

## Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

### **Optimización y Validación de un Método a Microescala para la Cuantificación de Fenoles Totales en extractos vegetales**

### **Optimization and Validation of a Microscale Method for the Quantification of Total Phenols in Plant Extracts**

Authors/Autores: Pérez Guillen, C., Alanís Garza, B.A., Portillo Castillo, O.J., Salazar Aranda, R.

ID: e1863

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1863>

Received/Fecha de recepción: December 18<sup>th</sup> 2024

Accepted /Fecha de aceptación: June 06<sup>th</sup> 2025

Available online/Fecha de publicación: June 20<sup>th</sup> 2025

*Please cite this article as/Como citar este artículo:* Pérez Guillen, C., Alanís Garza, B.A., Portillo Castillo, O.J., Salazar Aranda, R. (2025). Optimization and Validation of a Microscale Method for the Quantification of Total Phenols in Plant Extracts. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1863. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1863>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

## Optimización y Validación de un Método a Microescala para la Cuantificación de Fenoles Totales en extractos vegetales

## Optimization and Validation of a Microscale Method for the Quantification of Total Phenols in Plant Extracts

Cuantificación de Fenoles Totales en Microplaca/

Quantification of Total Phenols in Microplate

Pérez Guillen, C., Alanís Garza, B.A. ([ID 0000-0002-4760-2223](https://orcid.org/0000-0002-4760-2223)), Portillo Castillo, O.J. ([ID 0000-0002-7690-2153](https://orcid.org/0000-0002-7690-2153)), Salazar Aranda, R \* ([ID 0000-0001-7448-5256](https://orcid.org/0000-0001-7448-5256))

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica. Ave. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Mitras Centro. C.P. 64460. Monterrey, N. L. México.

\*Corresponding Author:

Ricardo Salazar-Aranda. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica. Ave. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Mitras Centro. C.P. 64460. Monterrey, N. L. México. Teléfono: (81) 8329 4185. E-mail: [ricardo.salazarar@uanl.edu.mx](mailto:ricardo.salazarar@uanl.edu.mx)

### RESUMEN

Los compuestos fenólicos se encuentran en las plantas y poseen una alta capacidad antioxidante. Se han reportado diversas metodologías para la Cuantificación de Fenoles Totales, sin embargo, es común que no se evalúe el efecto que tienen las pequeñas modificaciones de las diversas variables involucrados en el procedimiento. Por este motivo, en este trabajo se propuso optimizar las diversas variables del análisis, realizar la validación y evaluar su aplicación en extractos de plantas. Se seleccionó el agua como medio de disolución y se redujo el volumen de reacción hasta 200  $\mu$ L. Se optimizó el volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu (33.5  $\mu$ L), el volumen de carbonato de sodio al 20 % (86.5  $\mu$ L) y el tiempo de reacción (46.5 min). Bajo estas condiciones se realizaron curvas de calibración y se estableció la linealidad, la precisión y la exactitud, el Límite de Detección y Límite de Cuantificación. Se evaluó la robustez del método y el efecto de la matriz, determinando que el método es robusto, pero existe interferencia de la matriz. Se concluyó que la cuantificación se debe realizar por una curva de adición estándar.

### PALABRAS CLAVE:

Fenoles Totales; Folin-Ciocalteu; Optimización en Microplaca; Validación en Microplaca.

### ABSTRACT

Phenolic compounds are found in plants and possess a high antioxidant capacity. Many methodologies have been reported for total phenol quantification; however, the effect of small modifications in the various variables involved in the procedure is often not evaluated. Hence, this work proposes to optimize the various variables of the analysis, perform validation, and evaluate its application in plant extracts. Water was chosen as the dissolution medium, and the reaction volume was reduced to 200  $\mu$ L. The volumes of the Folin-Ciocalteu reagent (33.5  $\mu$ L) and 20 % sodium carbonate (86.5  $\mu$ L), as well as the reaction time (46.5 min), were optimized. Under these conditions, calibration curves were created, and linearity, precision, accuracy, detection limit, and quantification limit were established. The robustness of the method and the effect of the matrix were evaluated, revealing that the method is robust, although there is matrix interference. It was concluded that quantification should be performed using a standard addition curve.

## KEYWORDS

Total Phenols; Folin-Ciocalteu; Microplate Optimization; Microplate Validation.

## Introducción

Un antioxidante es un compuesto que, a bajas concentraciones, previene o disminuye la oxidación. Esta acción tiene una gran importancia biomédica, ya que se ha demostrado su utilidad en el tratamiento de importantes enfermedades como cáncer, Alzheimer, Parkinson, diabetes, artritis reumatoide, entre otras; así como diversas propiedades como neuro, nefro, hepato y cardio protectoras, incluso los antioxidantes se utilizan como tratamientos anti-edad o antienvjecimiento, etc. (Liu *et al.*, 2018).

Este tipo de compuestos se encuentran abundantemente en el reino vegetal, en forma de compuestos fenólicos y son consumidos en la dieta. Por esta razón muchos trabajos se han enfocado en el estudio de productos vegetales de consumo diario para identificar, cuantificar y confirmar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Ponnampalam *et al.*, 2022). La ruta biosintética de los compuestos fenólicos es común en bacterias, hongos, plantas y animales, e involucran la vía de los policétidos junto con la vía del ácido siquimico. Los compuestos fenólicos o polifenólicos se clasifican de acuerdo con el tipo y número de anillos fenólicos que contienen y la forma en que estos se unen. En general son 4 tipos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Pandey & Rizvi, 2009). Los compuestos polifenólicos pueden desempeñar su actividad antioxidante a través de diferentes mecanismos de acción: capturando radicales libres, disminuyendo el oxígeno singulete, quelando metales de transición, inhibiendo enzimas, etc. (Mucha *et al.*, 2021).

Aunque la Cuantificación de Fenoles Totales, forma parte de los parámetros para describir la Capacidad Antioxidante de un material vegetal, determinar un alto contenido de Fenoles Totales no significa que posean una actividad antioxidante alta; para verificarlo es necesario realizar otro tipo de evaluaciones antioxidantes que involucren diversos mecanismos como son: la remoción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo o N,N-dimetil-p-fenilendiamina, la remoción de especies reactivas de



(2002). El método en tubo se realizó con los estándares: pirocatecol, ácido gálico, quercetina y trolox, en todos los casos se prepararon por triplicado disoluciones de 1000 ppm en etanol a 8 niveles de concentración (17.86 – 0.14 ppm). En la Tabla 1, aparece el procedimiento general del ensayo. Se obtuvieron las curvas de regresión lineal por mínimos cuadrados con las absorbancias obtenidas a cada nivel de concentración.

**Tabla 1. Método de Folin-Ciocalteu en tubo.**

Concentración final de estándar (17.86 – 0.14 ppm)	100 µL
Agua destilada	3 mL
Reactivo de Folin-Ciocalteu	0.5 mL
Incubar	3 min
carbonato de sodio (20 %)	2 mL
Incubar	60 mim
** Medir la absorbancia	750 nm

\*\* Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s. Thermo Scientific.

