

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PISCO PERUANO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Adolfo La Rosa Toro G.^a Fredy Vigo López^a, Golfer Muedas Taipe^a

RESUMEN

El pisco es uno de los productos de origen peruano que ha incrementado su demanda en los últimos años. El pisco legítimo, como un producto destilado de la fermentación de la uva muestra actividad antioxidante, atribuido a la presencia de derivados fenólicos, contenidos en las uvas. La voltametría cíclica es una técnica rápida y de alta sensibilidad mediante la cual es posible evaluar la actividad antioxidante de algunas muestras naturales debido a su respuesta electroactiva. El presente trabajo emplea la técnica de voltametría cíclica como un método de identificación de la autenticidad del pisco evaluando su actividad antioxidante, comparándola con el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se evaluaron muestras de pisco legítimo y adulterado obtenidas en el mercado nacional.

Palabras clave: Pisco, antioxidante, potencial de oxidación, voltametría cíclica.

ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PERUVIAN PISCO THROUGH CYCLIC VOLTAMMETRY

ABSTRACT

Pisco is a peruvian beverage which has increased its demand over the last years. Legitimate pisco is a distilled product of the fermentation of grapes; due to this, it shows antioxidant activity attributed to the presence of phenolic derivatives (which are contained in grapes). Cyclic voltammetry is a rapid and high sensitivity technique; this characteristic allows this technique for evaluating the antioxidant activity of some natural samples due to its electroactive response. This technique is used in this research project as a method for identifying the authenticity of pisco by evaluating its antioxidant activity. Results obtained by cyclic voltammetry are then compared with the method of neutralization of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Samples of legitimate and adulterated pisco obtained in the national market were evaluated.

Key words: Pisco, antioxidant, oxidation potencial, cyclic voltammetry.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser empleados en la industria de alimentos, cosméticos y atención de la salud con el objetivo de prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos que ocurren como consecuencia de actividad de los radicales libres en nuestro organismo¹. El pisco es un producto con identidad peruana que ha incrementado su venta en forma significativa; sin embargo, la estrategia de comercialización no considera su importante contribución como

^a Laboratorio de Electroquímica Aplicada, Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional de Ingeniería.
Casilla: 31-316. Av. Túpac Amaru 210, Rímac, e-mail: toro@uni.edu.pe

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Muestras de pisco:

S_A y S_B = Pisco legítimo de origen artesanal de la zona de Mala - Perú

S_C y S_D = Pisco de marcas registradas

S_E y S_F = Pisco adulterado

Reactivos: El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), la rutina y los solventes utilizados fueron de grado *para análisis*. Asimismo, se utilizó un buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v).

Los voltagramas (VC) fueron obtenidos utilizando un potenciostato PGSTAT 12 equipado con SCAN GEN que opera bajo el sistema GPES 4.9 Eco Chemie B. V. con un sistema de tres electrodos compuesto de carbón vítreo (electrodo de trabajo), platino (electrodo auxiliar) y Ag/AgCl/KCl 3M (electrodo de referencia).

En el análisis de antioxidantes empleando el método de neutralización de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) se utilizó el espectrofotómetro UV-Visible LABMED.

Métodos

Voltametría cíclica (VC)

Mediante la técnica de VC es posible la evaluación del potencial rédox de los compuestos electroactivos (fenólicos) mediante un barrido de potencial en un rango previamente definido. La muestra de pisco (4 mL), fue adicionada a 40 mL de una mezcla de etanol y buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2 (1:1). La solución resultante fue purgada con gas N_2 manteniendo la atmósfera inerte durante todo el proceso. Se obtuvo los voltagramas (VC) realizando un barrido de potencial desde -1,00 V hasta 0,92 V a una velocidad de 100 mV/s. El carbón vítreo fue pulido antes de cada experimento utilizando una lija N° 1200 y alúmina en polvo de 0,3 micras de Buehler micropolish. La reproducibilidad del potencial del pico voltamétrico es del orden de $\pm 0,01$ V, dependiendo del pretratamiento de la superficie del electrodo. Para cada muestra de pisco se han obtenido varios voltagramas obteniéndose así los picos de potencial de oxidación característicos; además, se realizó la voltametría cíclica del estándar de rutina para corroborar la exactitud del método electroquímico.

