

Protocolo para la determinación de flavonoides en *Calendula officinalis* L.

Método colorimétrico (Palma-Tenango Mariana *et al.*, 2025)

Palma-Tenango, M., Soto-Hernández, M., San Miguel-Chavez, R., Gaytán-Acuña, A., & González-Hernández, V. A. (2025). Flavonoid Content During the Growth and Floral Development of *Calendula officinalis* L. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 220. DOI:[10.3791/67741](https://doi.org/10.3791/67741)

Técnica experimental

La curva de calibración de flavonoides totales se construye graficando la absorbancia de estándares conocidos frente a sus concentraciones. Esto permite determinar las concentraciones de flavonoides en muestras de interés, expresándolas como equivalentes de un flavonoide de referencia, como quercetina o rutina.

Nota: Para esta microtécnica, se recomienda preparar la curva de calibración a una concentración de 0.27 mg/mL. Si se requieren absorbancias mayores, puede prepararse una solución madre más concentrada.

1. Preparación de la curva de calibración

1.1. Preparación de la solución madre:

Disolver 2.7 mg de quercetina (0.0027 g) en 10 mL de metanol al 80%.

1.2. Preparación de las soluciones de trabajo:

Tomar alícuotas de 50 μ L, 100 μ L, 175 μ L, 250 μ L y 350 μ L de la solución madre, y aforar cada una a 10 mL con metanol al 80%.

1.3 Preparación de la mezcla de reacción (respetar el orden de adición):

De cada solución de trabajo tomar 500 μ L y agregar:

- 100 μ L de cloruro de aluminio al 10% (preparado con metanol 80%).
- 100 μ L de acetato de potasio 1 M (preparado con agua destilada)
- 1.5 mL de metanol al 80%.
- 2.8 mL de agua destilada.

1.4. Incubación:

Dejar reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente.

1.5. Medición de la absorbancia:

Leer la absorbancia a 415 nm utilizando un espectrofotómetro.



2. Procesamiento del material vegetal

2.1. Preparación del extracto inicial:

Disolver 25 mg de material vegetal seco en 500 μL o 1000 de metanol μL al 80%

2.2. Extracción asistida por ultrasonido:

Incubar el extracto a 70°C durante 1 hora en baño ultrasónico.

2.3. Centrifugación:

Centrifugar a 731 \times g durante 13 minutos.

2.4. Preparación de la muestra para la reacción:

- Tomar 150 μL del sobrenadante y agregar 37 μL de metanol al 80%.
- De esta mezcla, tomar 50 μL y agregar:
 - 100 μL de acetato de potasio 1 M,
 - 100 μL de cloruro de aluminio al 10%,
- Aforar la mezcla final a 5 mL con agua destilada.

2.5. Incubación:

Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

2.6. Medición de la absorbancia:

Leer la absorbancia a 415 nm.