UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

CUADERNILLO DE PROPUESTAS EXPERIMENTALES PARA PRÁCTICAS EMPLEANDO ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis, CON APLICACIÓN A LA MATRIZ MACROALGAS

Producto correspondiente al Proyecto PAPIME (Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación)

"Apoyo a la Titulación y Formación Terminal desde la Investigación Formativa y Docencia en Química Analítica " (CLAVE PE201324)

Nota: El documento no ha sido aun revisado por el comité correspondiente.

Cd. Universitaria, Coyoacán, CDMX
Octubre 2025

Autores:

María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar

Cecilia Santos Trejo

Danna Estefanía Silva Mata

Francisco Isaías Vitela Escudero

Manuel Arturo Sustayta Azuara

Marcus Ian Vera Jiménez

Oscar Uriel Rodríguez Pacheco

Ricardo Salcedo Mendoza

Información: mtjrs.papime2020@gmail.com / mtjrs@quimica.unam.mx

Las prácticas están elaboradas para su aplicación en las siguientes asignaturas de los programas de estudio de las Carreras de Química, Química Farmacéutico-Biológica (QFB) y Química de Alimentos (QA):

- Analítica Experimental I (Clave 1507, 1602)-Unidad Temática 6
- Analítica Experimental II (1607, 1700)-Unidad Temática 2
- Analítica Experimental III (1802) – Unidades Temáticas 2 y 3

INDICE:

	PÁGINA
1) Cuantificación de polifenoles totales (PFT) en macroalgas mediante espectrofotometría UV-Vis (λ=280 nm) con estándar externo de ácido gálico. Salcedo-Mendoza, R.; Santos-Trejo, C; Silva-Mata, DE; Sustayta-Azuara, MA; Vera-Jiménez, MI; Vitela-Escudero, FI; Rodríguez-Pacheco, OU; Rodríguez-Salazar, MTJ	**6**
2) Cuantificación de polifenoles totales en algas mediante el método colorimétrico Folin – Ciocalteu (RFC) Santos-Trejo, C; Salcedo-Mendoza, R; Vitela-Escudero, FI; Rodríguez-Salazar, MTJ	**12**
3) Cuantificación de flavonoides totales (TFC) en macroalgas comerciales con el método de complejometría y su medición espectrofotométrica en el rango visible Silva-Mata, DE; Vitela-Escudero, FI; Rodríguez-Salazar, MTJ	**19**

El presente documento se puede consultar en línea (acceso abierto) a través del sitio AMyD de la Facultad de Química, UNAM:

https://amyd.quimica.unam.mx/course/view.php?id=459

Nota: Se recomienda realizar el tratamiento de la muestra correspondiente, en sesión experimental previa.

PRÁCTICA No. 1

Cuantificación de polifenoles totales (PFT) en macroalgas mediante espectrofotometría UV-Vis (λ=280 nm) con estándar externo de ácido gálico.

A. Introducción

Actualmente una de las principales problemáticas que la sociedad enfrenta es la resistencia microbiana a los antibióticos, ya que, los tratamientos farmacológicos antimicrobianos disponibles cada vez son menos efectivos ante los diferentes microorganismos patológicos causantes de las enfermedades, debido a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia en las bacterias.

Por ello se han buscado alternativas a los tratamientos farmacológicos disponibles, y una de las opciones que se han encontrado es el empleo de polifenoles, ya que, estos compuestos pueden alterar la hidrofobicidad y la carga superficial de la membrana celular bacteriana, causando así la ruptura local o la formación de poros en la membrana celular (Liu et al., 2024).

Los polifenoles se encuentran en frutas, verduras, algas, cereales, etc., estos son compuestos orgánicos los cuales contienen en su estructura múltiples grupos fenólicos (Safer et al., 2012), formados por un grupo hidroxilo (-OH) unido a un átomo de carbono de un anillo aromático, así mismo, estos pueden formar ésteres, éteres u otros enlaces C-C mediante otros grupos funcionales creando polifenoles más complejos (Liu et al., 2024). Se pueden clasificar según su estructura y grupos funcionales en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos , flavonoides y taninos (Li et al., 2023).

El contenido fenólico puede ser analizado por espectroscopía UV-visible, técnica basada en la absorción de luz por los enlaces conjugados presentes en las estructuras de los polifenoles, este método permite identificar la presencia de estos compuestos por sus picos de absorbancia característicos comúnmente localizados entre los 250 y 350 nm para flavonoides, ácidos fenólicos y otros polifenoles simples (Ignat et al., 2011).

B. Objetivos

- Cuantificar con la ayuda de un estándar externo de ácido gálico, los polifenoles totales (PFT) contenidos en algas mediante espectrofotometría en el rango ultravioleta por el método directo a una longitud de onda de 280 nm.
- Aprender el funcionamiento del espectrofotómetro UV-Vis, preparación de muestras como calibrantes y el manejo de datos.
- Comparar la eficiencia de extractantes, analizar cuál fue más eficaz y por qué (polaridad, solubilidad de polifenoles).