Neutralización del radical libre DPPH

El método a emplear es el de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), en este caso, la solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta un máximo de absorbancia a 515 nm.

La reacción química consiste en que el radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante); producto de este cambio se desarrolla un cambio de color, de violeta a amarillo, como resultado de la disminución de la concentración del radical libre; esta intensidad fue leída en el espectrofotómetro después de un tiempo de 30 minutos de reacción. La muestra de pisco utilizada, previa a la reacción con DPPH, fue diluida con etanol absoluto en la relación de volúmenes de 1:10. Luego 1250 μ L de la solución obtenida se mezcla con 500 μ L de DPPH 0,3 mM.

La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje, y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(A_m - A_b)100}{A_{control}} \right\}$$

Donde,

- $\% AA$: Porcentaje de actividad antioxidante
 Am : Absorbancia de la muestra
 Ab : Absorbancia del blanco
 $Acontrol$: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(Am - Ab)/Acontrol$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de muestras empleando el método de voltametría cíclica (VC)

Todos los voltagramas fueron obtenidos en solución de Buffer de fosfato de sodio 0,07 M, pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v); empleando electrodo de trabajo de carbón vítreo (GC), electrodo auxiliar de platino y electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3 M), la velocidad de barrido empleada fue de 100 mV/s.

En la figura 2 se presenta el voltagrama del electrodo de GC obtenido en la solución buffer (blanco) que se utiliza como electrolito de fondo para el análisis de las muestras. En el gráfico, en el rango de potencial entre -0,80 a 0,60 V, no se observa reacciones redox significativas, constituyendo una buena línea base para la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de pisco.

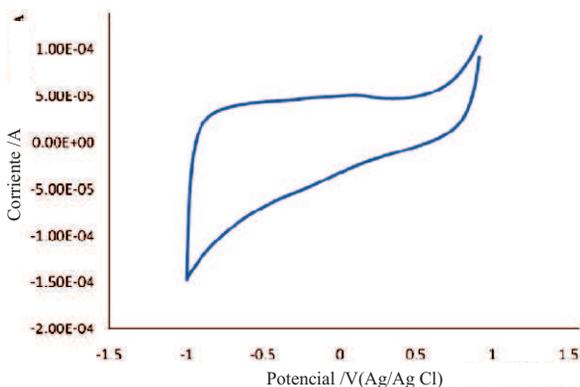


Figura 2. Voltagrama cíclico de la solución electrolítica: buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

Los voltagramas de las figuras 3 y 4 corresponden a las muestras S_A y S_B (pisco de origen artesanal) y las figuras 5 y 6, muestran los voltagramas de las muestras S_C y S_D (pisco de marcas registradas). En todos los casos los voltagramas muestran la formación de dos picos de corriente consecutivos en el barrido de potenciales en sentido anódico. El primer pico aparece entre -0,082 y -0,076 V y el segundo pico de oxidación entre 0,094 y 0,132 V, ambos asignables a la oxidación de los compuestos fenólicos característicos de las sustancias antioxidantes. En el barrido en sentido catódico se observa los correspondientes picos de reducción de las sustancias previamente oxidadas. En la figura 7 se presenta el voltagrama correspondiente a la rutina, un antioxidante tipo flavonoide que se encuentra presente en las uvas y frutas cítricas¹³.

