

Efecto del tiempo sobre la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu

Time influence over total polyphenolic quantification with
Folin-Ciocalteu reagent

ÓSCAR JULIO MEDINA VARGAS

*Licenciado en Química y Biología
Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Correo electrónico: oscar.medina@uptc.edu.co*

LUIS CARLOS ARTURO GARZÓN SALCEDO

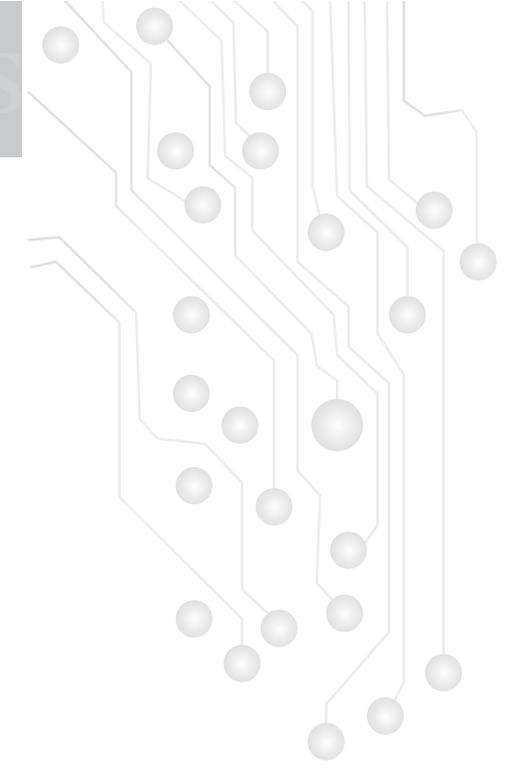
*Químico Farmacéutico
Doctor en Ciencias-Química
Grupo de Investigación Núcleo
Universidad de Boyacá, Colombia
Correo electrónico: lcgazon@uniboyaca.edu.co*

WILFRED EDILBERTO ESPINOSA MANRIQUE

*Químico de Alimentos
Magíster en Química
Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Correo electrónico: wilfred.espinosa@uptc.edu.co*

Recibido: 03/09/2015

Aceptado: 05/11/2015



RESUMEN

En este manuscrito se presentan los resultados experimentales obtenidos durante el proceso de cuantificación de polifenoles totales en función del tiempo, mediante la metodología de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como molécula de referencia. El trabajo se realizó para obtener el tiempo apropiado de reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu, dado que en la literatura se encuentra, para esta metodología, un conjunto variado de condiciones que pueden afectar la confiabilidad de los resultados experimentales. Se construyeron 5 curvas de calibración para que el ácido gálico interactuara con el reactivo de Folin-Ciocalteu entre 1,0 y 3,0 horas a intervalos de 30 minutos, y se contrastaron sus valores de pendiente e intercepto entre sí y con los valores de absorbancia del blanco. Se aplicaron las pruebas estadísticas de análisis de varianza de un factor y contraste t para dos medias experimentales. Este estudio permitió demostrar que el tiempo es una variable influyente en la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu, y dentro de las condiciones experimentales analizadas se encontró que el tiempo adecuado de interacción fue de 1,0 hora.

Palabras clave: ácido gálico, polifenoles totales, reactivo de Folin-Ciocalteu.

ABSTRACT

In this manuscript we present the experimental results obtained during the quantification process of total polyphenols as a function of time, using the methodology of Folin-Ciocalteu and gallic acid as the reference molecule. In the literature, it is reported for this methodology a varied set of conditions, a factor that may affect the reliability of the experimental results. This work was carried out to determine the appropriate reaction time between gallic acid and Folin-Ciocalteu reagent. Five calibration curves were constructed to allow the gallic acid interaction with the Folin-Ciocalteu reagent for different intervals of time between 1.0 and 3.0 hours (30-minute intervals). Then, the slope and intercept values were compared with each other, and also with the absorbance values. Statistical analysis was performed using one-factor ANOVA and contrast t for two experimental means. This study demonstrated that time is an influential variable in the quantification of total polyphenols when analyzed with the Folin-Ciocalteu reagent. It was also determined that within the experimental conditions examined, the adequate interaction time was 1.0 hour.

Keywords: gallic acid, total polyphenols, Folin-Ciocalteu reagent.

Citar este artículo así: Medina O., Garzón L. & Espinosa W. (2016). Efecto del tiempo sobre la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Revista I3+, 3(2), 10 - 24 p.

Efecto del tiempo sobre la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

INTRODUCCIÓN

Boyacá es un departamento de gran riqueza natural, destacado por su diversidad de cultivos frutales. En sus zonas altas (2600 – 4000 m.s.n.m.) crece una planta conocida comúnmente como agraz o mortiño; su nombre científico es *Vaccinium meridionale* y desde hace algún tiempo su fruto se comercializa con mayor intensidad por poseer un alto contenido de compuestos polifenólicos, debido a que contiene moléculas de la familia de los flavonoles, antocianinas, antocianidinas, y ácido cinámico (Ávila *et al.*, 2007). Este es un fruto con gran potencial para ser empleado como materia prima en la formulación de productos nutracéuticos.

