

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS
TEKNIKOA**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA***

Capacidad antioxidante de subproductos de *Cynara scolymus*

presentado por

FRANCESCA VOLPE SAINZ *e)k*

aurkeztua

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS
MASTERRA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN INDUSTRIETAKO TEKNOLOGIAN ETA
KALITATEAN**

Junio, 2018 /*Ekaina, 2018*

El trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria titulada “Capacidad antioxidante de subproductos de *Cynara scolymus*” ha sido realizado en el Departamento de Ciencias de la Universidad Pública de Navarra, bajo la dirección de Dra. Carmen Ancín Azpilicueta y Dra Nerea Jiménez Moreno.

Pamplona, 20 de junio de 2018

Fdo. Dra. Carmen Ancín Azpilicueta

Fdo. Dra. Nerea Jiménez Moreno

Resumen

El consumo de vegetales ricos en antioxidantes genera un efecto beneficioso para la salud, ya que reduce el estrés oxidativo de las células. Actualmente existe un elevado número de investigaciones cuyo objetivo es encontrar fuentes de antioxidantes naturales en residuos de la industria agroalimentaria. La alcachofa es un vegetal con un alto contenido en compuestos bioactivos como flavonoides y ácidos hidroxycinámicos. En la industria agroalimentaria, se desecha un 80% de este vegetal, entre brácteas externas, tallos y hojas. Estos subproductos podrían utilizarse como fuente de compuestos bioactivos al presentar un elevado contenido de antioxidantes. Existen numerosos métodos para cuantificar la capacidad antioxidante de un extracto, y los ensayos más usados son los métodos ABTS, DPPH y FRAP.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de extractos de alcachofa, obtenidos con diferentes tratamientos de extracción, mediante diferentes métodos analíticos y cuantificar el contenido fenólico total de los extractos. Los valores más elevados de capacidad antioxidante se obtuvieron con el método FRAP, seguido del DPPH y ABTS. Los extractos obtenidos con una mezcla de metanol:agua al 60 %, presentaron mayor capacidad antioxidante que los extractos obtenidos únicamente con agua. Además, la aplicación de ultrasonidos no aumentó la cantidad de extracto obtenida, ni afectó a los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Los resultados obtenidos por los tres métodos de capacidad antioxidante presentaron un elevado coeficiente de correlación con el contenido fenólico total.

Palabras claves:

Capacidad antioxidante, alcachofa, subproductos, flavonoides, ácidos hidroxycinámicos y compuestos fenólicos.

Abstract

Consumption of vegetables rich in antioxidants produces a beneficial effect for health, since it reduces the oxidative stress of the cells. Currently there is a large number of research works with the aim of finding sources of natural antioxidants in the agri-food industry wastes. Artichoke is a vegetable with a high content of bioactive compounds such as flavonoids and hydroxycinnamic acids. In the processing industry, 80% of artichoke is discarded, including external bracts, stems and leaves. These by-products could be used as a source of bioactive compounds since they have a high content of antioxidants. There are several methods to determine the antioxidant capacity of the obtained extracts, and the most used essays are the ABTS, DPPH and FRAP methods.

The aim of the present work was to determine the antioxidant capacity of artichoke extracts, which were obtained with different extraction treatments, using different analytical methods and to quantify the total phenolic content of these extracts. The highest values of antioxidant capacity were obtained with the FRAP method, followed by DPPH and ABTS. The extracts obtained with a mixture of methanol:water at 60%, had greater antioxidant capacity than extracts obtained only with water. In addition, the application of ultrasound did not increase the amount of extract obtained and did not affect the phenolic compounds present in the sample. Results obtained by the three methods used to quantify the antioxidant capacity showed a high correlation coefficient with total phenolic content.

Key words:

Antioxidant capacity, artichoke, by-products, flavonoids, hydroxycinnamic acids, phenolic compounds.

Índice

1. Introducción	1
1.1. <i>Tipos de antioxidantes</i>	2
1.2. <i>Extracción de antioxidantes</i>	3
1.3. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	5
1.4. <i>Alcachofa</i>	6
2. Materiales y métodos	11
2.1. <i>Materiales</i>	11
2.2. <i>Métodos</i>	11
2.2.1. Extracción de antioxidantes de los subproductos de alcachofa	11
2.2.2. Análisis de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total de los extractos de residuo de alcachofa	14
a) Método de determinación de capacidad antioxidante ABTS	15
b) Método de determinación de capacidad antioxidante DPPH.....	17
c) Método de determinación de capacidad antioxidante FRAP	18
d) Método de determinación del contenido fenólico total.....	20
2.2.3. Análisis estadístico	22
3. Resultados y discusión	23
3.1. <i>Extracción de antioxidantes</i>	23
3.2. <i>Capacidad antioxidante del extracto total (Et), fracción de ácidos hidroxicinámicos (F1) y fracción de flavonoides (F2)</i>	24
3.3. <i>Contenido fenólico total</i>	32
4. Conclusiones	37
5. Bibliografía	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Extracción de antioxidantes de subproducto de alcachofa liofilizado	13
Tabla 2. Extracto total, fracción 1 y fracción 2 obtenidos en cada tipo de extracción ...	23
Tabla 3. Capacidad antioxidante de los extractos totales medidos mediante ABTS, DPPH y FRAP	24
Tabla 4. Valores F del análisis ANOVA del extracto total	26
Tabla 5. Capacidad antioxidante de la fracción rica en ácidos hidroxicinámicos (F1) medida mediante ABTS, DPPH y FRAP	29
Tabla 6. Valores F del análisis ANOVA de la fracción 1	30
Tabla 7. Capacidad antioxidante de la fracción de flavonoides (F2) medida mediante ABTS, DPPH y FRAP	31
Tabla 8. Valores F del análisis ANOVA de la fracción 2	32
Tabla 9. Contenido fenólico de los extractos medidos mediante el método Folin	33
Tabla 10. Valores F del análisis ANOVA realizado a partir del ensayo Folin	33
Tabla 11. Coeficientes de correlación entre el contenido fenólico y el tipo de ensayo de capacidad antioxidante realizado	34
Tabla 12. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con metanol:H ₂ O (E1)	46
Tabla 13. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con H ₂ O (E2)..	47
Tabla 14. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con metanol:H ₂ O + ultrasonidos (E3)	48
Tabla 15. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con H ₂ O + ultrasonidos (E4).....	49
Tabla 16. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para el extracto total (ET) obtenido con los diferentes métodos de extracción analizados	50
Tabla 17. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para fracción 1 (F1) obtenida con los diferentes métodos de extracción analizados	52
Tabla 18. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para fracción 2 (F2) obtenida con los diferentes métodos de extracción analizados	54
Tabla 19. Matriz de correlaciones de Pearson en el extracto total (ET)	56

