



ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE AZUL DE PRUSIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN CULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS EN MICROPLACAS

Oswaldo Guzmán-López, Octavio Loera-Corral, José Luis Parada-López, Gerardo Saucedo-Castañeda.
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, CP 09340,
Delegación Iztapalapa, México, D.F., Fax (55) 5804-6554, saucedo@xanum.uam.mx

Palabras clave: bacterias lácticas, compuestos fenólicos, azul de prusia.

Introducción. En la actualidad hay una gran variedad de métodos espectrofotométricos para la cuantificación de compuestos fenólicos que están basados en diferentes principios. Las técnicas de Azul de Prusia (1) y de Folin-Ciocalteu (2) han sido utilizadas para la cuantificación de compuestos fenólicos en algunos alimentos como vino, sorgo, etc. Aún cuando existen técnicas como la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos, estos métodos son caros y laboriosos.

En este trabajo se adapta un método espectrofotométrico confiable y de fácil implementación para la determinación de compuestos fenólicos simples durante el cultivo de bacterias lácticas utilizando la técnica de microplacas, sin que se presenten interferencias por la composición del medio de cultivo.

Metodología. Se probaron tres metodologías: El método de sulfato ferroso, Folin-Ciocalteu y Azul de Prusia. Se realizó una curva estándar hasta una concentración de ácido gálico de 0.3 g/L disuelto en metanol.

Se cultivó *Lactobacillus plantarum* (L-08) en el medio de cultivo MRS *Lactobacilli* adicionando ácido gálico (0.3 g/L) disuelto en agua y ajustando previamente el pH a 6.8 con NaOH. El método se adaptó para su utilización en microplacas de ELISA de 96 pozos ajustando los volúmenes y la concentración de los reactivos.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro a 720 nm (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer) y en microplacas se utilizó un lector de ELISA ((Ultra Microplate Reader ELX808, Biotek Instruments) realizando lecturas a 595 nm.

Resultados y discusión. De los tres métodos espectrofotométricos, el método de Azul de Prusia fue el que presentó una mayor facilidad para su implementación en las microplacas de 96 pozos. El método de sulfato ferroso presentó precipitación con los reactivos y fue poco confiable. El método de Folin-Ciocalteu presenta mayores interferencias a bajas concentraciones de compuestos fenólicos y un largo tiempo de reacción (1-2 h), resultando laborioso y costoso (2). Por otra parte, el método modificado de Azul de Prusia resultó ser un método simple, con un tiempo de reacción corto (<15 min), con el que se puede estabilizar la reacción con H₃PO₄ y evitar la precipitación con goma arábiga (1,3). Éste método se empleó en la cuantificación de ácido gálico con medio MRS inoculando

con la cepa L-08, en estas condiciones se presentaron problemas de precipitación debido a la interacción del FeCl₃ y las proteínas presentes. Se probaron algunos agentes precipitantes de proteínas como el ácido tricloroacético, CaCl₂, ZnSO₄ y BaCl₃ pero interaccionaron con los reactivos. Se empleó finalmente metanol en proporción 2:1 (metanol:medio de cultivo) con lo cual se resolvió este problema.

Después de seguir el protocolo, se realizó una curva estándar en microplacas con ácido gálico obteniendo linealidad hasta los 0.25 g/L de ácido gálico (Figura 1).

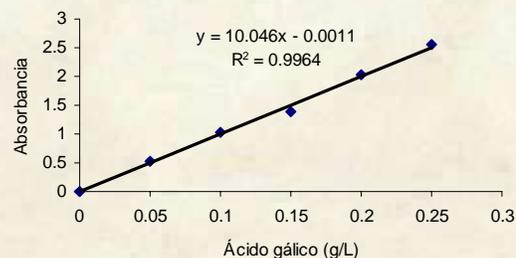


Fig. 1. Curva de calibración con ácido gálico disuelto en metanol con el método de Azul de Prusia.

Conclusiones. El método espectrofotométrico de Azul de Prusia puede ser utilizado en las microplacas de 96 pozos con lo cual se pueden analizar un mayor número de muestras a la vez y se emplea una menor cantidad de reactivos. La adaptación del método espectrofotométrico permitirá hacer seguimientos de la presencia de compuestos fenólicos en cultivos de bacterias lácticas con un medio complejo.

Agradecimiento. Al financiamiento de CONACYT.

Bibliografía.

1. Singleton, V., Osthofer, R., Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagents. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
2. Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91: 21-40.
3. Graham, H. (1992). Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 40: 801-805.