C. Materiales y reactivos

A. Muestra:

La elección de la alga a utilizar está sujeto en su disponibilidad:

a. 15 g de alga Wakame (*Undaria pinnatifida*)
b. 15 g de alga Nori (*Porphyra yezoensis)*
c. 15 g de alga Hijiki (*Sargassum fusiforme)*
d. 15 g de Sargazo (*Sargassum fluitans o Sargassum natans).*

B. Material para preparación de muestra:

- Mortero y pistilo agata.
- Desecador. Está en una caja de plástico con aluminio ya que se debe de controlar la temperatura.
- Tamizador de partícula
  - Marca: Mont Inox.
  - Número de tamiz: #30.
- Trituradora
- Centrifugadora

- Horno de calentamiento.
    - Marca ECOSHEL UNAM 03001193

C. Material para curva estándar:
- 1 espátula de Cr-Ni
- 1 Matraz volumétrico de 100.0 mL
- 6 Matraz volumétrico de 25.0 mL
- Puntas de micropipeta de 100-1000 µL
- 1 celda de cuarzo.

D. Aparatos e instrumentos:
- Balanza analítica;
    - Marca: Adventurer OHAUS.
    - No. de inventario:_____.
- Agitador Magnético CIVEQ 85-2
- Espectrofotómetro
    - UV-Visible VELAB VE-5100UV
- Micropipeta de 100-1000 µL;
    - Marca: Science Med.

E. Reactivos:
i. Agua Desionizada (H_2O DI) (Marca MEYER, Grado ACS, Lote D0823679).
ii. Etanol (Marca J.T.Baker) 70% / Agua desionizada 30%
iii. MeOH 100%
iv. Ácido gálico (anhidro). MERCK. Lote SDBB0557
v. Ácido fosfórico. (Marca BAKER Grado Reactivo) (Control de Reactivos Lab 3/D) al 85% (8.1 M

D. Procedimiento experimental

Parte I. Preparación de muestra

1. Tratamiento físico

i. Pesar 10.0-15.0 g de la macroalga que se desea cuantificar.
ii. Realizar el secado en horno a 60 °C por un periodo estimado de 3 h. Utilizar el secador para un enfriamiento sin aumento de peso por humedad.
iii. Se realiza la verificación del peso periódico en una balanza analítica hasta alcanzar un peso seco (no húmedo) constante, como una variación menor al 4%
iv. Una vez obtenido el peso constante, la muestra se traslada a un desecador de sílica gel.
v. Reducción del tamaño de partículas de la muestra con el uso de una trituradora y mortero.
vi. Finalmente, la muestra pulverizada se tamiza (#30) para obtener un tamaño de partícula homogéneo

2. Extracción de PFT.

a. Extracción con EtOH (Marca J.T.Baker) 70% / Agua desionizada 30%
i. Pesar 0.5 g - 1 g de muestra tamizada.
ii. Transferir a un vaso de precipitado de 50 mL.
iii. Agregar 20 mL de EtOH 70%
iv. Macerar 1 semana
v. Centrifugar 3500 RPM por 10 min
vi. Filtrar sobrenadante con un embudo de vidrio y un soporte universal en papel filtro
vii. Transferir a matraz volumétrico 25.0 mL
viii. Aforar a 25.0 mL con la disolución EtOH 70%
ix. Tomar 1.0 mL de disolución
x. Transferir a matraz volumétrico 10.0 mL

xi. Aforar a 10 mL con la disolución EtOH 70%

b. EXTRACCIÓN CON H_2O DI

i. Pesar 0.5 g - 1 g de muestra tamizada y transferir a un vaso de precipitados de 50 mL.
ii. Agregar 20 mL de H_2O DI
iii. Calentar a 60°c por 4 hr en Agitador Magnético CIVEQ 85-2.
iv. Macerar 1 semana
v. Centrifugar a 3500 rpm por 10 min
vi. Filtrar sobrenadante con un embudo de vidrio y un soporte universal en papel filtro
vii. Transferir a matraz volumétrico 25.0 mL
viii. Aforar a 25.0 mL con H_2O DI
ix. Tomar 1.0 mL de disolución
x. Transferir a matraz volumétrico 10.0 mL
xi. Aforar a 10 mL con la disolución H_2O DI

3. Lectura de muestras

i. Encender espectrofotómetro 20 min antes de la lectura.
ii. Ajustar la longitud de onda del equipo a 280 nm.
iii. Realizar el ajuste *auto zero* con celda de cuarzo vacía.
iv. Medir blanco de reactivos para cada muestra en Espectrofotómetro y presionar "zero".
v. Medir absorbancia de disoluciones estándar de ácido gálico preparadas.

Parte II. Curva Estándar Intervalo lineal de la curva de con 5 mg/L

Debido a que las muestras de macroalgas se evaluarán 3 extractantes (agua DI caliente, etanol agua, y metanol), es necesario realizar una curva estándar con el correspondiente disolvente para cada una, para un mejor resultado de equivalentes de ácido gálico en nuestra muestra.