Tabla 20. Matriz de correlaciones de Pearson en la fracción 1 (F1)	56
Tabla 21. Matriz de correlaciones de Pearson en la fracción 2 (F2)	56

Índice de Figuras

Figura 1. Efecto de los antioxidantes sobre los radicales libres	1
Figura 2. Dispositivos ultrasonidos. A) baño ultrasonidos, B) sonda ultrasónica	4
Figura 3. Partes de la alcachofa	6
Figura 4. Producción mundial alcachofa 2016	7
Figura 5. Producción de alcachofa de las diferentes provincias de España en el año 2016	7
Figura 6. Etapas del proceso de extracción de antioxidantes a partir de residuo de alcachofa liofilizado.....	12
Figura 7. Cámara de vacío utilizada para la extracción en fase sólida. A) Acondicionado del cartucho y lavado del extracto, B) Elución de la columna para la obtención de la F1 y F2	14
Figura 8. Reacción de transferencia de electrones en el ensayo ABTS	15
Figura 9. Curva de calibrado para el ensayo ABTS	16
Figura 10. Evolución del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo ABTS	16
Figura 11. Reacción con electrones o átomos de hidrógeno en el ensayo DPPH	17
Figura 12. Curva de calibrado del ensayo DPPH	18
Figura 13. Variación del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo DPPH	18
Figura 14. Reacción de transferencia de electrones en el ensayo FRAP	19
Figura 15. Curva de calibrado del ensayo FRAP	20
Figura 16. Evolución del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo FRAP	20
Figura 17. Curva de calibrado del ensayo Folin	21
Figura 18. Evolución del color en función de la concentración de los patrones de ácido gálico.....	22
Figura 19. Capacidad antioxidante de los extractos totales obtenidos en cada tipo de extracción.....	26
Figura 20. Capacidad antioxidante de las fracciones de ácidos hidroxicinámicos obtenidos en los diferentes tipos de extracción.....	30
Figura 21. Capacidad antioxidante de las fracciones de flavonoides obtenidos por los diferentes tipos de extracción	31

Figura 22. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin	51
Figura 23. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin	53
Figura 24. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin	55
Figura 25. Extractos analizados mediante el método ABTS. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos	57
Figura 26. Extractos analizados mediante el método DPPH. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos	57
Figura 27. Extractos analizados mediante el método FRAP. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos	58
Figura 28. Extractos analizados mediante el método Folin. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos	58

1. Introducción

Los antioxidantes naturales presentes en los alimentos juegan un papel fundamental tanto en el propio alimento como en la dieta. Evitan los procesos oxidativos preservando el alimento y además previenen las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Los antioxidantes son sustancias capaces de inhibir o retrasar la oxidación de sustratos oxidables. El estrés oxidativo está causado por la baja actividad de los mecanismos antioxidantes endógenos y el aumento de radicales libres como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que dañan la estructura celular, destruyen tejidos, producen patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento (Charles, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013).

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado en el último orbital externo y los más abundantes son: radical anión superóxido O_2^- , hidroxilo HO^- , hidroperoxilo HO_2^- , peroxilo ROO^- , alcoxilo RO^- , óxido nítrico NO^- y peroxinitrito $ONOO^-$ (Pisoschi et al., 2016). Se trata de especies muy inestables que reaccionan con todo tipo de moléculas biológicas. Los antioxidantes eliminan los radicales libres a través de diferentes mecanismos como la transferencia de átomos de hidrógeno o la transferencia de un electrón convirtiéndolos en átomos estables, como se observa en la Figura 1 (Charles, 2013).

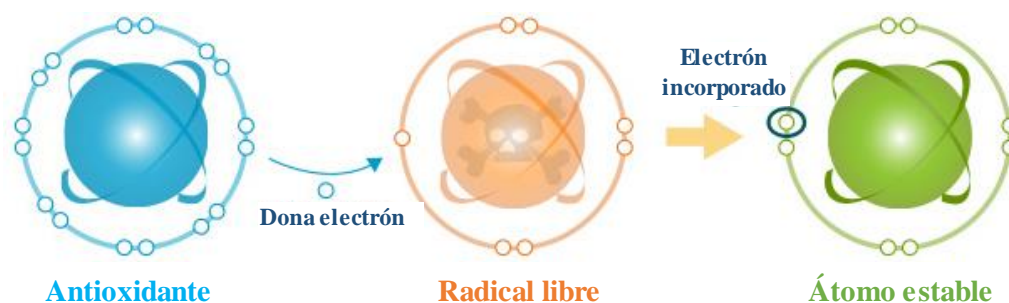


Figura 1. Efecto de los antioxidantes sobre los radicales libres (Fuente: Laboratoire Nutergia, 2016)

Si los radicales libres se encuentran presentes en bajas concentraciones, tienen efectos beneficiosos en el organismo, ya que intervienen en procesos fisiológicos vitales. Los radicales libres generan la respuesta inflamatoria, y matan directamente a los patógenos (Brieger et al., 2012). Sin embargo, en concentraciones altas, los radicales libres son nocivos y citotóxicos, pueden causar mutaciones y cambios en la expresión génica, y provocan cáncer. Además, pueden causar enfermedades cardiovasculares y trastornos

neuronales (Alam et al., 2013; Brieger et al., 2012). Por ello, la ingesta de antioxidantes dietéticos mejora la protección frente a los radicales libres (Charles, 2013).

1.1. Tipos de antioxidantes

Los antioxidantes naturales se encuentran en vegetales, microorganismos, hongos e incluso tejidos animales. Están presentes en alimentos como cereales, nueces, legumbres, semillas oleaginosas, verduras y algunos productos animales. Es recomendable el consumo de vegetales debido a su elevado contenido en antioxidantes (ácido ascórbico, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides y tocoferoles), que producen efectos beneficiosos para la salud, ya que reducen el estrés oxidativo e inhiben la oxidación de macromoléculas (Charles, 2013).

