

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CAFÉICO, EVALUACIÓN
DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO POLIFENÓLICO
EN BRÁCTEAS SECAS DE *Cynara scolymus L.* (ALCACHOFA), AREQUIPA -
2013”**

Tesis presentada por:

Bach. Béjar Camapaza, Estefanía Ángela

Para optar el título profesional de:

INGENIERA BIOTECNÓLOGA

Asesor:

Dr. Villanueva Salas, José

AREQUIPA – PERÚ

2017

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO I.....	8
MARCO TEÓRICO	8
1.1 ALCACHOFA	8
1.1.1 Aspectos botánicos	8
1.1.2 Clasificación taxonómica	10
1.1.3 Variedades principales cultivadas en Perú	10
1.1.4 Composición química.....	11
1.1.5 Investigaciones realizadas sobre la actividad biológica de la alcachofa	14
1.2 EL AMBIENTE OXIDATIVO	16
1.2.1 Radicales libres.....	16
1.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	18
1.3.1 Determinación de la Actividad antioxidante por el método DPPH.....	19
1.4 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	20
1.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS	20
1.4.2. FLAVONOIDES	21
1.4.3. CAROTENOIDES	22
1.4.4 TOCOFEROLES.....	22
1.5. ÁCIDO CAFÉICO.....	23
1.5.1 Generalidades	23
1.5.2 Usos y propiedades.....	24
1.5.3 Investigaciones realizadas	25
1.6 LA CROMATOGRAFÍA	26
1.6.1 La separación en Cromatografía.....	26

1.6.2 Sistemas de Gradientes.....	27
CAPÍTULO II.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. MATERIALES	29
2.1.1 Reactivos Químicos.....	29
2.1.2 Materiales de laboratorio	30
2.1.3 Equipos	30
2.1.4 Otros	30
2.2 MÉTODOS	31
2.2.1 Ubicación de la fuente de estudio.....	31
2.2.2 Unidad de estudio	32
2.2.3 Procesamiento de la muestra	32
2.2.3.1 Recolección de muestras	32
2.2.3.2. Secado de brácteas de <i>Cynara scolymus L.</i>	33
2.2.3.3. Pulverización de brácteas de <i>Cynara scolymus L.</i>	33
2.2.4 Determinación del porcentaje de humedad.....	34
2.2.5. Extracción de metabolitos.....	34
2.2.5.1 Extracción por maceración con agitación.....	34
2.2.5.2 Extracción por Soxhlet	35
2.2.6 Filtración de los extractos al vacío.....	36
2.2.7 Concentración de los extractos	36
2.2.8 Filtración del extracto por gravedad	38
2.2.9 Determinación de ácido caféico en brácteas secas de <i>Cynara scolymus L.</i> (alcachofa)	38
2.2.9.1 Extracción en fase Sólida (SPE).....	38
2.2.9.2 Preparación del equipo HPLC	39
2.2.9.3 Preparación del gráfico de calibración	40
2.2.9.4 Preparación de la muestra para HPLC.....	41
2.2.10 Determinación de la capacidad antioxidante en brácteas secas de <i>Cynara scolymus L.</i> (alcachofa)	41

2.2.10.1 Preparación de la solución madre de DPPH.....	42
2.2.10.2 Preparación de la solución madre de Trolox	42
2.2.10.3 Preparación del gráfico de calibración	42
2.2.11 Determinación de la cantidad de polifenoles totales	43
CAPÍTULO III	46
RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
3.1 Porcentaje de humedad	46
3.2 Determinación del ácido caféico.....	47
3.2.1. Preparación de la gráfica estándar de ácido caféico (AC).....	47
3.2.2. Determinación de ácido caféico en los extractos metanólicos	49
3.3. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.....	55
3.3.1. Preparación de la gráfica estándar de Trolox	55
3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos	56
3.4 Determinación de polifenoles totales.....	62
CONCLUSIONES.....	68
SUGERENCIAS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS.....	71
LISTA DE ABREVIATURAS	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1.1. Fruto de alcachofa, sección transversal.	10
Figura N° 1.2. Estructura química de algunos ácidos cinámicos	12
Figura N° 1.3 Estructura química del radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazino), (DPPH).	20
Figura N° 1.4. Estructura básica de flavonoides y sistema de numeración.....	21
Figura N° 1.5. Estructura química de los flavonoides: rutina y quercetina.....	22
Figura N° 1.6. Estructura química del antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).....	23
Figura N° 1.7. Representación de la columna en fase estacionaria lista para recibir los analitos	26
Figura N° 1.8. Representación de las etapas que suceden en la columna cromatográfica	28
Figura N° 2.1. Vista satelital del lugar de recolección del material de estudio....	32
Figura N° 2.2. Proceso de tamizaje	33
Figura N° 2.3. Agitación de según los tratamientos 1 a 4.....	35
Figura N° 2.4. Rotavapor usado para volatilizar los solventes de los extractos....	37
Figura N° 2.5. Concentración del extracto por aire comprimido	37
Figura N° 2.6. Equipo HPLC utilizado, LaChrome-Hitachi	40
Figura N° 2.7. Fiolas preparadas para el gráfico de calibración.	43
Figura N° 3.1. Gráfico de calibración para la determinación de ácido caféico (ppm)	48
Figura N° 3.2. Gráfica de medias para la comparación de ácido caféico en las muestras.....	52
Figura N° 3.3. Gráfico de calibración para la determinación de antioxidantes.....	56
Figura N° 3.4. Gráfica estándar de trolox (mmol/L) versus % de inhibición	57
Figura N° 3.5. Gráfica de medias para la comparación del % de Inhibición en las muestras de alcachofa.....	60
Figura N° 3.6. Gráfico de calibración para la determinación de polifenoles totales (mg/L).....	63
Figura N° 3.7. Gráfica de medias para la comparación de polifenoles en las muestras de alcachofa.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1.1. Valores nutricionales de la alcachofa por cada 100 g de fruto	13
Tabla N°1.2. Alimentos vegetales con alto contenido antioxidante (10).....	14
Tabla N° 2.1. Gradiente usada para la separación de componentes.....	40
Tabla N°2.2. Soluciones del estándar ácido caféico.	41
Tabla N° 2.3. Volúmenes usados para determinación de la actividad antioxidante	42
Tabla N° 2.4. Volúmenes usados para el gráfico de calibración de polifenoles totales.....	44
Tabla N° 2.5. Volúmenes usados para la determinación de polifenoles totales en muestras.....	45
Tabla N° 3.1. Determinación de humedad de las brácteas de alcachofa (<i>Cynara Scolymus L.</i>)	47
Tabla N° 3.2. Resultados de áreas y tiempos de retención para el gráfico de calibración, en la determinación de ácido caféico mediante HPLC.....	48
Tabla N° 3.3. Áreas en muestras de alcachofa para la determinación de ácido caféico	49
Tabla 3.4. Concentración ácido caféico (ppm) en muestras de brácteas de alcachofa	50
Tabla N°3.5. Análisis de varianza para la determinación de ácido caféico en las muestras.....	50
Tabla 3.6. Absorbancias para el gráfico de calibración en la determinación de antioxidantes presentes en la alcachofa.....	55
Tabla N° 3.7. Valores de % de inhibición según la concentración de trolox (mmol/L) para la gráfico de calibración.....	57
Tabla N° 3.8. Absorbancias para las de muestras de alcachofa para la determinación de antioxidantes por el método del DPPH.....	58
Tabla N° 3.9. Concentración trolox (mmol/L) en muestras de alcachofa.....	58
Tabla N° 3.10. Porcentaje de inhibición en muestras de alcachofa	59
Tabla N° 3.11. Absorbancias para el gráfico de calibración en la determinación de polifenoles totales.....	55

Tabla N° 3.12. Absorbancias para el gráfico de calibración en la determinación de polifenoles totales.....	62
Tabla N° 3.13. Absorbancias de muestras de alcachofa para la determinación de polifenoles	64
Tabla N° 3.14. Análisis de varianza para la determinación de polifenoles en las muestras.....	65
Tabla N° 3.15. Concentración de polifenoles en muestras de alcachofa	65



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se utilizaron las brácteas de desecho de *Cynara scolymus L* (alcachofa), recolectadas de la empresa ALSUR. S.A.C. (Arequipa); evaluando el contenido de ácido caféico (AC) mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC), actividad antioxidante medida como porcentaje de inhibición (% I) mediante el método de DPPH; y contenido polifenólico en miligramos de Equivalentes de Ácido Gálico por litro (mg EAG/L) por el método de Folin Ciocalteu.

Las brácteas de desecho de *Cynara scolymus L* fueron secadas, pulverizadas y tamizadas obteniendo una fracción de partículas $<50 \mu\text{m}$ y otra entre $50\text{-}350 \mu\text{m}$. Se realizaron dos tratamientos de extracción: maceración y extracción por Soxhlet independientemente. El primero, la maceración, fue realizado a velocidad constante y temperatura ambiente empleando el tamizado $<50 \mu\text{m}$ bajo una agitación de 2 y 6 hrs, respectivamente; y el tamizado de $50\text{-}350 \mu\text{m}$, bajo una agitación de 2 y 6 hrs. El segundo tipo de tratamiento, extracción en Soxhlet, empleó la fracción de tamizado $<50 \mu\text{m}$ por un tiempo de 16 hrs, completando 25 ciclos. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y emplearon 10g de muestra en 50 mL de metanol (20% p/v) cada una, finalizado el proceso extractivo se filtró y concentró para luego ser almacenadas bajo refrigeración hasta su posterior uso.

Para de determinación de AC, se aplicó una extracción en fase sólida (SPE) la cual empleó sílica gel contenida en el cartucho de SPE acondicionado con diclorometano; el extracto colocado en el cartucho fue enjuagado con acetato de etilo y eluido con metanol. Los extractos fueron identificados y cuantificados mediante HPLC, empleando para ello dos columnas monolíticas acopladas, una precolumna Chromolith RP-18e de $5 \times 4.6 \text{ mm}$ y una columna Chromolith RP18e de $100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $2 \mu\text{m}$; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 300 nm usando como fase móvil una mezcla de Acetonitrilo(A) y

solución buffer de ácido acético (B) (pH 2.8) para la gradiente. Dicho análisis por HPLC permitió cuantificar 21.23ppm AC/g y 59.19 ppm AC/g extraído en la fracción de partículas <50 μm maceradas y agitadas por 2 y 6 horas respectivamente; por su parte se identificó que el tratamiento Soxhlet fue el mejor método de extracción de AC respecto a los macerados bajo agitación puesto que consiguió extraer 116.71 ppm AC/g.

Para analizar el porcentaje de inhibición (%I) del radical DPPH, se realizaron las mediciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, empleando una solución de DPPH (2.1 mM) frente a una solución de Trolox(0.005-0.04mmol/L). El porcentaje de inhibición para los macerados bajo agitación fueron: para el tamizado <50 μm , 33.39 %I y 20.66 %I bajo 2 y 6 hrs de agitación respectivamente; para el tamizado entre 50-350 μm resultó 32.28 %I y 26.93 %I bajo 2 y 6 hrs de agitación respectivamente y para la muestra en Soxhlet resultó 13.22% I del radical DPPH. Los resultados fueron estadísticamente diferentes ($p=0.0016$) y muestran que se conserva mejor las propiedades antioxidantes si no se somete la muestra aun estrés mecánico ni térmico.

La determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu fue realizada en espectrofotómetro a una longitud de onda de 715 nm. En los macerados el tamizado <50 μm resultó en 6.81 y 7.34 mg EAG/L bajo 2 y 6 hrs de agitación respectivamente, en el tamizado entre 50-350 μm resultó 5.6 y 5.89 mg EAG/L bajo 2 y 6 hrs de agitación respectivamente, y para la muestra de Soxhlet con el tamizado <50 μm se obtuvo 7.3216 ± 0.87 mg EAG/L. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1411$), denotando que el contenido polifenólico se conserva independientemente del tipo de tratamiento utilizado. Finalmente, los máximos valores encontrados de ácido caféico, actividad antioxidante y fenoles totales en las brácteas secas de alcachofa fueron 116.71 ± 5.16 ppm AC/g, 33.39 ± 3.04 %I del radical DPPH y 7.3216 ± 0.87 mg EAG/L respectivamente, dichos valores son comparables a los encontrados en vegetales usados en industria alimentaria y biotecnológica por lo tanto se puede sugerir a las brácteas de alcachofa como una alternativa óptima de materia prima para su transformación en productos de valor agregado en dichas industrias.

Palabras clave: *Cynara scolymus L*, Ácido caféico, antioxidantes, polifenoles.

ABSTRACT

The present research employed the bracts of *Cynara scolymus L* (artichoke), collected from the company ALSUR S.A.C. (Arequipa). The evaluation of the content of caffeic acid (AC) was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the DPPH method was utilized to measure the antioxidant activity as an inhibition percent (%I); and polyphenolic content in milligrams of Gallic Acid Equivalents per liter (mg EAG/L) was measured by the Folin Ciocalteu method.

Cynara scolymus L waste bracts were dried, pulverized and sieved to obtain two particle size, one of $<50 \mu\text{m}$ and another between $50\text{-}350 \mu\text{m}$. Two extraction treatments were performed: maceration and extraction by Soxhlet independently. Maceration was performed, at constant speed, at room temperature and under agitation of 2 and 6 hrs shaking, with $<50 \mu\text{m}$ and $50\text{-}350 \mu\text{m}$ size particle respectively. The second type of treatment, Soxhlet extraction, used the sieving fraction $<50 \mu\text{m}$ for a time of 16 hrs, completing 25 cycles. All treatments were performed in duplicate and used 10 g of sample in 50 ml of methanol (20% w/v). After the extraction, the samples were concentrated by filtration and refrigerated.

Solid phase extraction (SPE) was applied to determinate the concentration of AC, which used silica gel contained in an SPE cartridge conditioned with dichloromethane. The extract, placed in the cartridge, was rinsed with ethyl acetate and eluted with methanol. The extracts were identified and quantified by HPLC, using two monolithic coupled columns, a Chromolith RP-18e pre-column of $5 \times 4.6 \text{ mm}$ and a Chromolith 18e column of $100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $2 \mu\text{m}$. The detection was carried out by a wavelength of 300 nm using as a mobile phase a mixture of Acetonitrile (A) and acetic acid buffer

solution (B) (pH 2.8) for the gradient. The HPLC analysis results of the <50 μm particle size, macerated and agitated for 2 and 6 hours respectively was 21.23ppm AC/g and 59.19 ppm AC/g respectively. On the other hand, the Soxhlet treatment was identified as the best method of extraction for AC since it was able to extract 116.71 ppm AC/g.

In order to analyze the inhibition percent (% I) of the DPPH radical, analysis were made in the spectrophotometer at a wavelength of 517 nm, using a solution of DPPH (2.1 mM) against a solution of Trolox (0.005-0.04 mmol/L). The inhibition percentage results were: for <50 μm particle size, 33.39% I and 20.66% I under 2 and 6 hrs agitation respectively; the particle size between 50-350 μm resulted in 32.28% I and 26.93% I under 2 and 6 hrs of agitation respectively and for the Soxhlet method resulted in 13.22% I of DPPH radical. The results were statistically different ($p = 0.0016$) and show that the antioxidant properties are better conserved if the sample is not subjected to mechanical or thermal stress.

The determination of total phenols by the Folin-Ciocalteu method was performed in a spectrophotometer at a wavelength of 715 nm. The <50 μm particle size resulted in 6.81 and 7.34 mg EAG/L under 2 and 6 hrs of agitation respectively, the particles between 50-350 μm resulted in 5.6 and 5.89 mg EAG/L under 2 and 6 hrs of agitation respectively; and for the Soxhlet method 7.3216 \pm 0.87 mg EAG/L was obtained of the <50 μm particle size. No statistically significant differences were observed ($p=0.1411$), indicating that the polyphenolic content is preserved independently of the type of treatment used.

Finally, the maximum values of caffeic acid, antioxidant activity and total phenols in the artichoke dried bracts were: 116.71 \pm 5.16 ppm AC/g, 33.39 \pm 3.04% I of the DPPH radical and 7.3216 \pm 0.87 mg EAG/L respectively. These results are comparable to those found in vegetables used in the food and biotechnology industry, therefore artichoke bracts can be suggested as an optimal raw material alternative for their transformation into value added products in these industries.

Key words: Cynara scolymus L, caffeic acid, antioxidants, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

En muchos procesos agroindustriales y forestales, se generan subproductos que no se aprovechan lo suficiente y en muchos casos su valor es totalmente desconocido. Las industrias generadoras de esta materia no encuentran en ellos más que un problema para su uso final y una complicación desde el punto de vista ambiental; sin embargo, la utilización de este material descartado no sólo podría ser económicamente viable sino también ambientalmente favorable. Diferentes tipos de residuos, de origen vegetal, han sido aprovechados y estudiados como fuentes baratas para la extracción de distintos antioxidantes, tenemos las cáscaras de papa para la obtención de un extracto fenólico y su aprovechamiento para retardar la oxidación lipídica en aceite de girasol o el uso de residuos de aceite o bagazo de uva (1). La industria de la alcachofa en la región Sur utiliza sólo el corazón como producto de venta, mas no de sus remanentes como son sus brácteas, y estas corresponden generalmente a los $\frac{3}{4}$ respecto al total de su fruto (2,3). Ciertos estudios demostraron que las brácteas de alcachofa de algunas variedades poseen concentraciones importantes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante (4), tal que pueden llegar a ser un recurso alternativo para las aplicaciones en diversos productos a nivel industrial. Según un reporte de la asociación de exportadores (ADEX) (5), Perú estaría en el puesto 3 dentro del ranking de países productores de alcachofas, donde existen 29 productores; por otro lado la Sociedad de Comercio Exterior del Perú (Comex Perú) (6) indica que se produce 18.6 TM/ha de alcachofas, demostrando que el país posee una elevada producción de *Cynara Scolymus L.* (alcachofa), con una producción total de 127500 TM del fruto, es decir que a nivel nacional se producen un aproximado de 95625 TM de brácteas; resaltando así la importancia de utilizar los subproductos o mal llamados desechos que constituyen las brácteas. En la presente tesis se pretende demostrar la existencia de antioxidantes naturales, compuestos fenólicos, así como específicamente la presencia de ácido caféico (antioxidante-anticarcinogénico) en las brácteas, puesto que puede dárseles un valor agregado luego de un proceso de extracción de sus componentes.