### Aplicación del Método en tubo.

Se seleccionaron 5 extractos de plantas existentes en el laboratorio, los cuales se obtuvieron en estudios previos a partir de plantas colectadas en el Noreste de México (Rodríguez-Martínez, 2018): *Tecoma stans*, *Malus pumila*, *Chrysactinia mexicana*, *Eucalyptus globulus* y *Quercus virginiana*. En todos los casos, la parte aérea de las plantas se secó, molió y conservó en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta su extracción. Se realizaron 3 extracciones hidroalcohólicas de 100 g de polvo de la planta con 100 mL de solución durante 20 min. El extracto obtenido se llevó a sequedad en rotavapor a 37 °C. El extracto resultante se almacenó en frasco ámbar bajo oscuridad, se selló bajo atmósfera de nitrógeno y se mantuvo en refrigeración (2 – 4 °C), hasta su uso.

Se preparó una disolución de cada extracto a concentración de 1000 ppm en 1 mL de etanol, y 2 diluciones seriadas 1:2. Cada solución se sometió al procedimiento para la Determinación de Fenoles Totales en tubo. Se interpoló la absorbancia en la curva de calibración de ácido gálico y se calculó el Contenido de Fenoles Totales expresados como miligramos equivalentes a Ácido Gálico (GAE) por cada gramo de extracto. Cada extracto se evaluó por triplicado.

### Selección del Solvente.

Se aplicó el procedimiento para la Determinación de Fenoles Totales en tubo a disoluciones de 1 mL de ácido gálico (1000 ppm) tanto en etanol como en Dimetilsulfóxido (DMSO al 0.05 % en agua). Se utilizó la concentración de 4.46 ppm de ácido gálico en cada disolvente para obtener un barrido espectral en el rango de 300 a 800 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s (Thermo Scientific). Se midieron las absorbancias de cada curva a la longitud de onda de máxima absorción correspondiente.

## Determinación de Fenoles Totales a Microescala.

Se redujeron los volúmenes de cada reactivo utilizado en el método de Macrodilución hasta un volumen final de mezcla de reacción de 200  $\mu\text{L}$ , sin modificar las concentraciones finales de cada reactivo, aunque se variaron los niveles de concentración final del estándar entre 4 y 20 ppm. En la Tabla 2 aparece el procedimiento general para el método en microplaca, con los volúmenes en cada pozo de reacción. Bajo estas condiciones se realizó una curva de calibración a 5 niveles de concentración entre 4 y 20 ppm por triplicado y en días diferentes.

**Tabla 2. Reducción de valores de variables para el método de microplaca**

Factor o variable	bueno
Concentración final de ácido gálico (20 – 4 ppm) ( $\mu\text{L}$ )	20
Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	90
Reactivo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )	20
incubar (min)	3
carbonato de sodio 20 % ( $\mu\text{L}$ )	70
Incubar (min)	60
* Medir absorbancia (nm)	750

\* Lector de microplacas Multiskan fc. Thermo Scientific

## Diseño de Experimentos: Simplex Secuencial Básico.

Las variables del método a optimizar fueron: la cantidad de Reactivo de Folin-Ciocalteu, la cantidad de carbonato de sodio al 20 % y el tiempo de reacción. Inicialmente se realizó el rastreo de las variables con efecto significativo en la respuesta. Con este propósito se trabajó con diseño de Simplex Secuencial Básico, que consistió en una matriz de 4 experimentos con 3 variables. Los valores de las variables de los 4 experimentos aparecen en la Tabla 3. Cada experimento se realizó por duplicado tanto para la concentración de 20 ppm como de 4 ppm de ácido gálico. En todos los casos se completó el volumen final de cada pozo a 200  $\mu\text{L}$  con agua destilada y después del tiempo de reacción, se tomó la absorbancia a 750 nm en el lector de microplacas Multiskan fc. Thermo Scientific.

De acuerdo con las reglas del Simplex (Granados-Guzmán *et al.*, 2017), se compraron las respuestas de la medida y se descartó el experimento con la respuesta más baja. Posteriormente se calcularon los nuevos valores de cada variable para un nuevo experimento, utilizando la siguiente fórmula:

$$V_N = (2 * X_{\text{óptima}}) - (V_{\text{baja}})$$

$V_N$  = Nuevo valor para cada factor.

$X_{\text{óptima}}$  = valor promedio de los factores que produjeron una respuesta óptima.

$V_{\text{baja}}$  = valor que produjo la respuesta más baja.

**Tabla 3. Diseño de los experimentos 1 a 4**

Experimento	Tiempo de incubación (min)	Volumen de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de carbonato de sodio ( $\mu\text{L}$ )
1	80	20	70
2	60	20	70
3	40	18	70
4	40	6	55

### Validación del método optimizado.

La validación analítica del método optimizado se realizó mediante la construcción de curvas de calibración de estándar externo de ácido gálico a 5 niveles de concentración (4 - 20 ppm) por triplicado y en diferentes días. Se estableció la linealidad, la precisión intra e Inter día a cada nivel de concentración, la exactitud mediante el recálculo de la concentración de estándares a 3 niveles de concentración, mientras que los límites de detección y cuantificación con las absorbancias de 30 blancos utilizando las fórmulas:  $3 SD_b/m$  o  $10 SD_b/m$ , respectivamente, donde  $SD_b$  es la desviación estándar de las lecturas de los blancos y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración obtenida.

Se evaluó la robustez de cada condición modificando los volúmenes del reactivo Folin-Ciocalteu (33 y 34  $\mu\text{L}$ ), la concentración de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (19 y 21 %) así como el tiempo de reacción (46 y 47 min).

El efecto de la matriz se evaluó utilizando una disolución de extracto de *Tecoma stans* (1000 ppm) adicionado con ácido gálico (200 ppm), se prepararon diluciones hasta llegar a obtener el intervalo de concentraciones finales de ácido gálico entre 4 a 20 ppm, la curva se realizó por triplicado y en 3 días diferentes.

### Aplicación.

El método en microplaca optimizado y validado se aplicó a 30 extractos de plantas existentes en el laboratorio, los cuales habían sido obtenidos para estudios previos a partir de plantas colectadas en el Noreste de México (descrito antes). Se construyeron curvas de adición de estándar de ácido gálico (0 - 16 ppm) en 4  $\mu\text{L}$  de una solución de extracto (1000 ppm), para evaluar el efecto de matriz, y se siguió el protocolo que aparece en la Tabla 4.

A partir de la curva obtenida por adición de estándar, se estableció la concentración (ppm) de ácido gálico en los 4  $\mu\text{L}$  de extracto (1000 ppm). Posteriormente se calculó el Contenido de Fenoles Totales expresados como miligramos equivalentes a Ácido Gálico (GAE) por cada gramo de extracto.

