

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

1.- INTRODUCCIÓN

El presente método colorimétrico permite el análisis de compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (polifenoles, ácido tánico, taninos, ácido clorogénico, etc.).

El método permite medir contenidos de compuestos fenólicos comprendidos entre 500 mg/kg y 5000 mg/kg. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que los distintos compuestos analizables presentan diferentes coeficientes de extinción molar (ver nota 8.1); asimismo, debe tenerse en cuenta que muchos compuestos reductores son también reactivos, por lo que debe tenerse siempre en cuenta la posible presencia de sustancias interferentes.

2.- PRINCIPIO

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato) a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de una determinación espectrofotométrica a 760 nm.

3.- MATERIAL

- Matraces aforados.
- Pipetas.
- Tubos de ensayo

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

- Vasos de precipitados, embudos, y otro material general de laboratorio.

El material de vidrio a utilizar deberá estar completamente limpio, debiendo enjuagarse previamente a su utilización con agua desmineralizada, con la propia muestra o con el reactivo a utilizar según sea el caso.

El material volumétrico a utilizar deberá ser siempre de clase A.

4.- APARATOS

- Balanza analítica, capaz de pesar con precisión de 0,1 mg.
- Espectrofotómetro UV/Vis.

5.- REACTIVOS

- Agua desmineralizada de calidad ISO tipo I (Milli Q o equivalente)
- Acetona
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N
- Acido tánico
- Carbonato sódico

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

- Filtros de membrana de PTFE o PVDF de 30 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,45 µm

Todos los reactivos a utilizar deberán ser de calidad P.A. y deberán ser chequeados mediante la realización de un análisis en blanco para comprobar que no contienen compuestos que puedan dar lugar a interferencias.

6.- PROCEDIMIENTO

6.1.- Preparación de disoluciones

6.1.1.- Preparación de la disolución de carbonato sódico 0,7 M

Se pesan 74,19 gramos de carbonato sódico, se disuelven en aproximadamente 750 ml de agua desmineralizada calentando ligeramente si fuese necesario. Se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente y se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada.

6.1.2.- Preparación de la disolución madre de ácido tánico de 500 mg/l

Se pesan 50 mg de ácido tánico y se disuelven en 100 ml de acetona/ agua 1:1 (v/v).

Esta disolución es estable durante tres meses, conservada en frío y al abrigo de la luz.

6.1.3.- Preparación de la disolución patrón de ácido tánico de 50 mg/l

Se diluyen 10 ml de la disolución madre de ácido tánico, preparada según 6.1.2, a 100

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

ml con acetona/agua 1:1 (v/v).

6.2.- Preparación de las muestras

Se pesan 100 mg de muestra seca, previamente cortada en fragmentos de 1 mm aproximadamente y se extraen con 10 ml de mezcla acetona/agua, manteniéndolas en obscuridad y a temperatura ambiente durante veinticuatro horas. Los extractos se filtran a través de una membrana de PTFE o PVDF (ver nota 8.2) de 0,45 µm

6.3.- Preparación de la curva de calibrado

En una serie de tubos de ensayo se introducen sucesivamente:

	B	I	II	III	IV	V	VI	VII
Solución patrón de ácido tánico (ml)	0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1
Acetona/agua 1:1 (ml)	1	0,9	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0
Reactivo de Folin-Ciocalteu (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2
Disolución de carbonato (ml)	8	8	8	8	8	8	8	8
Correspondencia en µg/ml de fenoles	0	5	10	20	25	30	40	50

Agitar el contenido de los tubos, esperar treinta minutos para que se desarrolle el color y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Trazar la curva de calibrado concentración/absorbancia.

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

6.4.- Análisis de los extractos

Se toma una alícuota de 1 ml de la muestra filtrada y se añaden sucesivamente y por este orden 2 mililitros de reactivo de Folin-Ciocalteu y a los dos minutos 8 mililitros de disolución de carbonato sódico (ver nota 8.3), y se deja desarrollar el color de la forma que se ha descrito para la curva de calibrado. Efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 760 nm e interpolar los valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración de compuestos fenólicos en el extracto.

7.- CÁLCULOS

El contenido de compuestos fenólicos, expresado en µg de ácido tánico por g de muestra, se obtiene por medio de la ecuación:

$$\text{Contenido} = \frac{C_{ex} \times V_{ex}}{P_m} \times 1000$$

Donde P_m es el peso de muestra utilizado, V_{ex} es el volumen de extracto utilizado y C_{ex} la concentración encontrada en el extracto.

8.- OBSERVACIONES

8.1.- Las distintas sustancias fenólicas reaccionan de forma diferente con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando una intensidad de color que depende de su composición química. Así pues si se conoce la naturaleza de los compuestos presentes en la muestra puede ser conveniente la

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

utilización de un patrón más acorde con la naturaleza de dichos compuestos.

8.2.- No deben utilizarse membranas de nylon u otros materiales que puedan ser adsorbentes para los fenoles. En caso de duda puede comprobarse la adsorción por parte de un material concreto comparando las absorbancias de una muestra antes y después de la filtración.

8.3.- El reactivo de Folin-Ciocalteu debe añadirse antes que la disolución alcalina para evitar la oxidación de los fenoles por el aire.

9.- EXCEPCIONES

No procede.

10.- CLAUSULA DE ESCAPE

De existir algún problema acudir al técnico responsable.

11.- REVISIONES

Una vez al año salvo introducción de modificaciones.

TÍTULO: Determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

12.- RESPONSABILIDADES

El operario es responsable del seguimiento de este PNT.

13.- DOCUMENTACIÓN

1.- Z. Yu and R.A. Dahlgren. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, Vol. 26, pp. 2119-2140.

2.- E.A Ainsworth and K.M. Gillespie. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007, Vol. 2, pp. 875-877.