Los antioxidantes incluyen compuestos que difieren en sus propiedades químicas: vitaminas (ácido ascórbico, tocoferoles); carotenoides (xantofilas y carotenos); flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavonoides, flavanonas); ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico); alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos, taninos, antioxidantes que contienen azufre y melanoïdinas (Cömert & Gökmen, 2017). El ácido ascórbico está presente en la mayoría de las frutas y verduras, en mayor medida en frutas cítricas. Los tocoferoles son moléculas capaces de eliminar los radicales lipídicos y regenerar las moléculas de lípidos. Se encuentran en nueces, aceites vegetales, especias y hierbas. Los carotenoides, actúan como inhibidores en la oxidación de lípidos mediante la desactivación del oxígeno singlete. Están presentes en verduras de hoja verde, en la zanahoria, en el tomate y en los cereales, destacando especialmente, el tomate por su alto contenido de licopeno (Oroian & Escriche, 2015). Los compuestos fenólicos, son los antioxidantes más poderosos y numerosos, entre los que destacan los flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos (Cömert & Gökmen, 2017).

Los antioxidantes también se usan como aditivos en la industria alimentaria para prevenir la oxidación de lípidos, y evitar posibles deterioros en los alimentos. Los antioxidantes permitidos para uso alimentario pueden ser naturales o sintéticos, dentro de estos últimos los más utilizados son butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT). El uso de estos aditivos sintéticos se ha restringido por sus posibles efectos indeseados. Por ello, actualmente existe un elevado número de investigaciones cuyo

objetivo es encontrar fuentes de antioxidantes naturales en alimentos o subproductos de la industria agroalimentaria (Mármol et al., 2017).

1.2. Extracción de antioxidantes

La obtención de los antioxidantes a partir de productos naturales se ve influenciada por las condiciones del proceso de extracción al que se somete el producto. Para extraer los diferentes compuestos de la matriz del vegetal, es necesario el uso de agua y/o disolventes orgánicos y diferentes tratamientos físicos.

Las técnicas convencionales de extracción se basan en la aplicación de agua o de disolvente para liberar o separar un componente deseado (solute) de un sólido, usando calentamiento o agitación (Pisoschi et al., 2016). Algunas de las técnicas más comunes son la maceración, infusión, extracción sólido-líquido y la extracción con Soxhlet. Las principales desventajas de estas técnicas son los elevados tiempos de extracción, la utilización de disolventes de alta pureza en elevadas cantidades, la necesidad de evaporar los disolventes y la posible descomposición de sustancias termolábiles si se aplica un tratamiento térmico (McDonnell & Tiwari, 2017). La maceración es una de las técnicas convencionales más utilizadas, donde el material vegetal se tritura o liofiliza para aumentar el área superficial y después se agrega el disolvente, dejándolo reposar a temperatura ambiente durante periodos largos de tiempo y/o sometándolo a agitación para facilitar su disolución. A continuación, el extracto obtenido se purifica por filtración, decantación o centrifugado (Pisoschi et al., 2016).

Una tecnología más actual que puede usarse como alternativa a los métodos tradicionales, es la extracción asistida por ultrasonidos. Esta se basa en la difusión de ondas de ultrasonidos, con frecuencias entre 20 kHz y 100 MHz, a través de la matriz del vegetal, produciendo cavitación. La transferencia de masa es mayor respecto a un tratamiento convencional, ya que el aire presente en los tejidos implosiona, debido a las fuerzas de cizallamiento que se producen, rompiendo las paredes celulares y permitiendo la liberación de compuestos extraíbles y facilitando la penetración del disolvente (Chemat et al., 2011; Gil-Chávez et al., 2013). En las últimas décadas ha aumentado la aplicación de ultrasonidos, debido a las numerosas ventajas que presenta esta técnica, como la rapidez, mayor flujo de materia, altos rendimientos de extracción y menor gradiente de temperatura comparado con un tratamiento térmico (McDonnell & Tiwari, 2017; Pisoschi et al., 2016).

El ultrasonidos puede aplicarse mediante dos tipos de dispositivos, baño de ultrasonidos o ultrasonidos de tipo sonda (Figura 2), basados en un transductor como fuente de potencia de ultrasonidos. El baño de ultrasonidos consiste en un recipiente de acero inoxidable con uno o más transductores ultrasónicos. La muestra contenida en un material de vidrio se sumerge en el interior del baño, por lo que la intensidad suministrada es atenuada por el agua contenida en dicho baño. La ventaja es que se pueden tratar varias muestras de forma simultánea. En el caso de la sonda ultrasonidos se aplica directamente en el medio de extracción, administrando mayor intensidad ultrasónica comparada con el baño de ultrasonidos. Por lo que su acción resulta más eficaz para la extracción de compuestos (Chemat et al., 2011).

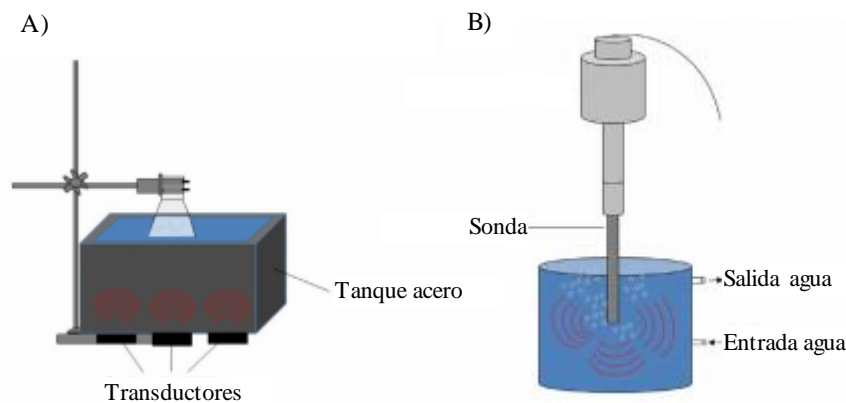


Figura 2. Dispositivos ultrasonidos. A) baño ultrasonidos, B) sonda ultrasónica (Fuente: Chemat et al., 2011).

Existen también otras técnicas como la extracción asistida por altas presiones y microondas. La aplicación de altas presiones aumenta la difusión de metabolitos y la permeabilidad celular. El líquido extractante llena parcialmente los espacios de aire presentes en el tejido vegetal, y al liberar posteriormente la presión, el aire ocluido en los poros sale generando daño en la membrana de la célula (Oroian & Escriche, 2015). En la extracción asistida por microondas, el calentamiento se produce por ondas electromagnéticas, de 300 Hz a 300 GHz, donde la interacción del campo electromagnético con los componentes de los alimentos, como el agua y el NaCl, provoca una fricción y excitación molecular, que genera rápidamente calor. Este tratamiento permite reducir el tiempo de extracción y la cantidad de disolvente utilizada (Sun et al., 2007).