HIPÓTESIS

Dado que la especie *Cynara scolymus L.* (alcachofa) posee elevado contenido de compuestos fenólicos antioxidantes, es probable que las brácteas desechadas de esta especie luego de ser sometidas al tratamiento de escaldado en industria, conserven cantidades significativas de estos compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar el porcentaje de humedad en las brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa).
2. Determinar las condiciones de gradiente adecuadas para la separación cromatográfica de ácido caféico, así como su tiempo de retención en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).
3. Identificar y cuantificar ácido caféico contenido en los extractos de brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa) mediante el uso de HPLC.
4. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa) por el método del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en el espectrofotómetro UV-visible.
5. Evaluar la cantidad de polifenoles totales en los extractos de las brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa) por el método de Folin-Ciocalteu en el espectrofotómetro UV-visible.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ALCACHOFA

1.1.1 Aspectos botánicos

La alcachofa pertenece a la especie *Cynara scolymus*, de la familia Asteraceae, que también pertenecen la lechuga, el girasol, el marigold, la dalia, la manzanilla y muchas otras especies alimenticias, medicinales y ornamentales, siendo genéticamente una especie de 34 cromosomas. Es de estructura herbácea y originalmente de tipo semiperenne, aunque por selección genética se han obtenido recientemente variedades anuales. Las hojas se insertan alrededor de un tallo muy corto, no visible, formando una roseta como ocurre con las lechugas; las jóvenes son muy crespas, hendidas y tienen una tonalidad plateada muy acentuada que van perdiendo a medida que crecen, llegando a ser muy grandes, de color verde algo grisáceo, con bordes aserrados de grandes dientes y con nervaduras carnosas y prominentes hacia el envés, que tiene color blanquecino. Las hojas bajas maduras se doblan por su peso y se tienden sobre el suelo, siendo esto más notorio cuando pierden turgencia por estrés hídrico. (3)

La raíz es carnosa y turgente y su forma varía según el tipo de planta, en las variedades semiperennes que se reproducen por hijuelos, tiende a ser fasciculada y relativamente superficial al principio, alcanzando gran desarrollo con el tiempo; en cambio en las variedades de semilla es más pivotante aunque de menor tamaño. Alrededor de los tres meses de plantada y luego de formar un cierto número de

hojas la planta forma la primera cabezuela botánicamente una inflorescencia o capítulo que es levantada por un tallo floral o pedúnculo erguido y carnoso, de rápido crecimiento, color más claro que las hojas y de superficie acanalada. En él se insertan en forma espaciada unas hojuelas mucho más pequeñas y delgadas que las de la roseta, de cuyas axilas salen ramificaciones que dan lugar a capítulos secundarios y luego terciarios, siendo los primeros de tamaño tan grande como el apical, pero los siguientes van desarrollando menos.

El fruto (Fig. N°1.1) es un aquenio, semillas negras y lisas. Los capítulos florales constituyen la parte comercial de la planta y tienen brácteas carnosas que se traslapan y protegen los numerosos flósculos o flores en formación de 700 a 1400 que son las “espinitas” que se asientan en lo que conocemos por “fondo”. Al madurar la alcachofa las brácteas se abren totalmente y se hacen visibles las flores, que son de forma tubular filamentosa y de color violeta azulado muy intenso, de gran atracción para las abejas. (6,2)

Según Vavilov (7) su centro de origen se ubica en una amplia zona que cubre Asia Menor y el norte de África, formando parte de la cuenca del Mediterráneo e incluye a las islas Canarias, las Egeas y el Sur de Turquía y Siria, donde aún crecen al estado silvestre tres subespecies primitivas (*C. cardunculus*, *C. sibthropiana* y *C. syriaca*), que se consumían unos 2000 a 2500 AC. La migración italiana que siguió a la primera guerra mundial la introdujo en Argentina y por la misma vía llegó también al Perú, donde la mayor parte de ellas se concentró en la zona de Concepción del departamento de Junín (63%) y alrededor de los 3300 m. sobre el nivel del mar, lo que constituye una situación única en el mundo. En la actualidad el área mundial de alcachofas bordea apenas las 119 000 Has. y es bastante menor a la del espárrago - que también es pequeña comparada con la de otras hortalizas. (2,3)

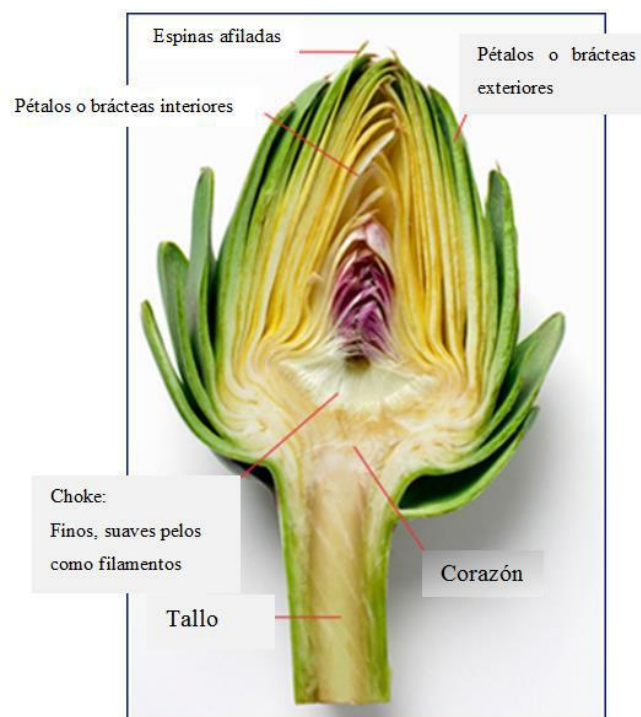


Figura N° 1.1. Fruto de alcachofa, sección transversal (Fuente: MINAG-INIA).

1.1.2 Clasificación taxonómica

Grupo: Dicotiledóneas (8)

Clase: Equisetopsida C.

Subclase: Magnoliidae

Superorden: *Asteranae*

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Cynara* L.

1.1.3 Variedades principales cultivadas en Perú

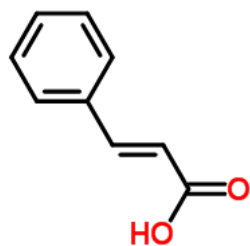
En el marco del desarrollo de los procesos productivos se han cultivado diferentes variedades, existen 21 variedades de alcachofa de las cuáles se han adaptado a diversos pisos ecológicos para su óptima productividad, quedando en la agricultura peruana 6 de estas variedades. Se han considerado variedades de reproducción sexual (semilla

botánica) y de reproducción asexual (parte vegetativa). Las alcachofas sin espinas, son las de mayor comercialización en el mundo, siendo las principales variedades comercializadas: Blanca Tudela, Harmony, Imperial Star, Lorca, Madrigal y Opal (6).

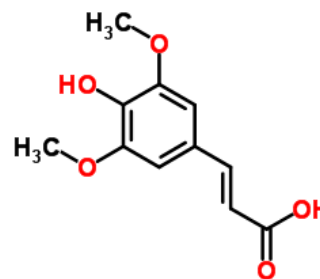
Si bien la costa peruana es un invernadero natural en el que desarrolla bien el cultivo durante todo el año, en primavera y verano se excede largamente la temperatura ideal para la cosecha, lo que limita en esa época la posibilidad de lograr capítulos cerrados con los calibres que prefiere el mercado norteamericano de alcachofas frescas. También las altas temperaturas del verano pueden afectar los capítulos pequeños destinados a proceso, por favorecer el desarrollo temprano de los flósculos, o pilosidad interna. En los valles interandinos libres de heladas y granizo, tales como Concepción en el Mantaro, Cajamarca, Ancash, Abancay o Arequipa, por citar unos ejemplos, la alcachofa encuentra condiciones adecuadas. (6)

1.1.4 Composición química

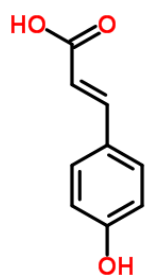
Las hojas de alcachofa contienen cinarina, apigenina, cinarosida, ácido clorogénico, rutina, hesperitina, hesperidosida, maritimeina, esculina, quercetina, ácido caféico, cosmosida, luteolina, sesquiterpenos (aguerin B, cinaropicrina, grosheimina), glucósidos de sesquiterpeno (cinarascolosidas A, B, y C), apigenina-7-rutinósido, narirutina, ácido caféico, ácido 5-cafeoilquínineoclorogénico; flavonoides (0,1-1,0%), incluyendo glicósidos de luteolina-7- β -rutinósido, scolimosida, cinarósido, glucósidos; ácidos glicólicos y glicéricos; taraxasterol; inulina; guaianolides (cinaropicrina, 8-epigrosheimina); cinaratriol; azúcares; enzimas, y un aceite volátil que consiste de β -selineno y cariofileno como sus principales componentes. En tanto que la cinaropicrina, cinarina, ácido clorogénico y scolimosida se encuentran entre diversos constituyentes activos identificados hasta ahora. El contenido máximo de cinarina, el principal derivado de ácido cafeoilquínico en las cabezas de alcachofa, se obtiene por ebullición acuosa del fármaco. (9) La figura N°1.2 muestra la estructura química de algunos ácidos cinámicos incluyendo la del AC, y la Tabla N°1.1 presenta el valor nutricional encontrado en el fruto de alcachofa.



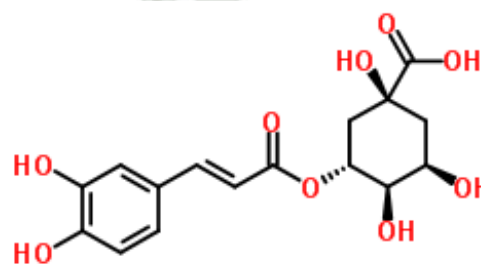
Ácido cinámico
(ácido (E)-3-fenilprop-2-enoico)



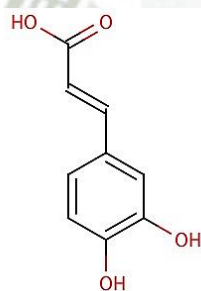
Ácido sinápico (ácido 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)prop-2E-enoico))



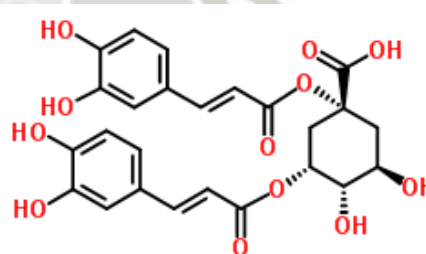
Ácido p-cumárico (ácido (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico) ácido clorogénico



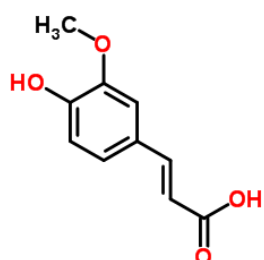
Ácido clorogénico
(3-O-Caffeoylquinic acid)
Ácido 3-trans-cafeoilquinico



Ácido caféico (Ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico)



Cinarina (ácido (1R,3R,4S,5R)-1,3-bis[[E]-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoil]oxi]-4,5-dihidroxiciclohexano-1-carboxílico)



Ácido ferúlico (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico)

Figura N° 1.2. Estructura química de algunos ácidos cinámicos (72)

Tabla N°1.1. Valores nutricionales de la alcachofa por cada 100 g de fruto

Valor nutricional por 100 g (3.5 oz)	
Energía	211 KJ (50 Kcal)
Carbohidratos	11.39 g
Azúcares	0.99 g
Fibra	8.6 g
Grasas	0.34 g
Proteínas	2.89 g
luteína y zeaxantina	464 ug
Tiamina (vit. B1)	0.05 mg (4%)
Riboflavina (vit. B2)	0.089 mg (7%)
Niacina (vit. B3)	1.11 mg (7%)
Ácido Pantoténico(B5)	0.24 mg (7%)
Vitamina B6	0.081 mg (6%)
Folato(Vit. B9)	0.89 µg (22%)
Vitamina C	7.4 mg(9%)
Vitamina E	0.19 mg (1%)
Vitamina K	14.8 µg (14%)
Calcio	21 mg (2%)
Hierro	0.61 mg (5%)
Magnesio	42 mg (12%)
Manganeso	0.225 mg (11%)
Fósforo	73 mg (10%)
Potasio	286 mg (6%)
Sodio	296 mg (20%)
Zinc	0.4 mg (4%)

Fuente: Nutrient Data Laboratory, ARS, USDA National Food and Nutrient Analysis Program Wave 5h, Beltsville MD. 2001

1.1.5 Investigaciones realizadas sobre la actividad biológica de la alcachofa

El extracto de hoja de alcachofa ha mostrado ser antimicrobiana in vitro y poseer actividades antioxidantes, la tabla 1.2 muestra los alimentos vegetales con mayor contenido antioxidante, este último atribuido al ácido caféico, ácido 1-cafeoilquínico, luteolina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-rutinósido, cinarina, cinarosida, ácido clorogénico y narirutina (10). La actividad antioxidante también se muestra en los eritrocitos de las ratas con dietas que contenían las porciones comestibles de alcachofa, y un efecto acompañado por una disminución en ácido úrico en plasma así también la actividad anticlastogénica se muestra en la médula ósea de ratón en ensayos in vivo de micronúcleos a partir de un concentrado de la hoja, y la administración tópica de hidroxiterpenos tipo taraxastano aisladas de las hojas (faradiol y taraxasterol) inhibió el desarrollo de tumores de piel en ratones (11). Las alcachofas adultas o maduras y en especial las que aún están en crecimiento exhiben elevada capacidad antioxidante, además el trabajo demostró que el procesamiento térmico de estas no disminuye su valor nutricional debido a la pérdida de antioxidantes. (12)

Tabla N°1.2. Alimentos vegetales con alto contenido antioxidante (10)

Producto	Contenido antioxidante, mmol/100 g
Moras	5.75
Nueces	3.72
Fresas	3.58
Alcachofas(corazón)	3.56
Arándanos agrios	3.13
Frambuesas	2.87
Arándanos	2.68
Clavo de olor	2.64

Halvorsen (13) analizó la concentración total de compuestos en 1113 muestras de alimentos del departamento nacional de agricultura en Estados Unidos, el análisis fue basado en la reducción de iones férrico usando TPTZ (2,4,6-tri-pyridyl-s-triazina), encontrándose en el puesto 17 a la alcachofa con 4.24 mmol/100g. Un gramo de

corazón de alcachofa (materia seca) tiene una actividad in vitro sobre DPPH y FRAP equivalentes a 29.2 y 62.6 mg de vitamina C y así mismo equivalentes a 77.9 y 159 mg de vitamina E, respectivamente. Los extractos de alcachofa también mostraron buena eficiencia en la inhibición in vitro de la oxidación LDL. (11)

Se extrajeron compuestos fenólicos antioxidantes a partir de subproductos de alcachofa cruda y blanqueadas (tratado térmicamente), sobre la base de ambas extracciones metanol y agua. Los contenidos fenólicos (expresado como derivados del AC) (100 mg/g de extracto seco) fueron de 15.4 y 9.9 para la alcachofa cruda cuando se extrae con metanol y agua respectivamente; y de 24.3 y 10.3 de la alcachofa blanqueada, cuando se extrae con metanol y agua respectivamente. La mayor cantidad de compuestos fenólicos en el tratamiento térmico podría ser debido a la inactivación de la polifenol oxidasa (PPO) en la escala industrial (debido al proceso de escaldado), evitando la oxidación catalizada por PPO de estos compuestos fenólicos, un fenómeno que podría ocurrir en subproductos con alcachofa cruda.

Extractos de alcachofa de subproductos industriales mostraron una actividad de eliminación de radicales libres alta (en comparación tanto de DPPH y ABTS), así como la capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos (método del tiocianato férrico). De acuerdo con estos resultados, el uso de extractos de alcachofa como posibles ingredientes de subproductos industriales pueden ser productos alimenticios (para disminuir la peroxidación lipídica y de aumentar las propiedades promotoras de la salud) (14). Extractos de alcachofa y algunos de sus constituyentes fenólicos puros fueron evaluados por su papel protector en el control de daño oxidativo a las moléculas biológicas (proteínas, lípidos y ADN), causados por los radicales libres tales como RCOO y/o OH. Los resultados de este estudio sugieren que las cabezas de alcachofa son ricos en compuestos fenólicos, en algunas condiciones, una buena actividad antioxidante y podrían, por lo tanto, considerarse como una fuente de antioxidantes en la dieta. Además, las hojas y las brácteas exteriores de cabezas de alcachofa pueden ser considerados como materia prima barata y como fuente de antioxidantes naturales no tóxicos para su uso en procesos industriales (para conservar y estabilizar la frescura, valor nutritivo, sabor y color de los alimentos), aunque todavía no es utilizado. (15)

Se realizaron ensayos con extractos de hojas de alcachofa en n-butanol, demostrando que la fracción de n-butanol exhibió actividades antimicrobianas significativas contra las especies bacterianas y levaduras. Siendo el ácido clorogénico, cinarina, luteolina-7-rutinósido, y cinarosida los más eficaces contra los hongos que las bacterias y las concentraciones mínimas inhibitorias de estos compuestos eran entre 50 y 200 mg/mL (16). Otros estudios demuestran la existencia de constituyentes sesquiterpénicos de las hojas de alcachofa, en particular cinaropicrina, la cual disminuye los niveles de triglicéridos en suero de ratas cuando se administra por vía oral. Respecto a la actividad hepatoprotectora, se ha demostrado tanto en animales y en estudios in vitro con extractos de alcachofa. Ensayos clínicos controlados con placebo de extractos de hojas de alcachofa han demostrado efectos para bajar colesterol y la mejoría sintomática de los pacientes con dispepsia funcional (9).

1.2 EL AMBIENTE OXIDATIVO

La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. Todo inicia con el empleo del oxígeno como la molécula oxidante final del metabolismo aeróbico y oxidativo, el cual realizan la mayoría de los organismos del planeta. Ello hace que las células mantengan una alta concentración de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y en muchas ocasiones radicales libres. Numerosas reacciones en las células implican oxidaciones, en principio todas las degradaciones para obtener energía y muchas reacciones del metabolismo intermedio, de igual forma múltiples xenobióticos ejercen sus efectos, generalmente tóxicos, sobre la célula por procesos oxidativos inducidos por la propia molécula xenobiótica o por el metabolismo para su biotransformación. Este tipo de ambiente hace necesario que las células mantengan sistemas de amortiguamiento reductor, para poder aprovechar los beneficios del metabolismo oxidativo y a su vez limitar al máximo los daños severos. (17)

1.2.1 Radicales libres

La mayor parte de los compuestos químicos de importancia biológica están formados por átomos unidos por enlaces covalentes, en estos enlaces dos átomos comparten un par de electrones en un orbital molecular y cada electrón muestra una rotación o giro

opuesto a su par. En las células se llevan a cabo reacciones químicas que rompen estos enlaces de manera heterolítica, haciendo que una de las partes conserve dos electrones y la otra tenga deficiencia de dos electrones, lo cual genera compuestos estables nucleofílicos o electrofílicos, respectivamente, que son los conocidos aniones y cationes. Sin embargo, en algunas reacciones químicas, las radiaciones electromagnéticas y otros factores, pueden romper estos enlaces de la forma llamada 'homolítica', proceso después del cual cada parte conserva un solo electrón que estará desapareado, generándose así las especies químicas llamadas radicales libres.