Estudios realizados sobre el fruto de *Vaccinium meridionale* han mostrado varios tipos de actividad biológica. Vale la pena mencionar la actividad antioxidante determinada con los métodos ABTS, DPPH y FRAP (Gaviria *et al.*, 2009; Garzón *et al.*, 2010); la actividad cardioprotectora en ratas con extractos fermentados y no alcohólicos (Lopera *et al.*, 2013); y la actividad antioxidante, los efectos citotóxicos y antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de colon con extractos acuosos (Maldonado *et al.*, 2014). También es importante recalcar que el fruto de esta especie contiene una cantidad de polifenoles totales (PT) comparables y, en algunos casos, mayores respecto a otros frutos del género *Vaccinium*, como los son *V. myrtillus*, *V. corymbosum*, *V. ashei* y *V. angustifolium* (Gaviria *et al.*, 2009; Garzón *et al.*, 2010).

La actividad biológica de un extracto depende de su composición química, que está determinada por el método de extracción y las condiciones experimentales (Sarker *et al.*, 2006). La técnica denominada extracción asistida por microondas, conocida como MAE por sus siglas en inglés, se ha aplicado exitosamente en la extracción de compuestos fenólicos (Zhang *et al.*, 2011). En este proceso, el material vegetal disperso en un líquido se expone a radiación microondas para que las moléculas de agua presentes en los sistemas vasculares de las plantas rompan los tejidos, liberen las biomoléculas allí contenidas y se solubilicen en el solvente (Zhang *et al.*, 2011). Comparado con los métodos tradicionales, la técnica MAE ofrece muchas ventajas como son los cortos tiempos de extracción, un menor consumo de solvente, extractos de mejor calidad en términos de su composición química, disminución en los costos, entre otras. Dentro de los factores que afectan el proceso de extracción se encuentra la potencia, la temperatura, el tiempo de extracción, la naturaleza del solvente, la relación sólido-solvente, el tiempo de contacto del material vegetal con el sistema solvente y el tamaño de partícula (Jokić *et al.*, 2012). La aceleración del proceso y un alto rendimiento de extracción es el resultado de una combinación sinérgica de dos fenómenos de transporte: gradientes de energía térmica y de materia que trabajan en la misma dirección (desde el interior hasta el exterior de la célula). En extracciones convencionales, la transferencia de masa se produce desde el interior hacia el exterior de la célula, y la transferencia térmica en sentido contrario (Chemat y Cravotto, 2013).

Para los autores es de interés la obtención de extractos de frutos secos de *Vaccinium meridionale* con mejores propiedades antioxidantes. En ese sentido, es importante evaluar el impacto de las condiciones experimentales de extracción con MAE sobre la eficiencia de remoción en los frutos. Como etapa inicial, se ha propuesto estudiar el efecto de la temperatura, la potencia, el tiempo, la relación fruto seco/solvente y la concentración de etanol del sistema solvente etanol-agua en términos de la cantidad de polifenoles totales (PT) removidos, empleando para ello el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) y ácido gálico (AG) como molécula de referencia. La ejecución de los experimentos propiamente dichos requiere de la validación de la metodología analítica; así mismo, el proceso de validación necesita del establecimiento del tiempo de reacción entre el analito (en este caso el AG) y el reactivo de F-C. Lo anterior se justifica en el hecho de que en la literatura se encuentra una serie de condiciones experimentales para cuantificar PT con el reactivo de F-C. Con respecto al tiempo de reacción, existen reportes en los que el analito y el reactivo de F-C interactúan durante 30 minutos (Turkmen *et al.*, 2006; Blainski *et al.*, 2013; Sim *et al.*, 2016), 90 minutos (Rafiee *et al.*, 2011) y 120 minutos (Li *et al.*, 2013; Hatami *et al.*, 2014).

El reactivo de F-C estándar está compuesto por fosfotungstato-molibdatos y es una solución acuosa de color amarillo que tiene la capacidad de capturar uno o dos electrones en reacciones de oxidación-reducción y de formar especies de color azul (por ejemplo, el $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$) cuyo máximo de absorción se encuentra muy próximo a los 760 nm de longitud de onda. Algunos autores han sugerido, como etapa inicial del proceso, la reducción del molibdeno desde un número de oxidación +6 hasta un número de oxidación +5: $\text{Mo(VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo(V)}$. En la cuantificación de compuestos fenólicos, el medio debe ajustarse con carbonato de sodio hasta que el sistema alcance un $\text{pH} \approx 10$, para que los fenolatos allí formados reaccionen con el reactivo de F-C. Las especies resultantes no dependen de la estructura de los compuestos fenólicos (Huang *et al.*, 2005).

En este artículo se muestra el estudio realizado para evaluar la variabilidad de los resultados en la cantidad de PT con AG y reactivo de F-C por efecto del tiempo. En el análisis de resultados se aplicaron algunas pruebas estadísticas para contrastar los resultados obtenidos con el blanco de reactivos y las curvas de calibración.