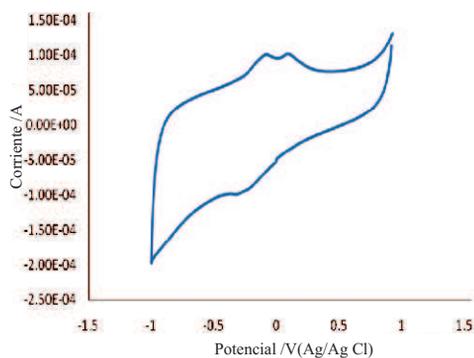


Figura 3. Voltagrama cíclico de la muestra S_A en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

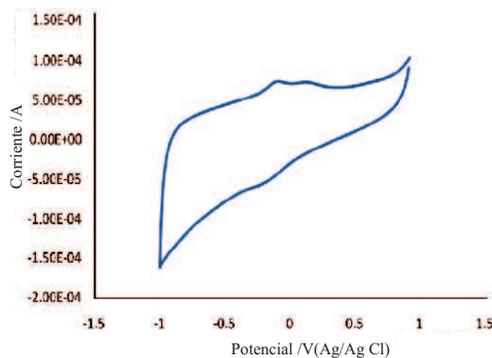


Figura 4. Voltagrama cíclico de la muestra S_B en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

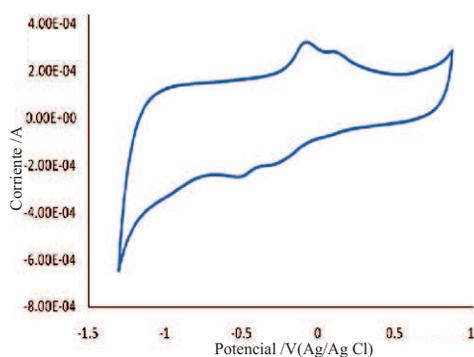


Figura 5. Voltagrama cíclico de la muestra S_C en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

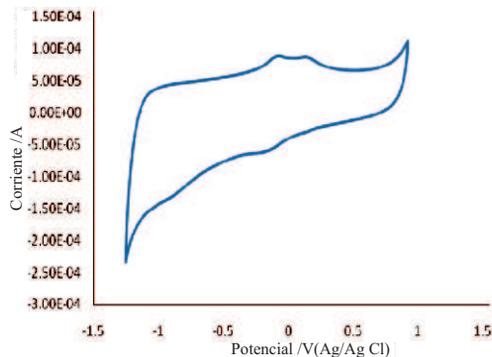


Figura 6. Voltagrama cíclico de la muestra S_D en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

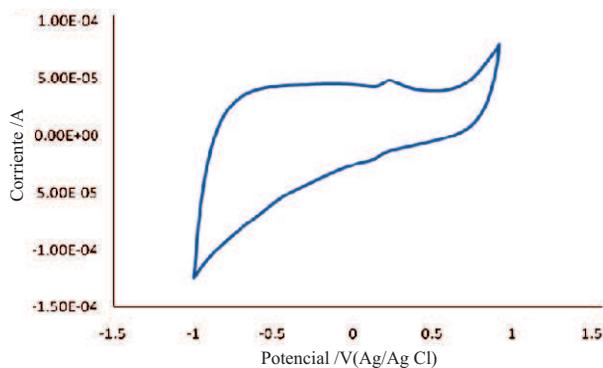


Figura 7. Voltagrama cíclico de la rutina en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

En la tabla 1 se presenta los potenciales de oxidación y sus correspondientes picos anódicos de las muestras de pisco legítimo y los de rutina (0,227 V); este último utilizado con fines comparativos.

Tabla 1. Potenciales de oxidación de muestras de pisco legítimo medidos bajo condiciones estándar*

Muestra	Pico 1 E_{pa1} (V vs. Ag/AgCl)	Pico 2 E_{pa2} (V vs. Ag/AgCl)	E descomposición E_{desc} (V vs. Ag/AgCl)
S _A	-0,082	0,094	-0,260
S _B	-0,077	0,125	-0,236
S _C	-0,082	0,096	-0,264
S _D	-0,076	0,132	-0,249
rutina	0,227	----	0,140

* Condiciones estándar: Buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v); electrodo de trabajo y auxiliar de carbono cristalino (GC) y electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M; velocidad de barrido: 100 mV/s.

