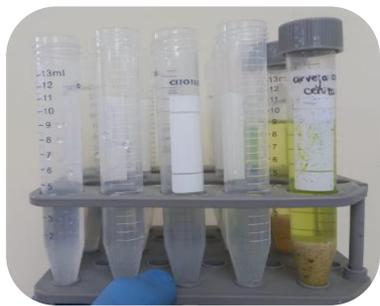
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Determinación de contenido fenólico total – Folin Ciocalteu



Reacción

Antes



Después



Figura 7. Antes y después de la reacción de Folin Ciocalteu.



Análisis Estadístico

Tabla 3. Diseño experimental factorial 2x2.

Ceniza	Órgano de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.)	
	Hoja	Fruto
Presencia	3	3
Ausencia	3	3

Normalidad

$$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_B \neq \mu_C \neq \mu_D$$

$$H_0: \sigma_A^2 = \sigma_B^2 = \sigma_C^2 = \sigma_D^2$$

$$H_1: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2$$

Homocedasticidad

Determinación de actividad antioxidante total

Tabla 4. Respuestas experimentales promedio de cada ensayo.

Órgano	Ausencia / Presencia ceniza	Métodos para la determinación de Capacidad Antioxidante		
		DPPH	FRAP	ABTS
		($\mu\text{mol TRX/g Fw}$)	($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g Fw}$)	($\mu\text{mol TRX/g Fw}$)
Fruto	Ausencia ceniza	0,53	0,73	0,83
	Presencia ceniza	16,98	4,87	7,10
Hoja	Ausencia ceniza	51,50	22,57	25,36
	Presencia ceniza	70,39	31,67	31,24

Tres repeticiones de cada método realizado.



El ensayo de DPPH tuvo mejores resultados en cuanto a la determinación de TAC.



Los órganos con ceniza presentan valores más elevados de concentración de antioxidantes.

Resultados y Discusión

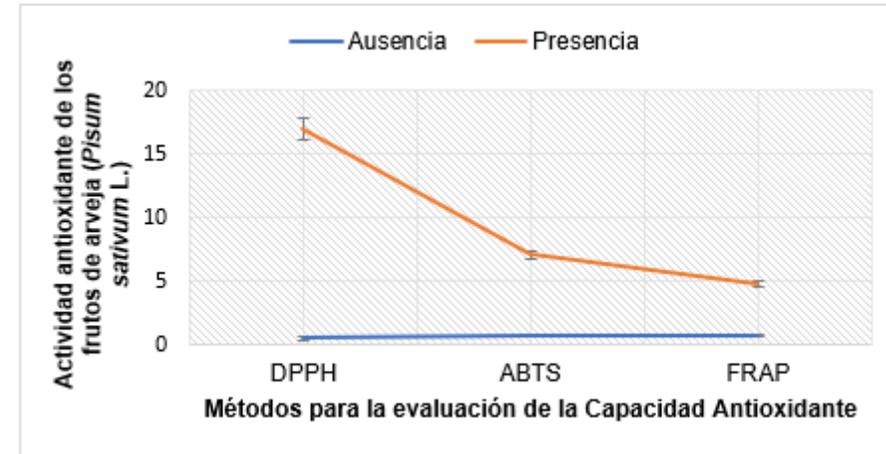


Figura 8. Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante vs Actividad antioxidante de los frutos de arveja (*Pisum sativum L.*).

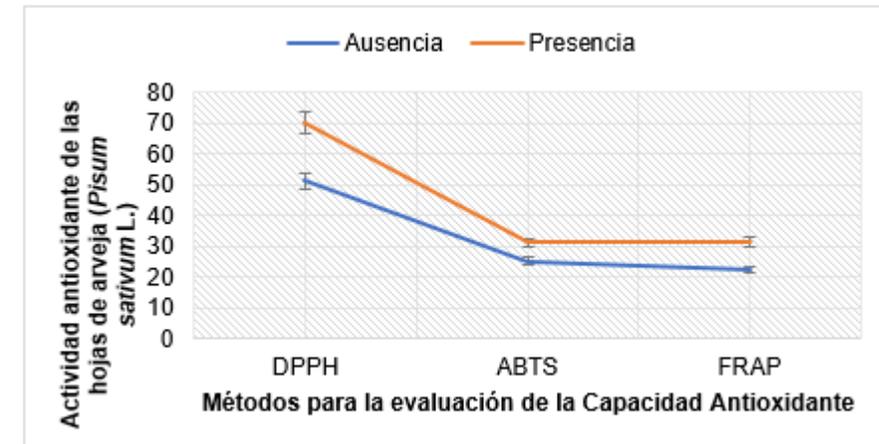


Figura 9. Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante vs Actividad antioxidante de las hojas de arveja (*Pisum sativum L.*).