METODOLOGÍA

Instrumentos y Equipos

Balanza analítica Ohaus explorer EX 224, capacidad 220 g, incertidumbre $\pm 10^{-4}$ g. Espectrofotómetro Hach DR 5000, rango de longitud de onda: 190–1100 nm, precisión de longitud de onda: ± 1 nm entre 200 a 900 nm, precisión fotométrica: 1 % entre 0,50 a 2,0 de absorbancia.

Reactivos

Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu 2 N, Merck. Ácido gálico monohidratado Panreac, $\geq 0,99$ en fracción másica (No. CAS: 149-91-7). Agua desgasificada ultrapura (tipo I), sistema Pall Corporation Cascada LS®, conductividad: $0,056 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Carbonato de sodio monohidratado Mallinckrodt R.A., $\geq 0,999$ en fracción másica (No. CAS 497-19-8).

Absorbancia del Blanco Obtenida a 760 nm

Se realizaron en total 35 ensayos para el sistema blanco de reactivos: 7 puntos en días diferentes para cada tiempo (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 horas). Cada ensayo se realizó en un balón aforado de 5 mL, al que se le agregó inicialmente $125 \mu\text{L}$ de reactivo de F-C 2 N y se homogenizó por 1 minuto. Después se adicionó $400 \mu\text{L}$ de solución de carbonato de sodio al 10 % (p/p) y se llevó al aforo con agua. Se homogenizó por 30 segundos y se dejó en un sitio oscuro por 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 horas respectivamente. Esta solución se llevó a un espectrofotómetro Hach DR 5000 y se midió su absorbancia a 760 nm de longitud de onda. La precisión de los resultados en cada tiempo se determinó a través de los valores de desviación estándar obtenidos y la comparación de los resultados se evaluó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) al 95 % de confianza.

Curvas de Calibración para el AG con el Reactivo de F-C en Función del Tiempo

Las soluciones estándar de AG fueron preparadas por pesada con una balanza analítica Ohaus explorer EX 224. El AG fue puesto en desecador por lo menos 72 horas antes de su uso. Para cada curva de calibración y en cada réplica, se pesó un equivalente de 30 mg de AG y se mezcló con agua ultrapura hasta una masa final de 49,8 g. De allí se pesaron seis muestras diferentes con masas desde 16,6 hasta 66,4 mg de solución de AG y se llevaron a un balón aforado de 5 mL. Luego se agregó $125 \mu\text{L}$ de reactivo de F-C 2 N y se homogenizó por 1 minuto. Después, se adicionaron $400 \mu\text{L}$ de solución de carbonato de sodio al 10 % (p/p) y se llevó al aforo con agua. Se homogenizó por 30 segundos y se dejó en un sitio oscuro por 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 horas, según correspondiera. La solución se llevó a un espectrofotómetro Hach DR 5000 y se midió su absorbancia a 760 nm de longitud de onda. Los resultados experimentales obtenidos en cada curva de calibración se analizaron con la aplicación de las pruebas estadísticas C de Cochran, para comprobar homocedasticidad; ANOVA de un factor, para comparar los valores de pendiente e intercepto; y contraste *t*, para confrontar los valores de pendiente e intercepto en curvas de calibración de tiempos sucesivos, y entre el valor de la respuesta instrumental del blanco con los valores de intercepto en las curvas de calibración. Para todos los casos se empleó un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 presenta los valores de absorbancia obtenidos en cada una de las 7 réplicas, su promedio y desviación estándar para el sistema blanco de reactivos (reactivo de F-C sin AG).

Absorbancia del Blanco Obtenida a 760 nm

Ensayo	1,0 horas	1,5 horas	2,0 horas	2,5 horas	3,0 horas
1	0,013	0,016	0,025	0,014	0,010
2	0,016	0,013	0,018	0,020	0,014
3	0,024	0,017	0,010	0,017	0,013
4	0,015	0,014	0,019	0,019	0,019
5	0,015	0,013	0,017	0,011	0,018
6	0,017	0,016	0,013	0,012	0,020
7	0,008	0,020	0,015	0,016	0,015
Promedio	0,0154	0,0156	0,0167	0,0156	0,0156
σ	0,0048	0,0025	0,0048	0,0034	0,0036

Tabla 1. Absorbancias obtenidas a 760 nm para el blanco (reactivo de F-C) en función del tiempo, y un nivel de confianza del 95 %.

Como se puede observar en la tabla 2, y con un nivel de confianza del 95 %, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los valores de absorbancia medidos durante el intervalo de tiempo considerado, dado que $F_{exp.} < F_{crit.}$. Lo anterior indica que la lectura instrumental para el reactivo de F-C sin AG es estadísticamente igual cuando se determina entre 1 y 3 horas. Mediante la conjunción de los 35 ensayos realizados, se obtuvo para el blanco un valor de absorbancia promedio de 0,0158 y desviación estándar de 0,0037.