En la tabla 2 se presenta el área integrada de los picos de oxidación de las muestras de piscos S_A y S_B (figuras 8 y 9) el cual es proporcional a la altura de pico (cantidad de corriente). La muestra S_A presenta mayor área por lo que presenta una mayor capacidad antioxidante en comparación de la muestra S_B.

Tabla 2. Área y corriente de los picos de oxidación de muestras de piscos legítimos

Muestra	Área	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)	Corriente inicial (A)	Corriente final (A)
S _A	1,47E-04	-0,41	0,44	5,66E-05	7,60E-05
S _B	0,69E-04	-0,41	0,44	4,85E-05	6,64E-05

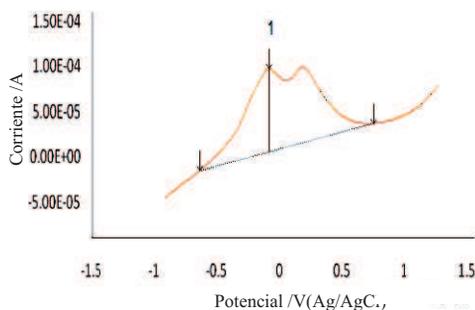


Figura 8. Altura de picos de oxidación de la muestra S_A

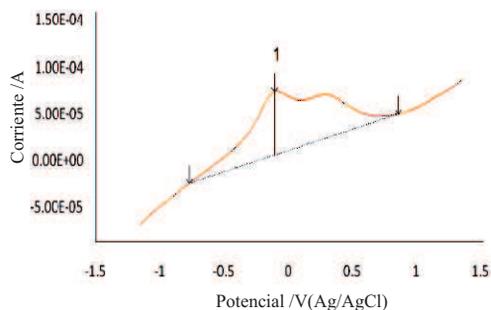


Figura 9. Altura de picos de oxidación de la muestra S_B

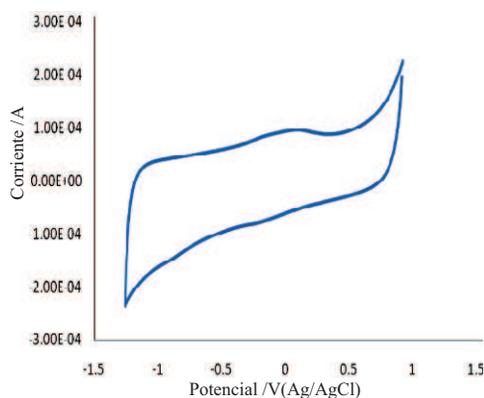


Figura 10. Voltograma cíclico de la muestra S_E en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

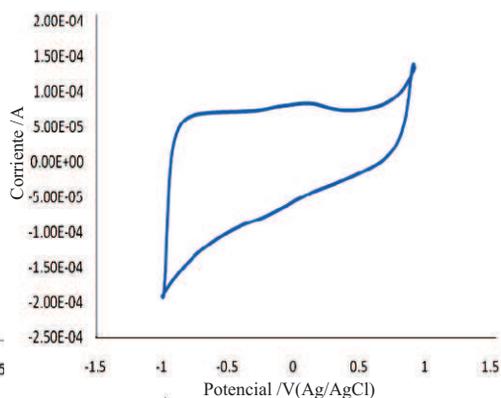


Figura 11. Voltograma cíclico de la muestra S_F en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

Las figuras 10 y 11 muestran los voltagramas de las muestras de piscos adulterados: S_E y S_F . En los gráficos no se observan picos de oxidación asignables a procesos redox debido a la ausencia de componentes electroactivos (antioxidantes).

Análisis de muestras empleando el método de neutralización del radical libre DPPH

Se ha utilizado el método de neutralización del radical libre DPPH con la finalidad de verificar los resultados obtenidos empleando el método electroquímico.

