

## DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN FENOLI TOTALI

Dewanto et al. (2002)

1,5 grammi di materiale vegetale fresco venivano omogenati con 4 mL di una soluzione costituita da metanolo acquoso 80%; l'omogenato ottenuto, posto in tubi falcon e in shaker overnight a  $-20^{\circ}$  C. Il mattino seguente il materiale era centrifugato a 10000 *g* per 15 minuti a  $4^{\circ}$  C ed il surnatante filtrato con filtri per HPLC (pori diametro 0,45  $\mu$ m).

Per la determinazione del contenuto in fenoli il protocollo eseguito è stato quello proposto da Dewanto *et al.* (2002): in cuvette del visibile venivano posti 5  $\mu$ L di estratto ai quali venivano aggiunti 120  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O distillata ad ottenere 125  $\mu$ L ai quali sono stati aggiunti 125  $\mu$ L di reagente di *Folin-Ciocalteu*. Il tutto è stato agitato e lasciato riposare per 6 minuti trascorsi i quali sono stati aggiunti 1,25 mL di NaHCO<sub>3</sub> al 7% ad ottenere un volume totale di 1,5 mL; il campione veniva quindi lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 90 minuti. Il bianco veniva preparato nello stesso modo ma con l'unica differenza che i 125  $\mu$ L iniziali erano costituiti esclusivamente da H<sub>2</sub>O distillata. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla determinazione spettrofotometrica della reazione colorimetrica che si sviluppa dall'interazione tra il reagente di *Folin-Ciocalteu* e l'estratto alla lunghezza d'onda di 760 nm. Per il calcolo del contenuto in fenoli totali, è stata necessaria la determinazione di una curva di taratura ottenuta da concentrazioni note di acido gallico (0-600  $\mu$ g). L'equazione della curva è la seguente:

$$y = 0,01146x - 0,01515$$

dove:  $y$  = assorbanza a 760 nm

$x$  =  $\mu$ g di acido gallico

Il principio di questa metodica si basa sul fatto che il reagente di *Folin-Ciocalteu* è formato da due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno. I composti fenolici in ambiente basico vengono ossidati dai metalli molibdeno e tungsteno presenti nei complessi, ed assumono la colorazione blu dovuta alla riduzione dei metalli. I valori finali della determinazione sono stati espressi in mg di acido gallico  $g^{-1}$  FW.

### ESEMPIO NUMERICICO

- VOLUME FINALE DI REAZIONE 1.5 mL
- 5  $\mu$ L ESTRATTO UTILIZZATO
- RETTA DI TARATURA  $Y=0.01146X-0.01515$
- ASSORBANZA DI UN CAMPIONE 0.500

Il valore dell'assorbanza del campione si sostituisce alla y della retta di taratura

$$0.5=0.01146x-0.01515$$

$$X=(0.5+0.01515)/0.01146$$

$$X=44.95 \mu\text{g fenoli totali in 1.5 mL}$$

Considerando che la concentrazione di fenoli trovata deriva da 5  $\mu$ L di campione in 1.5 mL di volume totale della miscela di reazione devo moltiplicare per il fattore di diluizione (volume totale/volume estratto = 1.5 mL/0.005 mL=300)

$$44.95 \mu\text{g}/1.5\text{mL} * 300= 13.49 \text{ mg } 1.5\text{mL}^{-1} \text{ (fenoli totali in 1.5 mL estratto originale)}$$

Per sapere quanti ce ne sono in 1 mL

$$13.49 \text{ mg} : 1.5 \text{ mL} = x : 1 \text{ mL}$$

$$X=(13.49 \text{ mg} * 1 \text{ mL})/1.5 \text{ mL}$$

$$X=8.99 \text{ mg mL}^{-1} \text{ (fenoli totali in 1 mL di estratto originale)}$$

Sapendo che in tutto ho estratto 1,5 g di materiale vegetale in 4 mL di metanolo all' 80% :

$$(8.99 \text{ mg mL}^{-1} * 4 \text{ mL})/1,5 \text{ g}= 24 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW (fenoli in 1 g di peso fresco)}$$

Realizzare la retta di taratura:

- Pesate 60 mg di acido gallico e solubilizzatelo ad esempio in 10 mL di metanolo all' 80%. (La soluzione contiene  $6000 \mu\text{g mL}^{-1}$  di acido gallico). Adesso da questa soluzione prelevate concentrazioni crescenti e diluite in etanolo 80%
- ES 1: 150  $\mu\text{L}$  della soluzione sopra in 1.350 mL di metanolo 80% (la soluzione contiene adesso 600  $\mu\text{g}$  di acido gallico in 1.5 mL perché ho diluito 10 volte la soluzione originale)
- ES 2: 75  $\mu\text{L}$  della soluzione sopra in 1.425 mL di metanolo 80% (la soluzione contiene adesso 300 $\mu\text{g}$  di acido gallico in 1.5 mL perché ho diluito 20 volte la soluzione originale )
- ES 3: 50 $\mu\text{L}$  della soluzione sopra in 1.450 mL di metanolo 80% (la soluzione contiene adesso 200 $\mu\text{g}$  di acido gallico in 1.5 mL perché ho diluito 30 volte la soluzione originale )
- ES 4: 37.5  $\mu\text{L}$  della soluzione sopra in 1.462,5 mL di metanolo 80% (la soluzione contiene adesso 150  $\mu\text{g}$  di acido gallico in 1.5 mL perché ho diluito 40 volte la soluzione originale )
- ES 5: 30  $\mu\text{L}$  della soluzione sopra in 1.470 mL di metanolo 80% (la soluzione contiene adesso 120  $\mu\text{g}$  di acido gallico in 1.5 mL perché ho diluito 50 volte la soluzione originale )
- Con questi 5 punti posso già costruire una retta di taratura ponendo su asse x i mg di acido gallico e sull'asse y la relativa assorbanza. Poi tramite regressione lineare trovo la curva e determino l'equazione della retta.