Fuentes de variación	Sumatoria de cuadrados $\cdot 10^4$	Grados de libertad	Cuadrado medio $\cdot 10^5$	$F_{exp.}$	$F_{crit.}$
Entre grupos	0,21	4	0,52	0,337	2,69
Dentro de los grupos	4,60	30	1,53	—	—
Total	4,81	34	—	—	—

Tabla 2. Resultados obtenidos en la prueba ANOVA para la evaluación de la absorbancia del blanco en función del tiempo a 760 nm (reactivo de F-C).

Curvas de Calibración para el AG con el Reactivo de F-C en Función del Tiempo

En la tabla 3 se muestran los resultados experimentales obtenidos en cada curva de calibración. Dichos resultados se encuentran, según corresponda con el tiempo de medida, en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5. En cada gráfica se presenta la ecuación de la recta, las incertidumbres de los parámetros pendiente e intercepto, y el valor de r^2 . Se observa una relación directamente proporcional entre el tiempo y los valores de pendiente e intercepto en cada una de las curvas de calibración.

1,0 horas		1,5 horas		2,0 horas		2,5 horas		3,0 horas	
mg/L AG	A								
2,05	0,196	2,04	0,209	1,95	0,207	2,00	0,212	1,99	0,225
2,02	0,186	2,10	0,202	2,21	0,230	2,20	0,221	2,03	0,221
2,05	0,193	2,05	0,203	2,30	0,243	2,16	0,226	2,02	0,229
3,26	0,307	3,03	0,296	3,20	0,334	3,21	0,346	3,15	0,341
3,22	0,300	3,25	0,322	3,15	0,327	3,21	0,345	3,24	0,362
3,21	0,296	3,15	0,302	3,19	0,323	3,18	0,335	3,21	0,343
4,43	0,414	4,28	0,433	4,42	0,439	4,40	0,465	4,44	0,474
4,40	0,400	4,48	0,447	4,38	0,422	4,40	0,450	4,36	0,467
4,40	0,406	4,41	0,426	4,30	0,415	4,36	0,453	4,40	0,453
5,61	0,509	5,60	0,536	5,59	0,546	5,64	0,567	5,63	0,582
5,76	0,541	5,59	0,548	5,63	0,569	5,61	0,578	5,62	0,593
5,76	0,527	5,67	0,543	5,61	0,553	5,58	0,564	5,59	0,582
6,77	0,621	6,83	0,660	6,81	0,669	6,79	0,679	6,81	0,697
6,82	0,607	6,78	0,643	6,82	0,657	6,80	0,661	6,81	0,682
6,78	0,619	6,80	0,658	6,84	0,674	6,82	0,678	6,83	0,692
8,24	0,739	8,02	0,741	7,97	0,759	8,10	0,784	8,01	0,791
8,11	0,710	7,96	0,728	8,10	0,757	8,15	0,774	8,03	0,778
8,09	0,723	7,98	0,741	8,30	0,792	8,23	0,796	8,05	0,795

Tabla 3. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función del tiempo y de la concentración de AG.

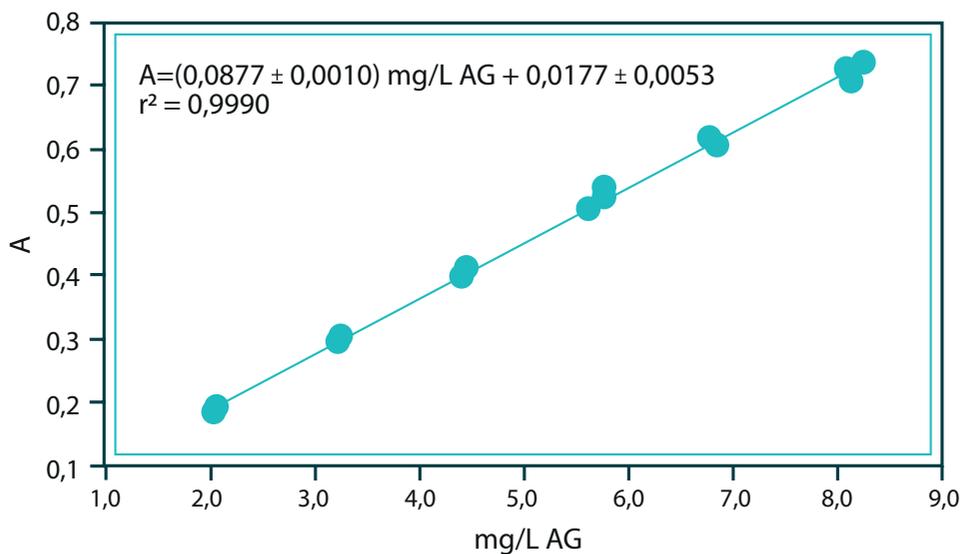


Figura 1. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función de la concentración de AG, transcurrida 1 hora.