**Tabla 4.** Método de microplaca por curva de adición estándar.

Condición o variable	Valor
<i>Extracto de Tecoma stans</i> (1000 ppm)	4 $\mu$ L
Ácido gálico (concentración final 0-16 ppm) en agua destilada	76 $\mu$ L
Reactivo de Folin-Ciocalteu	33.5 $\mu$ L
Incubar	3 min
Carbonato de sodio 20 %	86.5 $\mu$ L
Incubar	46.5 min
* Medir absorbancia	750 nm

### Análisis Estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres días diferentes, excepto en el Método Simplex Secuencial Básico. Se realizó la comparación de curvas de calibración utilizando un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA  $p < 0.05$ ). Se compararon los resultados obtenidos con el método inicial y final utilizando una Prueba  $t$  de student ( $\alpha > 0.05$ ).

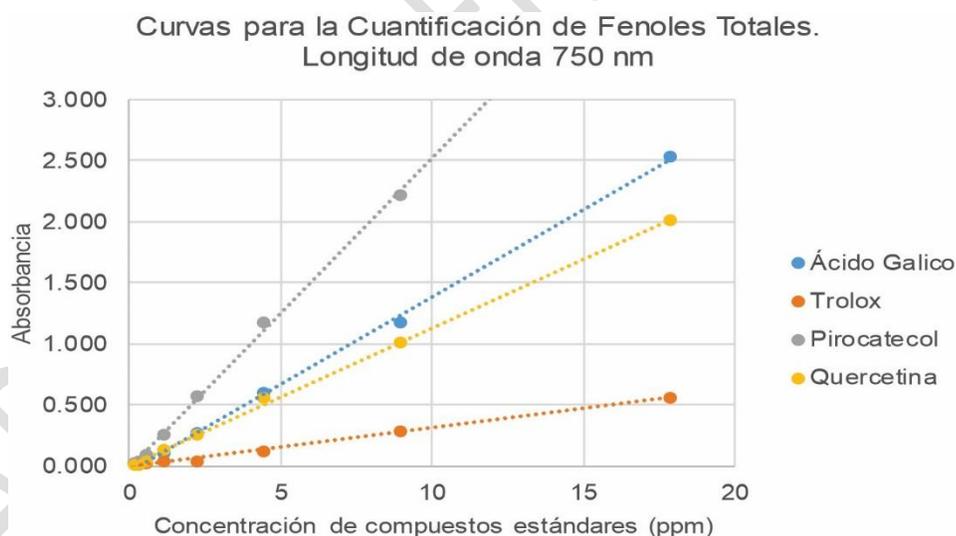
### Resultados y Discusión

El Contenido de Fenoles Totales presentes en un extracto puede explicar la actividad antioxidante de un producto vegetal por lo que es importante reportar el valor estimado dentro de su caracterización (Ponnampalam *et al.*, 2022). Sin embargo, el método para la Determinación de Fenoles Totales puede presentar algunas limitaciones que se deben evaluar en cada laboratorio y resolver antes de reportar la determinación (Martins *et al.*, 2021).

### Determinación de Fenoles Totales en tubo.

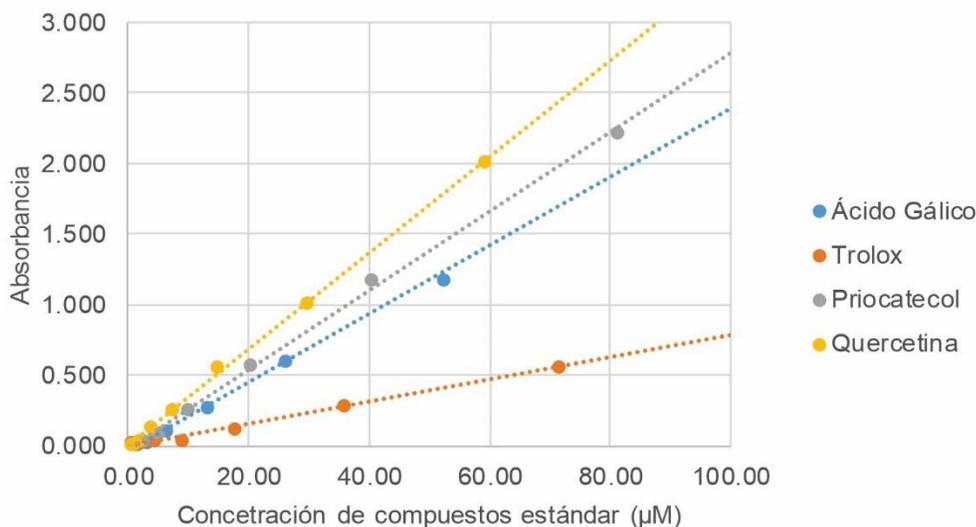
Un problema común en los diversos reportes es la homogeneidad del estándar utilizado, se ha reportado el uso de pirocatecol, ácido gálico, quercetina, trolox, entre otros compuestos fenólicos (Pérez *et al.*, 2023). Como se mencionó anteriormente, este método se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, por tanto, cada uno de los estándares va a producir un grado diferente de reducción y en consecuencia los valores en cada reporte serán distintos y no se podrán comparar. La capacidad de reducción de cada compuesto está íntimamente relacionada con su estructura química (Pérez *et al.*, 2023). El pirocatecol es el más claro ejemplo de un compuesto fenólico, en su estructura tiene un grupo fenólico más que el propio fenol, el ácido gálico tiene 3 grupos fenólicos y un grupo carboxílico como sustituyentes del anillo, la quercetina tiene una estructura más compleja, pues tiene un núcleo flavonoide con 5 grupos fenólicos, mientras que el trolox tiene un anillo fenólico polisustituido (Pérez *et al.*, 2023).

En la Figura 2 aparecen las curvas de calibración obtenidas en unidades de concentración en ppm. Se calcularon las concentraciones molares de cada estándar, en la Figura 3, se muestran las curvas en unidades micromolares ( $\mu\text{M}$ ). Todas las curvas obtenidas tuvieron valores de pendiente e intervalos lineales diferentes, estos valores están relacionados con la estructura de cada compuesto y en consecuencia con su respuesta (absorbancia). La curva obtenida para pirocatecol presentó el valor más alto de la pendiente ( $m = 0.2547$ ) en un intervalo lineal ( $R^2 = 0.9987$ ) entre 0.14 a 8.93 ppm, equivalente a 1.27 a 81  $\mu\text{M}$ , a concentraciones mayores se perdió la linealidad. Las curvas obtenidas para ácido gálico como para quercetina mostraron valores de pendiente de  $m = 0.1428$  y  $m = 0.113$ , respectivamente, con el intervalo lineal más amplio de 0.14 a 17.86 ppm, correspondientes a 0.82 a 104  $\mu\text{M}$  para ácido gálico ( $R^2 = 0.9966$ ) y 0.46 a 59.09  $\mu\text{M}$  para quercetina ( $R^2 = 0.997$ ); podría pensarse que sería necesario incluir concentraciones mayores a 17.86 ppm (59.09  $\mu\text{M}$ ) para quercetina pues tiene el peso molecular más alto de los estándares analizados, pero los valores de absorbancia a la más alta concentración, fueron alrededor de 2. La curva con trolox presentó el valor más bajo de la pendiente ( $m = 0.0335$ ) con el intervalo lineal ( $R^2 = 0.9902$ ) más corto que incluyó los niveles más altos de concentración de 2.23 a 17.86 ppm equivalentes a 8.91 a 71.36  $\mu\text{M}$ , este resultado es el esperado, pues el trolox tiene solo un grupo fenólico y también tiene un peso molecular alto, por lo que se necesitó una mayor cantidad del compuesto para producir valores de absorbancia proporcionales a los otros compuestos.