En forma general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena. (18)

Los radicales libres de importancia biológica pueden clasificarse como:

- Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las principales son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (O_2^1), así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; esto es, el anión superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperoxilo (HO_2) y el radical hidroxilo (OH). Estas especies son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 y son más reactivos que el O_2 en su estado basal. El peróxido de hidrógeno, no es un radical libre pero está estrechamente relacionado con la producción de radicales porque es el principal precursor del radical hidroxilo. Estas ERO son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de óxido-reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos.

- Metales de transición.

Los elementos del primer periodo de la serie “d” de la tabla periódica (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) pertenecen a los llamados metales de transición, tienen la característica de llegar a ser estables por si mismos sin necesidad de reaccionar con otro elemento, esto es, cuando a su último nivel de energía le faltan electrones, para estar completo utiliza e^- de los niveles o subniveles internos con lo cual logra su estabilidad, la falta de electrones en el nivel de donde los transfirió se compensa con otros electrones de otro nivel o subnivel, y así sucesivamente: a este fenómeno se le llama transición electrónica. La mayoría de los metales de transición tienen electrones desapareados y precisamente gracias a esta transición pueden existir en forma de radical libre.

- Otros radicales libres

Entre los que se encuentran los radicales libres de nitrógeno; tales como, el óxido nítrico (NO) y el dióxido nítrico (NO_2). El NO es un radical muy reactivo y de importancia fisiológica puede oxidar y dañar, pero es esencial en funciones biológicas complejas como son la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso, así como en procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, con el O_2 genera NO_2 y con el O_2 forma peroxinitrito (ONOO^\cdot). Este tipo de ERN es capaz de generar daño oxidativo y muerte celular. Existen otros radicales libres que tienen diferente naturaleza como el ion hipoclorito (ClO) y el radical triclorometilo (CCl_3) este último producido durante el metabolismo del CCl_4 por el citocromo P450. La reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es variable pero siempre elevada y de baja especificidad. La vida media biológica del radical libre es de no más de microsegundos, ya que puede reaccionar rápidamente con todo lo que esté a su alrededor, pudiendo provocar un gran daño a macromoléculas y a estructuras supramoleculares como las membranas. Diferentes radicales y especies reactivas tienen diferentes vidas medias, siempre muy bajas, pero algunas de ellas suficientes para permitir que algunas moléculas puedan difundir y actuar en orgánulos o células vecinas, tal es el caso del H_2O_2 y del NO. (18)

1.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), entre otros radicales pueden generar estrés oxidativo, fenómeno al cual se le atribuyen muchas enfermedades neurodegenerativas.

Se ha evidenciado que las plantas y sus constituyentes son fuente de antioxidantes; por tanto, tienen la capacidad de capturar EROs. Químicamente la oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones, de hidrógenos o la ganancia de oxígeno en una molécula. La reducción de un compuesto es exactamente lo contrario; es decir, la ganancia de electrones, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. En tal sentido, un agente oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par oxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las óxido- reducciones en el organismo. Las macromoléculas de importancia biológica (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) son moléculas nucleofílicas que tienen electrones susceptibles de compartir, es decir, tienen electrones en orbitales superficiales que pueden ser capturados (oxidación) o compartidos en una reacción nucleofílica para formar compuestos. Los oxidantes son compuestos electrofílicos especies que tienen afección por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de la mayor importancia biológica. Otro subgrupo son los radicales libres que no solo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que adicionalmente pueden generar reacciones oxidativas en cadena. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias) y se encuentran involucradas en diversas patologías. (17)

1.3.1 Determinación de la Actividad antioxidante por el método DPPH

El fundamento del método desarrollado por Brand-Willams (19); consiste en que el radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazino (DPPH), véase figura N°1.3, posee un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH.



Figura N°1.3. Estructura química del radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazino), (DPPH). Fuente: website: ChempSpider

1.4 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes de más relevancia que pueden encontrarse en la naturaleza son los ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, tocoferoles, compuestos S y diterpenos.

1.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos o ácidos fenolcarboxílicos son un tipo de compuestos orgánicos. Se pueden agrupar en; derivados del ácido benzoico (con una estructura C6-C1), donde destacan los ácidos salicílico y gálico; también se agrupan en derivados del ácido cinámico (estructura C6-C3), donde destacan el ácido orto y para cumárico, el ácido caféico, el ácido ferúlico y clorogénico. Los ácidos fenólicos se encuentran en una variedad de alimentos de origen vegetal; las semillas, envolturas o cáscaras de frutas y las hojas de los vegetales contienen las concentraciones más altas. Son absorbidos a través de las paredes del tracto intestinal, y puede ser beneficiosos para la salud, ya que funcionan como antioxidantes que previenen el daño celular debido a reacciones de oxidación de radicales libres. También pueden promover condiciones anti-inflamatorias en el cuerpo cuando se les consume con regularidad. (20,21)

Las zarzamoras, kiwis, ciruelas, cerezas y manzanas contienen grandes cantidades de AC, el vino tinto y frutas cítricas contienen ácido cinámico, el ácido ferúlico se

encuentra en los revestimientos exteriores de los granos de cereales, la harina de maíz tiene la mayor parte del ácido ferúlico, y el trigo de grano entero, arroz, así como también las harinas de avena son buenas fuentes de ácido ferúlico. Los alimentos ricos en ácidos fenólicos pueden ser beneficiosos para su salud, pero es difícil de entender cuánto de ese beneficio es en realidad debido a los ácidos fenólicos, o a los nutrientes, fibra y otros fotoquímicos también encontrados en el mismo alimento. (21)

1.4.2. FLAVONOIDES

Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. La estructura base es un esqueleto C6-C3-C6 (Figura 1.4) el cual puede sufrir modificaciones, y todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua; se destacan por sus propiedades antioxidantes a la rutina y quercetina (Figura 1.5), Poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; antiasmáticas e inhibidoras de enzimas. Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y sequestradoras de radicales libres; también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂ (FLA₂), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). (22)

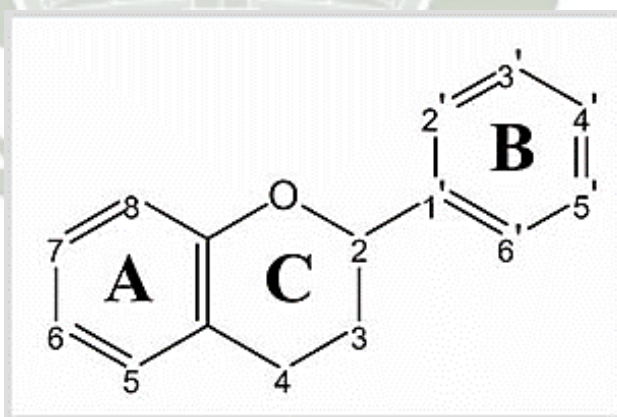


Figura 1.4. Estructura básica de flavonoides y sistema de numeración.

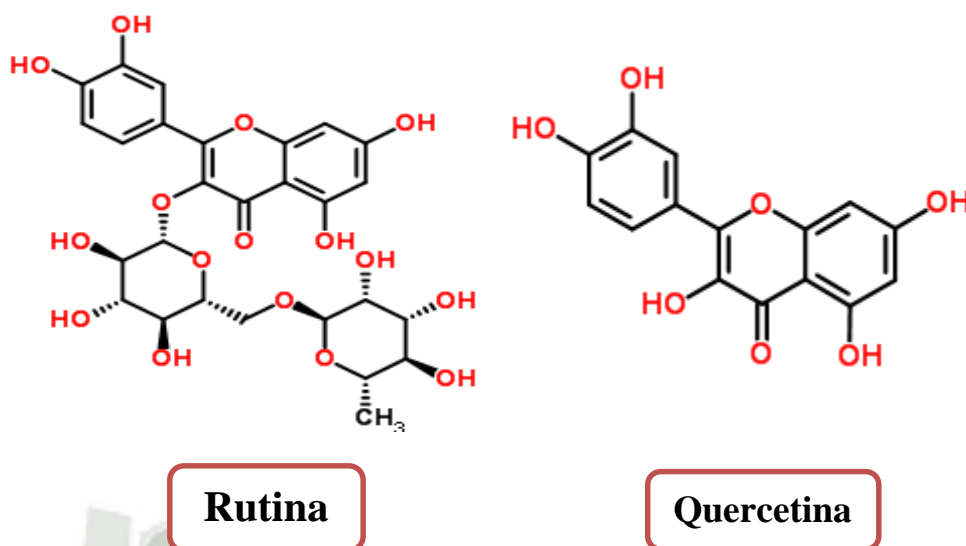


Figura 1.5. Estructura química de los flavonoides: rutina y quercetina.

1.4.3. CAROTENOIDES

La actividad antioxidante de los carotenoides se basa en el sistema de deslocalización electrónica, lo que hace a este tipo de compuestos muy susceptibles a la oxidación y por tanto al ataque de radicales peroxilo y otros agentes electrófilos. Los radicales peroxilo no son capaces de abstraer un hidrógeno de los carotenoides, así que el mecanismo antioxidante se lleva a cabo de manera distinta al de los compuestos fenólicos. Se destacan el β -caroteno, licopeno y luteína. (23)

1.4.4 TOCOFEROLES

Se encuentra dentro del grupo de vitaminas antioxidantes, con reacción sobre los radicales libres lipídicos membranares. Se destacan la vitamina E, tocotrienoles, tocoenoles y esteroides. (24)

Por otro lado, en la presente investigación se utilizó como antioxidante a Trolox (Figura 1.6), que es un análogo de la vitamina E soluble en agua. Se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño. La capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) es una medida de la fuerza antioxidante basado en Trolox, medido en unidades llamadas Trolox equivalentes (TE). Debido a las dificultades para medir componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja (como los arándanos o los tomates), la equivalencia Trolox se

utiliza como referencia para la capacidad antioxidante de una mezcla de este tipo. El ensayo TEAC se utiliza para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, bebidas y suplementos.

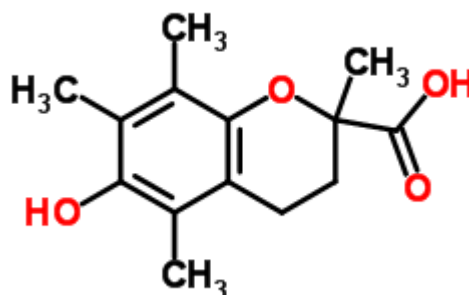


Figura N°1.6. Estructura química del antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

1.5. ÁCIDO CAFÉICO

1.5.1 Generalidades

Existen dos compuestos fenólicos de gran importancia debido a su amplia y variada actividad biológica, estos compuestos son el ácido caféico y el ácido clorogénico. Estos ácidos son fenilpropanoides que se biosintetizan por la ruta del ácido shikímico. Las propiedades más representativas de estos compuestos son las siguientes: antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, anticarcinogénicas, antitumorales, antimutagénicas, hepatoprotectoras, antihipercolesterolémicas, antiinflamatorias e inmunoestimulantes.

Sinonimias: Ácido 3,4-Dihidroxi-cinámico; trans-cafeato; 3,4-dihidroxi-trans-cinamato; Ácido(E)-3-(3,4-dihroxifenil)-2-propenoico; Ácido3,4-Dihroxibenceneacrílico; Ácido 3-(3,4-Dihroxifenil)-2-propenoico (25). De fórmula molecular $C_9H_8O_4$, posee una masa molecular de 180.16 g/mol y posee una temperatura de descomposición de 223-225°C.

El AC se utiliza junto con sus derivados en la fabricación de fármacos anticarcinogénicos, antioxidantes, antimutogénicos e inmunomoduladores. Junto con sus derivados éster del ácido cafeico fenetil (CAPE), AC es un compuesto orgánico natural que es el producto de muchas plantas. Es antioxidante y también puede actuar como un inhibidor de los compuestos cancerígenos (26,27).

La formación de AC ocurre en plantas sólo en formas conjugadas como por ejemplo a partir de ácido clorogénico; así también se puede preparar mediante la hidrólisis de ácido clorogénico (28). El ácido cafeico, el cual no está relacionado con la cafeína, es biosintetizado mediante la hidroxilación del cumaril éster del éster quínico. Esta hidroxilación produce el éster cafeico del ácido shikímico, el cual se convierte a ácido clorogénico. Es el precursor del ácido ferúlico, alcohol coniferílico, y alcohol sinápico, todos ellos pilares significativos en la lignina. La transformación a ácido ferúlico es catalizada por la enzima ácido cafeico-*o*-metiltransferasa.

1.5.2 Usos y propiedades

Se utiliza junto con sus derivados en la fabricación de fármacos anticarcinogénicos, antioxidantes, antimutogénicos e inmunomoduladores. Compuestos relacionados: Ácido cinámico y ácido clorogénico. Hay que recalcar que a pesar de que el AC se puede encontrar en el café, no tiene relación con la cafeína. Siendo el AC un ácido carboxílico; no nitrogenado, que se encuentra en diversas plantas. Se observa como cristales amarillos que se disuelven en alcohol. Se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina (29), una de las principales fuentes de biomasa. Junto con sus derivados éster del ácido cafeico fenetil (CAPE), AC es un compuesto orgánico natural que es el producto de muchas plantas. Es antioxidante y también puede actuar como un inhibidor de los compuestos cancerígenos.

Los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, AC, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico) presentan propiedades anti-cancerígenas, antiinflamatorias y anti-oxidantes. Esta última propiedad es de gran interés para la industria de los alimentos, cosmetología y farmacéutica.

1.5.3 Investigaciones realizadas

La radiación ultravioleta B (UVB) presente en luz solar causa supresión inmune sostenida, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento en humanos. Se evaluaron los efectos protectores del AC contra radiación UVB induciendo expresión IL-10 y fosforilación de MAPKs en piel de ratón. Donde el AC inhibió la activación transcripcional por promotor IL-10 inducida por UVB. Los resultados indicaron que AC podría inhibir la producción de IL-10 al interferir con una etapa temprana, síntesis de prostaglandina E2, en la activación de la cascada de citocinas de supresión inmune inducida por UVB. El AC también inhibió significativamente la activación de las vías de transducción de señal de MAPK. Tales resultados sugieren que puede conferir una protección significativa contra la inmunosupresión inducida por UVB y la fotocarcinogénesis in vivo tal que tiene potencial terapéutico como un agente protector tópico contra los efectos nocivos de la radiación UVB (30). Se administraron vía subcutánea y oral dosis de AC y CAPE los cuáles redujeron significativamente la metástasis hepática; confirmando el potencial terapéutico de los compuestos, se sugiere que los efectos anti-metastásicos y antitumorales de CA y CAPE estén mediados a través de la supresión selectiva de la actividad enzimática de Matriz de metalopeptidasa-9 y de una inhibición de la regulación transcripcional de NF-kappa (31). También se ha demostrado que inhibe el metabolismo del ácido araquidónico (32) en las plaquetas a dosis altas; estimula la síntesis de prostaglandinas en dosis altas y es un inhibidor de glutatión S-transferasa (33) y ornitina descarboxilasa (34).

El ácido cafeico fenetil éster (inyecciones de 30 mg/kg intraperitonealmente/5 días) ejerció efectos neuroprotectores en el cerebro de rata en desarrollo después de un estado epiléptico visualizado por el examen histopatológico, mostrando la conserva significativa del número de neuronas disminuyendo la apoptosis en el hipocampo y la corteza prefrontal. Tales resultados sugieren que la administración de CAPE puede ser neuroprotectora en el estado epiléptico en el cerebro de rata en desarrollo (35)

El AC y algunos de sus derivados, tales como éster de ácido caféico fenetilo y caféico octilo son potentes antioxidantes que presentan importantes acciones antiinflamatorias. Se realizó una experimentación que muestra que los derivados del ácido caféico ejercen in vitro e in vivo acciones antiinflamatorias, siendo sus acciones

mediadas, al menos en parte por el barrido de NO y su capacidad para modular la expresión de iNOS y, probablemente, otros mediadores de la inflamación (36)

1.6 LA CROMATOGRAFÍA

Es una Técnica de separación, su propósito es “Separar y Cuantificar” analitos en mezcla (por lo general en matrices complejas). Se basa en la partición de solutos (diferentes solutos), entre dos fases: La Fase Estacionaria y La Fase Móvil.

1.6.1 La separación en Cromatografía

La separación ocurre por migración de los analitos en mezcla a diferentes velocidades. La velocidad de migración está gobernada por diferentes interacciones entre un Soluteo (conducido por un líquido en movimiento) y el Absorbente (sólido o líquido). El Líquido se denomina “Fase Móvil” y el Adsorbente “Fase Estacionaria”. La figura 1.7 representa a la columna cromatográfica en fase estacionaria.

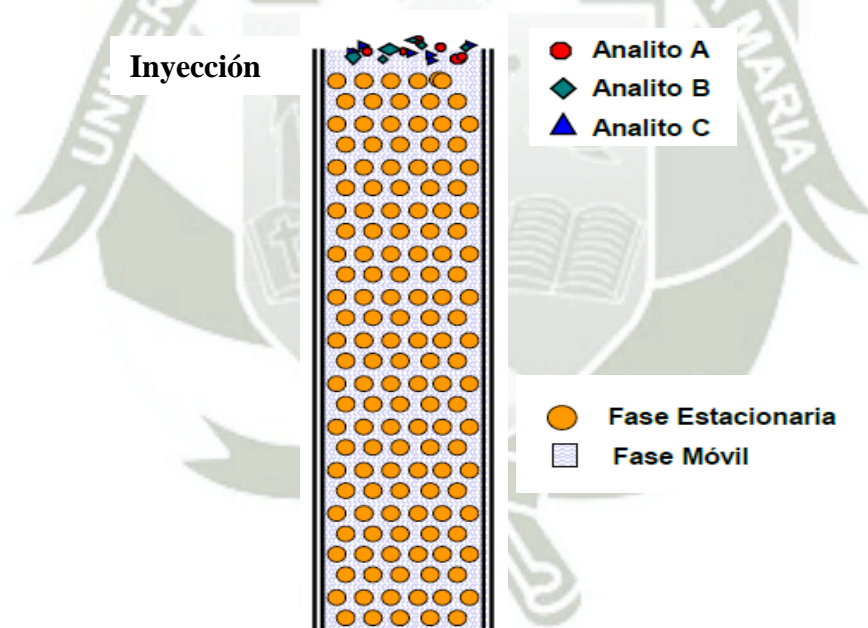


Figura N°1.7. Representación de la columna en fase estacionaria lista para recibir los analitos (37)

La fase estacionaria se empaca o deposita en la columna y está constituida por un sólido poroso, con un tamaño de partícula muy pequeño. Es de superficie inerte y está

recubierto por una pequeña capa o película de un líquido. Mientras que la fase móvil pasa a través de la columna a una velocidad determinada y transporta la muestra. Es un solvente de alto grado de pureza o una mezcla de ellos.