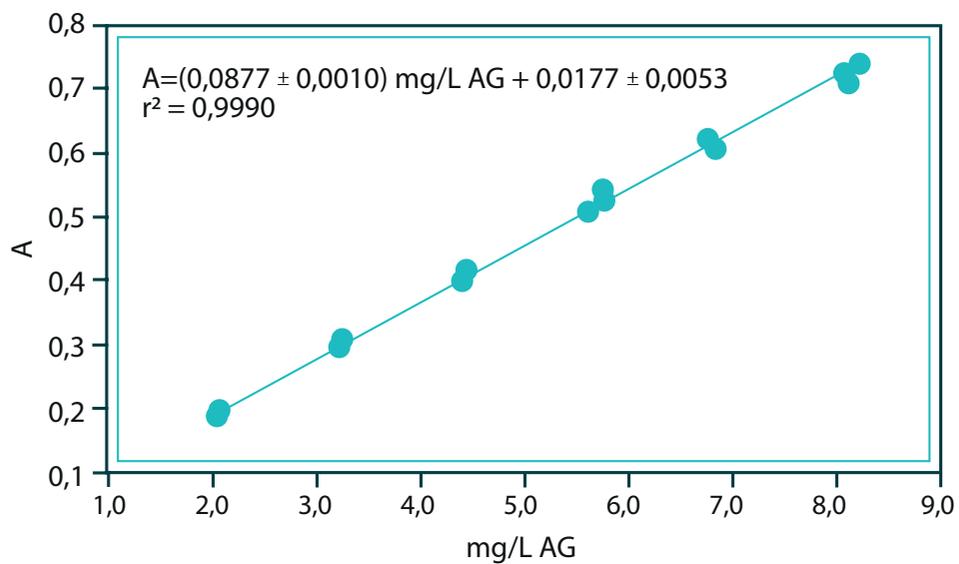


Figura 2. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función de la concentración de AG, transcurridas 1,5 horas.

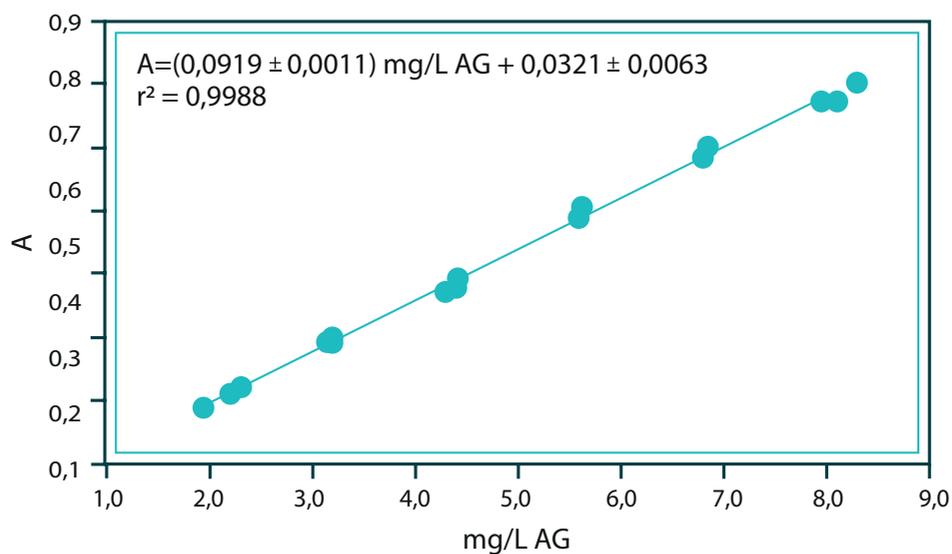


Figura 3. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función de la concentración de AG, transcurridas 2 horas.

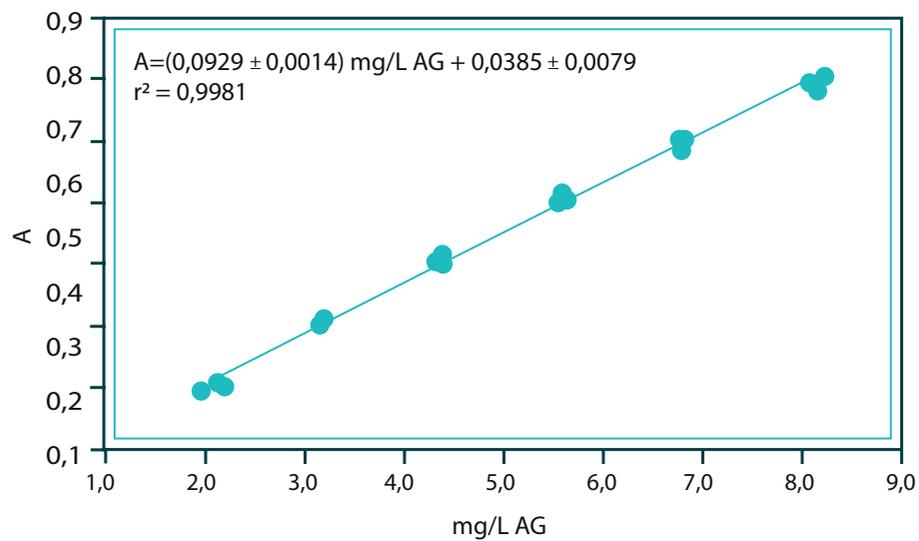


Figura 4. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función de la concentración de AG, transcurridas 2,5 horas.