**Figura 2. Curvas de Fenoles Totales por el método del tubo con Reactivo de Folin-Ciocalteu. Concentración en ppm de compuestos fenólicos. Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en Programa Excel.**

Curvas para la Cuantificación de Fenoles Totales.  
Longitud de onda 750 nm.



**Figura 3. Curva de Fenoles Totales por el Método del Tubo con Reactivo de Folin-Ciocalteu. Concentración molar de compuestos fenólicos. Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en Programa Excel.**

Con base a los resultados anteriores se seleccionó el ácido gálico como el estándar que presenta la mejor linealidad y respuesta analítica en función de la concentración. Por lo tanto, con este compuesto se desarrollaron los siguientes experimentos.

Se realizó la Determinación de Fenoles Totales en 5 extractos vegetales, mediante el procedimiento en tubo, utilizando la curva de calibración construida con ácido gálico. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para cada extracto y se compararon con los encontrados en reportes previos, excepto para *Chrysactinia mexicana* porque no se encontró ningún reporte hasta donde pudimos buscar.

**Tabla 5. Contenido total de fenol en extractos de plantas por triplicado con el método del tubo.**

Extracto de plantas	mg GAE/g	Referencias	mg GAE/g
<i>Tecoma stans</i>	117.66 ± 2.04	Sbihi <i>et al.</i> , 2015	1.68 in seeds
<i>Malus pumila</i>	129.49 ± 3.10	Ko <i>et al.</i> , 2022	0.40
<i>Chrysactinia mexicana</i>	186.55 ± 3.48		
<i>Eucalyptus globulus</i>	212.43 ± 4.65	Rodríguez-Solana <i>et al.</i> , 2016	36.12
<i>Quercus virginiana</i>	262.14 ± 3.33	Valero-Galván <i>et al.</i> , 2021	29.4

GAE: Equivalente de ácido gálico

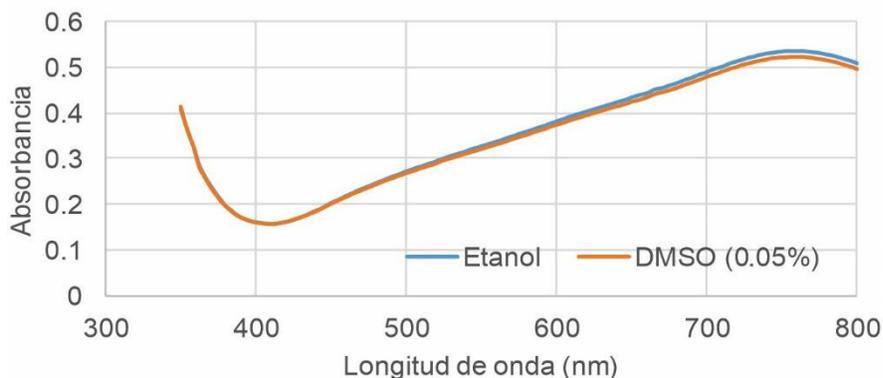
Para aquellos casos en donde se encontró información previamente reportada, los resultados fueron mucho menores que los determinados en este trabajo, esto puede deberse al procedimiento que utiliza cada grupo de trabajo. Por ejemplo, Ko & Ku, (2022), así como Valero-Galván *et al.*, (2021), utilizan un volumen más bajo de carbonato de sodio en comparación con nuestro procedimiento, esto hace que la concentración final de este reactivo en el medio sea baja y por tanto el pH no sea lo suficientemente alcalino, para llevar a cabo la reacción de forma completa, además ellos reportan tiempos de reacción más cortos y longitudes de onda de absorción más bajas, lo cual repercute directamente en las respuestas obtenidas.

### Selección del disolvente.

A pesar de obtener buenos resultados, confiables y reproducibles, actualmente es necesario diseñar métodos químicos amigables con el medioambiente, por lo que es recomendable tomar en cuenta la cantidad de reactivos utilizados, así como su peligrosidad y toxicidad. El disolvente utilizado en el método de macordilución y comúnmente reportado para la Cuantificación de Fenoles Totales en extractos naturales es el etanol, ya que los polifenoles de estructuras más complejas (taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos) son insolubles en agua (Valencia-Avilés, 2017). El uso de agua destilada también se ha reportado en la Cuantificación de Fenoles Totales, aunque existe controversia por la misma razón (Pérez *et al.*, 2023). Para solucionar la baja o nula solubilidad de polifenoles en agua, consideramos utilizar una pequeña cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver y luego llegar al volumen deseado con la adición de agua. Para comparar el desempeño de los dos disolventes, se prepararon curvas de calibración con ácido gálico utilizando como disolvente etanol o DMSO (0.05 % en agua), a los niveles de concentración del intervalo lineal (17.86 – 0.14 ppm), mediante el protocolo del método para la Determinación de Fenoles Totales en tubo. Es importante señalar que, antes de medir las absorbancias, se obtuvieron los espectros del ácido gálico en cada disolvente y como puede verse en la Figura 4, no encontraron diferencias en los espectros obtenidos.

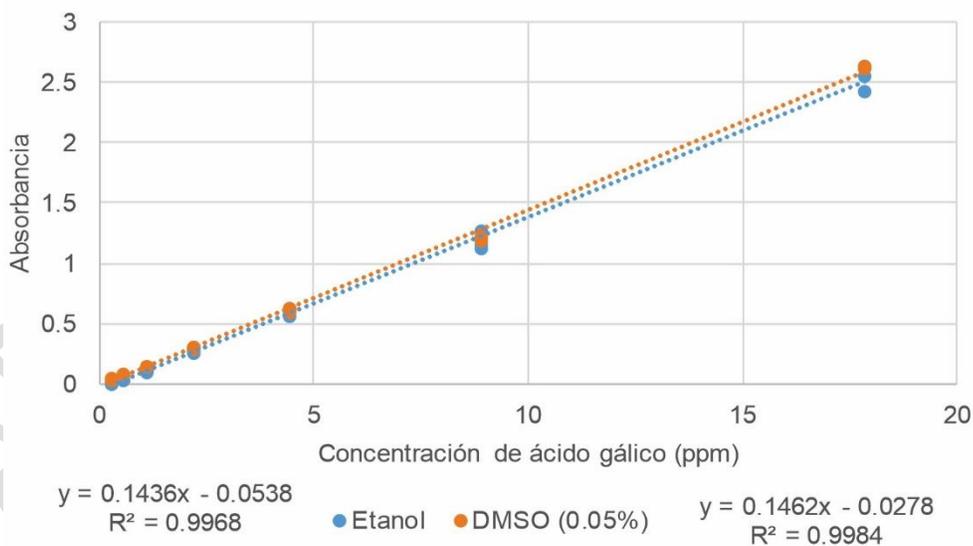
Después, se midieron las absorbancias de cada estándar, se construyeron las curvas de calibración, se obtuvieron las gráficas y las ecuaciones correspondientes. Ambas curvas de calibración fueron lineales y presentaron valores de pendientes similares (Figura 5). El conjunto de absorbancias obtenidas a los diferentes niveles de concentración se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ellas, por lo tanto, el agua puede ser usado como disolvente para este ensayo con el mismo desempeño analítico que el etanol, con la ventaja que el agua es un reactivo más económico y menos tóxico.

