

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES. FOLIN-CIOCALTEAU

1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.

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 la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 760 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Pesar 0,5 g de muestra en tubos de centrífuga de 30 mL. Se puede coger más cantidad de muestra en aquellas que se espere menor actividad antioxidante.

↓
Añadir 5 mL de metanol-HCl (0.2M HCl en metanol).

HCl 0.2M: 1,64 mL HCl 37% / 100 mL MetOH

↓
Tapar y agitar, protegiendo de la luz en un agitador de balanceo (15 min, 50 rpm).

↓
Colocar en ultrasonidos durante 15 min en oscuridad.

↓
Centrifugar (10 min, 10000 rpm a 4°C).

↓
Filtrar el sobrenadante (FilterLab 1300/80) (Poro 43-48 µm).

↓
EXTRACTO FINAL

3. CURVA DE CALIBRADO

✓ **Madre ÁCIDO GÁLICO (100 mg/L):**

Preparado en el propio día.

Pesar 0,01 g de Ácido gálico y disolver en 100 mL de metanol-HCl (0.2M HCl en metanol).

✓ Patrones recta calibrado:

Patrón	Conc. Patrón (mg/L)	Vol. madre Ácido gálico (μL)	Vol. MetOH-HCl (μL)	Vol. final (μL)
P1	5	25	475	500
P2	10	50	450	500
P3	20	100	400	500
P4	30	150	350	500
P5	40	200	300	500
P6	50	250	250	500
P7	60	300	200	500
P8	80	400	100	500
P9	100	500	0	500

*Se coge siempre 0.5 mL de los patrones para hacer el siguiente paso.

4. DETERMINACIÓN POLIFENOLES TOTALES

Diluir (x5) las muestras (200 μL muestra + 800 μL de metanol-0.2M HCl)



Pipetear 0,5 mL de cada muestra (extractos diluídos) en tubos de ensayo topacio de 10 mL. También para el blanco (agua destilada) y los patrones de los diferentes puntos de la recta usar 0,5 mL.



Añadir 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/10).

Diluir (1:10) la disolución de Folin-Ciocalteu con agua destilada



Mezclar y esperar 2 minutos.



Añadir 2 mL de carbonato de sodio al 7,5%.

Pesar 7,5 g de Na₂CO₃ y diluir en 100 mL de agua destilada



Homogenizar e incubar (15 min, 50°C).



Dejar enfriar a temperatura ambiente 10 minutos.



Medir la absorbancia a 760 nm.

5. CÁLCULOS

$$\left[\left(\frac{X \text{ mg recta}}{L \text{ extracto}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{5 \text{ mL extracto polifenoles}}{P \text{ (g)muestra}} \right) \times 5 (\text{dilución}) \times 100 \right] = \text{mg ácido gálico/100 g muestra}$$