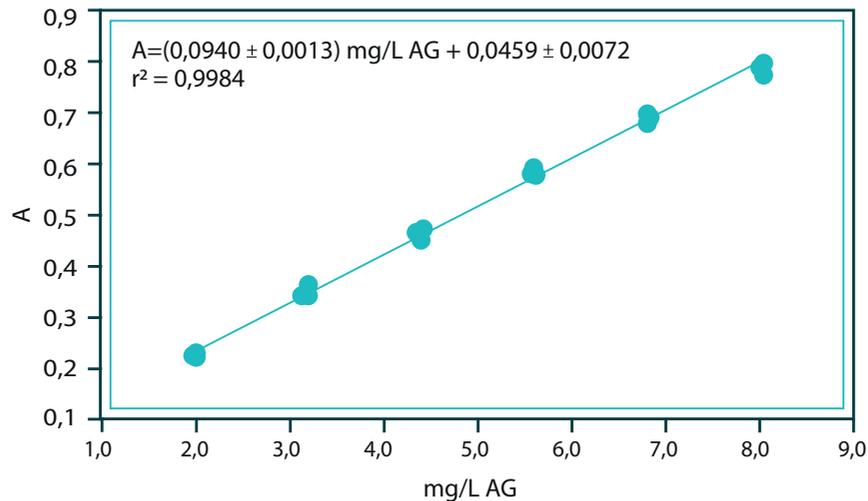


Figura 5. Absorbancia obtenida con el reactivo de F-C a 760 nm en función de la concentración de AG, transcurridas 3 horas.

En la tabla 4 se presentan los promedios y varianzas obtenidas para el factor de respuesta en las curvas de calibración. También se muestran los valores de $C_{\text{exp.}}$ calculados en cada una de ellas, y en todos los casos estos valores no superan el valor crítico ($C_{\text{crit.}} = 0,781$). Se infiere así que la variabilidad de los resultados no depende de la concentración de AG, es decir, cada curva de calibración presenta una distribución homocedástica (Miller y Miller, 2002).

La tabla 5 resume los resultados obtenidos en la prueba ANOVA frente a la evaluación de los valores de las pendientes de las curvas de calibración en función del tiempo. Con un nivel de confianza del 95 %, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre dichos valores. Se deduce entonces que el tiempo es una variable determinante en el proceso de cuantificación de PT con el reactivo de F-C.

mg/L AG	1,0 hora		mg/L AG	1,5 horas		mg/L AG	2,0 horas	
	Factor de respuesta			Factor de respuesta			Factor de respuesta	
promedio	Promedio	Varianza	promedio	Promedio	Varianza	promedio	Promedio	Varianza
2,04	0,0938	$3,25 \cdot 10^{-6}$	2,06	0,0993	$1,09 \cdot 10^{-5}$	2,15	0,105	$8,55 \cdot 10^{-7}$
3,23	0,0932	$1,16 \cdot 10^{-6}$	3,14	0,0976	$2,56 \cdot 10^{-6}$	3,18	0,103	$2,86 \cdot 10^{-6}$
4,41	0,0922	$1,62 \cdot 10^{-6}$	4,39	0,0991	$5,51 \cdot 10^{-6}$	4,37	0,0973	$3,06 \cdot 10^{-6}$
5,71	0,0920	$2,84 \cdot 10^{-6}$	5,62	0,0965	$1,68 \cdot 10^{-6}$	5,61	0,099	$3,19 \cdot 10^{-6}$
6,79	0,0907	$2,23 \cdot 10^{-6}$	6,80	0,0961	$1,23 \cdot 10^{-6}$	6,82	0,0977	$1,39 \cdot 10^{-6}$
8,14	0,0889	$1,37 \cdot 10^{-6}$	7,99	0,0922	$5,06 \cdot 10^{-7}$	8,12	0,0947	$1,13 \cdot 10^{-6}$
C_{exp}	0,168		C_{exp}	0,465		C_{exp}	0,187	

mg/L AG	2,5 horas		mg/L AG	3,0 horas	
	Factor de respuesta			Factor de respuesta	
promedio	Promedio	Varianza	promedio	Promedio	Varianza
2,12	0,104	$8,93 \cdot 10^{-6}$	2,02	0,112	$6,07 \cdot 10^{-6}$
3,20	0,107	$1,79 \cdot 10^{-6}$	3,20	0,101	$6,94 \cdot 10^{-6}$
4,39	0,104	$2,77 \cdot 10^{-6}$	4,40	0,106	$5,33 \cdot 10^{-6}$
5,61	0,102	$1,61 \cdot 10^{-6}$	5,61	0,104	$1,19 \cdot 10^{-6}$
6,80	0,0989	$2,22 \cdot 10^{-6}$	6,82	0,101	$1,14 \cdot 10^{-6}$
8,16	0,0962	$1,10 \cdot 10^{-6}$	8,03	0,0981	$1,14 \cdot 10^{-6}$
C_{exp}	0,425		C_{exp}	0,266	

Tabla 4. Promedios y varianzas obtenidas para el factor de respuesta en función del tiempo y la concentración de AG a 760 nm.