1. Stock de Ácido gálico 500 mg/L para muestras según su disolvente de extracción.

a. Pesar 0.0500 g de ácido gálico Sref en balanza analítica.
b. Transferir cuantitativamente a matraz volumétrico de 100.0 mL.
c. Añadir 50 mL de agua desionizada, etanol 70:30 o metanol según el disolvente extracto de la muestra de la macroalga posteriormente.
d. Aforar a 100.0 mL con agua desionizada, etanol 70:30 o metanol y homogeneizar.

2. **Blanco de calibración**.

a. Añadir 50 mL de agua desionizada a matraz volumétrico de 100.0 mL.
b. Agregar 2 gotas de H_3PO_4 al 85% (8.1 M).
c. Aforar a 100.0 mL con agua desionizada, etanol 70:30 o metanol y homogeneizar.

3. **Curva Estándar de ácido gálico.**

a. Encender espectrofotómetro 20 min antes de la lectura.
b. Ajustar la longitud de onda del equipo a 280 nm.
c. Realizar el ajuste *auto zero* con celda de cuarzo vacía.
d. Etiquetar matraz volumétrico de 25.0 mL con (2, 4, 6, 8,10 y 15 mg/L).
e. Transferir a cada matraz 100, 200, 300, 400, 500 y 750 µL de disolución Stock 500 mg/L de ácido gálico respectivamente.
f. Aforar con agua desionizada, etanol 70:30 o metanol y homogeneizar.
g. Medir blanco de calibración en Espectrofotómetro y presionar "zero".

h. Medir absorbancia de disoluciones estándar de ácido gálico preparadas.

Nota. Experimentalmente, disoluciones con valores próximos o mayores a 2 unidades de absorbancia, deben diluirse.

E. Resultados.

Parte II.

Tabla 1. Curva de estándar de ácido gálico.

# Estándar	Concentración [mg/L]	Absorbancia (λ=280 nm)	Absorbancia corregida
Blanco calibración			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

- Elaborar gráfica absorbancia en función de la concentración de ácido gálico, y realizar la regresión lineal:

	Valores de parámetro de la regresión de la recta	
	m	
	b	
	R^2	

Tabla 2. Curva de Ringbom de la curva de calibración de ácido gálico

# Estándar	Relación (# Estándar /# Estándar)	Relación numérica de concentración	Relación numérica de absorbancia
1			

2			
3			
4			
5			
6			

Parte III.

Tabla 3. Cuantificación de PFT en algas mediantes espectrofotometría UV-Vis (280 nm) mediante estándar externo de ácido gálico.

Muestra	Masa (g)	Abs	Abs corregida	PFT [mg/L] EAG	PFT (mg)	PFT [mg/g]
Blanco de reactivo						

- Escriba el modelo matemático que se usó para la determinación del analito. (Recuerde hacer el análisis dimensional).

F. Conclusiones

Consideraciones necesarias para el reporte:

G. Anexo

- **Cuestionario previo**
    1. Definición de estándar interno y estándar externo.
    2. ¿Por qué es relevante cuantificar PFT en algas? (propiedades antioxidantes, aplicaciones en alimentos, farmacéutica, etc.).
    3. Diferencia entre cuantificación con estándar interno y externo.
    4. ¿Por qué y para qué se emplea el ácido gálico como estándar externo?
    5. Definición de blanco de calibración y blanco de reactivos.
    6. Contenido de PFT en alga Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra yezoensis)*, Hijiki (*Sargassum fusiforme)*, Sargazo (*Sargassum fluitans o Sargassum natans).*
    7. Definición de peso constante.
    8. Aplicaciones de los polifenoles en la industria y química analítica ambiental.
    9. Investigar el funcionamiento de desecadores con perlas de sílica gel y el cambio de color.

H. Referencias

1. Liu, Y., Shi, Y., Zhang, M., Han, F., Liao, W., & Duan, X. (2024). Natural polyphenols for drug delivery and tissue engineering construction: A review. European Journal Of Medicinal Chemistry, 266, 116141. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116141
2. Safer, A., Afzal, M., Nomani, M., & Mousa, S. (2012). Green Tea Extract in the Management of Hepatic Fibrosis. En Elsevier eBooks (pp. 903-909). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384937-3.00076-8
3. Li, W., Chen, H., Xu, B., Wang, Y., Zhang, C., Cao, Y., & Xing, X. (2023). Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. Journal Of Future Foods, 3(4), 289-305. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.001
4. Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026

PRÁCTICA No. 2

Cuantificación de polifenoles totales en algas mediante el método colorimétrico Folin – Ciocalteu (RFC)

Introducción.