La separación cromatográfica viene a ser la migración depende de la afinidad de los analitos con la fase estacionaria y con la fase móvil. De ello, se puede observar que:

a. Si el analito tiene gran afinidad con la Fase Móvil y poca afinidad con la Fase Estacionaria: El compuesto migrará a través de la columna con poca interacción con la fase estacionaria (mayor velocidad) .

b. Si el analito tiene mayor afinidad a la Fase Estacionaria que la Fase Móvil: El compuesto migrará más lentamente a través de la columna dependiendo del grado de la interacción.

c. Si cada soluto viaja a través de la columna a una velocidad diferente, los componentes se separan.

La Fig.Nº1.8 muestra una representación de las etapas cromatográficas desde la inyección de los analitos hasta su elución. Cuando la muestra y la Fase Móvil atraviesan la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción: hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas. El Componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda en eluir. (37)

1.6.2 Sistemas de Gradientes

Gradiente, es la variación de la composición de la fase móvil. Por lo general, la Elución inicia utilizando un solvente de baja polaridad (débil), aumentando en forma progresiva la proporción de un componente alta polaridad (fuerte).

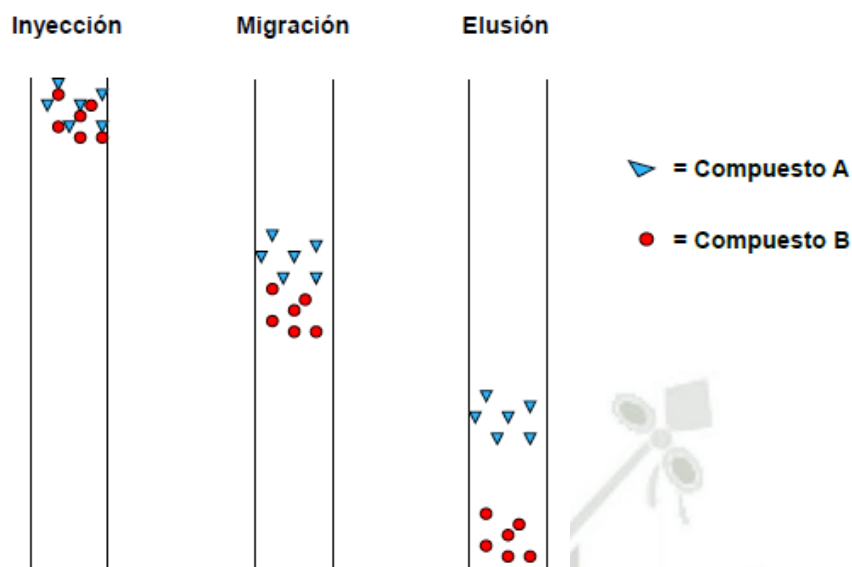


Figura N° 1.8. Representación de las etapas que suceden en la columna cromatográfica (37)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1 Reactivos Químicos

- Ácido acético glacial Q.P (Merck)
- Etanol absoluto (Diproquim)
- Ácido caféico 99% pureza (Merck)
- Metanol grado HPLC (Merck)
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- DPPH (Merck)
- Trolox (Merck)
- Metanol industrial
- Diclorometano (Merck)

- Acetato de etilo.

2.1.2 Materiales de laboratorio

- Fiolas Blaubrand, Duran de 5, 10, 25, 250 \pm 0.06 mL
- Equipo de extracción Soxhlet
- Matraz kitasato de 500 mL
- Beaker 50 ml.
- Pipetas graduadas Brand de 1 y 5 ml.
- Probeta graduada de 10 ml.
- Tubos de ensayo de 15x100 mm.
- Recipientes de vidrio de 100 cm³.
- Embudo
- Balón de 50mL boca ancha.
- Celda de cuarzo de 3 cc.

2.1.3 Equipos

- Balanza analítica (Mod: SYW-104; Sargent)
- Microcentrífuga (Centra CL2; Thermo IEC)
- Espectrofómetro (Cary 60 UV-VIS; Agilent Technologies)
- Estufa (Mod: Serie 500; Fisher Scientific Itemp)
- Equipo de Cromatografía de alta Resolución (Mod: LACHrom; Merck Hitachi);
Detector UV L-7400; Interface D-7000; Columna monolítica Chromolith
RP18e de 10cm x 4.6 mm, 2 μ m y precolumna RP18e de 5, 4.6
- Rotavapor
- Equipo de filtración a vacío.

2.1.4 Otros

- Licuadora. (Oster)
- Molino de acero manual.
- Gradilla.
- Ependorfs de 1.5mL (Ependorf)

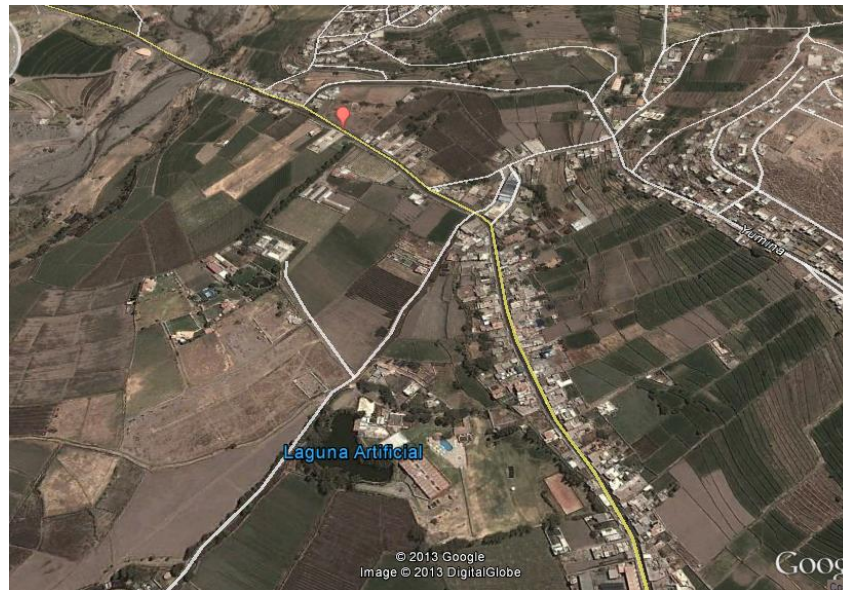
- Micropipeta automática de 0.5-10ul, 25-200ul y 250-1000ul
- Membrana de filtración de PVDF de 45 um.
- Tamizadores (Anvantech)
- Filtros anotop-10 (Merck)
- Papel de filtración lento.
- Soporte universal.
- Varillas para soporte universal.
- Espátula.
- Jeringas descartables.
- Cronómetro.
- Papel aluminio.
- Plastic graft.
- Papel absorbente.
- Tijeras.
- Cinta adhesiva.
- Marcador.
- Parafilm

2.2 MÉTODOS

El presente trabajo de investigación fue realizado durante los meses de marzo a diciembre del año 2013 en los laboratorios del pabellón H de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2.2.1 Ubicación de la fuente de estudio

Las brácteas de alcachofa fueron recolectadas de la empresa ALSUR PERU SAC. Es una empresa dedicada al cultivo, envasado y exportación de productos vegetales congelados y en conserva. Ubicada en el distrito de Socabaya de la ciudad de Arequipa a 2380 m.s.n.m (fig. 2.1) La cosecha de alcachofa se realiza en 850 Ha de cultivo y el producto es procesado en la planta.



*Figura N° 2.1. Vista satelital del lugar de recolección del material de estudio
(Fuente: Google Earth)*

2.2.2 Unidad de estudio

Se recolectaron brácteas de alcachofas de la empresa AlSur SAC, estas brácteas fueron sometidas por la empresa a un tratamiento de escaldado donde se las coloca en un medio con agua acidulada (92°C) y ácido cítrico en, (Fuente: AlSur SAC.) esto conlleva a la inactivación enzimática y facilita el pelado.

Luego de esto las alcachofas pasan a ser peladas manualmente y estos desechos o las brácteas son llevados por bandas transportadoras hasta camiones. La producción normal en temporada alta es de 80 ton/mes. Las brácteas son aproximadamente un 70% del total de este producto tal que la cantidad de brácteas por mes en temporada alta viene a ser 56 ton/mes de brácteas.

2.2.3 Procesamiento de la muestra

2.2.3.1 Recolección de muestras

Las brácteas de alcachofa se recolectaron de la empresa ALSUR, de la variedad criolla o italiana con espinas.

2.2.3.2. Secado de brácteas de *Cynara scolymus L.*

Se seleccionaron las brácteas que estaban en buenas condiciones, eliminando las marchitas. Luego fueron sometidas a limpieza de tierras e insectos, enjuagando con agua potable, y dejando que ésta se evapore a temperatura ambiente sobre bandejas cerca de 7 días, esparciendo todas las brácteas.

2.2.3.3. Pulverización de brácteas de *Cynara scolymus L.*

El fin de la reducción de tamaño de partícula facilitará la extracción de un constituyente deseado que se encuentre dentro de la estructura del sólido. Así también aumenta la relación superficie-volumen la cual actúa en beneficio de la extracción del soluto deseado (38). Una vez secas las brácteas se molieron en una trituradora giratoria de acero manual (Victoria's steel) por ser extremadamente duras en algunas zonas. Se colectó la molienda y se traspasó hacia una licuadora común, hasta obtención de polvo fino. Una vez obtenido el material seco y molido se procedió a cernir en tamizadores de 50 y 350 μm de apertura (fig.2.2). Obteniendo estos tamizados finales por separado, se almacenaron en frascos de vidrio limpios, rotulados y sellados para posterior uso.



Figura N° 2.2. Proceso de tamizaje

2.2.4 Determinación del porcentaje de humedad

Se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y realizar un registro continuo de la pérdida de peso, hasta que éste sea constante (39).

Se tomaron 10 gramos de muestra limpia y fresca, se le pesó y rotuló. Luego se introdujo en la estufa a 100°C. Se monitoreó el peso de esta cada hora hasta que el peso sea constante. Finalmente el porcentaje de humedad se determinó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \times 100$$

Ecuación 1. Fórmula para la determinación porcentual de humedad

2.2.5. Extracción de metabolitos

Se realizaron dos tipos de tratamiento para la extracción de metabolitos, usando siempre la misma proporción de 10 g de muestra tamizada en 50 mL de metanol (20% p/v). Un tratamiento de extracción por maceración con agitación, usando por separado, los tamizados de <50 µm y el tamizado de 50-350 µm, y una extracción Soxhlet usando el tamizado <50 µm.

2.2.5.1 Extracción por maceración con agitación

La maceración es una extracción sólido-líquido, se dará cuando un disolvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado dando lugar a un proceso por el cual se extrae uno o varios solutos desde el sólido. Este soluto o solutos podrán difundirse desde el sólido a la fase líquida, debido a la diferencia de concentración de éste en la interface sólido-líquido (gradiente de concentración) y la superficie exterior del sólido lo que produce una separación de los componentes originales del sólido, esta transferencia de materia se da por transporte molecular y turbulento.

Para el primer tipo de extracción, se realizó una maceración bajo agitación a temperatura ambiente. Se usó los dos tamaños de partícula por separado, el de <50 µm y el de 50-350 µm. Se colocaron 10 g del tamizado respectivo en un envase de vidrio

de 150 mL de capacidad. En seguida se colocaron 50 mL de metanol comercial y se sellaron los frascos con plastic graft para evitar pérdidas de solvente, dando una concentración del 20 % p/v. Se les sometió por separado a diferentes tiempos de agitación, de 2 y 6 horas respectivamente. Los tratamientos se realizaron por duplicado para finalmente sacar un promedio de los mismos. En adelante los tratamientos se denominarán de la siguiente manera:

Tratamiento 1 (T1)= <math><50\ \mu\text{m}</math> de muestra agitada por 2 horas

Tratamiento 2 (T2) = <math><50\ \mu\text{m}</math> de muestra agitada por 6 horas

Tratamiento 3 (T3) = 50-350 μm de muestra agitada por 2 horas

Tratamiento 4 (T4) = 50-350 μm de muestra agitada por 6 horas

Luego se marcaron los envases de vidrio con una línea que indicaba el volumen inicial del solvente más la muestra para verificar el volumen durante la agitación y al final para notar si existía alguna disminución de volumen (Fig. 2.3).

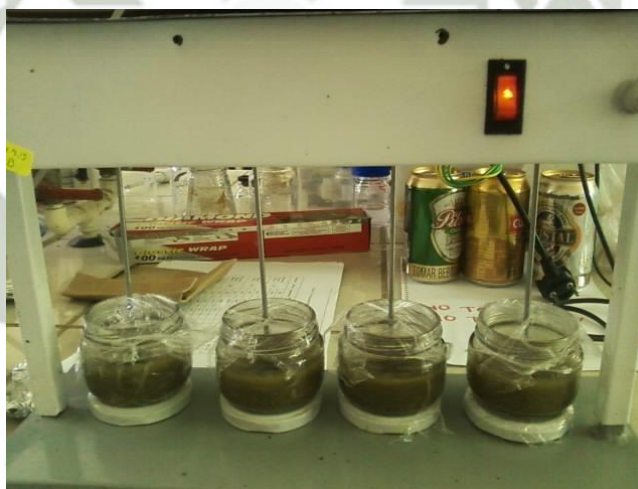


Figura N° 2.3. Agitación de según los tratamientos 1 a 4

2.2.5.2 Extracción por Soxhlet

Es una extracción semicontinua con disolvente donde una cantidad de disolvente rodea la muestra y se calienta a ebullición, una vez dentro del Soxhlet el líquido condensado llega a cierto nivel y es sifoneado de regreso al matraz de ebullición. En donde se separa con un líquido una fracción específica de la muestra, dejando el resto

lo más íntegro posible, es un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en el solventes, que están presentes en una muestra vegetal (40).

El segundo tipo de extracción se realizó utilizando el equipo de Soxhlet. Se usó una proporción de 10 g materia seca pulverizada $<50 \mu\text{m}$ en 50 mL de metanol (20% p/v). En adelante el tratamiento se denominará como:

Tratamiento 5 (T5)= $<50 \mu\text{m}$ en extracción por Soxhlet

Se recortó y formó un tubo con papel filtro de poro pequeño a modo de depósito de los 10 g ($<50 \mu\text{m}$) de brácteas de alcachofa tamizada. Luego se le colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet. Enseguida se añadió metanol comercial hasta sumergir la muestra, para luego proceder a terminar de armar el equipo de Soxhlet, es decir colocando el condensador para luego encender la cocina y abrir la llave de entrada de agua. Se esperó que se cumplieran los ciclos hasta que en la cámara de extracción no tuviera más color.

2.2.6 Filtración de los extractos al vacío

Una vez obtenidos los extractos, se procedió a realizar la filtración a vacío de los mismos por separado. Se instaló el equipo de filtración y se usó un disco de papel filtro de poro pequeño. Antes de retirar el papel del embudo Buchner se agregó un poco de metanol para que no queden posibles sustancias impregnadas en el papel filtro. Una vez terminada la filtración se almacenó a 5°C hasta posterior tratamiento. Ya conseguido el extracto filtrado se procuró que no pase mucho tiempo hasta el siguiente procedimiento evitando así pérdidas de compuestos por degradación.

2.2.7 Concentración de los extractos

El rotavapor realiza un proceso que se basa en la evaporación y la condensación de disolventes o el secado de polvos en un matraz de evaporación rotativo. La presión baja disminuye el punto de ebullición del medio dentro del rotavapor, esto permite tratar el producto con delicadeza incluso con un rendimiento de evaporación superior comparado con el manejo a presión ambiental. (41)

Se procedió a eliminar el solvente usando el equipo de rotavapor (Fig. 2.4), de esta manera se concentró la muestra, usando un balón de 50 mL para mayor facilidad de limpieza del producto. Para esto se introdujo el extracto hasta la mitad del balón y se puso el baño maría a 35°C con una velocidad media de 25 rpm. Una vez disminuido hasta casi sequedad se traspasó este concentrado del extracto a un beaker de 20 mL. Se realizó esto de 3 a 4 veces por cada muestra. La última vez que se eliminó el solvente se agregó un poco de metanol al balón y se agitó circular y cuidadosamente para retirar de las paredes los restos que quedaron pegados.



Figura N° 2.4. Rotavapor usado para volatilizar los solventes de los extractos

Para eliminar lo que queda del solvente se realizó el secado por medio de aire comprimido de la manera en que muestra la figura 2.5. Una vez concentrado hasta casi sequedad se traspasó a una fiola de 5 mL y pasando un poco de solvente por los cantos del embudo para limpiarlo, obteniendo un volumen aproximado de 5 mL. Para el enrase se agregó solvente si éste faltaba y se evaporó nuevamente si éste excedía. Finalmente se almacenaron las muestras en viales de vidrio a una temperatura de 5°C.

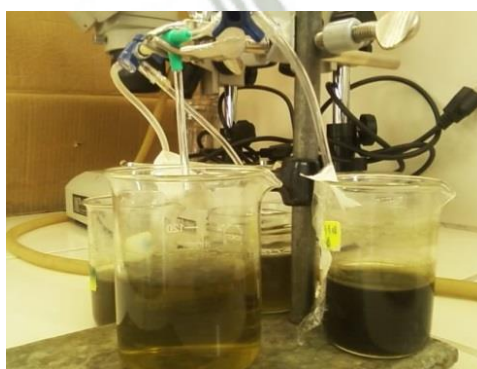


Figura N° 2.5. Concentración del extracto por aire comprimido

2.2.8 Filtración del extracto por gravedad

Tanto el calor como las temperaturas bajas tendieron a ayudar a la formación de cúmulos granulados dentro del extracto, por tal se procedió a filtrar por gravedad con ayuda de un embudo y papel filtro doblado adecuadamente. Para esto se usó un soporte universal acoplado a una pinza de hierro que sujetó al embudo, colocando debajo una fiola de 5 mL.