Determinación de actividad antioxidante total

Tabla 5. Respuestas experimentales del ensayo DPPH.

Tipo de muestra	DPPH ($\mu\text{mol TRX/g Fw}$)				
	R1	R2	R3	Media	Desviación estándar
FAC	0,6145	0,2914	0,6953	0,5337	0,2137
FPC	16,9311	17,0119	16,9850	16,9760	0,0411
HAC	43,9489	54,2917	56,2722	51,5042	6,6177
HPC	67,7703	76,3526	67,0551	70,3927	5,1738

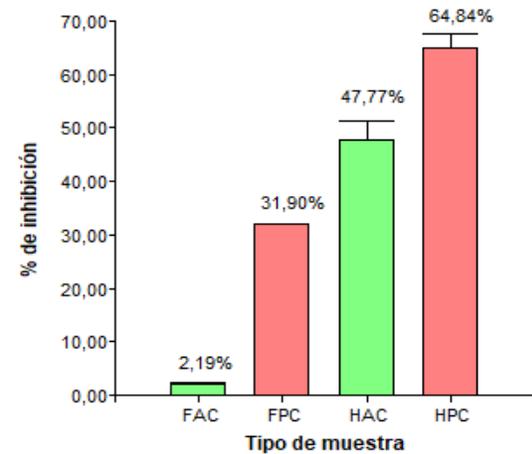


Figura 10. Tipo de muestra vs Porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Frutos procesados

13,67 g extracto/g DPPH

Efectos analgésicos

489,25 $\mu\text{g/mL}$

Cáscara de arveja

0,650 \pm 0,05 mg/mL

Extracción metanólica

64,95% con una concentración de 294 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 6. Prueba de comparación de medias de Duncan.

Ceniza	Órgano	Medias	n	E.E	
Presencia	Hoja	70,39	3	2,42	A
Ausencia	Hoja	51,50	3	2,42	B
Presencia	Fruto	16,97	3	2,42	C
Ausencia	Fruto	0,53	3	2,42	D

Tabla 7. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis.

Trat.	Ranks		
Ausencia:Fruto	2,00	A	
Presencia:Fruto	5,00	A	B
Ausencia:Hoja	8,00		B C
Presencia:Hoja	11,00		C

Análisis Estadístico

($F_{3,8} = 172,23; p < 0,0001$)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Determinación de actividad antioxidante total

Tabla 8. Respuestas experimentales del ensayo FRAP.

Tipo de muestra	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g Fw}$)				
	R1	R2	R3	Media	Desviación estándar
FAC	0,6860	0,7418	0,7697	0,7325	0,0426
FPC	4,9328	4,7768	4,8994	4,8696	0,0821
HAC	20,7111	23,3528	23,6426	22,5689	1,6154
HPC	30,2525	32,1250	32,6267	31,6681	1,2513

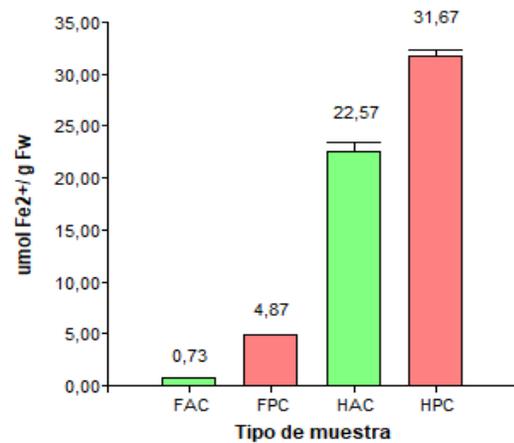


Figura 11. Tipo de muestra vs concentración de antioxidante.

Muestras frescas vs procesadas

2187 mmol Fe (II)/mg de extracto

Alta capacidad de reducción Fe (III)

0.74–0.84 mmol Fe₂₊/g

Tabla 9. Prueba de comparación de medias de Duncan.

Ceniza	Órgano	Medias	n	E.E	
Presencia	Hoja	31,67	3	0,59	A
Ausencia	Hoja	22,57	3	0,59	B
Presencia	Fruto	4,87	3	0,59	C
Ausencia	Fruto	0,73	3	0,59	D

Tabla 10. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis.

Trat.	Ranks		
Ausencia:Fruto	2,00	A	
Presencia:Fruto	5,00	A	B
Ausencia:Hoja	8,00		B C
Presencia:Hoja	11,00		C

Análisis Estadístico

($F_{3,8} = 612,33; p < 0,0001$)



Determinación de actividad antioxidante total

Tabla 11. Respuestas experimentales del ensayo ABTS.