1.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los productos naturales depende de su composición en antioxidantes y es de gran interés. No existe un método universal que permita medir de forma precisa y cuantitativa la capacidad antioxidante de todas las matrices vegetales, ya que los resultados se ven influidos por el radical libre utilizado en el ensayo. La estructura química de la molécula es la que determina mayoritariamente su capacidad antioxidante. Además, las condiciones del ensayo pueden afectar significativamente a la eficacia de los antioxidantes y con ello a los resultados obtenidos en los ensayos realizados (Charles, 2013). Se han desarrollado numerosos ensayos *in vitro* para medir la eliminación de radicales por diferentes antioxidantes, y de esta forma comparar y clasificar la capacidad antioxidante de diferentes alimentos. Los ensayos miden la actividad y la capacidad antioxidante de la muestra. La primera es la constante de velocidad de la reacción entre un antioxidante único y un radical libre dado. La segunda es la cantidad de moles de radicales libres eliminados por una cantidad de muestra (Alam et al., 2013).

Las diferentes estrategias en las que se basan los ensayos estiman el consumo de radicales libres por los antioxidantes, la capacidad de los antioxidantes de la muestra para reducir los iones cúpricos o férricos, su capacidad para proteger una molécula diana expuesta a una fuente de radicales libres y la capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas LDL de baja densidad (López-Alarcón & Denicola, 2013). Las reacciones químicas que se producen en los principales ensayos de capacidad antioxidante se dividen en dos categorías: ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones simples (Huang et al., 2005). Los ensayos de capacidad antioxidante más utilizados son los métodos de los radicales 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el método de reducción del complejo ferroso (FRAP). Estos ensayos se basan en evaluar la capacidad de los compuestos de reaccionar con los radicales libres, controlando el progreso de la reacción mediante un espectrofotómetro UV-vis (López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich et al., 2015).

Los métodos DPPH y ABTS son ensayos que miden la disminución de la absorbancia cuando los radicales se reducen por el efecto de los antioxidantes de la muestra. El método FRAP se basa en la capacidad del antioxidante en reducir el complejo férrico incoloro (Fe^{3+}), a un complejo ferroso de color azul, (Fe^{2+}).

El ensayo de decoloración del método ABTS es rápido y adecuado para cuantificar antioxidantes en componentes alimenticios. El radical ABTS es compatible con disolventes acuosos y orgánicos, polares y no polares, lo que le permite evaluar tanto los compuestos antioxidantes hidrófilos como los lipófilos. Por otra parte, el ensayo DPPH es más rápido, simple y económico comparado con el resto de los métodos (Moon & Shibamoto, 2009). El ensayo FRAP es económico y proporciona resultados rápidos y fiables para antioxidantes tanto en una solución pura, como para mezclas de antioxidantes en soluciones acuosas. Sin embargo, con este último método, no es posible determinar la capacidad reductora de tioles y carotenoides (Moon & Shibamoto, 2009; Schaich et al., 2015).

Por último, para determinar el potencial antioxidante de los extractos alimenticios, así como de un compuesto, es necesario el uso de más de un ensayo de capacidad antioxidante, ya que los diferentes métodos pueden producir resultados divergentes (Müller et al., 2011).

1.4. Alcachofa

La alcachofa (*Cynara scolymus*) es una planta pluriannual perteneciente a la familia Asteraceae y originaria de la región Mediterránea (Zuorro et al., 2016). La planta está formada por tallo, hojas y corazón, que comprende, brácteas externas, internas y corazón (Figura 3).

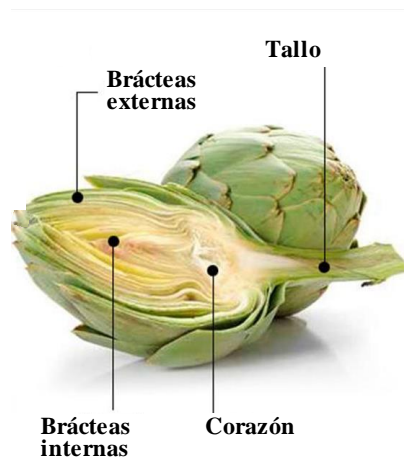


Figura 3. Partes de la alcachofa.

Según los datos de la FAO en 2016 la producción mundial de alcachofa fue de 1.452.576 toneladas. En la Figura 4 se muestra la producción de alcachofa de cada país

en 2016. Los tres principales productores fueron Italia, con un total de 365.991 toneladas, seguido de Egipto 236.314 y España 185.796 toneladas (FAO, 2016).

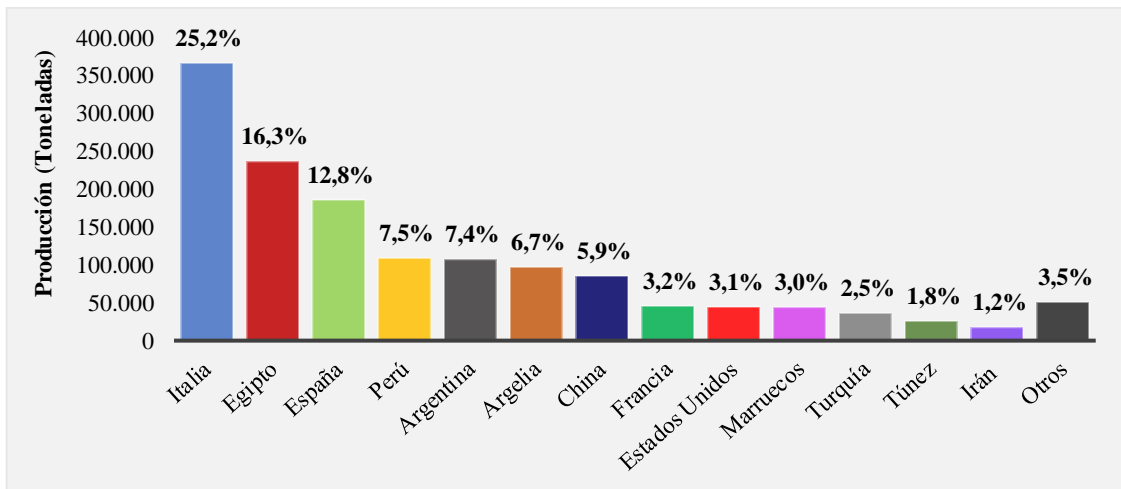


Figura 4. Producción mundial alcahofa 2016 (Fuente: FAO, 2016).

En España en 2016, Murcia fue la principal productora de alcahofa, representando un 47% de la producción total, seguido de la Comunidad Valenciana, 27%, Andalucía, 11% y Navarra, 6% (Figura 5).