Se vertió el producto lentamente sobre el papel eliminando así los cúmulos que se formaron durante la eliminación del solvente, siempre agregando un poco de solvente al final de cada filtración, enrasando hasta los 5 mL.

De quedar mayor cantidad de extracto se procedió a secar haciendo uso de aire comprimido hasta un enrase exacto. De formarse nuevamente partículas se volvió a filtrar de la misma anterior manera. Finalmente se almacenó bajo congelación para evitar que actúen las enzimas propias de la planta.

2.2.9 Determinación de ácido caféico en brácteas secas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa)

2.2.9.1 Extracción en fase Sólida (SPE)

Es una técnica de limpieza de muestras que consiste en una columna de lecho adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable, estos permiten la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen. Pasando por 5 etapas. El primer paso es la activación en la que se utiliza un solvente orgánico para “humidificar” la fase. La etapa 2 es de acondicionamiento. La etapa 3 de retención, donde las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SPE. En la fase 4 se eliminan las interferencias usando uno o más solventes, finalmente se llega a la etapa de elución.

Para eliminar interferentes, cada extracto se sometió a una separación de componentes por medio del método de SPE o extracción en fase sólida. Se pesó 0.5 g de sílica gel y se introdujo en el cartucho para SPE sobre la primera tapa o filtro de éste, luego se tapó con la segunda tapa o filtro, se colocaron a 120°C durante 2 horas en estufa, para

activar la sílica. Una vez hecho esto, para acondicionar esta columna se colaron 3 mL de diclorometano al cartucho y se esperó a que filtre empero sin dejar secar la parte superior, justo antes de esto se colocó 3 mL del extracto. Enseguida se enjuagó con 3 mL de acetato de etilo y ésta columna sí debe secarse por completo, se hizo el secado con aire comprimido. Luego de este secado se procedió a realizar la elución, añadiendo 3 mL de metanol. Finamente se colectó éste último siendo el producto requerido para el análisis en HPLC y se realizó este procedimiento para las ocho muestras y cada una filtró por gravedad; guardándolas hasta posterior uso bajo refrigeración.

2.2.9.2 Preparación del equipo HPLC

Los equipos cromatográficos que se emplean en la actualidad disponen de integradores electrónicos, los cuales integran los picos de los cromatogramas, pudiéndose obtener la altura y el área de cada pico. Ambos parámetros se pueden utilizar para cuantificar los distintos compuestos; siendo el área del pico el más utilizado y el que se va a emplear en este trabajo. (42)

Se utilizaron como solventes al acetonitrilo grado HPLC (250 ml) y metanol grado HPLC (250 ml). Primero se procedió a instalar el equipo de desgasificación a vacío, este aparato consta de un embudo de vidrio con soporte de filtro, frita de vidrio con *anillo* – O, frasco kitasato para la recepción y pinza grande sujetadora que asegura ambos cuerpos. Se aplicó primero el metanol al kitasato para cebar, se eliminó este, y se procedió a instalar el equipo, colocando la membrana o disco de celulosa de 0.45um como segundo filtro. Por la parte superior se vertió el metanol al frasco se esperó a que filtrara. Una vez terminado esto se traspasó lentamente el solvente desgasificado y filtrado al depósito principal del solvente indicado del equipo de HPLC. Se volvió a conectar el equipo asegurándose que no quedasen restos de solvente, una vez esto se continuó con el acetonitrilo, procediendo de la misma manera. El agua ultrapura fue sonicada y en el caso de solución amortiguadora fue desgasificado, filtrado y sonicado. Finalmente listas las soluciones para los 4 canales en el equipo de HPLC (Fig. 2.6), se utilizó Software es EZChrom Elite como parte del funcionamiento.



Figura N°2.6. Equipo HPLC utilizado, LaChrome-Hitachi

Se finalizó con el lavado de columna, almacenando todos los datos de las muestras analizadas. Donde la gradiente usada se muestra en la tabla 2.1.

Tabla N° 2.1.- Gradiente usada para la separación de componentes.

Tiempo, minutos	Acetonitrilo, %	Ácido acético, %
0	5	95
2	15	85
4	20	80
10	5	95
15	5	95

2.2.9.3 Preparación del gráfico de calibración

Se realizaron soluciones a las concentraciones de 200, 400, 800, 1200 y 1600 ppm (tabla N° 2.2) a partir del estándar de AC, usando como solvente metanol grado, en fioas de 5 ± 0.2 mL disueltos y enrasados. Luego se almacenaron bajo refrigeración a máximo 8°C , para evitar degradaciones. Para ver a qué longitud de onda se obtenía el

mayor pico se realizó una lectura de escaneo en el equipo de espectrofotometría y así se eligió 300nm. Finalmente la lectura de picos más altos de AC a 300 nm concuerda con que el AC está disuelto en metanol.

Tabla n°2.2. Soluciones del estándar ácido caféico.

Concentración final, ppm
200
400
800
1200
1600

2.2.9.4 Preparación de la muestra para HPLC

Luego de obtener la solución filtrada por SPE, se traspasó a tubos eppendorf para ser centrifugados. Se utilizó una jeringa de 1 mL, sacando del extracto obtenido por SPE, luego se acopló el filtro anotop de membrana de celulosa 0.45 μ m, luego se colocó el filtrado a un tubo eppendorf, se rotuló y almacenó a 5°C hasta su posterior uso. Esto se realizó para cada extracto para finalmente ser evaluados en el equipo de HPLC inyectando 20 μ L de la solución problema siguiendo la misma gradiente presentada en la tabla N° 2.1.

2.2.10 Determinación de la capacidad antioxidante en brácteas secas de *Cynara scolymus L.* (alcachofa)

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método basado en la reducción del radical libre estable 2,2, difenil-1-picrilhidrazil a la hidracina correspondiente. Las sustancias antioxidantes de las muestras reaccionan con el DPPH y ocasionan la reducción del reactivo, lo que produce una sustancia incolora, la intensidad de esta disminución se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm.

Se preparó metanol al 80% para 50 mL totales de la siguiente manera: Se midieron 10 mL agua ultrapura enrasando en bureta de 10 ml, vertiéndola luego a una fiola de 50 mL y se enraso con metanol p.a.

2.2.10.1 Preparación de la solución madre de DPPH

A partir de un estándar DPPH se pesó 4 mg y se enraso en fiola de 5 mL, Se agitó en el vortex hasta disolución total. Dando una concentración de 2.1 mM. Se cubrió por completo con papel aluminio y se almacenó a 10°C, para evitar cambios de actividad en la muestra.

2.2.10.2 Preparación de la solución madre de Trolox

A partir de una solución preparada de Trolox de 1mM, se extrajo 1 mL y se colocó en fiola de 5mL enrasando con metanol obteniendo así 0.2 mM.

2.2.10.3 Preparación del gráfico de calibración

Para la preparación del gráfico de calibración, se prepararon 5 soluciones, con una micropipeta calibrada se tomó y colocó a cada fiola; 125, 250, 500, 750 y 1000 μ L de la solución de Trolox respectivamente; a continuación se colocó 250 μ L de la solución de DPPH a cada fiola y se terminó enrasando hasta los 5 mL con metanol al 80%; se agitó y se almacenó en oscuridad (fig. N° 2.7). Transcurridos 10 minutos, cada concentración obtenida se introdujo en el espectrofotómetro y se realizó la lectura a 517 nm, en su orden de preparación, tal como se muestra en la tabla N°2.3. Esto se realizó por triplicado. Obteniendo así el gráfico de calibración.

Tabla 2.3. Volúmenes usados para determinación de la actividad antioxidante

	TUBO					
	Blanco	1	2	3	4	5
Trolox 0.2 mM	-	125	250	500	750	1000
DPPH 2.1 mM	250	250	250	250	250	250
Metanol, 80%	4750	4625	4500	4250	4000	3750
Conc. Mmol/L.	-	0.005	0.01	0.02	0.03	0.04

Para medir cero en el espectrofotómetro se colocó únicamente metanol al 80% en la celda de cuarzo limpia. Una vez obtenida el gráfico de calibración de DPPH se

procede a realizar el mismo método con las muestras. Midiendo como blanco únicamente a el trolox con DPPH para restar a las muestras. Para la lectura de la muestras se procedió de la misma manera a excepción de que se usó 20 μ L de muestra en vez de trolox utilizando una micropipeta de 20 uL.

$$\%I = \frac{A_0 - A_e}{A_0} \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición del radical DPPH

Donde:

A_0 = Absorbancia sin extracto o trolox

A_e = Absorbancia con extracto



Figura N° 2.7. Fiolas preparadas para el gráfico de calibración.

2.2.11 Determinación de la cantidad de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos se determinan haciendo reaccionar los componentes de las muestras de alcachofa con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta reacción es característica para compuestos que tienen un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, tiene una coloración amarilla que en presencia de un compuesto fenólico se torna de color azul. La intensidad de la coloración azul es proporcional a

la concentración de polifenoles usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo. Los resultados se presentan en el equivalente de ácido gálico (GAE). (16)

Primero se lavaron 6 fioles de 10 mL (± 0.04), procurando que no existan partículas de ningún tipo que pudiesen afectar la reacción. Se dejaron secar y se les rotuló para posterior uso. La solución de ácido gálico se preparó pesando dentro del pesafiltro 0.005 g de ácido gálico en la balanza analítica y enrasando en fiola de 5 mL. Se agitó en el vortex para completa disolución. Esta solución se transfirió a un tubo de ensayo de boca ancha para fácil acceso de recolección con la micropipeta. El tubo se selló con plastic graft y cubrió con papel aluminio para evitar cualquier alteración. El reactivo de Folin Ciocalteu se almacenó por separado en tubo de ensayo de boca ancha, éste se selló con plastic graft y cubrió con papel aluminio para evitar cualquier alteración. La solución de carbonato de sodio se preparó pesando 5 g de carbonato sódico, debido a su gran cantidad se colocó con cuidado dentro de la fiola por medio de un embudo; dejando pasar el resto de partículas con la ayuda de la piseta de agua destilada hasta un volumen de 25 mL. Se agitó en el vórtex hasta obtener una disolución completa. Luego de esto, se volvió a medir el menisco y se enrasó hasta volumen exacto. Ésta solución también se pasó a tubo de ensayo de boca ancha y se cubrió la boca con plastic graft. Para el blanco únicamente se disolvió 250 microlitros del reactivo de Folin Ciocalteu, en 4 mL de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo por 5 minutos y luego se añadió los 2 mL de carbonato de sodio y finalmente se enrasó a 10 mL. Cada enrase de 10 mL se realizó con agua destilada y a continuación se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu cada 2 minutos a cada fiola, para esperar la reacción inicial, se agitó y tapó. Luego cada una esperó 5 minutos hasta agregar el carbonato de sodio, una vez agregado se agitó y enrasó hasta 10 mL con agua destilada. Se volvió a agitar 6 veces y se almacenó esperando 2 horas hasta la medición a 715 nm. Una vez transcurridas las 2 primeras horas se procedió a medir en el espectrofotómetro. Para la preparación del gráfico de calibración de cinco puntos, se agregó en orden las soluciones a las cinco fioles, en las cantidades indicadas en la tabla N° 2.4.

Tabla N° 2.4. Volúmenes usados para el gráfico de calibración de polifenoles totales

	Blanco	1	2	3	4	5
Ácido gálico (uL)	-	40	50	60	70	80
H ₂ O (mL)	4	4	4	4	4	4
Reactivo de folin ciocalteu (uL)	250	250	250	250	250	250
Na ₂ CO ₃ (mL)	2	2	2	2	2	2
Concentración final (mg/L)	0	4	5	6	7	8

Para la medición de las muestras se procedió de acuerdo a la siguiente tabla N° 2.5:

Tabla N° 2.5. Volúmenes usados para la determinación de polifenoles totales en muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8
Muestra (uL)	20	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4
Reactivo de Folin-Ciocalteu (uL)	250	250	250	250	250	250	250	250
Na ₂ CO ₃ (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2

El gráfico de calibración del ácido gálico fue para estimar la capacidad de actividad de las muestras. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por g de muestra (mg EAG/g).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan los resultados experimentales, se realizarán las evaluaciones de rendimiento, análisis cuantitativo sobre el contenido de ácido caféico, actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales, y discusión de los mismos.

3.1 Porcentaje de humedad

Las moléculas de agua en la muestra pueden causar interferencias en las reacciones; así como impedir una correcta conservación de la muestra. Por tal, el método que se empleó para determinar el porcentaje de humedad se describe en el Capítulo II sección 2.2.4, realizando tres ensayos por muestra como se muestra en la Tabla 3.1. Si consideramos que en temporada alta se procesan 80 TM alcachofa/día durante 2 meses (Fuente:Entrevista - logística AISur S.A.C.) y constituyendo las brácteas un 70 % del fruto total, se calcula que se obtendría un aproximado de 1680 TM/mes de brácteas en la temporada alta. Recurriendo a los datos hallados de humedad, cuya media encontrada es $88.04 \pm 1.4095\%$, las TM en peso seco serían 194.88 TM/mes en la región Arequipa.

Tabla N°3.1. Determinación de humedad de las brácteas de alcachofa criolla
(*Cynara Scolymus L.*)

N° muestra	peso inicial, g	peso final, g	% humedad
1	20.00	2.46	87.70
2	20.30	2.10	89.66
3	20.55	2.32	88.71
4	20.20	2.60	87.13
5	20.00	2.37	88.15
6	20.67	2.27	89.01
7	20.30	2.38	88.28
8	20.43	3.03	85.19
9	20.13	2.05	89.82
10	20.98	2.77	86.79
		Promedio	88.04

Fuente: Datos experimentales propios.

DS=± 1.4095

3.2 Determinación del ácido caféico

3.2.1. Preparación de la gráfica estándar de ácido caféico (AC)

Usando la metodología descrita en la sección 2.9.3, se prepararon las soluciones respectivas a partir del estándar de AC. Se determinó el tiempo de retención adecuado, el cual osciló entre 8.46 y 8.785 min., usando la gradiente descrita en la tabla N° 2.1, la cual logró una buena separación y perfilación de picos. Se usaron dos columnas acopladas (Chromolith 18e) en el equipo de HPLC para mejor separación de compuestos. El uso de la solución amortiguadora en la fase móvil fue necesaria para estabilizar el pH de la muestra y así no presentase cambios en la forma o resolución de picos; en tanto que el uso de acetonitrilo ayudó a perfilar los estos picos. Cada concentración del estándar de AC arrojó un valor de área respectiva indicada en la tabla N°3.2, se determinó así el gráfico de calibración y los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla N°3.2. Resultados de áreas y tiempos de retención para el gráfico de calibración, en la determinación de ácido caféico mediante HPLC.

AC, ppm	R1		R2		R3		Promedio de Áreas ± DS
	Área	T _{ret}	Área	T _{ret}	Área	T _{ret}	
200	245849	8.710	283841	8.768	295841	8.688	275177±15068
400	562259	8.717	579774	8.777	561226	8.604	567753±6018
800	1271811	8.693	1086226	8.775	1196428	8.700	1184820±53890
1200	1973113	8.692	1723925	8.710	1889216	8.460	1862080±73205
1600	2623186	8.590	2415885	8.477	2578819	8.572	2539300±63020

*Donde “R1”, “R2” y “R3”, hacen referencia al número de repeticiones; y “T_{ret}” es el tiempo de retención respectivo.

Se realizó un análisis de regresión para cada concentración del estándar de AC y su respuesta referida al área de integración del pico, la Figura N°3.1 muestra la calibración de las concentraciones vs el promedio de las áreas.

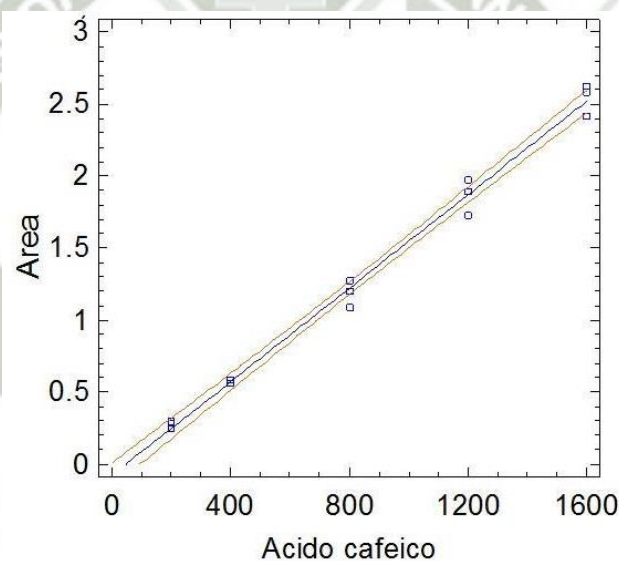


Figura N°3.1. Gráfico de calibración para la determinación de ácido caféico (ppm)

Coeficiente de Correlación = 0.996027; R-cuadrada = 99.207 por ciento.

$$\text{Área} = -75907.2 + 1621.11 * \text{Ácido caféico} \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$

Para que exista aceptación de la linealidad, el análisis debe evidenciar un R2 mayor a 0.995, en el ensayo sustenta que se tiene un r de 0.996, indicando una alta correlación entre la concentración (variable independiente) y el área de respuesta (variable dependiente).

3.2.2. Determinación de ácido caféico en los extractos metanólicos

Para el análisis cuantitativo de los extractos se usó la metodología descrita en la sección 2.2.9. La tabla N° 3.3 muestra el área de integración con sus respectivos tiempos de retención, determinados en las muestras de extractos macerados bajo agitación y extractos obtenidos por el método de Soxhlet.

Tabla N° 3.3. Áreas en muestras de alcachofa para la determinación de ácido caféico

Tratamiento	R1		R2		Promedio ± DS
	Área	T _{ret}	Área	T _{ret}	
T1 (AG, <50 µm, 2h)	260328	8.567	268196	8.457	264262±83649.0
T2 (AG, <50 µm, 6h)	852962	8.51	914437	8.785	883700±83648.5
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	462853	8.522	584261	8.79	523557±83649.0
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	418709	8.697	416125	8.775	417417±83649.0
T5 (Soxhlet, <50µm, 16h)	1893191	8.665	1739022	8.64	1816110±83650.0

Donde:

R1 y R2 = número de repetición realizada

T_{ret} = tiempo de retención

T1 a T4, son los tratamientos de maceración con agitación, y T5 el tratamiento de extracción con Soxhlet.