Las algas marinas constituyen un grupo diverso de organismos fotosintéticos distribuidos en ecosistemas costeros, reconocidas por su relevancia nutricional, farmacológico e industrial, estas biomasas marinas contienen diversos metabolitos secundarios, entre los que destacan los compuestos fenólicos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Kadam et al., 2015; Gupta & Abu-Ghannam, 2011). En el presente protocolo se seleccionaron cuatro especies de algas (*Undaria pinnatifida, Porphyra yezoensis, Sargassum fusiforme y Sargassum fluitans o Sargassum natans*) la elección de estas muestras responde tanto a su disponibilidad comercial como a su diversidad taxonómica, lo que nos permite comparar el contenido de PFT en distintos tipos de algas, asimismo representa una oportunidad para considerar y valorizar residuos marinos que han sido considerados un problema ambiental pero también una fuente prometedora de compuestos bioactivos (Machado et al., 2020).

Los compuestos fenólicos son reconocidos por su alta capacidad antioxidante, la cual se debe principalmente a su habilidad para donar electrones y neutralizar radicales libres (Cheynier, 2012). Debido a estas propiedades, los polifenoles han despertado gran interés en las industrias.

La determinación del contenido de polifenoles totales es una herramienta útil para evaluar el potencial antioxidante de un extracto. El método colorimétrico más utilizado para esta finalidad es el de Folin–Ciocalteu, desarrollado originalmente para proteínas, pero posteriormente adaptado para compuestos fenólicos (Singleton et al., 1999). Este método se basa en una reacción redox donde los polifenoles reducen los complejos de fosfomolibdato y fosfowolframato del reactivo de Folin–Ciocalteu en medio alcalino, generando un complejo azul intenso cuya absorbancia puede medirse mediante espectroscopía UV-Visible.

Objetivos.

- Cuantificar polifenoles totales (PFT) en algas comerciales utilizando el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, mediante espectrofotometría en el rango visible a una longitud de onda 765 nm utilizando ácido gálico como patrón de referencia.

Materiales y reactivos.

Muestras

a. 15 g de Sargazo (*Sargassum fluitans)*

Material para preparación de muestra

- Mortero y pistilo de ágata.
- 1 tamiz con malla Nº30 (Apertura de 250 μm) (Marca Mont inox)
- 1 Espátula Cr-Ni.
- Matraz volumétrico de 25.0 mL.
- Celdas de poliestireno o metacrilato.
- 3 vasos de precipitados de 50 mL.
- 1 probeta de 50 mL
- Papel parafilm.
- Papel filtro.
- 1 embudo de filtración rápida.
- 1 soporte universal.
- 1 anillo metálico.
- 3 matraz volumétrico 25.0 mL.
- 3 tubos de ensayo 13×100.
- Puntas de micropipeta 10-100 μL.
- Puntas de micropipeta 100-1000 μL.

Material para curva estándar de ácido gálico

- 1 Espátula Cr-Ni
- 1 matraz volumétrico 250.0 mL
- 9 matraz volumétrico 25.0 mL
- Puntas de micropipeta 10-100 μL
- Puntas de micropipeta 100-1000 μL
- Puntas de micropipeta de 5 mL
- Celdas de poliestireno o metacrilato.

Aparatos e Instrumentos

- Balanza Analítica (Adventurer OHAUS.)
- Horno. (ECOSHEL UNAM 03001193)
- Desecador de sílica gel.
- Centrifugadora.
- Trituradora. (Krups)
- Espectrofotómetro UV-Vis (VELAB VE-5100 UV)

- Micropipeta de 10 -100 µL (Science Med)
- Micropipeta de 100 -1000 µL (Science Med)
- Micropipeta de 1 - 5 mL (Science Med)

Reactivos

- Agua Desionizada (H2O DI) (MEYER, Grado ACS, Lote D0823679).
- Etanol (Marca J.T.Baker) 70% / Agua desionizada 30%
- Ácido gálico (anhidro). (MERCK. Lote SDBB0557)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) 2 mol/L(Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio anhídrido (MEYER)

Procedimiento experimental.

Parte I. Preparación de muestra

1. **Tratamiento físico**
   i. Pesar 15 g de la muestra de alga.
   ii. Secar en horno a 60 °C durante 3 h.
   iii. Se realiza la verificación del peso periódico en una balanza analítica hasta alcanzar un peso constante, definido como una variación menor al 4% entre pesadas sucesivas.
   iv. Una vez obtenido el peso constante, la muestra se traslada a un desecador de sílica gel.
   v. Reducción del tamaño de partículas de la muestra con el uso de una trituradora y mortero.
   vi. Tamizar con una malla Nº30
2. **Extracción de polifenoles totales (PFT)**
   a. **Extracción con EtOH (Marca J.T. Baker) 70% : 30% agua desionizada.**
      i. Pesar 0.2500 g de muestra previamente tamizada.
      ii. Transferir a un vaso de precipitados de 50 mL.
      iii. Agregar 20 mL de EtOH 70%
      iv. Dejar macerar durante 1 día en lugar oscuro.
      v. Centrifugar 3500 rpm por 10 min.
      vi. Filtrar sobrenadante en papel filtro.
      vii. Transferir a matraz volumétrico 25.0 mL.
      viii. Aforar a 25.0 mL con la disolución EtOH 70%
2. **Preparación de muestra (Método de Folin-Ciocalteu).**
      i. Recubrir 3 matraz volumétrico de 25.0 mL con papel aluminio
      ii. Etiquetar matraz volumétrico de 25.0 mL recubiertos con M1, M2 y M3
      iii. Transferir a cada matraz volumétrico extracto de la muestra acorde a la Tabla 4.
      iv. Añadir RFC (2 mol/L) acorde a la Tabla 4.
      v. Mezclar con vortex 10 s.
      vi. Añadir Na_2CO_3 1 mol/L acorde a la Tabla 4.
      vii. Mezclar con vortex 10 s
      viii. Incubar 5 min a T_{amb}

ix. Aforar con EtOH 40% / H_2O DI 60%
x. Incubar 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.