Fuentes de variación	Sumatoria de cuadrados $\cdot 10^4$	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_{exp.}$	$F_{crítico}$
Entre grupos	4,22	4	$1,05 \cdot 10^{-4}$	79,0	2,87
Dentro de los grupos	1,13	85	$1,34 \cdot 10^{-6}$	—	—
Total	5,35	89	—	—	—

Tabla 5. Resultados obtenidos en la prueba ANOVA (95 % de confianza) para la evaluación de los valores de pendiente en las curvas de calibración desarrolladas para la cuantificación de polifenoles totales, con el reactivo de F-C y AG a 760 nm en función de tiempo.

Adicionalmente, se muestran en la tabla 6 los resultados obtenidos en la prueba estadística de contraste para los valores de la pendiente entre curvas de calibración en tiempos sucesivos. Con una confianza del 95 %, se obtienen diferencias estadísticamente significativas en los valores de la pendiente medidos cada 30 minutos ($t_{exp.} > t_{crit.}$). En ese sentido, se infiere que el proceso de cuantificación de PT con el reactivo de F-C experimenta cambios significativos en este intervalo de tiempo.

	t = 1,0 y 1,5 horas	t = 1,5 y 2,0 horas	t = 2,0 y 2,5 horas	t = 2,5 y 3,0 horas
Hipótesis	$H_0: \beta_{1,0h} = \beta_{1,5h}$	$H_0: \beta_{1,5h} = \beta_{2,0h}$	$H_0: \beta_{2,0h} = \beta_{2,5h}$	$H_0: \beta_{2,5h} = \beta_{3,0h}$
	$H_0: \beta_{1,0h} \neq \beta_{1,5h}$	$H_0: \beta_{1,5h} \neq \beta_{2,0h}$	$H_0: \beta_{2,0h} \neq \beta_{2,5h}$	$H_0: \beta_{2,5h} \neq \beta_{3,0h}$
Resultados	$t_{exp.} = 8,43$	$t_{exp.} = 2,05$	$t_{exp.} = 2,40$	$t_{exp.} = 2,34$
	$t_{crit.} = 2,04$	$t_{crit.} = 2,04$	$t_{crit.} = 2,04$	$t_{crit.} = 2,04$
Criterio de decisión	Rechazar H_0	Rechazar H_0	Rechazar H_0	Rechazar H_0

Tabla 6. Resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pendiente (β) en las curvas de calibración desarrolladas en tiempos sucesivos (nivel de confianza del 95 %).

De manera análoga, se efectuaron las pruebas estadísticas ANOVA y de contraste entre dos medias experimentales al 95 % de confianza para los valores de intercepto obtenidos en las curvas de calibración. Los resultados se muestran en las tablas 7 y 8 para la primera y la segunda prueba respectivamente.

Fuentes de variación	Sumatoria de cuadrados $\cdot 10^3$	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_{exp.}$	$F_{critico}$
Entre grupos	8,90	4	$2,22 \cdot 10^{-3}$	56,4	2,87
Dentro de los grupos	3,35	85	$3,94 \cdot 10^{-5}$	—	—
Total	12,24	89	—	—	—

Tabla 7. Resultados obtenidos en la prueba ANOVA (95 % de confianza) para la evaluación de los valores de intercepto en las curvas de calibración desarrolladas para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de F-C y AG a 760 nm en función de tiempo.

	t = 1,0 y 1,5 horas	t = 1,5 y 2,0 horas	t = 2,0 y 2,5 horas	t = 2,5 y 3,0 horas
Hipótesis	$H_0: \alpha_{1,0\text{ h}} = \alpha_{1,5\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{1,5\text{ h}} = \beta_{2,0\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{2,0\text{ h}} = \alpha_{2,5\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{2,5\text{ h}} = \alpha_{3,0\text{ h}}$
	$H_0: \alpha_{1,0\text{ h}} \neq \alpha_{1,5\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{1,5\text{ h}} \neq \beta_{2,0\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{2,0\text{ h}} \neq \alpha_{2,5\text{ h}}$	$H_0: \alpha_{2,5\text{ h}} \neq \alpha_{3,0\text{ h}}$
Resultados	$t_{\text{exp.}} = 3,31$	$t_{\text{exp.}} = 3,18$	$t_{\text{exp.}} = 2,72$	$t_{\text{exp.}} = 2,94$
	$t_{\text{crit.}} = 2,04$	$t_{\text{crit.}} = 2,04$	$t_{\text{crit.}} = 2,04$	$t_{\text{crit.}} = 2,04$
Criterio de decisión	Rechazar H_0	Rechazar H_0	Rechazar H_0	Rechazar H_0

Tabla 8. Resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de intercepto (α) en las curvas de calibración desarrolladas en tiempos sucesivos (nivel de confianza del 95 %).