En Navarra la alcahofa es un cultivo de gran importancia, la superficie cultivada asciende a 1.129 hectáreas (MAPAMA, 2016). Cuando la alcahofa se procesa en la industria agroalimentaria deja gran cantidad de residuos que poseen alto valor biológico.

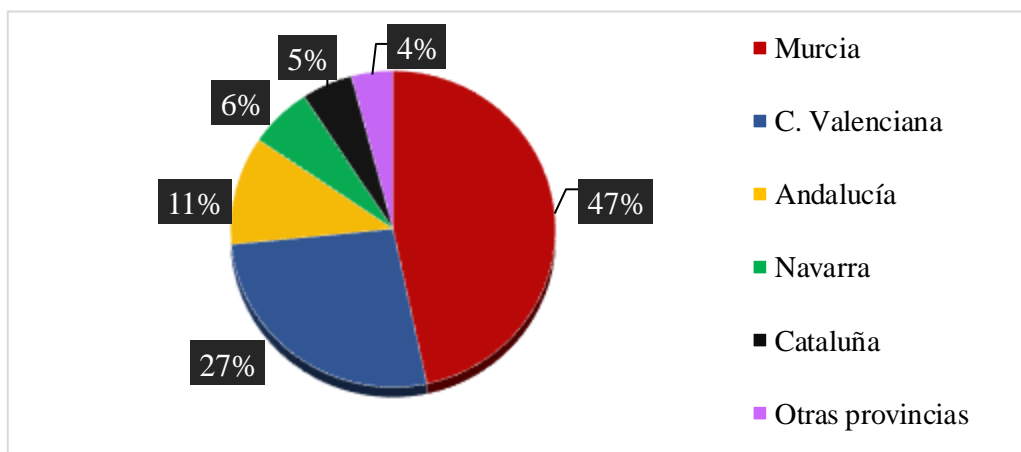


Figura 5. Producción de alcahofa de las diferentes provincias de España en el año 2016 (Fuente: MAPAMA, 2016).

La alcahofa se consume por sus cualidades organolépticas, y por su valor nutricional. Se puede consumir en fresco o procesar como conserva vegetal en la industria alimentaria. Es un vegetal con bajo contenido lipídico, alto contenido en fibra, minerales, vitaminas y elevado contenido en compuestos bioactivos (Petropoulos et al., 2016). Presenta un

elevado contenido en compuestos polifenólicos, metabolitos secundarios con grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo de benceno o unas estructuras aromáticas más complejas (Tsao, 2010). Los principales componentes fenólicos presentes en la alcachofa son los flavonoides, luteolina y derivados de apigenina, y ácidos fenólicos, mono y di-isómeros de ácidos cafeoilquínicos (Gouveia & Castilho, 2012; Zuorro et al., 2016). Estos compuestos son de gran importancia, ya que presentan función protectora contra los daños oxidativos causados por los radicales libres, y además intervienen en reacciones reducción-oxidación, actuando como agentes reductores, donadores de hidrógenos o eliminando el oxígeno singlete (Lombardo et al., 2010).

Gran parte de los compuestos bioactivos de la alcachofa se encuentran en las partes externas como son las brácteas externas, hojas y tallos, estas partes corresponden a los residuos que se desechan tras su procesado, aproximadamente del 80-85%. Por ello, el aprovechamiento de dichos subproductos es uno de los objetivos de investigación actuales. Se intenta valorizar los residuos, obteniendo un extracto funcional que contenga compuestos bioactivos al presentar un elevado contenido de antioxidantes (Ruiz-Cano et al., 2014). El contenido de compuestos fenólicos puede variar en función de diferentes factores: tipo de cultivo, año de cosecha, condiciones cosecha y post-cosecha, parte de la planta, genotipo y condiciones de crecimiento y procesamiento (Petropoulos et al., 2016). También se han realizado estudios farmacológicos, donde se ha demostrado la actividad antimicrobiana, anticancerígena, antifúngica, antioxidante, hepatoprotectiva, hipocolesterolemica y diurética de los extractos de la alcachofa (Gouveia & Castilho, 2012). En la mayoría de los países europeos y en Estados Unidos, la alcachofa se comercializa como suplementos dietéticos.

Kollia et al. (2017) realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar la capacidad antioxidante de extractos de diferentes partes de alcachofa (corazón, brácteas, tallos), aplicando diferentes técnicas de extracción, clásica o asistida por ultrasonido, y analizando el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante mediante el método DPPH y ABTS. Los extractos de la corazón de alcachofa obtenidos mediante ultrasonidos mostraron valores más altos de fenoles totales y capacidad antioxidante medida por los métodos DPPH y ABTS, en comparación con los extractos de brácteas y tallos. El método DPPH obtuvo mayores valores de capacidad antioxidante en la extracción tradicional comparado con el método ABTS. En cambio, los resultados de capacidad antioxidante de

los extractos obtenidos con ultrasonidos fueron mayores con el método ABTS que con el método DPPH.

En el estudio descrito por Ben Salem et al. (2017), se analizó la composición fitoquímica y antioxidante, mediante HPLC de extractos de alcachofa, empleando distintos disolventes para su obtención (hexano, butanol, acetato de etilo, etanol: agua 75:1 y agua) y posteriormente analizaron la capacidad antioxidante a través de diferentes métodos *in vitro*, ABTS, DPPH y FRAP. Los resultados mostraron que los extractos de alcachofa obtenidos con etanol presentaban valores más elevados de capacidad antioxidante por DPPH, ABTS y FRAP, así como mayor contenido fenólico y de flavonoides, alcanzando los valores más elevados con el método FRAP y los valores más bajos con el método DPPH. También Gouveia & Castilho (2012) investigaron el perfil fenólico de extractos de alcachofa. La extracción la llevaron a cabo empleando metanol como disolvente y con la aplicación de ultrasonidos. Para el análisis de componentes se utilizó la técnica HPLC y como métodos *in vitro* de capacidad antioxidante, ABTS, DPPH y FRAP, y relacionaron la composición fenólica con la capacidad antioxidante. Observaron que la composición mayoritaria se basaba en ácidos cafeoilquínicos y en menor medida algunos derivados de flavonoides. Además, los valores más altos de capacidad antioxidante se obtuvieron con el método FRAP, seguido del método ABTS y por último el método DPPH.