AG = Maceración con agitación

Usando la expresión lineal de la ecuación 2, se expresan las concentraciones encontradas de AC en cada muestra, expresadas en ppm AC/g. y visualizada en la tabla N°3.4.

Tabla 3.4.- Concentración ácido caféico (ppm) en muestras de brácteas de alcachofa

Tratamiento	Concentración de Ácido caféico, ppm/g		Promedio±DS
	R1	R2	
T1 (AG,<50 µm, 2h)	20.74	21.27	20.98±0.35 ^a
T2 (AG,<50 µm, 6h)	57.3	61.09	59.19±2.69 ^c
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	33.23	40.72	36.98±5.30 ^b
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	30.51	30.35	30.43±0.07 ^{ab}
T5 (Soxhlet,<50µm, 16h)	121.47	111.96	116.71±5.16 ^d

*Donde: R1 y R2 = número de repetición realizada

Según el análisis de varianza mostrado en la tabla N°3.5 existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los cinco tratamientos con un nivel de confianza del 95%, puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05.

Tabla N°3.5. Análisis de varianza para la determinación de ácido caféico en las
muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.17769E6	4	294422.	182.68	0.0000
Intra grupos	8058.55	5	1611.71		
Total (Corr.)	1.18575E6	9			

El resultado del tratamiento T2 (59.1944±2.69 ppm AC/g) es significativamente distinto y mayor dentro del estudio de maceración, esto puede deberse a que la materia prima seca empleada fue un conjunto de brácteas exteriores e interiores, las cuales presentaron distinto comportamiento frente a la molienda evidenciando que en ciertos sectores las brácteas secas interiores fueron más frágiles presentando una molienda más sencilla y por consiguiente permitiendo obtener partículas más pequeñas; siendo

probable que la mayor parte la fracción de $<50\mu\text{m}$ de apertura corresponda a brácteas interiores.

Por su parte la Boerjan W. (29) que denota que el ácido caféico es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, esta lignina es un polímero presente en las paredes celulares de las plantas en general, y ya que las brácteas interiores son las que aún están en crecimiento es donde existe mayor actividad de metabolitos para su correcta formación; también según Lutz (12) puede encontrarse que en alcachofas bebés o en formación, poseen mayor cantidad de fenoles, AC, ácido clorogénico y contenido de cinarinas.

Por lo tanto, es muy probable que la diferencia de concentraciones de AC encontrado sea debido a que las brácteas interiores (en formación), que fueron las que estuvieron en mayor cantidad en el tamizado de $<50\mu\text{m}$ además de estar un tiempo más prolongado bajo agitación T2 (6hrs) en comparación a T1 (2hrs) en el cual se obtuvo $20.98\pm 0.35\text{ppm AC/g}$. También distinto a los tratamientos T3($36.98\pm 5.30\text{ ppmAC/g}$) y T4($30.43\pm 0.07\text{ ppmAC/g}$) cuyos tamaños de partícula fueron de $350\mu\text{m}$; donde el test de comparaciones múltiples denotó una diferencia por cada tratamiento.

Una investigación realizada en desechos de alcachofas (4), mediante HPLC indicó sólo ácido clorogénico con 82.8560 mg/L , sin evidencia de contener ácido caféico, a pesar de que el fruto posee altas cantidades de AC puede verse la dificultad de encontrar el compuesto sin los procedimientos de purificación adecuados. Al igual que en la presente investigación hubieron dificultades al encontrar las condiciones adecuadas de purificación para poder visualizar el compuesto en el equipo de HPLC; encontrando en la extracción con Soxhlet un mejor resultado, se encontraron $116.71\pm 5.16\text{ ppm AC/g}$, posiblemente debido al tiempo de extracción que duró 16 hrs en el Soxhlet, al calor expuesto y trabajar con la muestra de tamizaje de $<50\mu\text{m}$. Puede notarse la diferencia entre cada tratamiento en la gráfica de medias en la figura N°3.2, donde el T5 resalta por encima de todos los demás. La temperatura durante el proceso de T5 no debió afectar negativamente la estructura del AC durante el proceso de extracción debido a que no excedió los 70°C , siendo el punto crítico de descomposición de 223°C , mas sí posiblemente haya ayudado a su formación, ya que

estudios muestran que la fracción libre de ácidos fenólicos aumenta, luego del calentamiento, así también la capacidad antioxidante y TPC (43), esto puede explicar el aumento de la concentración de AC encontrado en el T5, en el cual se expuso a calentamiento durante prolongado tiempo, comprobando que las brácteas de alcachofa son una gran fuente de éste compuesto, reportándose concentraciones similares en sus hojas según bibliografía (4,9) y otras especies de plantas ya reconocidas (44), donde se encontraron 34.3 ± 0.6 mg/g de derivados totales de AC en extractos de alcachofa.



Figura N°3.2. Gráfica de medias para la comparación de ácido caféico en las muestras

Esta teoría también puede ser respaldada con el trabajo de investigación de Martino (45) en donde el tratamiento en *Coffea canephora* en Soxhlet, durante 2 hrs y 4 hrs extrajo 0.41 mg/g y 0.819mg/g de ácido clorogénico respectivamente; y en tanto que en *Coffea arabica* (46) se encontró 6.95 mg/g CGA; también se reportó que los derivados de AC (ácido caftárico, ácido clorogénico y ácido chichórico), contenido en raíz seca de *Echinacea purpurea*, es afectado por la temperatura durante la extracción por reflujo por 2 hrs/40°C donde resultó en 2.8 ± 0.4 mg/g, y a 60°C resultó 3.6 ± 0.1 mg/g de CGA (47).

Podemos hacer algunas relaciones de sus posibles usos y aplicaciones en cuanto a la concentración encontrada en la presente investigación. Los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, AC, ácido p-cumárico y ácido sinápico) presentan propiedades anti-

cancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. Ya que los ácidos hidroxicinámicos se encuentran esterificados a la pared celular y son liberados por la acción de enzimas hidrolíticas como las pectinasas y las metil ferulato esterasa (34). Sin embargo; también a altas concentraciones existen evaluaciones sobre su carcinogenicidad (30) por administración oral en ratones, como la producción de adenomas en hembras, en células escamosas la aparición de papilomas y carcinomas en el estómago de machos así como hiperplasia, tal que la administración de ácido caféico en combinación con conocidos carcinógenos puede conducir a una inhibición o desarrollo de células cancerígenas, dependiendo del tipo de carcinógeno, dosis y tiempo de administración.

El AC y ácido clorogénico contenido en el café han mostrado contribuir a actividades neurofarmacológicas, a virtud de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (48), así también inhiben la elevación de peróxidos de lípidos séricos, así como peróxidos del hígado, en ratas alimentadas con aceite peroxidado (49). Otro estudio reportó la prevención de estrés oxidativo inducido por paraquat en el hígado de ratas suplementadas con ácido clorogénico en su dieta (50). Dentro de la señalización celular AC exhibe un potente efecto citoprotector de células endoteliales cultivadas contra la oxidación de LDL, el bloqueo concomitante del Ca^{2+} intracelular y el proceso de apoptosis. Presenta un efecto “directo” protector de células endoteliales contra la apoptosis inducida por LDL oxidada, independientemente de la inhibición de oxidación de LDL (51). La capacidad del AC para ejercer una acción antioxidante y para modular una respuesta a un desafío oxidativo dentro de la célula también se ha observado en cultivos de monocitos celulares humanos (U937), en este estudio el AC se incorporó a la célula sin efecto citotóxico hasta una concentración de 100 μ M en el medio de cultivo. Las células preincubadas con ácido caféico eran más resistentes a la muerte celular inducida. “Se puede considerar que el AC puede operar complementariamente en: la extinción de radicales libres fuera de las células; la modulación de las vías de señalización tóxicos provocados por las LDL oxidadas a través del mecanismo que no están necesariamente relacionados con su actividad antioxidante y reducir el estrés oxidativo intracelular”. (52)

En contraste a sus beneficios antioxidantes ‘la habilidad de compuestos fenólicos para unir ADN ha sido también sugerida una conexión con sus efectos mutagénicos’, ya

que una dosis dietética elevada pero breve (52) o una baja (0.04%-0.8%) a largo plazo de AC promueve la carcinogénesis de estómago en ratas (53). Por otro lado los ácidos fenólicos han sido fuertes inhibidores de carcinogénesis en las etapas de iniciación y promoción inducidos por compuestos diferentes, estos efectos son reflejados por la capacidad de AC para prevenir el cáncer de piel, lengua, hígado, pulmón y esófago en ratas (54)

Martino (45) realizó la determinación espectrofotométrica del contenido de ácidos cafeoilquínicos en especies argentinas usadas en medicina popular en la cual encontraron datos de ácidos cafeoilquínicos obteniendo 8.65% peso seco de la droga, en yerba de gato montés (*Ppterocaulon virgatum*), carqueja (*Baccharis crispa*) 4.28 %, calculado como ácido clorogénico.

La fruta de arveja, corazón de betarraga, coles de brusela, piel de ajo seca y rábano contienen 0.5-9, 4 33, < 20 y 11 mg AC/Kg peso fresco respectivamente (55); en tanto que en *Cynara scolymus L.* contiene más de 2% de compuestos orto-difenólicos como AC, ácido clorogénico, de los cuales se sabe que son compuestos activos, el ácido clorogénico es metabolizado a AC y presente en cerezas y duraznos a concentraciones aproximadas 50 a 500 ppm (mg/kg) y en el presente trabajo podemos comparar que se obtuvo más AC con 116.7 ppm AC/g peso seco. El jugo de frutas y vino, presentado en manzana reporta contener 0-10ppm AC, entre 50 muestras de vino blanco comercial el promedio fue de 2.5 mg AC/L. En tanto que el vino alemán Riesling contiene la mayor concentración de 4.1 mg/L, seguido de Koshu japonés 3.1 mg/L, vino Chardonnay con 1.7 mg/L. Hojas de *Vitex agnus castus* (VAC) muestran 2.77 mg AC/g peso seco, frutos de VAC *Marmaris* contienen 0.31 mg AC/g materia seca y hojas de VAC *Antalya* contienen 2.66 mg AC/g y en su fruto 0.89 mg AC/g en materia seca (56). Haciendo estas comparaciones con este estudio vemos que el valor de 116 mg AC/g de brácteas secas, es elevado en comparación a muchas legumbres; sin embargo no compite contra ciertas especies como *P. capsici* y *P. megakarya* cuyo contenido puede alcanzar hasta 3000 mg/g (18,56). Sin embargo no pasa por alto que la cantidad encontrada aún es razonable asemejando a varios vegetales frescos, por tal se tiene una gran opción de materia prima para la obtención de compuestos activos de uso terapéutico y agroindustrial.

Las referencias recopiladas se encuentran en un cuadro resumen en el anexo 1.

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante descrita para distintos polifenoles, es atribuida a frutas y vegetales, se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes como son las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y el cáncer. La capacidad antioxidante medida mediante el ensayo de DPPH que estima la capacidad de quelar el radical libre en muestras midiendo la reducción del radical libre DPPH* a través de la sustracción de un H* desde un donador reductor reciclan a través de la intervención de una serie de sistemas enzimáticos u otros sistemas antioxidantes no enzimáticos.

3.3.1. Preparación de la gráfica estándar de Trolox

La tabla N° 3.6 muestra los resultados obtenidos de las tres repeticiones para el gráfico de calibración (señaladas como Rep1, Rep2 y Rep3) realizadas por triplicado y sacando un promedio final de las mismas. La ecuación de linealidad se muestra en la ec.3 de donde se reemplazarán los datos finales tras medir las absorbancias de las muestras problema. En la figura N° 3.3 podemos ver la representación de la línea de tendencia en color azul construida para el modelo lineal y las dos líneas rojas señalan los límites de confianza para un 95.0 %.

Tabla 3.6. Absorbancias para el gráfico de calibración en la determinación de antioxidantes presentes en la alcachofa

Trolox (mmol/L)	Absorbancias			Promedio±DS
	Rep1	Rep2	Rep3	
0	1.1844	0.8054	1.3541	1.1146±0.1622
0.005	1.1026	0.7049	1.1791	0.9955±0.1470
0.01	0.8940	0.5938	1.0721	0.8533±0.1396
0.02	0.6360	0.3347	0.7959	0.5889±0.1352
0.03	0.4105	0.0995	0.5259	0.3453±0.1273
0.04	0.0529	0.0307	0.2546	0.1127±0.0712

Donde: Rep1, Rep2 y Rep3 = número de repetición realizada

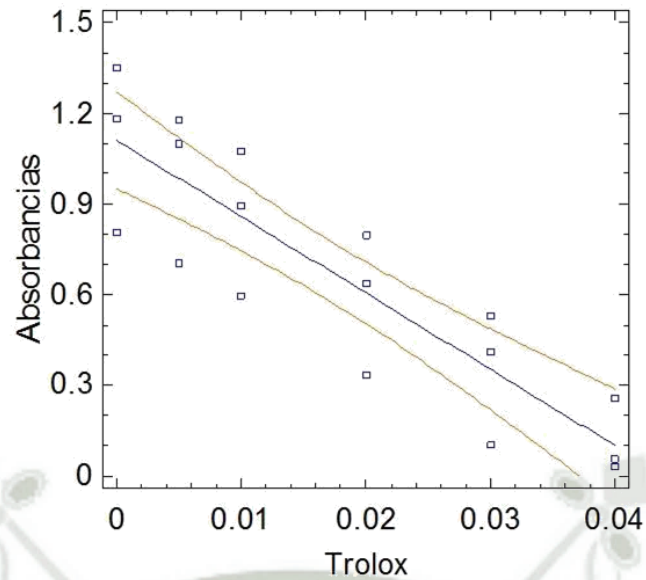


Figura N° 3.3. Gráfico de calibración para la determinación de antioxidantes

Coefficiente de Correlación = -0.882976

$$\text{Absorbancia} = 1.11087 - 25.2843 \cdot \text{Trolox} \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante en los extractos de alcachofa como describe la metodología en la sección 2.2.10 usando como reactivos principales al Trolox como antioxidante y a DPPH como indicador de radicales.

Las consiguientes pruebas estadísticas indica que existen diferencias significativas en las varianzas de cada resultado por tipo de prueba y tratamiento, tal que existe mejor extracción en el extracto realizado por Soxhlet con un tamaño de partícula de $\leq 50 \mu\text{m}$. Así también la tabla N° 3 muestra el % de inhibición de radicales libres (%I) hallado con la ec 3. Tras la lectura de todas las absorbancias de las muestras se restaron del blanco, así se hallaron los valores directamente proporcionales a la concentración de Trolox.

Esto demuestra que a mayor cantidad de antioxidante (Trolox) existe mayor cantidad de porcentaje de inhibición de radicales libres representado en la figura N°3.4.

Tabla N° 3.7. Valores de % de inhibición según la concentración de trolox (mmol/L) para la gráfica de calibración

Trolox (mmol/L)	% Inhibición
0	0
0.005	10.69
0.01	23.45
0.02	47.17
0.03	69.02
0.04	89.89

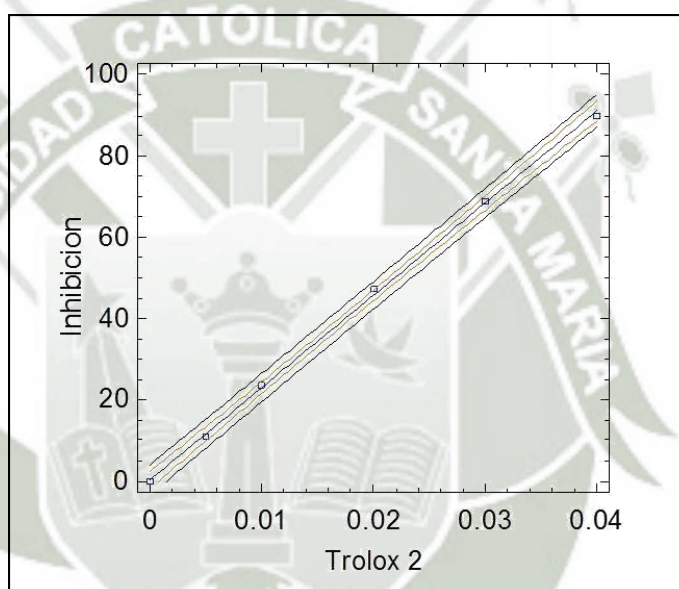


Figura N°3.4. Gráfica estándar de trolox (mmol/L) versus % de inhibición

Numerosas investigaciones han evaluado la capacidad antioxidante de los flavonoides frente a los radicales libres; ya que estos se encuentran en la categoría de compuestos fenólicos, podemos realizar un alcance sobre su papel antioxidante. Algunas investigaciones coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo hidroxilo libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la rutina seguida de la quercetina (4), compuestos encontrados ampliamente en alcachofa, estos se comportan como los secuestradores más fuertes

de radicales libres. Existiendo el consenso en que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (3,10).

Se realizaron dos repeticiones según cada tratamiento, donde primero muestra las absorbancias obtenidas en la tabla N° 3.8.

Tabla N° 3.8. Absorbancias para las de muestras de alcachofa para la determinación de antioxidantes por el método del DPPH

Tratamiento	Absorbancia		Promedio
	Rep1	Rep2	
T1 (AG,<50 µm, 2h)	0.398	0.346	0.3720±0.0339
T2 (AG,<50 µm, 6h)	0.250	0.210	0.2300±0.0339
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	0.385	0.334	0.3595±0.0339
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	0.298	0.302	0.3000±0.0339
T5 (Soxhlet,<50µm, 16h)	0.073	0.066	0.0695±0.0339

Se realizó la conversión de las absorbancias obtenidas a equivalentes de mmol trolox/L usando la ecuación lineal (ec.3) mostrada en la Figura 3.3. y finalmente hallando el porcentaje de inhibición, cuyos resultados se muestran en la tabla N°3.9, luego el porcentaje de inhibición promedio muestra diferencias entre los tratamientos, remarcado con los superíndices a,b,c,d en la tabla N° 3.10.