3. **Lectura de curva estándar de Ácido gálico mediante FC**
   i. Encender espectrofotómetro 20 min antes de la lectura y ajustar a 765 nm.
   ii. Ajustar el auto Zero con la celda de poliestireno o metacrilato.
   iii. Medir cada muestra
   iv. Determinar la concentración de cada muestra de PFT en mg/L y mg/g

Parte II. Curva de calibración

1. **Stock de ácido gálico 1000 mg/L**
   i. Pesar 0.2500 g de ácido gálico.
   ii. Transferir a vaso de precipitado de 250.0 mL.
   iii. Añadir 150 mL de EtOH 70%.,
   iv. Disolver y transferir cuantitativamente a matraz volumétrico de 250.0 mL
   v. Agregar 2 gotas de H_3PO_4 al 85% (8.1 M)
   vi. Aforar a 250.0 mL con EtOH 70%.
2. **Preparación del blanco de calibración.**
   i. Agregar 50 mL de agua desionizada a matraz volumétrico de 100.0 mL.
   ii. Agregar 2 gotas de H_3PO_4 al 85% (8.1 M).
   iii. Aforar a 100.0 mL con agua desionizada y homogeneizar.
3. **Preparación de la curva de estándar (Método de Folin-Ciocalteu).**
   xi. Recubrir 9 matraz volumétrico de 25.0 mL con papel aluminio
   xii. Etiquetar matraz volumétrico de 25.0 mL recubiertos con 0, 1, 2, 4, 6, 8,10, 12.5 y 15 mg/L.
   xiii. Transferir a cada matraz volumétrico Stock 1000 mg/L de ácido gálico acorde a la Tabla 5.
   xiv. Añadir RFC (2 mol/L) acorde a la Tabla 5.
   xv. Mezclar con vortex 10 s.
   xvi. Añadir Na_2CO_3 1 mol/L acorde a la Tabla 5.
   xvii. Mezclar con vortex 10 s
   xviii. Incubar 5 min a T_{amb}
   xix. Aforar con EtOH 40%
   xx. Incubar 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.
4. **Lectura de curva estándar de Ácido gálico mediante FC**
   i. Encender espectrofotómetro 20 min antes de la lectura y ajustar a 765 nm.
   ii. Ajustar el auto Zero con la celda de poliestireno o metacrilato.
   iii. Medir cada disolución estándar
   iv. Realizar curva estándar de Ácido gálico ([AG] vs Abs) y regresiòn lineal..

Resultados.

Tabla 1. Curva de estándar de ácido gálico en EtOH 70% / H20 DI 30%.

# Estándar	Concentración [mg/L]	Abs. (λ=765 nm)	Abs. corregida
Blanco de calibración			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Tabla 2. Regresión lineal curva estándar de ácido gálico.

Parámetros	
m	
b	
R^2	

Tabla 3. Cuantificación PFT en alga mediante método de Folin-Ciocalteu mediante extracción con EtOH 70% / 30 % H_20 DI.

Muestra	Masa (g)	Abs	Abs corregida	PFT [mg/L]	PFT (mg)	PFT [mg/g]
Blanco de reactivo						
1						
2						
3						
Promedio						
DE						
%CV						

Anexo.

Tabla 4. Reactivos para muestra método de Folin-Ciocalteu.

Matraz Volumétrico	Extracto	RFC 2 mol/L	Na_2CO_3 1 mol/L
Muestra	Volumen (µL)		
M1	2500	1000	3000
M2	2500	1000	3000

Tabla 5. Reactivos curva estándar método de Folin-Ciocalteu.

Matraz Volumétrico	STD 1000 mg/L	RFC 2 mol/L	Na2CO3 1 mol/L
AG [mg/L]	Volumen (µL)		
0	0	1000	3000
1	25	1000	3000
2	50	1000	3000
4	100	1000	3000
6	150	1000	3000
8	200	1000	3000
10	250	1000	3000
12.5	313	1000	3000
15	375	1000	3000
Extracto	2500	1000	3000

- **Cuestionario previo.**
    1. Explica brevemente en qué consiste el método de Folin–Ciocalteu.
    2. ¿Qué reacción química ocurre entre los polifenoles y el reactivo de Folin–Ciocalteu?
    3. ¿Cuál es la función del carbonato de sodio en el método de Folin–Ciocalteu?
    4. ¿Qué consecuencias tendría omitir el paso de incubación tras añadir el carbonato de sodio?