Tipo de muestra	ABTS ($\mu\text{mol TRX/g Fw}$)				
	R1	R2	R3	Media	Desviación estándar
FAC	0,6465	0,7342	1,0999	0,8269	0,2405
FPC	6,8491	7,2002	7,2441	7,0978	0,2165
HAC	25,8403	25,3722	24,8748	25,3625	0,4828
HPC	29,7024	33,8278	30,1998	31,2433	2,2520

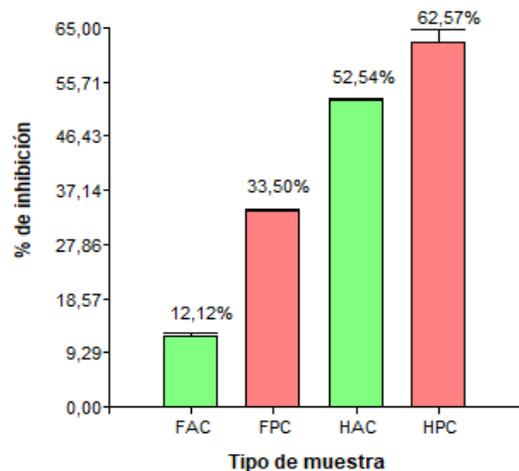


Figura 12. Tipo de muestra vs Porcentaje de inhibición del radical ABTS.

Frutos procesados
6155 mmol/g de extracto

Diferentes extractos (cáscara)
 $1,9 \pm 0,05 \mu\text{mol TRX/g}$

Tabla 12. Prueba de comparación de medias de Duncan.

Ceniza	Órgano	Medias	n	E.E	
Presencia	Hoja	31,24	3	0,67	A
Ausencia	Hoja	25,36	3	0,67	B
Presencia	Fruto	7,10	3	0,67	C
Ausencia	Fruto	0,83	3	0,67	D

Tabla 13. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis.

Trat.	Ranks		
Ausencia:Fruto	2,00	A	
Presencia:Fruto	5,00	A	B
Ausencia:Hoja	8,00		B C
Presencia:Hoja	11,00		C

Análisis Estadístico

($F_{3,8} = 464,54; p < 0,0001$)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Folin Ciocalteu

Determinación de contenido fenólico total

Tabla 14. Respuestas experimentales para Folin Ciocalteu.

Órgano	Ausencia /	Folin-Ciocalteu (mg GAE/g dw)			Promedio
	Presencia ceniza				
Fruto	Ausencia ceniza	0,39	0,36	0,35	0,36
	Presencia ceniza	1,59	1,40	1,59	1,53
Hoja	Presencia ceniza	4,54	4,53	4,37	4,48
	Ausencia ceniza	4,06	4,76	4,16	4,33

Frutos procesados

62,5 ± 0,8 mg GAE/g extracto

etanol (12,12 ± 0,19 mgGAE/g), acetona (10,03 ± 0,12 mgGAE/g), agua (1,61 ± 0,05 mgGAE/g) y hexano (0,72 ± 0,05 mgGAE/g).

Metodología de extracción

Características de las semillas

128 y 104 mg GAE/100 g fw

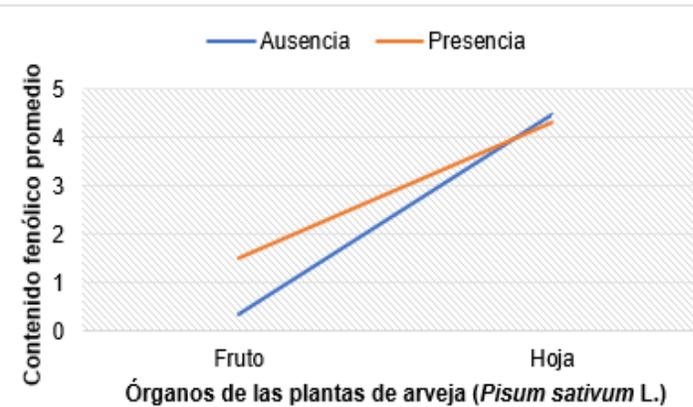


Figura 13. Órganos vegetal vs contenido fenólico.

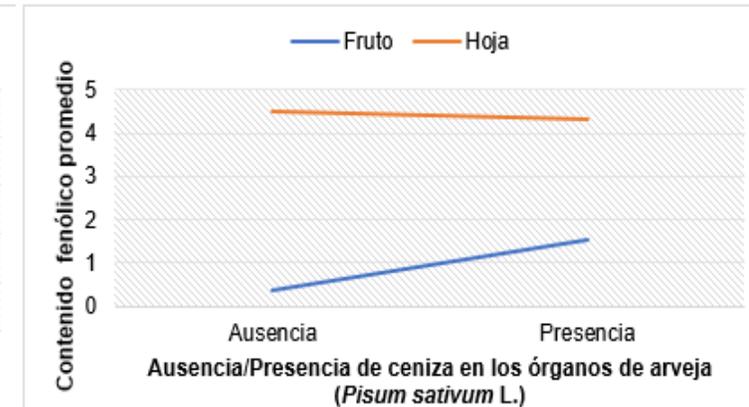


Figura 14. Interacción ausencia/presencia de ceniza.