Dabbou et al. (2015) cuantificaron el contenido fenólico de extractos de residuos de alcachofa (tallos, brácteas y hojas), y determinaron su capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP. La extracción se realizó con etanol como disolvente, macerando la muestra durante 7 días de almacenamiento. Los extractos obtenidos, mostraron una capacidad antioxidante mayor con el método ABTS que con el método DPPH. El valor obtenido en el ensayo ABTS fue mayor en los extractos de hojas, mientras que los resultados obtenidos mediante DPPH no mostraron variación entre los extractos de tallos, brácteas y hojas. También observaron que las brácteas y tallos presentaban altos niveles de ácidos cafeoilquínicos, y las hojas elevado contenido de luteolina.

Por último, en el estudio llevado a cabo por Llorach et al. (2002), se obtuvieron extractos de subproductos de alcachofa cruda y escaldada, utilizando metanol o agua como disolvente. Se analizó la capacidad antioxidante mediante ABTS, DPPH y FTC (determinación de oxidación lipídica), para la evaluación de estos subproductos como

fuentes de fenoles, y poder considerarlos como promotores de la salud, debido a su capacidad antioxidante. Los valores de capacidad antioxidante variaron en función del tipo de ensayo llevado a cabo y del tratamiento aplicado a la muestra de alcachofa. Tanto los extractos de alcachofa cruda como escaldada obtuvieron mayores valores de capacidad antioxidante con el ensayo DPPH, respecto al ABTS. Los extractos metanólicos mostraron mayor contenido fenólico y una elevada capacidad antioxidante, especialmente los extractos de subproducto de alcachofa escaldada.

El objetivo del presente trabajo es determinar la capacidad antioxidante de extractos obtenidos por diferentes métodos a partir de subproductos de alcachofa. Para ello se utilizarán los métodos como ABTS, DPPH y FRAP. Asimismo, se cuantificará el contenido fenólico total del extracto. Por tanto, se estudiará el efecto del tratamiento de extracción en la obtención de antioxidantes, y la relación entre el contenido fenólico de los extractos y su capacidad antioxidante cuantificada por los diferentes métodos.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Las alcachofas empleadas en este trabajo fueron *Cynara cardunculus* subespecie *scolymus*, de la cosecha de primavera y compradas en el mercado local de Landaben (Pamplona), en el año 2017. Para el acondicionamiento inicial del producto, las alcachofas se lavaron con agua de red, se limpiaron de forma manual y se secaron.

Dado que el presente trabajo se basó en analizar las partes desechables del producto, se procedió a separar las partes no comestibles como brácteas externas, hojas y tallos de la parte comestible de la alcachofa. A continuación, los tres residuos se mezclaron y se trocearon mediante un cuchillo. Posteriormente los residuos troceados se congelaron a -20 °C, y se liofilizaron (liofilizador, Telstar Cryodos). Por último, estos residuos liofilizados se trituraron mediante un molinillo de uso doméstico y se almacenaron a -20 °C, para su posterior análisis.

2.2. Métodos

La extracción de antioxidantes a partir de los subproductos de alcachofas se realizó mediante cuatro tratamientos diferentes de extracción, donde variaron los disolventes utilizados y el tipo de tratamiento de extracción aplicado a la muestra. Tras realizar la extracción, se purificaron los extractos y se analizó su capacidad antioxidante mediante diferentes métodos espectrofotométricos. En las siguientes secciones, se explican detalladamente cada tipo de extracción y método de capacidad antioxidantes utilizado.

2.2.1. Extracción de antioxidantes de los subproductos de alcachofa

A partir de los residuos de alcachofa liofilizados se procedió a la extracción de los antioxidantes. En la Figura 6 se representa el procedimiento de obtención de los antioxidantes, que consistió en una maceración de la muestra con el disolvente a utilizar en cada caso, y posteriormente filtrar o centrifugar para obtener el extracto acuoso. A continuación, se liofilizó y posteriormente, a partir de dicho extracto se obtuvieron las fracciones con los antioxidantes.

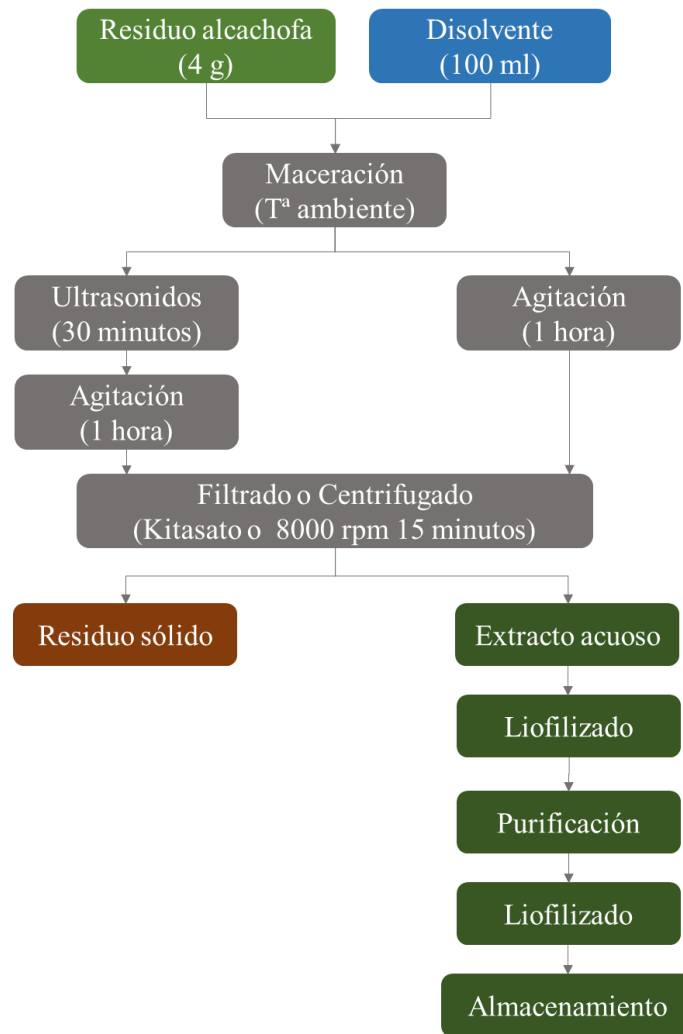


Figura 6. Etapas del proceso de extracción de antioxidantes a partir de residuo de alcachofa liofilizado.