Se ha analizado las muestras de pisco legítimo S_A y S_B , pisco adulterado S_F y etanol absoluto.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 3, sólo las muestras de pisco legítimo S_A y S_B muestran actividad antioxidante. Las muestras de pisco adulterado, así como de etanol absoluto, muestran porcentajes negativos, indicando que en estas dos últimas muestras no contiene antioxidantes.

Tabla 3. Porcentaje de actividad antioxidante de muestras de piscos A, B, F y etanol al 43 % obtenida por variación de la absorbancia a 515 nm

Muestras	Absorbancia de blanco	Absorbancia de muestra	% Actividad Antioxidante
S_A	0,646	0,452	30,03
S_B	0,646	0,527	18,94
S_F	0,646	0,891	-37,94
Etanol 43 %	0,746	0,904	-21,03

En la tabla 4 se presenta los resultados comparativos de la actividad oxidante de ambos métodos, con el objetivo de normalizar los valores. Los resultados se presentan como la razón de la actividad oxidante de las muestras S_A y S_B

Tabla 4. Análisis comparativo de la actividad antioxidante de las muestras de piscos A, B, F obtenido por los métodos de neutralización de radical DPPH y voltametría cíclica

Muestras Relación S _A /S _B	Antioxidante DPPH	Antioxidante Voltametría
S _A /S _B	1,58	2,12

CONCLUSIONES

- En el análisis electroquímico por voltametría cíclica, el perfil voltamétrico obtenido de las muestras de pisco legítimo (S_A-S_D) presenta un comportamiento similar, la formación de dos picos de oxidación. El primer pico aparece entre -0,082 y -0,076 V y el segundo pico de oxidación entre 0,094 y 0,132 V, revelando la presencia de más de un compuesto antioxidante. La comparación con el perfil voltamétrico de muestras de pisco adulterado revelan que estos últimos no presentan ninguna señal de oxidación.
- Según el análisis químico por DPPH, las muestras de pisco legítimo presentaron un porcentaje de actividad antioxidante positivo mayor a 18,94 %, mientras que las muestras de pisco adulterado mostraron un porcentaje de actividad antioxidante negativa (-37,94 %), lo que indica la ausencia de compuestos antioxidantes.
- De acuerdo a la tabla 4, los resultados obtenidos mediante el método de DPPH y VC, son cercanos entre sí, mostrando que la voltametría cíclica es una buena alternativa para la identificación del pisco legítimo y cuantificación de su actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Investigación en Electroquímica Aplicada y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo brindado para la realización y presentación del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Castillo P, Lock O. *Rev Soc Quím Perú* 2005; 71 (4): 227-236.
- 2 Lock Sing O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: Fondo editorial PUCP; 1994.
- 3 Chávez R, Plaza A, Lock O. *Revista de Química* 1996; 10 (1): 71-101.
- 4 Ksenzhek O, Petrova S. *Electroanalysis* 2007; 19 (2-3): 389-392.
- 5 Ángeles MA. *Eur Food Res Technol* 2003; 216: 445-448.
- 6 Ángeles MA. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50 (11): 3112-3115.
- 7 Shleev S V. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2004, 40 (3): 304-309.
- 8 Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsellatss J. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 42: 64-69.
- 9 Larrauri J, Ruperez P, Saura-Calixto F, *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 1390-1393.
- 10 Born M, Carrupt P, Zini R, Brée F, Tillement J, Hostettmann K, Testa B. *et al. Helvetica Chimica Acta* 1996; 79: 1147-1158.
- 11 Kook L, Mbwambo Z, Chung HaSook, Luyengi L, Gamez E, Mehta R, Kinghorn D, Pezzuto J. *et al. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1998; 1: 35-46.
- 12 Zielinska D, Wiczowski W, Konrad Piskula M. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 3524-3531.
- 13 Makhotkina O, Kilmartin P. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2009; 633: 165-174.