### Espectro de absorción Reacción del Reactivo Folin-Ciocalteu Ácido gálico



**Figura 4.** Espectros de absorción obtenidos a partir de la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con ácido gálico en etanol y en DMSO (0,05 % en agua). Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados de los espectros UV-vis y graficados en el programa Excel.

### Curva de Calibración de Reducción de Folin-Ciocalteu por Ácido Gálico



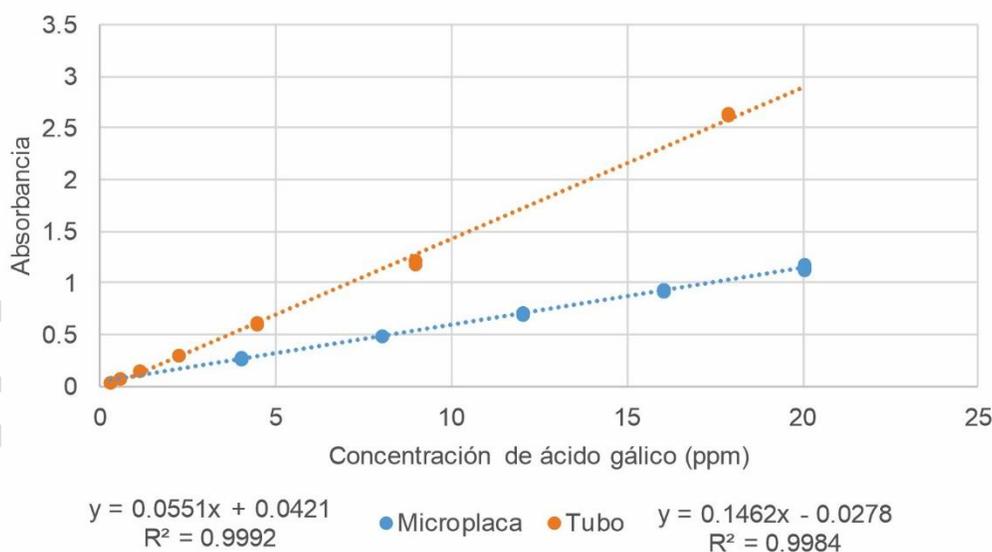
**Figura 5.** Curva de calibración obtenida a partir de la reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu en etanol y DMSO (0,05 % en agua) utilizando el método del tubo. Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en Programa Excel.

### Determinación de Fenoles Totales en microplaca.

Oresanya *et al.*, (2024) así como Ko & Ku (2022), reportaron el uso de un método en microplaca para la Cuantificación de Fenoles Totales en extractos de plantas, sin embargo, cada uno refiere un artículo previo, en el que se usó un método en tubo; pero no reportan la evaluación del efecto de esta modificación sobre la respuesta. Realizar el método a microescala, permite tener un procedimiento más económico, sencillo, menos tóxico y rápido, ya que la medición de absorbancias puede realizarse en un lector de microplacas de forma simultánea; estas características lo convierten en un método de alta eficiencia (Granados-Guzmán *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, en el método en tubo utilizó un volumen final de 5.6 mL, por lo que en esta parte experimental del trabajo quisimos reducir el volumen final hasta 200  $\mu\text{L}$ , con este propósito se escalaron proporcionalmente los volúmenes de cada disolución. El volumen del estándar resultó en una cantidad muy pequeña (3.57  $\mu\text{L}$ ) por lo que se decidió aumentar el volumen de la solución del estándar hasta 20  $\mu\text{L}$  y reducir el volumen del agua hasta 90  $\mu\text{L}$ , manteniendo constantes las concentraciones finales del estándar. Además, se ajustaron los volúmenes del reactivo Folin-Ciocalteu a 20  $\mu\text{L}$  y de carbonato de sodio a 70  $\mu\text{L}$ . Bajo estas condiciones se obtuvo una curva de calibración lineal en el intervalo evaluado, pero los valores de absorbancias y, por tanto, el valor de la pendiente fueron diferentes a los obtenidos en el método en tubo (Figura 6).

Curvas de calibración de reducción de Folin-Ciocalteu por el ácido gálico en agua, tanto en tubo como en microplaca.



**Figura 6. Curva de calibración obtenida a partir de la reacción del ácido gálico con el Reactivo de Folin-Ciocalteu en DMSO (0,05 % en agua) utilizando los métodos de tubérculo y microplaca.** Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en Programa Excel.

Posiblemente este efecto es el resultado de la modificación de utilizar un volumen muy pequeño de Reactivo de Folin-Ciocalteu, por lo que la cantidad de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico son pequeñas en comparación con el método en tubo, y por tanto sus absorbancias son más bajas.

### Diseño de Experimentos.

Se realizó un Simplex Secuencial Básico con el propósito de encontrar las mejores condiciones que permitieron ampliar la ventana de absorbancias entre los extremos del intervalo lineal (4 ppm y 20 ppm) para aumentar la sensibilidad. Las variables que se optimizaron fueron: el volumen de Reactivo de Folin-Ciocalteu, el carbonato de sodio al 20 % y el tiempo de reacción. El pH, definitivamente es una variable que afecta el resultado, sin embargo, es necesario mantenerlo constante para garantizar la reacción en todos los ensayos.

Los experimentos se realizaron por duplicado y se obtuvo el promedio de las absorbancias en ambos niveles de concentración (4 ppm y 20 ppm). Se calculó la diferencia entre las absorbancias, que nos indica la ventana de absorbancias que se puede utilizar para realizar la interpolación. Es decir, entre mayor sea la ventana, más confiabilidad tendremos al interpolar para determinar la concentración de Fenoles Totales. Después de obtener los resultados de los experimentos 1 a 4 (primer conjunto de experimentos), se descartó aquel que presentó la diferencia más baja, ya que se consideró como el experimento con las condiciones no adecuadas para el objetivo de los experimentos. Se calcularon las condiciones de un nuevo experimento y se realizó. Nuevamente se compararon y descartó el peor experimento. Este procedimiento de comparar los resultados, eliminar el experimento con las más bajas respuestas, aplicar la fórmula y calcular nuevos valores para nuevos experimentos, se realizó hasta llegar al experimento 9. Todos los resultados aparecen en la Tabla 6, incluyendo el orden en el que se descartó cada experimento.