Tabla N°3.9. Concentración trolox (mmol/L) en muestras de alcachofa

Tratamiento	Concentración de Trolox		Promedio
	Rep1	Rep2	
T1 (AG,<50 µm, 2h)	0.0282	0.0303	0.0293±0.0014
T2 (AG,<50 µm, 6h)	0.0340	0.0356	0.0348±0.0014
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	0.0287	0.0307	0.0297±0.0014
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	0.0321	0.0320	0.0321±0.0014
T5 (Soxhlet,<50µm, 16h)	0.0410	0.0413	0.0412±0.0014

La prueba de comparaciones múltiples indica que los tratamientos arrojaron resultados estadísticamente distintos, donde la columna de promedios con las letras a,b,c,d (Tabla N°10) indican que tanto los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 rinden diferentes resultados y también es representando sus medias en la figura N°3.5; obteniéndose un mejor valor de % de inhibición en T1 igual a 33.396 % lo cual indica un buen % de inhibición o de concentración de antioxidante equivalente a trolox comparando a otras especies vegetales muy populares como el extracto de *Acanthopanax senticosus* que al 1% w/v inhibe radicales libres frente al DPPH en un 67.67%

Tabla N° 3.10. Porcentaje de inhibición en muestras de alcachofa

Tratamiento	% de inhibición		Promedio
	Rep1	Rep2	
T1 (AG, <50 µm, 2h)	35.728	31.064	33.396±3.0418 ^d
T2 (AG, <50 µm, 6h)	22.454	18.867	20.6605±3.0418 ^b
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	34.562	29.988	32.275±3.0418 ^{cd}
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	26.759	27.118	26.9385±3.0418 ^c
T5 (Soxhlet, <50µm, 16h)	13.513	12.93	13.2215±3.0418 ^a

Estudios reportaron que la actividad antioxidante varía de 33.9 ± 9.7 a 324.6 ± 15.0 en propóleo. (57) y 7.30 en granos de maíz (58), cáscara de guanábana (6) también basados en pruebas de transferencia de electrones. En este estudio los resultados tienen una relación de extracción respecto a tiempo de agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, mas no al tamaño de partícula, mostrados en T1(33.396 ± 3.0418 mmolTrolox/L) como en T3(32.275 ± 3.0418 mmolTrolox/L), y podemos comparar los resultados con otras especies de plantas e incluso propóleo antes mencionadas.

Sin embargo los resultados fueron de menor rendimiento respecto al % de I para T5 posiblemente debido a la desnaturalización de compuestos producida por calor prolongado llevado a cabo en el proceso de extracción por Soxhlet.

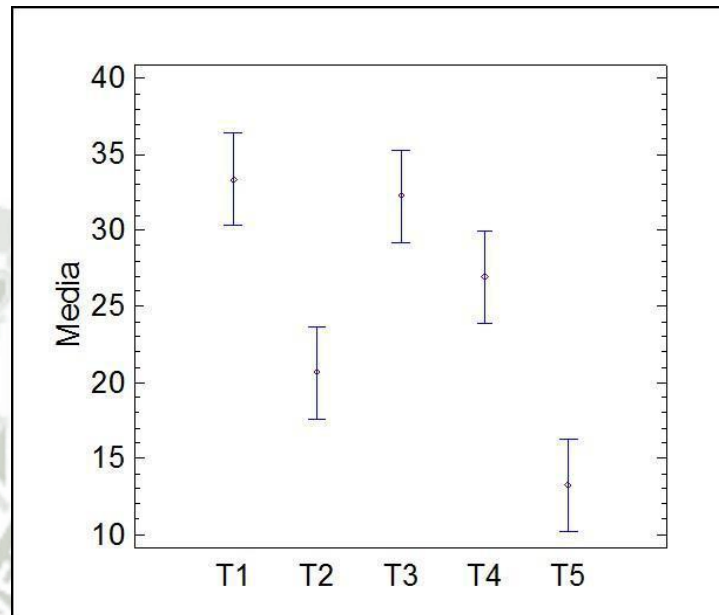


Figura N° 3.5. Gráfica de medias para la comparación del % de Inhibición en las muestras de alcachofa.

El tratamiento térmico puede activar ciertos compuestos de protección dentro de las especias, o de alguna manera puede preparar el compuesto para la absorción a nivel celular así también de manera positiva el impacto de los tratamientos de calor sobre la capacidad antioxidante y compuestos polifenólicos (43,59) por ejemplo en ácido clorogénico tiende a incrementar la concentración de compuestos fenólicos en vegetales sugiriendo una destrucción térmica de las paredes y compartimentos subcelulares durante el proceso de cocción que favorece a la liberación de estos compuestos.

Sin embargo hay diversos reportes que indican pérdida de propiedades nutricionales y pérdida de antioxidantes debido a la oxidación, degradación térmica entre otros (59), por ejemplo la vitamina C y fenoles se vieron afectados adversamente por el calor a más de 60 min (60).

También los efectos del tratamiento térmico sobre cáscara de huyou (*Citrus paradisi Changshanhuyou*) afecta la capacidad antioxidante (61), los resultados de los extractos de ñame crudo mostraron disminuciones en la capacidad quelante de iones ferrosos con el aumento de las temperaturas de calentamiento (62) y Akowuah (63) reportó que la actividad antioxidante entre 40 a 50°C permanece estable, pero decrece a elevadas temperaturas, a partir de 60°C en hojas de *Gynura procumbens*.

Nwaichi (64) reportó el descenso del contenido de vitamina C y fenoles más allá de 1 h siendo de 0.8, 14 y 8% inhibición para *T. tetraptera*, *P. guineense* y *X. aethiopica*. El tratamiento térmico puede activar ciertos compuestos de protección dentro de las brácteas, o de alguna manera puede preparar el compuesto para la absorción a nivel celular. Se vio afectada la actividad antioxidante adversamente por el calor, como se ve en T5, pues consideremos que esto se lleva a una cocción durante algunos minutos en la caldera durante el escaldado.

Valadão (65) reportó que café disuelto en agua destilada 1.5% (w/v) resultó en el 53.7 % I de DPPH, la exposición al ambiente muestra reducciones iguales a 3.2% a 20°C, confirmando que el oxígeno fue el principal factor relacionado a las reducciones. Juárez⁷⁸ reportó los efectos del tratamiento térmico sobre cáscara huyou (*Citrus paradisi Changshanhuyou*), en términos de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante donde más antioxidantes se desataron con un tiempo de cocción menor a 60 minutos.

La disminución en el contenido de vitamina C se notó más allá de 1 h de 0, 8, 14 y 8% para *T. tetraptera*, *P. guineense* y *X. aethiopica* (64) y si bien el procesamiento térmico de jugos cítricos a altas temperaturas elimina la posibilidad de daño microbiológico y reduce la actividad enzimática, afecta la calidad del producto, produce la pérdida de componentes termolábiles y termosensibles responsables de las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. Por todo lo expuesto se sugiere que un tratamiento térmico adecuado y razonable podría ser utilizado para mejorar la capacidad antioxidante.

Por lo tanto, para mantener el perfil y las actividades antioxidante, el tiempo de calentamiento óptima a la temperatura de cocción es de suma importancia. Basado en los resultados, es posible afirmar que las brácteas de alcachofa son un valioso recurso para obtener principios activos útiles para la industria de alimentos y de salud.

3.4 Determinación de polifenoles totales

Este método se usa para medir fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) el cual es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo. Sin embargo, este reactivo no sólo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra (16).

Antes de determinar la concentración de polifenoles totales en los extractos de alcachofa, se realizaron 3 gráficos de calibración siguiendo el procedimiento de la sección 2.2.11, usando el RFC, carbonato de sodio y al ácido gálico como principales actores en esta metodología.

La tabla 3.11 muestra los resultados de estas 3 repeticiones realizadas para el gráfico de calibración, expresadas en la absorbancia, la cual es directamente proporcional a cada miligramo de ácido gálico/L, con su respectivo promedio y desviación estándar.

Tabla N° 3.11. Absorbancias para el gráfico de calibración en la determinación de polifenoles totales.

mg Ácido gálico/L	Absorbancias			Promedio±DS
	Rep1	Rep2	Rep3	
4	0.367	0.373	0.369	0.3697±0.0018
5	0.469	0.465	0.462	0.4653±0.002
6	0.554	0.589	0.549	0.564±0.0126
7	0.632	0.663	0.657	0.6507±0.0095
8	0.749	0.751	0.76	0.7533±0.0034

La figura N°3.6 muestra la gráfica de ajuste lineal de mg ácido gálico/L versus la absorbancia, donde tenemos un coeficiente de correlación de 0.996, lo cual indica una

buena fiabilidad de resultados. En esta gráfica la línea (color azul) de tendencia construida para el modelo lineal, muestra un buen ajuste de los datos los cuales presentaron un coeficiente de correlación de 0.9968 y un R^2 igual a 99.3674 con un error estándar de 0.0116, por otra parte las cotas de color rojo muestran los límites al 95.0% de confianza. La ecuación del modelo ajustado para la concentración de ácido gálico se muestra en la ec.4.

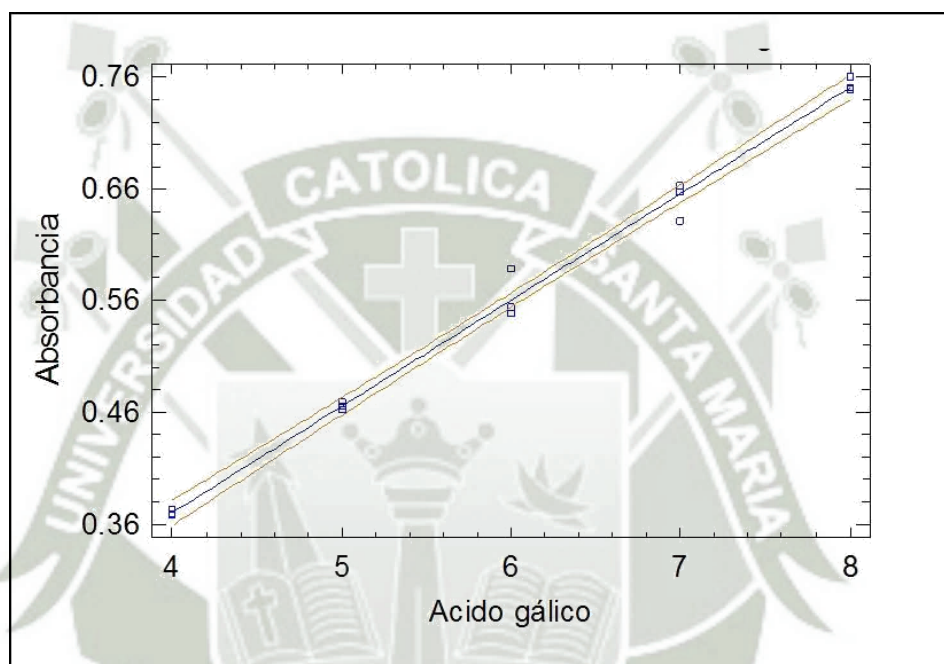


Figura N°3.6. Gráfico de calibración para la determinación de polifenoles totales (mg/L).

Coefficiente de Correlación = 0.996832

R-cuadrada = 99.3674 porciento

$y = 0.0952x - 0.0106$Ecuación 4

Los metabolitos de la alcachofa muestran compuestos fenólicos, llamados ácidos cafeoilquínicos y flavonoides (66). Las propiedades reductoras están asociadas a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno

(15) (16). En un estudio realizado en avellanas (14) se encontró que el CAA depende del solvente de extracción, obteniendo mejores resultados con butanol y metanol. Ya que los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (11), y los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico como el AC, ferúlico, p-cumárico entre otros que por regla general se hallan presentes en forma de derivados (6,10). En el Anexo 2 se puede ver una tabla resumen de la cantidad de polifenoles encontrados en distintas investigaciones, las cuales se encuentran a lo largo de la sección de discusiones.

En este estudio se halló la cantidad de mg ácido gálico por litro a partir de las absorbancias obtenidas en cada extracto mostradas en la tabla N° 3.12 y haciendo uso de la ec. 4, donde 'y' es igual a la absorbancia y 'x' es igual mg EAG/L, la expresión quedó como se muestra en la ec 5.

Tabla N° 3.12. Absorbancias de muestras de alcachofa para la determinación de polifenoles

Tratamiento	Absorbancias		Promedio±DS
	R1	R2	
T1 (AG,<50 µm, 2h)	0.606	0.669	0.6375±0.0315
T2 (AG,<50 µm, 6h)	0.658	0.719	0.6885±0.0305
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	0.574	0.472	0.523±0.051
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	0.572	0.529	0.5505±0.0215
T5 (Soxhlet,<50µm, 16h)	0.76	0.613	0.6865±0.0735

$$mg \text{ EAG/L} = (\text{Absorbancia} + 0.0106) / 0.0952 \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

Los resultados estadísticos muestran en la tabla N° 3.13 muestran que la razón-F es igual a 2.84232, siendo el cociente entre el estimado entre-grupos y el intra-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla N° 3.13. Análisis de varianza para la determinación de polifenoles en las muestras

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.20526	4	1.30131	2.84	0.1411
Intra grupos	2.28918	5	0.457836		
Total (Corr.)	7.49444	9			

Los resultados muestran entre un mínimo de 5.6053 mg EAG/L en el tratamiento 3 a un máximo de 7.3425 mg EAG/L en el tratamiento 2. En el presente trabajo se obtuvieron resultados muy similares entre sí respecto a los 5 tratamientos según el análisis de varianza, usando los datos de la tabla N°14 y representados en la figura N° 3.7, indicando que no existe diferencia significativa entre los resultados respecto a cada tratamiento a la hora de obtener la cantidad de polifenoles totales según el método usado, resultando un máximo de 7.343mg/g brácteas secas, muy similar al máximo de 8 mg EAG/g encontrados según Dueñas (67) en extractos hidroalcohólicos de residuos de alcachofa.

Tabla N° 3.14. Concentración de polifenoles en muestras de alcachofa

Tratamiento	Concentración de polifenoles		Promedio mg EAG/L ±DS
	R1	R2	
T1 (AG, <50 µm, 2h)	6.4766	7.1379	6.8072±0.8697
T2 (AG, <50 µm, 6h)	7.0224	7.6627	7.3425±0.8697
T3 (AG, 50-350 µm, 2h)	6.1407	5.07	5.6053±0.8697
T4 (AG, 50-350 µm, 6h)	6.1197	5.6683	5.894±0.8697
T5 (Soxhlet, <50µm, 16h)	8.0931	6.55	7.3216±0.8697

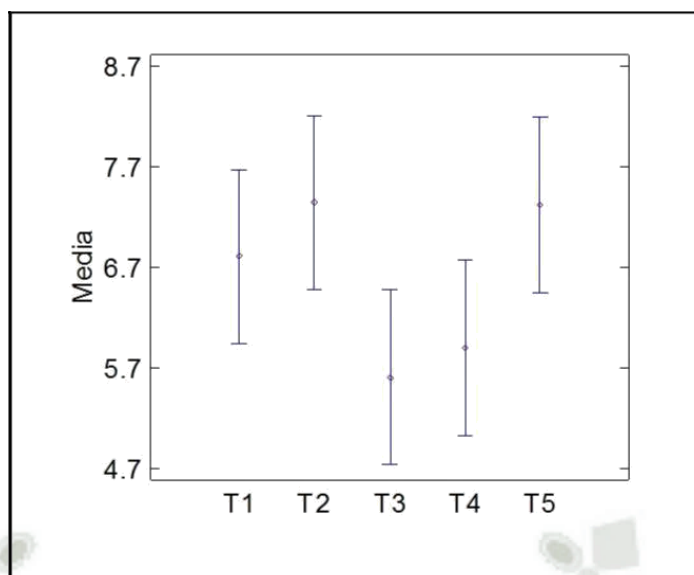


Figura N° 3.7. Gráfica de medias para la comparación de polifenoles en las muestras de alcachofa.

Cabe recordar que las muestras ya fueron sometidas térmicamente en la industria por el proceso de escaldado por tal, la temperatura a la que se sometieron las muestras en el proceso de extracción por Soxhlet no fue relevante para la extracción de polifenoles, ya que la posible inactivación de la polifenol oxidasa (PPO) por el proceso de escaldado evitó la oxidación durante los tratamientos. Cheng (68) reportó los efectos de temperatura y tiempo sobre la estabilidad de cinco compuestos fenólicos, la descomposición de tres de estos compuestos fenólicos aumentó con el incremento de la temperatura, tal que los ácidos se volvieron menos estables con el tiempo de calentamiento más largo (hasta los 200 °C); y se observó su descomposición completa a 300-350 °C. Existe también un efecto sobre el contenido fenólico total en hojas de *Gynura procumbens* siendo el contenido de fenoles totales igual a una temperatura de extracción, sea de 40 o 50 °C; sin embargo decrece a los 60°C (63). En este estudio se realizaron los tratamientos a temperatura ambiente y a un máximo de 70°C, sin embargo no se notó diferencias significativas de fenoles totales según el tratamiento, posiblemente a que no fue significativa la diferencia de temperaturas.

Se reportaron trabajos de contenido de fenoles totales, con diferentes especies vegetales. Dueñas (67) encontró en brácteas frescas de alcachofa, expresados en equivalentes de quercetina (EQT), 0.142 ± 0.004 y 0.001 ± 0.001 mg EQT/100g en extracto hidroalcohólico sin calor y uno hidrolizado con calor respectivamente. Zuurro

(69) encontró en muestras secas de alcachofa 32.2 mg EAG/g También se encontró 52.3 mg EAG/g materia seca de *Echinacea purpurea* (47). *Acanthopanax senticosus* (70) presentó 366.67 TPC (uM), en guanábana, en naranja y en mora se encontró 2.36, 126 ± 6 y 330 ± 4 mg EAG/100 g respectivamente (69). La banana de la especie raja posee 21.79 mg EAG/g (71). En tanto que en propóleo el contenido fenólico va entre 22.11 ± 0.54 y 75.22 ± 1.35 mg GAE/g (57). Comparando los resultados con esta investigación en residuos de brácteas de alcachofa, los resultados en mg EAG/L, son cercanos a los resultados encontrados en té negro (6.46 ± 0.02 a 18.75 ± 0.26) (11), pero inferior a la naranja (126 ± 6 mg AGE/100 g) (6) y mora (330 ± 4 mg AGE/100 g) (69); sin embargo se encuentra un buen contenido de polifenoles en brácteas de alcachofa. De acuerdo a los resultados se puede decir que el contenido de polifenoles totales se correlaciona bien con la actividad antioxidante expresada como poder reductor (17) y como actividad antioxidante; lo que significa que a mayor presencia de polifenoles mayor actividad antioxidante, sin embargo la calificación del poder antioxidante depende del tipo de método usado y el parámetro con el cual se mide. Se puede hacer uso de estos residuos en industria, debido a que su contenido polifenólico es similar a muchos frutos frescos de uso nutritivo.