Referencias.

- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11, 153–177. https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2015). Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 24–31. https://doi.org/10.1111/ijfs.12692
- Machado, A. L., Valdivia, C. A., et al. (2020). Valorization of *Sargassum spp.* biomass: A sustainable source of bioactive compounds. *Algal Research*, 50, 102023. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102023

PRÁCTICA No. 3

Cuantificación de flavonoides totales (TFC) en macroalgas comerciales con el método de complejometría y su medición espectrofotométrica en el rango visible.

I. Introducción

Los flavonoides son una amplia clase de metabolitos secundarios derivados de sustancias naturales, caracterizados por poseer estructuras polifenólicas variables (Figura 1). [1] Se clasifican en diferentes subgrupos, según el grado de oxidación y la estructura del anillo central (anillo pirano).[2] Estas moléculas están presentes en una gran diversidad de fuentes vegetales, como frutas, verduras, granos, cortezas, raíces, tallos, flores, así como en bebidas como el té y el vino.

Debido a sus propiedades bioactivas, los flavonoides son objeto de amplio estudio en los campos de la biotecnología y la farmacología.[3] Se les atribuyen múltiples actividades beneficiosas para la salud, entre ellas efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antimutagénicos, antimicrobianos y cardioprotectores. Estas propiedades los convierten en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos, suplementos nutricionales y productos funcionales.

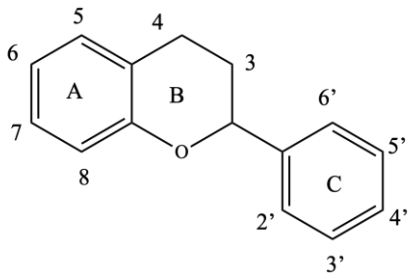

Figura 1. Estructura básica de flavonoides

La cuantificación de TFC se realiza por colorimetría con la formación de complejos estables con cloruro de aluminio en presencia de los grupos funcionales en estado ácido de ceto C4 y el grupo hidroxilo de C3 o C5 de la estructura principal de los flavonoides (Figura 2 y 3).[4]

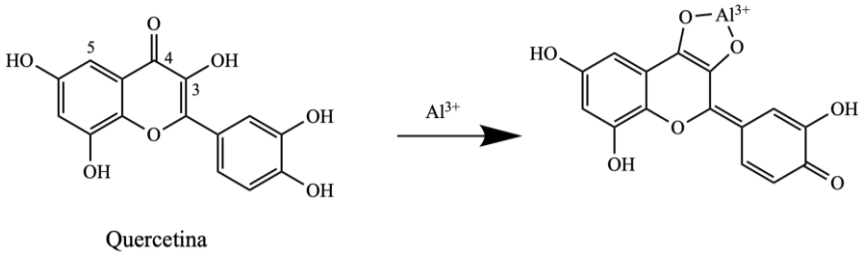

Figura 2. Ejemplo de formación de quelato con quercetina-Al(III).

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica ampliamente utilizada para la cuantificación de flavonoides debido a su alta sensibilidad, especificidad y facilidad de aplicación.[4] Esta metodología se basa en la capacidad de los flavonoides para formar complejos coloreados, como el que se genera con cloruro de aluminio, los cuales absorben luz en la región UV-Visible.[5,6] Esta propiedad permite detectar y cuantificar con **precisión concentraciones bajas de flavonoides** en diversos tipos de muestras. Mediante el uso de un estándar como la quercetina, es posible construir una curva de calibración externa que permite estimar el contenido total de flavonoides presentes en extractos vegetales, como los obtenidos de macroalgas pardas.[5]

II. Objetivos de la práctica

- Determinar el contenido total de flavonoides (TFC) en diferentes muestras de macroalgas pardas del género *Sargassum* a través del método complejométrico con cloruro de aluminio y medición por espectrofotometría UV-Vis.

III. Objetivos específicos

- Evaluar la variabilidad en la concentración de flavonoides totales en función del origen comercial de las macroalgas.
- Determinar la eficiencia del método colorimétrico con cloruro de aluminio en la detección de flavonoides en matrices complejas como las macroalgas.

IV. Material, equipo y reactivos.

Equipo de laboratorio:

- Horno de calentamiento. Marca ECOSHIEL UNAM
- Molino de cafe y especias KRUPS
- Mortero y pistilo de ágata
- Tamiz No. 50 Grupo FIICSA
- Espectrofotómetro UV-Visible VELAB VE-5100UV
- Centrífuga SM0406S, Science Med
- Balanza analítica; Marca: Adventurer OHAUS.
- Baño Ultrasonido CS-UB32, C scientific
- Matraces volumétricos 10. 0 mL
- Micropipetas Science ME Vol 10-1
- Medidor multiparamétrico HI9812-51 c/ Sensor HI1285-51, HANNA
- Celdas de vidrio 10 mm

Reactivos:

- H_2O Destilada (Facultad de Química, Laboratorio de Ingeniería Química)
- Agua Desionizada (H_2O DI) (Marca MEYER, Grado ACS, Lote D0823679).
- Cloruro de aluminio 99% ($AlCl_3$, Marca Meyer, Grado ACS)
- Metanol 99% Grado ACS Marca J.T. Baker
- Quercetina >95% (Marca Sigma Aldrich, Grado HPLC)
- Etanol Desnaturalizado 40B (Marca J.T.Baker)
- 15 g de Sargazo (*Sargassum fluitans o Sargassum natans*).