En un Erlenmeyer se pesaron 4 g de muestra de residuo de alcachofa liofilizado y se aplicaron los siguientes tratamientos de extracción:

- Tratamiento de extracción 1 (E1): al residuo de alcachofa se añadieron 100 ml de disolvente, en este caso una disolución 60 % metanol (Scharlab S.L., Sentmenat, España) y 40 % agua (agua MilliQ) y se maceraron durante una hora con agitación (agitador magnético) a temperatura ambiente.
- Tratamiento de extracción 2 (E2): al residuo de alcachofa se añadieron 100 ml de agua, y se maceraron durante una hora con agitación a temperatura ambiente.
- Tratamiento de extracción 3 (E3): se añadieron 100 ml de disolvente, 60 % metanol y 40 % agua al residuo de alcachofa. Posteriormente se aplicó un

tratamiento de baño de ultrasonidos durante 30 minutos (P-Selecta Ultrasons) y a continuación se maceró durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

- Tratamiento de extracción 4 (E4): al residuo de alcachofa se añadieron 100 ml agua, en primer lugar, se aplicó durante 30 minutos un baño de ultrasonidos y a continuación se maceró durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

En la Tabla 1 se muestran las diferentes condiciones que se fijaron para cada extracción.

Tabla 1. Extracción de antioxidantes de subproducto de alcachofa liofilizado

	Disolvente	Ultrasonidos	Agitación
E1	Metanol 60% - H ₂ O 40%	-	1 hora
E2	H ₂ O	-	1 hora
E3	Metanol 60% - H ₂ O 40%	30 minutos	1 hora
E4	H ₂ O	30 minutos	1 hora

Cada extracción se realizó por duplicado. Una vez transcurrido el tiempo de extracción las muestras tratadas con metanol:agua, E1 y E3, se filtraron a vacío con un embudo Buchner y matraz Kitasato, y se almacenaron congeladas a -20 °C. En cambio, las extracciones realizadas con agua como disolvente, E2 y E4, se centrifugaron durante 15 minutos a 8000 rpm, a continuación, se filtraron a vacío y se almacenaron congeladas a -20 °C.

Tras el congelado, las muestras se liofilizaron para eliminar el disolvente. A continuación, se rascó el extracto de las paredes del balón, se tomó 0.050 g para obtener E_T y se almacenó congelado. El resto del extracto sólido se purificó y fraccionó en compuestos fenólicos ácidos (F1) y ácidos fenólicos neutros (F2), según el procedimiento descrito por Lombardo et al. (2010). En primer lugar, el extracto sólido total restante se recogió con 20 ml de agua MilliQ y se ajustó a pH 7 con una disolución de NaOH 2 M. A continuación, se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos y se enrasó en un matraz aforado de 25 ml con agua MilliQ.

En segundo lugar, se realizó la extracción en fase sólida, utilizando un cartucho ExtraBond Cartridge C18 (Soherlab), previamente acondicionando con 5 ml de metanol y 10 ml de agua MilliQ. En la Figura 7 se muestra la estación de vacío utilizada para realizar la separación de las fracciones de antioxidantes, compuesta por una cámara de vidrio conectada a una bomba que realizaba el vacío. En la parte superior exterior se colocaron diferentes llaves de paso. En la primera de ellas se colocó el cartucho y la jeringuilla, en la cual se añadieron los 25 ml del extracto obtenido en alícuotas de 4 ml, a continuación, se eluyeron los ácidos hidroxicinámicos (fracción F1), utilizando 50 ml de una disolución metanol:agua al 10 %. El segundo lugar se eluyeron los flavonoides (fracción F2), con 50 ml de metanol puro 100 %. Ambas fracciones se congelaron y se liofilizaron para eliminar el disolvente. La fracción F1 liofilizada se recogió con 4 ml de metanol:agua al 50 % y la fracción F2 liofilizada con 1 ml de metanol:agua al 50 %. Las muestras se congelaron hasta su posterior análisis.

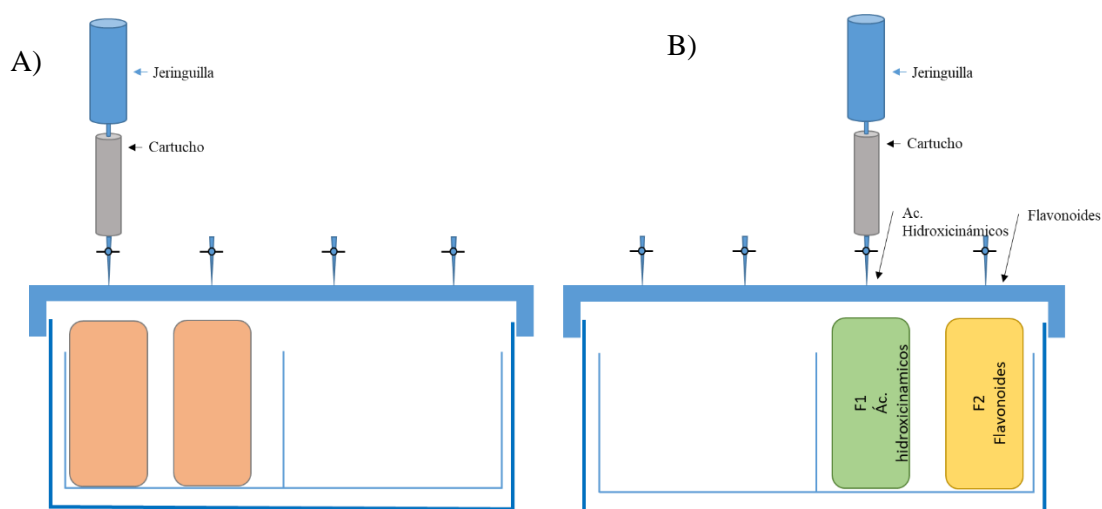


Figura 7. Cámara de vacío utilizada para la extracción en fase sólida. A) Acondicionado del cartucho y lavado del extracto, B) Elución de la columna para la obtención de la F1 y F2.

2.2.2. Análisis de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total de los extractos de residuo de alcachofa

La capacidad antioxidante se midió en todas las fracciones obtenidas (E_T, F1 y F2), según los métodos ABTS, DPPH y FRAP. Además, el contenido fenólico total se analizó mediante el método Folin Ciocalteu.

a) Método de determinación de capacidad antioxidante ABTS

El ensayo ABTS se basa en el método descrito por Re et al. (1999), donde se produce una decoloración de los cationes radicales $ABTS^+$, ocasionada por los antioxidantes presentes en la muestra (Figura 8). El radical $ABTS^+$ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm, este se genera al reaccionar el ABTS con el persulfato potásico, presentando un color verde-azulado. Cuando el sustrato antioxidante reacciona con el catión $ABTS^+$ preformado, se reduce a ABTS y se produce una pérdida de color (Mercado, 2010).