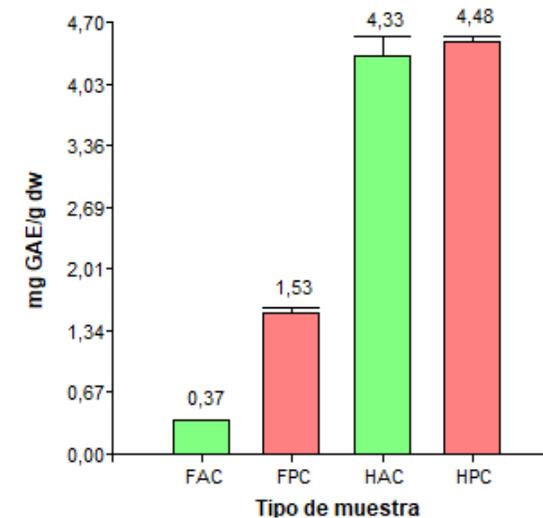


Figura 15. Tipo de muestra vs concentración de fenoles.



Folin Ciocalteu

Tabla 15. Prueba de comparación de medias de Duncan.

Ceniza	Órgano	Medias	n	E.E	
Presencia	Hoja	4,48	3	0,12	A
Ausencia	Hoja	4,33	3	0,12	A
Presencia	Fruto	1,53	3	0,12	B
Ausencia	Fruto	0,37	3	0,12	C

Comparación de a pares, siendo Ausencia : Hoja y Presencia : Hoja el mejor grupo.

Cantidad de clorofila en fruto vs hoja

Análisis Estadístico

($F_{3,8} = 306,44$; $p < 0,0001$)

Órganos con presencia de ceniza en sus estructuras exponiendo mejores respuestas experimentales

Tabla 16. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis.

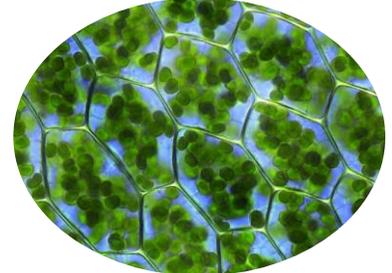
Trat.	Ranks		
Ausencia:Fruto	2,00	A	
Presencia:Fruto	5,00	A	B
Ausencia:Hoja	9,00		B
Presencia:Hoja	11,00		B



Conclusiones



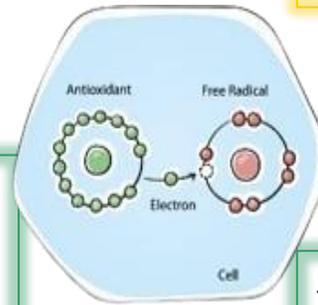
En el análisis fitoquímico del contenido fenólico, se observaron resultados destacados en los frutos y hojas de las plantas expuestas a la ceniza volcánica, con cifras promedio de 1,53 mg GAE/g dw y 4,48 mg GAE/g dw respectivamente.



Las hojas en ausencia de ceniza poseen un contenido promedio de fenoles correspondiente a 4,33 mg GAE/g dw, atribuido al contenido de clorofila en este órgano.

Existe relación entre la clorofila y la producción de fenoles, vinculado a la fotosíntesis, síntesis de compuestos orgánicos y la función que cumplen los fenoles en diversas respuestas fisiológicas y de defensa de las plantas.

La mayor capacidad antioxidante se evidenció en los frutos y hojas que tuvieron exposición a la ceniza volcánica del Cotopaxi en Ecuador: el porcentaje de inhibición de radicales libres de 31,90% y 64,84% (ensayo DPPH), 33,50% y 62,57% (ensayo ABTS) y potencial reductor de 4,87 y 31,67 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g Fw}$ (ensayo FRAP), respectivamente.



Se resalta la normalidad de síntesis de compuestos antioxidantes y fenólicos en períodos de estrés al que se exhiben las plantas.





Considerar el estado del órgano vegetal a evaluar, ya que no siempre es factible la obtención de frutos frescos.

Los órganos vegetales no deberían estar sometidos a ningún tipo de procesamiento, para la obtención de valores reales de contenido fenólico y capacidad antioxidante.



Evaluación de la composición real de la ceniza volcánica, considerando la posibilidad de realizar el mismo ensayo en diferentes zonas de Ecuador.

Evaluar el tiempo de exposición de las plantas a la ceniza y como afecta esto en la producción de antioxidantes y compuestos fenólicos.



Agradecimientos



Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.
Directora del proyecto

Laboratorio de Biotecnología del Centro de
Investigación de Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”

Tesistas y Técnico de Laboratorio

Familiares y Amigos