V. Procedimiento experimental

Parte I. Preparación de muestra.

A. Tratamiento físico:

1. Pesar 10.0-15.0 g de la macroalga Sargassum Fluitans III que se desea cuantificar.
2. Realizar el secado en horno a 60 °C por un periodo estimado de 3 h.

   Se realiza la verificación del peso periódico en una balanza analítica hasta alcanzar un peso constante, definido como una variación menor al 4% entre pesadas sucesivas.

3. Una vez obtenido el peso constante, la muestra se traslada a un desecador de sílica gel.
4. Reducción del tamaño de partículas de la muestra con el uso de una trituradora y mortero.
5. Finalmente, la muestra pulverizada se tamiza (#50).

B. Extracción con etanol 70% de TFC:

a. Extracción con EtOH 70% / Agua desionizada 30%

1. Pesar 250 mg de biomasa de sargazo en balanza analítica.
2. En un vaso de precipitado adicionar 25 mL de etanol. Se deja en maceración durante 24 horas en un lugar oscuro y fresco.
3. Pasado el tiempo, se centrifuga a 3500 RPM por 10 min y posteriormente se filtra por gravedad usando papel filtro y un embudo de separación.
4. Finalmente, se afora a un matraz de 25.0 mL con EtOH 70%

Parte II. Preparación de disoluciones.

A. $AlCl_3$ 10% p/v: Pesar 2.5 gramos de $AlCl_3$ y disolverlo en agua DI a un volumen final de 25 mL.

B. CH_3CO_2K 1 M: Pesar 2.45 gramos de CH_3CO_2K y disolverlo en agua DI a un volumen final de 25 mL.

C. Estándar quercetina 1000 mg/L: Pesar 263.2 mg de quercetina (95%) y disolver en 250.0 mL con MeOH.

Parte III. Curva de calibración por patrón externo.

A. Blanco de calibración.

En un matraz de 10.0 mL se adiciona 400 µL de $AlCl_3$ 10% y 400 µL de CH_3CO_2K 1 M y aforar con H_2O DI c.b.p

B. Estándares

La preparación de los estándares se realiza por triplicado de acuerdo a la siguiente tabla, siguiendo el orden de adición de soluciones:

Tabla B1. Calibrantes a partir de solución stock de 1000 mg/L de quercetina

Concentración mg/L	Alícuota (µL)	$AlCl_3$ 10% (µL)	CH_3CO_2K 1M (µL)	Aforo H2O DI(mL)
Blanco calibración	0	400	400	10
1.5	15	400	400	10
2.0	20	400	400	10
2.5	25	400	400	10
3.0	30	400	400	10

Una vez preparados los estándares, se colocan durante 10 minutos en el ultrasónico y posterior a esto, se almacenan en un lugar oscuro y fresco durante 30 min.

C. Lectura de muestras

a. Encender espectrofotómetro 20 min antes de la medición.

b. Ajustar la longitud de onda del equipo a 415 nm.

c. Realizar el ajuste *auto zero* con celda de vidrio vacía 10 mm y realizar la medición de cada estándar.

VI. Resultados

En la bitácora deberán estar registrados en orden y letra legible los resultados obtenidos. Recuerde nombrar las tablas como "Tabla 1. [contenido de la tabla]" así como pegar las gráficas hechas:

- Graficar absorbancia corregida en función de la concentración de quercetina, y realizar la regresión lineal.
- Graficar curva de Ringbom de la curva de calibración de quercetina (log Concentración vs. %Transmitancia; este último se puede calcular a través de la página web)

- Escriba el modelo matemático que se usó para la determinación del analito. (Recuerde hacer el análisis dimensional). El resultado se expresa como equivalentes de quercetina por gramos de muestra (biomasa).
- Determinar el %R y RSD de nuestro analito experimental, como el LOQ Y LOD de nuestro ensayo experimental.

VII. Informe.

El informe se entrega a computadora, los cálculos a mano y tinta azul serán escaneados desde la bitácora y deberán presentarse en forma legible, clara y limpia, se enviará un solo archivo en formato PDF. El contenido del informe solicitado es el siguiente:

- ❖ Título (Muestra/Análisis)
- ❖ Resumen (Muestra/Análisis).
- ❖ Metodología de trabajo.
- ❖ Tablas de resultados y valor del mensurando correctamente reportado.
- ❖ Conclusión del ANÁLISIS.
- ❖ Firma del responsable y fecha.
- ❖ ANEXO 1: Tabla de datos, TODOS los cálculos realizados incluyendo normalizaciones y el análisis de la muestra. Incluye los modelos involucrados
- ❖ ANEXO 2: Análisis de resultados

VIII. Cuestionario previo

1. Investigar el significado de polifenoles, menciona 5 ejemplos junto con su estructura química y en dónde se encuentran.