CONCLUSIONES

1. Se determinó el porcentaje de humedad en brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa), el cual fue de 88.04 %.
2. Se determinó que las condiciones de gradiente adecuadas para la separación cromatográfica de ácido caféico, en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), fueron usando como fase móvil una mezcla de Acetonitrilo(A) y solución buffer de ácido acético (B) (pH 2.8) para la gradiente. Siendo las concentraciones del solvente A , 5%, 15%, 20%, 55% a 0, 2, 4, 10, 15 min respectivamente. Donde la velocidad de flujo fue de 1mL/min y con un tiempo de retención de 8.662.
3. Se cuantificó mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) ácido caféico en los extractos metanólicos de brácteas de alcachofa, obteniéndose un máximo de 116.71 ± 5.16 ppm AC/g (tamizado $< 50 \mu\text{m}$) peso seco por el método de Soxhlet, siendo éste resultado estadísticamente distinto y mayor respecto a los demás tratamientos. Y se cuantificó un máximo de 59.19 ± 2.69 ppm AC/g peso seco (tamizado $< 50 \mu\text{m}$) con el tratamiento por maceración bajo agitación durante 6 horas.
4. Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos en las brácteas de *Cynara scolymus* L. (alcachofa) por el método del radical libre DPPH, donde el análisis ANOVA brindó un valor $p=0.0016$, y según la prueba de comparación múltiple se denotan resultados estadísticamente distintos según el tratamiento de extracción utilizado. Se encontró que las horas de agitación menores en el tratamiento de maceración influyen en el rendimiento del porcentaje de inhibición; siendo la mejor opción menores tiempos de agitación. Se encontró una elevada actividad

antioxidante al capturar radicales libres del DPPH en medio líquido, obteniéndose un máximo de 33.396 ± 3.0418 % I ($< 50 \mu\text{m}$, maceración con agitación por dos horas); siendo comparable con los 32.275 ± 3.0418 %I ($50-350 \mu\text{m}$, agitación por dos horas). Así también, se denota que se conservan mejor las propiedades antioxidantes si no se somete la muestra aun estrés mecánico ni térmico.

5. Se evaluó la cantidad de polifenoles totales en los extractos de las brácteas de *Cynara scolymus L.* (alcachofa) por el método de Folin-Ciocalteau en el espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 715 nm. Se verificó la presencia de compuestos fenólicos, encontrándose un máximo de 7.3216 ± 0.8697 mg EAG/g peso seco ($< 50 \mu\text{m}$, extracto por maceración bajo 6 horas de agitación) No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1411$), denotando que el contenido polifenólico se conserva independientemente del tipo de tratamiento utilizado, confirmando que este subproducto de alcachofa contiene compuestos fenólicos y que no están presentes solamente en las hojas y corazón en cantidades considerables.

SUGERENCIAS

1. Se recomienda realizar trabajos con las brácteas de alcachofa para la obtención de productos dermocosméticos debido a las propiedades bloqueantes de los rayos UVB y protección contra apoptosis por daño solar que confiere el ácido caféico.
2. Se recomienda realizar investigaciones para desarrollar una extracción y purificación de compuestos fenólicos, que sea rentable y de procesos eficaz para lleva a gran escala.
3. Siendo *Cynara scolymus L.*, una especie vegetal de elevada su producción en Perú, se puede proponer una alternativa de su uso, ya sea como fuente de fibra vegetal, o fuente alimenticia procesada para el consumo humano, pues contiene aún compuestos con actividad antioxidante. Tal que se tiene una posible fuente valiosa para el mercado industrial alimenticio y de salud.

ANEXOS

ANEXO 1

CUADRO RESUMEN DE ÁCIDO CAFÉICO(AC) Y COMPUESTOS DERIVADOS; RECOPIADOS EN DIVERSAS PUBLICACIONES.

Referencia	especie	Compuesto	Resultado
5,8	Alcachofa	derivados totales de AC	concentraciones similares luego de ser expuestas a calentamiento durante prolongado tiempo
46	alcachofa	derivados totales de AC	34.3±0.6 mg/g
41	<i>Coffea canephora</i>	ácido clorogénico	0.41 mg/g a 0.819mg/g
41	<i>C. arabica</i>	CGA	6.95
42	<i>Echinacea purpurea</i>	derivados de AC (ácido caftárico, ácido clorogénico y ácido chichórico),	2.8±0.4mg/g
57	cebolla	quercetina y derivados isorhamnetina	9.3 ± 0.02 mg AC /g masa seca
57	pimiento verde	derivados de luteolina	
51	<i>Vitex agnus castus</i> , especie <i>Marmaris</i>	AC	2.77 mg/g peso seco
51	<i>Vitex agnus castus</i> , especie <i>Antalya</i>	AC	2.66 mg/g peso seco
50	coles de brusela, piel de ajo seca	AC/Kg	11 mg
50	piel de ajo seca	AC/Kg	< 20 mg
50	arveja	AC/Kg	4 33 mg
50	corazón de betarraga	AC/Kg	0.5-9 mg
41	yerba de gato montés (<i>Pterocaulon virgatum</i>)	ácidos cafeoilquínico, calculado como ácido clorogénico	8.65% peso seco
41	<i>carqueja (Baccharis crispa)</i>	ácidos cafeoilquínico, calculado como ácido clorogénico	4.28 %, peso seco de la hierba
62	<i>Cynara scolymus L.</i>	compuestos orto-difenólicos como AC, ácido clorogénico	contiene más de 2%
50	cerezas y duraznos	AC	50 a 500 ppm (mg/kg)
17	jugo de frutas y vino de manzana	AC	0-10ppm
17	vino blanco comercial	AC	2.5 mg AC/L
17	vino alemán Riesling	AC	4.1 mg/L
17	Koshu japonés	AC	3.1 mg/L
17	vino Chardonnay	AC	1.7 mg/L
17	<i>P. capsici</i> y, <i>P. megakarya</i>	AC	500 a 3000 mg/g

ANEXO 2

tabla resumen de la cantidad de polifenoles encontrados en distintas investigaciones

Referencia	Especie	mg EAG/g	detalle
14	<i>Anona blanca</i>	33.9 ± 9.7 a 324.6 ± 15.0	extracto hidroalcohólico
15	<i>Cynara scolymus</i>	24.3	corazón de alcachofa; extracto metanólico a altas temperaturas
5	<i>Cynara scolymus</i>	0.142160 (±0.004) mgEQT/100g	brácteas frescas; extracto hidroalcohólico sin calor
5	<i>Cynara scolymus</i>	0,001(±0,001) mgEQT/100g	brácteas frescas; extracto hidrolizado con calor
52	<i>Acanthopanax senticosus</i>	67.67%	al 1% w/v inhibe radicales libres frente al DPPH
2	<i>Citrus cinensis</i>	126 ± 6 mg AGE/100 g	
13	<i>Camellia sinensis</i>	6.46 ± 002 a 18.75 ± 0.26 mg EAG/g	
43	<i>Cynara scolymus</i>	8 mg EAG/g	residuos de alcachofa; extracto hidroalcohólicos
42	<i>Echinacea purpurea</i>	52.3 mg EAG/g	materia seca de E. purpúrea
52	<i>Acanthopanax senticosus</i>	366.67 TPC (uM)	
53	<i>Annona muricata</i>	2.36 mg AGE/100 g	hojas de guanábana
65	<i>Rubus ulmifolius</i>	330 ± 4 mg AGE/100 g	fruto de mora
66	<i>Musa paradisiaca</i>	21.79 mg EAG/g	banana de la especie raja
54	<i>Gr. própolis</i>	22.11 ± 0.54 a 75.22 ± 1.35 mg GAE/g.	propóleo

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido caféico
AcHx	Ácidos hidroxicinámicos
CAPE	Ácido caféico fenil ester
CGA	Ácidos clorogénicos
CQAs	Cafeoilquínicos
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EQT	equivalentes de quercetina
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
MMP-9	Matriz de metalopeptidasa- 9
ODC	Ornitina decarboxilasa
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PPO	Polifenol oxidasa
RFC	reactivo de Folin-Ciocalteu
SPE	Extracción en Fase Sólida
TRAP	Total radical trapping antioxidant parameter

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez de Sotillo D, Holm ET, Handley M. Potato peel waste: Stability and activity of a freeze-dried extract. *J. Food Sci.* 1994; 59(5): p. 1031-33.
2. Mincetur. Proyecto de cooperación UE- Perú. Mejora de las técnicas y procesos en la producción, cosecha y acopio de la alcachofa. Lambayeque; 2004. Disponible en: http://www.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio_exterior/Sites/ueperu/licitacion/licitacion2007.aspx.
3. Robles F. Mincetur. [Online]; 2012 [cited 2013 jun 20]. Available from: http://www.planeamientoygestion.com.pe/consultoria/images/stories/herramientas/mercado/7_Estudio%20de%20mercado%20alcachofa%20en%20conserva.pdf.
4. Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón J. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L). 2013..
5. Lira J. Perú es el tercer exportador de alcachofas en conserva del mundo, afirma Adex. *Gestión: Diario de economía y negocios del Perú.* 2014 Junio 7. Disponible en: <http://gestion.pe/economia/peru-tercer-exportador-alcachofas-conserva-mundo-afirma-adex-2099624>.
6. Sociedad de Comercio Exterior del Perú (ComexPerú). Alcachofas: US\$ 123 millones en envíos al exterior. *Semanario ComexPerú.* 2012 feb: Disponible en: <https://semanariocomexperu.wordpress.com/alcachofas-us-123-millones-en-envios-al-exterior/>.
7. Vavilov I. A History of the World Collection of Plant Genetic Resources in Russia. [Online].; 1999 [cited 2013 marzo 16. Available from: http://www.vir.nw.ru/files/pdf/books/Vavilov_and_his_institute.pdf.
8. Linnaeus C. El género *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *J. Linn. Soc -Monsanto.* 1992; 109(1): p. 827–8.
9. Iklas A K, Ehab A A. Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients. 3rd ed. Wiley edition. Illinois;2010. Disponible en: <http://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/leungs-encyclopedia-of-common-natural-ingredients-3rd-edition.pdf>.
10. Deming A. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science.* 2002; 298: p. 2149–53.
11. Jiménez A, Dragsted L, Daneshvar B. In Vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Effecton Biomarkers of Antioxidants in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(18): p. 5540–45.
12. Lutz M, Henriquez M, Escobar C. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J. of Food C&An.* 2011;; p. 2449–54.
13. Halvorsen B B, et al. content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006 jul; 84(1): p. 95-135.
14. Llorach R, Espín J, Barberán T, Ferreres F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Agric Food Chem.* 2002; 50(12): p. 3458-64.

15. Lattanzio V, Cicco N, Linsalata V. Antioxidant activities of artichoke phenolics. In ISHS (international society for horticultural science) acta horticulturae. p. 681.
16. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52(24): p. 7272–78.
17. Quintanar M, Calderón S. La capacidad antioxidante total: bases y aplicaciones. *Rev. Educación bioquímica.* 2009; 28(3): p. 89-101.
18. Cartoni GP, Cocioli F, Pontell L, Quattruc. Separation and identification of free phenolic acids in wines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1991; 537: p. 93-99.
19. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss. Technol.* 1995; 22: p. 25-30.
20. Liu R. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134(12): p. 3479-85.
21. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry: family of phenolic compounds.. Springer Science. 2008;: p. 5.
22. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): p. 727-47.
23. Pérez G. Flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003; 22(1): p. 48-57.
24. Iglesias J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Universidad de Santiago de Compostela. [tesis de doctorado]; 2009.
25. Chover AM. Medicina ortomolecular Alicante: Club Universitario.
26. International Agency for Research on Cancer (IARC). International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations:CAFFEIC ACID. [Online].; 1993 [cited 2014 jun 3]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/03-caff.html>.
27. Chen YJ SMWS. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs.* 2001 Feb; 12(2): p. 143-9.
28. Mattos T, et al. Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *PLOS ONE.* 2015; 10(6).
29. Ashutosh K. cinnamic acids sciences FoP, editor. Hisar—India: New age International publisher; 2003.
30. Boerjan W RJBM. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology.* 2003 Jun; 54: p. 519-546.
31. Staniforth V, Chiu L, Yang N. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *J. of Carcinogenesis.* 2006; 27(9): p. 1803–11.
32. Chung T, et al.. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. .

33. Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997; 61(2): p. 347-50.
34. John D, Hayes J, Flanagan R. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2005; 45: p. 51-88.
35. Huang M, Smart R, Wong C, Conney A. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1988; 48(21): p. 5941-6.
36. Yiş U, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents apoptotic cell death in the developing rat brain after pentylenetetrazole-induced status epilepticus. *Dokuz Eylül University, Division of Pediatric Neurology. Epilepsy Behav.* 2013 Sep 6; 29(2): p. 275-80.
37. Da Cunha F, et-al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res.* 2004 Nov; 38(11): p. 1241-53.
38. Bio-rad Laboratories [sede web]. Fundamentals of HPLC. [Online]. California; 2013 [cited 2013 Abril 1]. Available from: https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem434/Swain_2015_Lecture%20Notes/HPLC%20Lecture1a.pdf.
39. Malvern instruments. Principios básicos: fundamentos sobre el tamaño de partícula. Madrid. [Online].; 2010 [cited 2015 dic 05]. Available from: <http://www.iesmat.com>.
40. Nollet L, Dekker M. Handbook of food analysis. 3rd ed. Belgium: Katholieke Universiteit Leuven; 1996.
41. Nielsen S. Nielsen S. Food Analysis Laboratory Manual. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. Ed Springer. [Online]; 2003 [cited 2014 jun 18]. Available from: <http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Food%20Analysis%20Laboratory%20Manual%20Second%20Edition.pdf>.
42. BÜCHI Labortechnik AG. Manual de instrucciones Rotavapor r-22° butchi. [Online]; Switzerland [cited 2015 feb 12]. Available from: http://static2.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593360_R0SE_OM_es_F_LR.pdf.
43. Fernandez S ME. Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método de Patrón Externo p.4-5. [Online].; 2012 [cited 2015 abr 19]. Available from: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16719/M%C3%A9todo%20Patr%C3%B3n%20Externo.pdf?sequence=1>.
44. Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J Agric Food Chem.* 2007; 24(55): p. 330-5.
45. Rechner A, Pannala A, Rice-Evans C. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Radic Res.* 2001; 35(2): p. 195-202.
46. Martino V, Ferraro G, Debenedetti B, Coussio J. Determinación Espectrofotométrica del Contenido de Ácidos Cafeoilquínicos en Especies Argentinas de Compuestas usadas en Medicina Popular. *Acta Farm. Bonaerense.* 1989; 8(1): p. 3-9.

47. Ky C, Noiro M, Hamon S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.). *Agric. Food Chem.* 1997; 45: p. 786-790.
48. Chun-Hua W, Hosakate. N, Murthy E, Lee Y. Efficient Extraction of Caffeic Acid Derivatives from Adventitious Roots of *Echinacea purpurea*. *Czech J. Food Sci.* 2008; 26(4): p. 254–258.
49. Jiyoung K, Ki Won L. Coffee And Its Active Compounds Are Neuroprotective. [Online]; 2015 [cited 2015 en 30]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124095175>.
50. Kimura Y, et al. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisa* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem Pharm Bull.* 1985 May; 33(5): p. 2028-34.
51. Tsuchiya T, Suzuki O, Igarashi S. Protective effects of chlorogenic acid in paraquat induced oxidative stress in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996; 60: p. 765-8.
52. Vieira O, et al. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: p. 565.
53. Hirose M, et al. Dose response for the stimulation of cell division by caffeic acid in forestomach and kidney of the male F344 rat. *Fundam Appl Toxicol.* 1997; 39: p. 131-37.
54. Wood A, et al. Mechanism of inhibition of mutagenicity of a benzo(a)pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide by riboflavin 5-phosphate. *Proc Natl Acad Sci.* 1982 Sep; 79(17): p. 5122-6.
55. Cadenas E, Packer L. *Handbook Of Antioxidants*. 2nd ed. Pharmacopea. Marcel Dekker I, editor. California; 2002.
56. Dawei W, Chenchen L, Hao D, Yiping L, Huwei L.. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines. *J Agric Food Chem.* 2005 Aug 24; 53(17): p. 6624-9.
57. Engin Ş, Gökbulut A.. Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of *Vitex agnus-castus*. *Turk J. Pharm. Sci.* 2008; 5(3): p. 167-174.
58. Correa J. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2012; 11(2): p. 111 – 126. ISSN 0717 7917.
59. Palomino G GPea. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia. *Redalyc.* 2009; 16(3): p. 388-90.
60. Xu G, et al. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(2): p. 330-5.
61. Amin I. Effect of different blanching times on antioxidant properties in selected cruciferous vegetables. *J. of the Science of Food and Agriculture.* 2005; 85: p. 2314–20.
62. Wu X, et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in United States. *J Agri Food Chem.* 2004; 52: p. 4026–37.

63. Juániz I LIHE, al. e. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem.* 2015; 15(197): p. 466-73.
64. Yi-Tzu Ch. Effects of heating temperature on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. *Food Chemistry.* 2007; 101(3): p. 955-63.
65. Akowuah G MACJ. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy magazine.* 2009; 5(17): p. 81-85.
66. Nwaichi E. Effect of heat treatment on the antioxidant properties of *Tetrapleura tetraptera*, *Xylopia aethiopica* and *Piper guineense*. *J. of Biotechnology and Food Science.* 2013; 1(1): p. 1-5.
67. Valadão S. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees.. *Braz. arch. biol. technol.* 2014; 57(1).
68. Senousy E, et al. Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke cvs. (*Cynara scolymus*) as determined via UHPLC-MS and chemometrics. *J. phytochem.* 2014; 108: p. 67-76.
69. Dueñas J. Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas[tesis] <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/877> , editor. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2009.
70. Cheng Y. Decomposition of five phenolic compounds in high temperature water. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25(11).
71. Zuorro A, et al. Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *J of Cleaner Production.* 2016; 111: p. 279-84.
72. Park HR. Antioxidant activity of extracts from *Acanthopanax senticosus*. *African Journal of Biotechnology.* 2006; 5(23): p. 2388-2396.
73. Shin T ea. Antioxidant Properties of Three Banana Cultivars (*Musa acuminata* ‘Berangan’, ‘Mas’ and ‘Raja’) Extracts. 2012; 41(3): p. 319-24.