**Tabla 6. Resultados del diseño experimental.**

Exp	Tiempo de incubacion (min)	Volumen de folin-Ciocalteu (µL)	Volumen de carbonato de sodio (µL)	4 ppm (Abs)	20 ppm (Abs)	Diferencia en absorbancias	Orden de eliminación
1	80	20	70	0.231	0.973	0.742	2
2	60	20	70	0.226	0.982	0.756	4
3	40	18	70	0.205	0.954	0.749	3
4	40	6	55	0.204	0.827	0.623	1
5	50	32.66	85	0.197	1.014	0.817	5
6	20	27.3	80	0.29	1.202	0.912	
7	46.66	33.3	86.6	0.331	1.367	1.036	
8	17.7	43.8	97.7	0.317	1.231	0.914	
9	6.24	38.14	91.28	0.207	0.745	0.538	6

Al comparar los resultados obtenidos con el último conjunto de experimentos (6, 7, 8 y 9), se determinó que las más bajas respuestas fueron del experimento 9. De acuerdo con las reglas del Simplex Secuencial Básico, si el nuevo experimento (9) es el que resulta con las peores condiciones se debe descartar. Posteriormente se debe tomar como el peor experimento aquel que resulta con las siguientes peores condiciones, para calcular las nuevas condiciones. Sin embargo, al revisar las diferencias de los otros experimentos (6 y 8) fueron casi iguales entre ellos, además el experimento 7, fue el mejor de todos los experimentos, proporcionando la diferencia de absorbancias más alta: 1.036. Con base a estos resultados se detuvo el diseño de experimentos y se establecieron las condiciones óptimas de la reacción tal como aparecen en la Tabla 7.

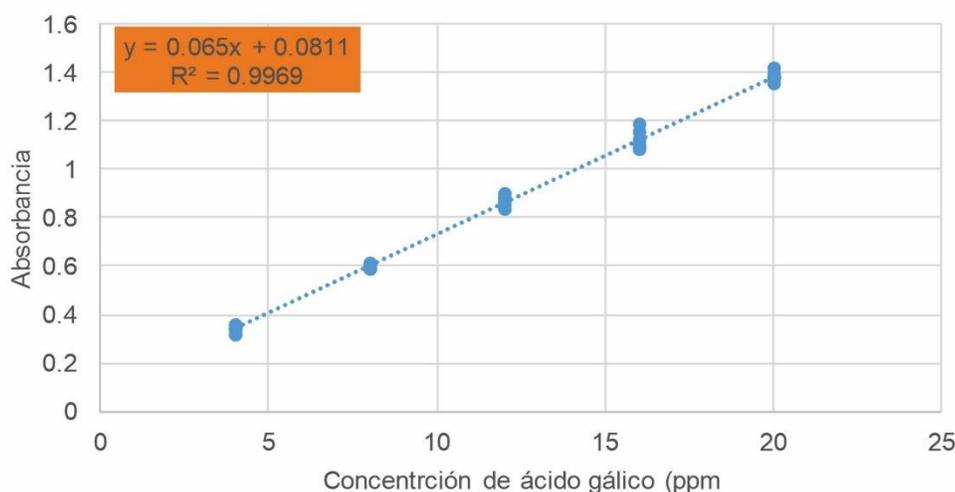
**Tabla 7. Condiciones óptimas para el método de microplaca.**

Condición o variable	Valor
Ácido gálico (4 - 20 ppm) en agua destilada	80.0 $\mu$ L
Reactivo de Folin-Ciocalteu	33.5 $\mu$ L
Incubar	3 min
Carbonato de sodio (20 %)	86.5 $\mu$ L
Incubar	46.5 min
Medir absorbancia	750 nm

#### **Validación del método optimizado.**

La validación analítica del método optimizado se realizó mediante la construcción de curvas de calibración de estándar externo con ácido gálico a 5 niveles de concentración. Se calculó la recta de regresión por mínimos cuadrados (Figura 7) y se estableció la linealidad por el coeficiente de determinación y por el porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de respuesta de todo el intervalo lineal ( $R^2 = 0.9969$  y % RSD = 8.31). La ventana de absorbancias fue de 1.104: desde 0.346 para 4 ppm hasta 1.420 para 20 ppm.

Curvas de calibración para Cuantificación de Fenoles Totales en microplaca, usando el método optimizado de reducción del Folin-Ciocalteu por el ácido gálico.



**Figura 7. Curva de calibración de ácido gálico con reactivo de Folin-Ciocalteu utilizando el método de microplaca optimizada. Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en programa Excel.**

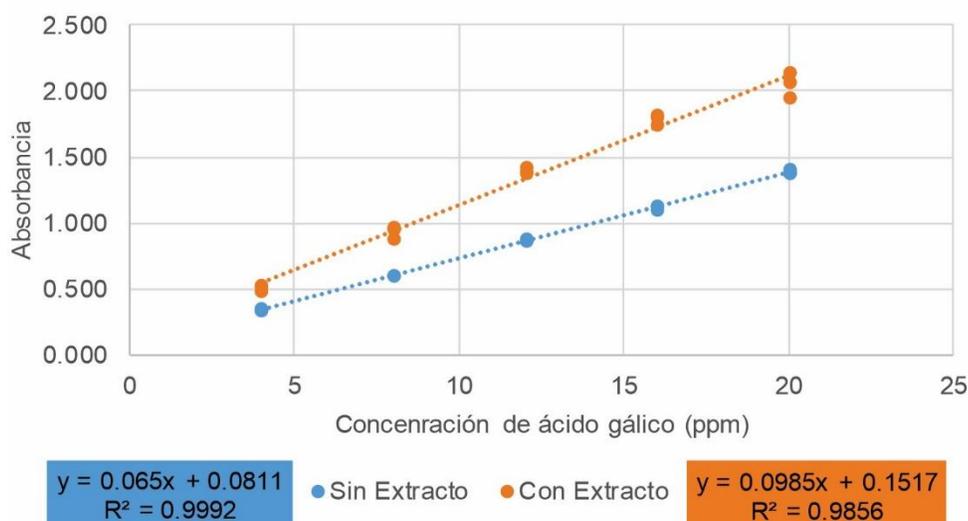
Se estableció la precisión intra e interdía a cada nivel de concentración con valores de % RSD < 4.27 y < 4.46, respectivamente. La exactitud se estableció con el porcentaje de error obtenido por recalcado de la concentración de estándares a 3 niveles: 4 ppm con % Error < 9.5 %; 12 ppm con % Error < 3.3 %; y 20 ppm con % Error < 1.04 %. Los límites de detección y cuantificación se establecieron como: LOD = 0.84 ppm y LOQ = 1.09 ppm, respectivamente.