2. Investiga la clasificación de los flavonoides y menciona 3 ejemplos de cada grupo, así como sus características principales.
3. ¿Qué es estrés oxidativo?
4. Investiga el método de extracción usado para los flavonoides y su fundamento.
5. Buscar el complejo que forma los flavonoides con el cloruro de aluminio, así mismo en las condiciones en la que se forma.
6. Investigar la solubilidad de los distintos reactivos en etanol, agua y metanol.
7. Investigar hojas de seguridad de los reactivos empleados.

IX. Bibliografía

1. Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 74(4), 418–425. https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418
2. Hernández Guiance, S. N., Marino, L., Isern, D. M., Coria, I. D., & Irurzun, I. M. (2019). *Flavonoides: Aplicaciones medicinales e industriales*. Invenio, 22, 24. Facultad de Química, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano; Instituto de Física de Rosario (CCT-CONICET); Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (CONICET). arxiv.org+9scholar.google.com+9
3. Fagundo Mollineda, A., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2023, 31 de octubre). *Macroalgas marinas: potentes antioxidantes sumergidos*. Avance y Perspectiva. Recuperado de https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/macroalgas-marinas-potentes-antioxidantes-sumergidos/
4. Bhaigyabati, T., Devi, P. G., & Bag, G. C. (2014). Total flavonoid content and antioxidant activity of aqueous rhizome extract of three Hedychium species of Manipur Valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 970–976.

5. Zou, L., Li, H., Ding, X., Liu, Z., He, D., Kowah, JAH, Wang, L., Yuan, M. y Liu, X. (2022). Revisión de la aplicación de la espectroscopia a flavonoides de materiales de homología en medicamentos y alimentos. *Molecules* , 27 (22), 7766. https://doi.org/10.3390/molecules27227766
6. Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
7. Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142–1145.
8. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41
9. Suresh Kumar, K., Ganesan, K., & Subba Rao, P. V. (2021). Profiling of bioactives and in vitro evaluation of antioxidant and antidiabetic property of polyphenols of marine algae Padina tetrastromatica. *Algal Research*, 58, 102250. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102250
10. Porphyra spp flour: An alternative for the sustainable supply of functional and nutritional components for the human diet. (2019). Congreso LACCEI. https://laccei.org/LACCEI2019-MontegoBay/full_papers/FP195.pdf
11. Molyneux, P. (2004). *On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents*. https://www.researchgate.net/publication/258921956
12. Ortega-Toro, R., Talero-Pérez, J., & Arrieta-Baez, D. (2019). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (Citrus limetta Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2), 243–259. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971124003

13. Howard, L. R., Pandjaitan, N., Morelock, T., & Gil, M. I. (2010). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4384–4392. https://doi.org/10.1021/jf103434u
14. García Nava, N. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales.* Memorias del Verano de la Ciencia UAQ. https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
15. Chaves, R. C., Lima, M. S., Silva, M. R. A., & Lima, E. S. (2017). Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of Eugenia uniflora Linn. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–8. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5541481/
16. Rutiaga-Quiñones, O. M., Rutiaga, J. G., & González-Laredo, R. F. (2008). Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (Matricaria recutita L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 361–366. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400005
17. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
18. Ilmi, H. M., Elya, B., & Handayani, R. (2020). Association between total phenol and flavonoid contents in Artocarpus heterophyllus (jackfruit) bark and leaf extracts and lipoxygenase inhibition. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12(Special Issue 1), 252–256. https://doi.org/10.22159/ijap.2020.v12s1.FF055
19. Sobuj, M. K. A., Shemul, M. S., Islam, M. S., Islam, M. A., Mely, S. S., Ayon, M. H., Pranto, S. M., Alam, M. S., Bhuiyan, M. S., & Rafiquzzaman, S. M. (2024). Qualitative and quantitative phytochemical

analysis of brown seaweed Sargassum polycystum collected from Bangladesh with its antioxidant activity determination. Food Chemistry Advances, 4, Article 100565. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100565

20. Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research, 37(2), 99–105. https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961

Agradecimiento Académico:

Jefatura del Departamento de Química Analítica (DQA)
Dr. José Luz González Chávez
M. en C. Juan Rolando Vázquez Miranda
Dra. Minerva Monroy Barreto

Colaboradores Académicos PAPIME PE201324:
Q. Ceferina Ignacio Vicente
M. en C. Silvia Citlalli Gama González
Dra. Norma Ruth López Santiago
Dra. Agueda Elena Ceniceros Gómez
Dra. Anaí Chiken Soriano (Sria. Académica del DQA)
Dr. Luis Gerardo Martínez
Dr. Rafael Ibarra Contreras