Al igual que en los valores de la pendiente, el tiempo afecta notablemente los valores de intercepto obtenidos en cada curva de calibración. Su influencia también se observa en cada intervalo de 30 minutos.

Por último, se realizó al 95 % de confianza la prueba estadística de contraste entre dos medias experimentales para evaluar diferencias significativas entre la respuesta instrumental del blanco y los valores de intercepto obtenidos a 1,0 y 1,5 horas. Como se observa en la tabla 9, el valor de absorbancia promedio del blanco es igual, dentro de la incertidumbre experimental, al valor del intercepto en la curva de calibración realizada a 1,0 hora ($t_{\text{exp.}} > t_{\text{crit.}}$), y difiere del valor obtenido en la curva de calibración a 1,5 horas ($t_{\text{exp.}} < t_{\text{crit.}}$). Esto significa que la cuantificación de PT con el reactivo de F-C con AG como molécula de referencia no se debe realizar a tiempos iguales o mayores de 1,5 horas; y teniendo en cuenta las condiciones experimentales de este estudio, el tiempo de cuantificación apropiado es de 1 hora.

Hipótesis	$H_0: A_{\text{blan.}} = \alpha_{1,0\text{ h}}$	$H_0: A_{\text{blan.}} = \alpha_{1,5\text{ h}}$
	$H_0: A_{\text{blan.}} \neq \alpha_{1,0\text{ h}}$	$H_0: A_{\text{blan.}} \neq \alpha_{1,5\text{ h}}$
Resultados	$t_{\text{exp.}} = 1,52$	$t_{\text{exp.}} = 5,90$
	$t_{\text{crit.}} = 2,01$	$t_{\text{crit.}} = 2,01$
Criterio de decisión	No rechazar H_0	Rechazar H_0

Tabla 9. Resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de intercepto (α) en las curvas de calibración a $t = 1,0$ y $1,5$ horas y el valor de absorbancia obtenido para el blanco ($A_{\text{blan.}}$) con un nivel de confianza del 95 %.

CONCLUSIONES

El tiempo es una variable determinante en el proceso de cuantificación de PT con el reactivo de F-C. Con un nivel de confianza del 95 %, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pendiente e intercepto en cada una de las curvas de calibración efectuadas.

Dentro del conjunto de condiciones experimentales estudiadas se demostró, con un nivel del 95 % de confianza, que la cuantificación de PT con el reactivo de F-C es adecuada a 1,0 hora, dado que el valor del intercepto de esta curva de calibración es estadísticamente igual a la absorbancia obtenida con el blanco, a diferencia de los otros tiempos considerados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, H. G., Cuspoca, J. A., Fischer, G. y Ligarreto G. A. (2007). Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale*. Swartz). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 60:4179-4193.
- Blainski, A., López, G. C. y Palazzo de Mello, J. C. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense*. *L. Molecules*. 18(6):6852-6865.
- Chemat, F. y Cravotto, G., (Eds.) (2013). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, vol. 3. *Springer Science & Business Media*. New York.
- Garzón, G., Narváez, C., Riedl, K. y Schwartz, S. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale*. Swartz) from Colombia. *Food Chemistry*. 122:980-986.
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Mosquera, A., Tamayo, A., Lopera, Y. y Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8(6):519-528.
- Hatami, T., Emami, S. A., Miraghaee, S. S. y Mojarrab, M. (2014). Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* willd. *Iran. J. Pharm. Res*. 13(2):551-559.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*. 53(6):1841-1856.

- Jokić, S., Cvjetko, M., Bozic, D., Fabek, S., Toth, N., Vorkapic-Furac, J. y Redovnikovic, I.R. (2012). Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47(12):2613-2619.
- Li, C., Feng, J., Huang, W-Y. y An, X-T. (2013). Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *J. Agric. Food Chem.* 61(3):523-531.
- Lopera, YE., Fantinelli, J., González, LF., Rojano, B., Ríos, JL., Schinella, G. y Mosca, S. (2013). Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of *Vaccinium meridionale* swartz during ischemia-reperfusion in rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Article ID 516727, 10 pages.
- Maldonado, M., Arango, S. y Rojano, B. (2014). Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines. *Rev. Cubana Plant. Med.* 19(2):172-184.
- Miller, JN y Miller, JC. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4ª ed.). Madrid: Prentice Hall.
- Rafiee, Z., Jafari, SM., Alami, M. y Khomeiri, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* 21(4):738-745.
- Sarker, S. D., Latif, Z. y Gray, A. I. (Ed.) (2006). Natural Products Isolation (2ª ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Sim, SYJ., Ng, JW., Ng, WK., Forde, CG. y Henry, CJ. (2016). Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. *Food Chem.* 200:46-54.
- Turkmen, N., Sari, F. y Velioglu, S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.* 99(4):835-841.
- Zhang, L., Wang, Y., Wu, D., Xu, M. y Chen, J. (2011). Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Camellia oleifera* Fruit Hull. *Molecules.* 16:4428-4437.