Se evaluó la robustez de cada condición modificando los volúmenes de Folin-Ciocalteu (33 y 34  $\mu$ L), la concentración de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (19 y 21 %) y el tiempo de reacción (46 y 47 min). Se compararon las absorbancias obtenidas en todo el intervalo lineal con un Análisis de Varianza de una vía, no se encontró diferencia significativa en ninguna de las pruebas (ANOVA  $p < 0.05$ ), por lo tanto, el método fue robusto bajo las condiciones evaluadas.

Comúnmente se preparan diluciones del extracto vegetal, se hacen reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y las absorbancias se interpolan directamente en la curva de calibración (Rumpf *et al.*, 2023). Sin embargo, no se evalúa el efecto que puede tener la matriz del extracto, pues el color de los extractos vegetales varía de coloración en los tonos de verde-café, que pueden absorber a 750 nm. El efecto de la matriz se evaluó utilizando una disolución de extracto de *Tecoma stans* (1000 ppm) + ácido gálico (200 ppm), se hicieron diluciones hasta llegar a obtener el intervalo de concentraciones finales de ácido gálico entre 4 a 20 ppm, la curva se realizó por triplicado y en 3 días diferentes. Al comparar las absorbancias obtenidas en cada nivel de concentración, utilizando un análisis de varianza, se observó que hubo diferencia

significativa (ANOVA  $p < 0.05$ ) en las mediciones obtenidas, es decir, existe un efecto de matriz (Figura 8). Las absorbancias obtenidas en el nivel más alto de concentración de ácido gálico (20 ppm) adicionado al extracto, fueron de 2.3 UA, posiblemente esta fue la razón por la que perdió la linealidad ( $R^2 = 0.9856$ ). Para compensar el efecto de matriz fue necesario buscar una técnica que permitió diferenciar la absorbancia de la muestra de la que produce la reacción con Folin-Ciocalteu.

Curvas de calibración para Cuantificación de Fenoles Totales en microplaca, por el método de Folin-Ciocalteu, usando o no extracto de *Tecoma stans*.



**Figura 8. Curvas de calibración de ácido gálico con reactivo de Folin-Ciocalteu utilizando el método de microplaca optimizado, con y sin extracto de *T. stans*.** Fuente: Elaboración propia a partir de resultados en programa Excel.

### Aplicación.

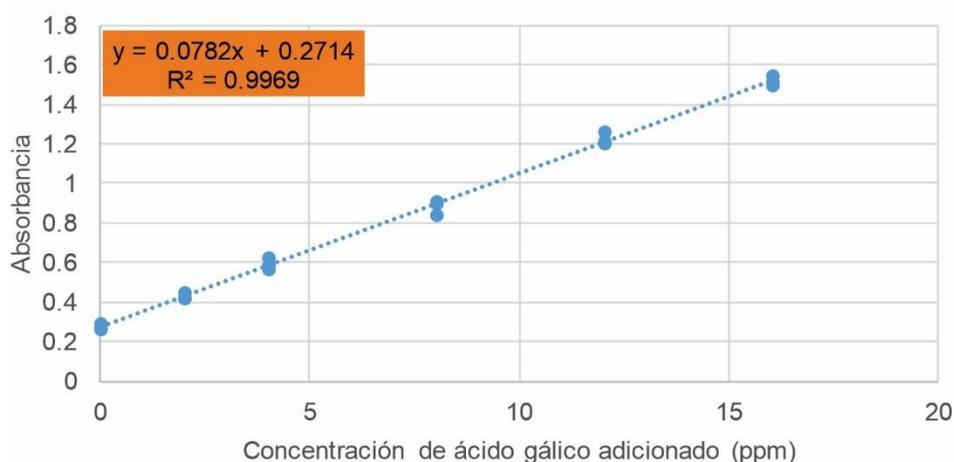
Como una estrategia para compensar el efecto de matriz, se construyeron curvas de adición de estándar de ácido gálico en cada muestra de extracto. El ácido gálico se añadió a concentraciones entre 0 y 16 ppm a una solución de 4  $\mu$ L de extracto de *Tecoma stans* (1000 ppm) y se siguió el protocolo que aparece en la Tabla 4. En la Figura 9 aparece la curva obtenida; se logró cuantificar 3.47 ppm equivalentes a ácido gálico en el extracto, después de considerar los efectos de dilución. Se determinó un Contenido de Fenoles Totales de  $172.7 \pm 16.1$  mg equivalentes a ácido gálico (GAE)/g de extracto.

A diferencia de la aplicación del método en tubo, que solo se aplicó a 5 extractos, el método en microplaca mediante adición de estándar se aplicó a 30 extractos de plantas, un número mucho mayor. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 8 así como la media y su desviación estándar (S D). Los extractos con mayor contenido de Fenoles Totales resultaron ser los encinos (*Quercus spp*), mientras que la planta Palo Verde (*Parkinsonia aculeata*) fue la que resultó con la menor cantidad de dichos compuestos. Interesantemente, fueron evaluados 2 extractos de *Chrysactinia mexicana* obtenidos por diferentes investigadores en diferentes épocas

y los resultados fueron muy parecidos, aunque con mayor Cantidad de Fenoles Totales en la que fue colectada en primavera.

Solo cinco extractos fueron evaluados por el método en tubo y por el método en microplaca con adición de estándar. Ambos resultados se comparan en la Tabla 9. Una Prueba *t de student* demostró que hubo diferencia significativa ( $\alpha > 0.05$ ) en tres de los 5 extractos: *Tecoma stans*, *Chrysactinia mexicana* y *Eucalyptus globulus*. En los casos donde no hubo diferencia significativa, la concentración determinada por el método en tubo fue menor que la determinada por adición estándar, posiblemente en el método de Macroclución hubo un efecto de matriz que tuvo un efecto en la cuantificación, mientras que en el de adición de estándar este efecto se superó o al menos se pudo sobrellevar.

Curvas de calibración para la cuantificación de Fenoles Totales en microplaca, por el método de Folin-Ciocalteu, utilizando la adición de ácido gálico al extracto de *Tecoma stans*.



**Figura 9. Curva de adición del estándar de ácido gálico con reactivo de Folin-Ciocalteu en microplaca utilizando el método optimizado.** Fuente: Elaboración propia con base en resultados en programa Excel.

**Tabla 8. Contenido total de fenol en extractos de plantas (mgGAE/g)**

Planta	Promedio	SD	Planta	Promedio	SD
1 <i>Quercus canbyi</i>	438.9	39.7	16 <i>Cephalanthus occidentalis</i>	156.3	24.7
2 <i>Quercus virginiana</i>	371.2	75.1	17 <i>Lantana camara</i>	154.9	16.6
3 <i>Chrysactinia mexicana</i>	365.3	23.9	18 <i>Xanthosoma robustum</i>	149.1	3.3
4 <i>Lippia graveolens</i>	348.9	37.7	19 <i>Parthenium hysterophorus</i>	111.5	11.9
5 <i>Chrysactinia mexicana</i>	333.9	18.4	20 <i>Ruta chalpensis</i>	99.3	20.3
6 <i>Leucaena greggii</i>	246.2	69.4	21 <i>Ricinus communis</i>	90.4	19.7
7 <i>Porophyllum scoparium</i>	235.0	11.1	22 <i>Solanum rostratum</i>	90.4	2.2

8	<i>Taraxacum officinale</i>	204.1	19.7	23	<i>Porlieria angustifolia</i>	86.7	5.5
9	<i>Hunnemannia fumariifolia</i>	192.5	22.7	24	<i>Physalis ixocarpa</i>	84.5	10.9
10	<i>Cordia boissieri</i>	191.3	9.8	25	<i>Teucrium bicolor</i>	79.1	3.9
11	<i>Tecoma stans</i>	172.7	16.1	26	<i>Ebenopsis ebano</i>	78.8	1.7
12	<i>Salvia coccinea</i>	168.8	2.1	27	<i>Juglans nigra</i>	75.3	8.8
13	<i>Malus pumila</i>	163.0	3.5	28	<i>Pinus teocote</i>	59.8	2.5
14	<i>Eucalyptus globulus</i>	161.6	2.1	29	<i>Pithecellobium dulce</i>	56.0	18.9
15	<i>Citrus aurantium</i>	158.9	39.5	30	<i>Parkinsonia aculeata</i>	55.5	13.7

**Table 9. Comparación de los métodos de tubo y microplaca.**

	Macrodilución mg GAE/g	Adición estándar mg GAE/g
<i>Tecoma stans</i> *	117.66 ± 2.04	172.7 ± 16.1
<i>Malus pumila</i> *	129.49 ± 3.10	163.0 ± 3.5
<i>Chrysactinia mexicana</i> *	186.55 ± 3.48	333.9 ± 18.4
<i>Eucalyptus globulus</i> *	212.43 ± 4.65	161.6 ± 2.10
<i>Quercus virginiana</i>	262.14 ± 3.33	371.2 ± 75.1

\* Diferencia significativa  $\alpha > 0.05$

## Conclusiones

El Contenido de Fenoles Totales en extractos de plantas se puede determinar por la reacción de oxidación de la mezcla de ácidos del Reactivo de Folin-Ciocalteu, que generan una banda ancha a 750 nm. El ácido gálico es el compuesto que proporciona las mejores respuestas entre los cuatro compuestos polifenólicos evaluados. En este trabajo se miniaturizaron y optimizaron las condiciones de reacción hasta obtener una ventana de absorbancias mayor de 1, en un intervalo lineal de concentraciones de ácido gálico. Se obtuvo un buen desempeño del método propuesto al utilizar agua como disolvente de la reacción en reemplazo del etanol, por lo tanto, se obtuvo un método más ecológico. Se establecieron los parámetros de calidad del método optimizado, garantizando que es lineal, preciso, exacto, sensible y robusto. Se observó que existe un efecto de matriz causado por la composición y/o color del extracto. Por esta razón se sugiere realizar la determinación utilizando una curva de adición de estándar para disminuir el efecto matriz. El método fue aplicado a 30 extractos de plantas que tuvieron un rango de concentración de Fenoles Totales de 55.5 a 438.9 mg GAE/g de extracto.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, R. S. A.; desarrollo de la metodología, C. P. G.; manejo de software, C. P. G., B. A. A. G.; validación experimental, C. P. G., O. J. P. C.; análisis de resultados, R. S. A., B. A. A. G., O. J. P. C.; Manejo de datos, R. S. A.; escritura y preparación del manuscrito, R. S. A.; redacción, revisión y edición, R. S. A., B. A. A. G., O. J. P. C.; administrador de proyectos, R. S. A.; adquisición de fondos, R. S. A. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

## Financiamiento

Esta investigación fue financiada con el Proyecto ProActi-UANL, número de convenio 39-BQ-2023.

## Declaraciones éticas

Esta investigación forma parte del Proyecto de Investigación QA21-00002, aprobado por el Comité de Ética de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina, UANL.

## Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecemos enormemente al T.L.C. Julio Cesar Torres González, por todo el apoyo brindado.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>
- Granados-Guzmán, G., Salazar-Aranda, R., Garza-Tapia, M., Castro-Ríos, R., & Waksman de Torres, N. (2017). Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity. *Current Analytical Chemistry*, 13(6), 499-507. <https://doi.org/10.2174/1573411013666170118111516>
- Kaur, Ch., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x>
- Ko, D. Y., & Ku, K. M. (2022). Effect of Anti-Obesity and Antioxidant Activity through the Additional Consumption of Peel from 'Fuji' Pre-Washed Apple. *Foods*, 11(4), 497. <https://doi.org/10.3390/foods11040497>
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C. C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in physiology*, 9, 477.
- Martins, G. R., Monteiro, A. F., do Amaral, F. R. L., & da Silva, A. S. (2021). A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (Euterpe oleracea Mart.) seeds extract. *Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 4693-4702. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04959-5>
- Mucha, P., Skoczyńska, A., Małecka, M., Hikisz, P., & Budzisz, E. (2021). Overview of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Selected Plant Compounds and Their Metal Ions Complexes. *Molecules*, 26(16), 4886. <https://doi.org/10.3390/molecules26164886>
- Oresanya, I. O., Orhan, I. E., Heil, J., & Morlock, G. E. (2024). African Under-Utilized Medicinal Leafy Vegetables Studied by Microtiter Plate Assays and High-Performance Thin-Layer Chromatography-Planar Assays. *Molecules*, 29(3), 733. <https://doi.org/10.3390/molecules29030733>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2(5), 270-278.

- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543-17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Ponnampalam, E.N., Kiani, A., Santhiravel, S., Holman, B. W. B., Lauridsen, C., & Dunshea, F. R. (2022). The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality—Invited Review. *Animals*, 12, 3279. <https://doi.org/10.3390/ani12233279>
- Rodríguez-Martínez, O. C. (2018). Evaluación de Actividad antihiperlipérmica de extractos de plantas [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina].
- Rodríguez-Solana, R., Vázquez-Araújo, L., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., & Cortés-Diéguez, S. (2016). Optimization of the process of aromatic and medicinal plant maceration in grape marc distillates to obtain herbal liqueurs and spirits. *Science of food and Agriculture*, 96(14), 4760-4771. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7822>
- Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, Article 123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Pérez, J., Salinas, M. C., & Waksman, N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46, 166–170. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>
- Sbihi, H. M., Mokbli, S., Nehdi, I. A., & Al-Resayes, S. I. (2015). Physico-chemical properties of Tecoma stans Linn. seed oil: a new crop for vegetable oil. *Natural Product Research*, 29(13), 1249-1255. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1024118>
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15-29. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/articulo/view/1583/1238>
- Valero-Galván, J., González-Fernández, R., & Jorrián-Novo, J. V. (2021). Interspecific Variation between the American Quercus virginiana and Mediterranean Quercus Species in Terms of Seed Nutritional Composition, Phytochemical Content, and Antioxidant Activity. *Molecules*, 26(8), 2351. <https://doi.org/10.3390/molecules26082351>