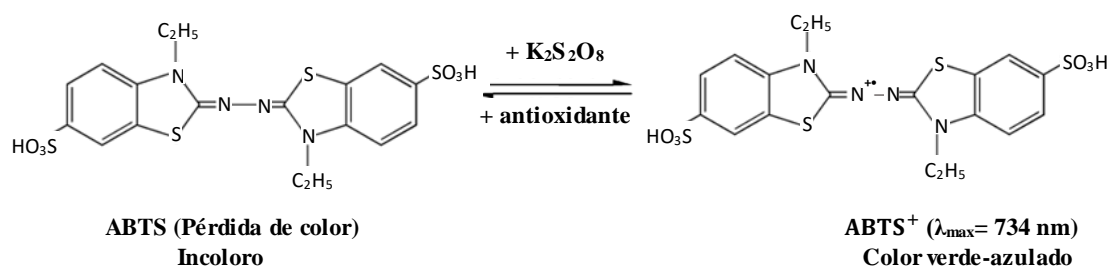


Figura 8. Reacción de transferencia de electrones en el ensayo ABTS (Fuente: Mercado Sánchez, 2010).

Para la obtención del radical $ABTS^+$ se prepara una disolución de ABTS 7mM, para ello se disolvieron 19,23 g de reactivo ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en 5 ml de etanol (Oppac, Noain, España). A continuación, se hicieron reaccionar los 5 ml de la disolución de ABTS con 88 μ l de persulfato potásico 2,45 mM, y se dejaron en oscuridad durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se diluyeron 0,5 ml del preparado de ABTS con 35 ml de etanol, se midió su absorbancia inicial (A_i) a 734 nm y se ajustó la absorbancia de la disolución con etanol, hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$.

En segundo lugar, se prepararon diferentes disoluciones de Trolox, para obtener los patrones de la curva de calibrado. Para ello, a partir de la disolución madre de Trolox 5 mM, se prepararon disoluciones de Trolox con distintas concentraciones: 0,05 mM, 0,20 mM, 0,35 mM, 0,50 mM, 0,65 mM, 0,80 mM, 0,95 mM, 1,6 mM, 2 mM y 2,4 mM. Una vez preparados los patrones, en las cubetas se añadieron 30 μ l del patrón de Trolox y 2,97 ml de la disolución de $ABTS^+$, se dejaron en oscuridad durante 30 minutos y a continuación, se agitaron y se midieron sus absorbancias a 734 nm con un espectrofotómetro UV visible.

Una vez obtenida la curva de calibrado (Figura 9), se analizaron las diferentes muestras de los extractos de residuos de alcachofa. En una cubeta se añadieron 30 μ l de extractos a analizar y 2,97 ml de la disolución ABTS⁺, tras 30 minutos en oscuridad, se agitaron y se midió la absorbancia obteniendo el valor de absorbancia final (Af). Los extractos se analizaron por triplicado.

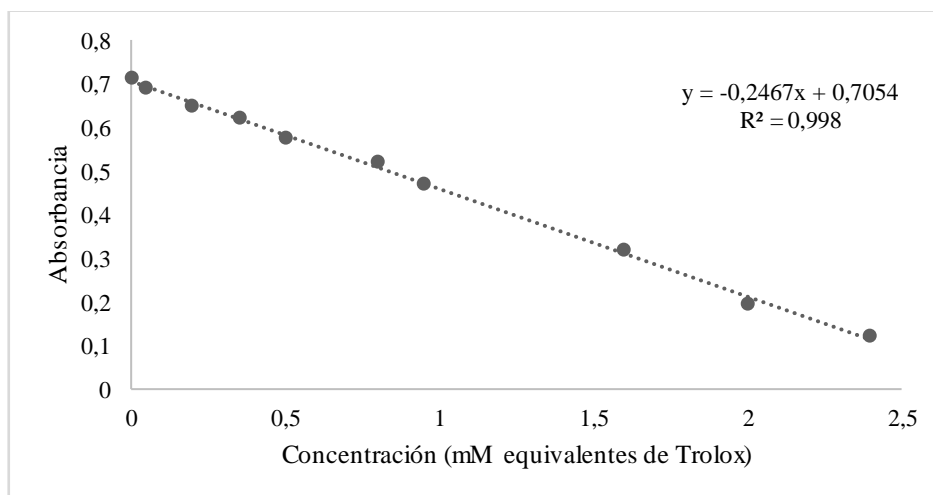


Figura 9. Curva de calibrado para el ensayo ABTS

En la Figura 10 se observa el cambio de color de la disolución ABTS⁺ en función de la concentración de Trolox utilizada en la curva de calibrado. En el Anexo 4 se muestran las imágenes de los diferentes extractos analizados.

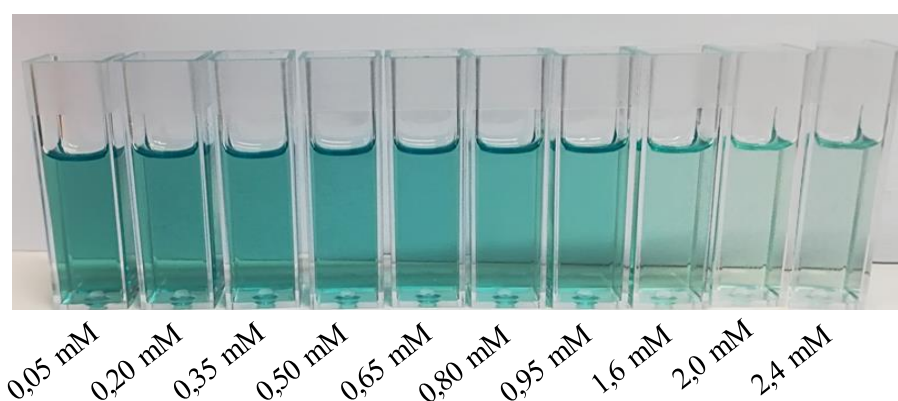


Figura 10. Evolución del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo ABTS

b) Método de determinación de capacidad antioxidante DPPH

El ensayo de DPPH se basa en el método descrito por Brand-Williams et al. (1995). La molécula 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) es un radical con absorción máxima a 515 nm y de color violeta intenso. Cuando la solución DPPH reacciona con un sustrato antioxidante, el compuesto se reduce y el color violeta se transforma en amarillo (Figura 11). El cambio de color se analiza espectrofotométricamente. La concentración de antioxidante que provoca una disminución del 50 % de la concentración del DPPH inicial se define como el parámetro IC₅₀ (Huang et al., 2005).

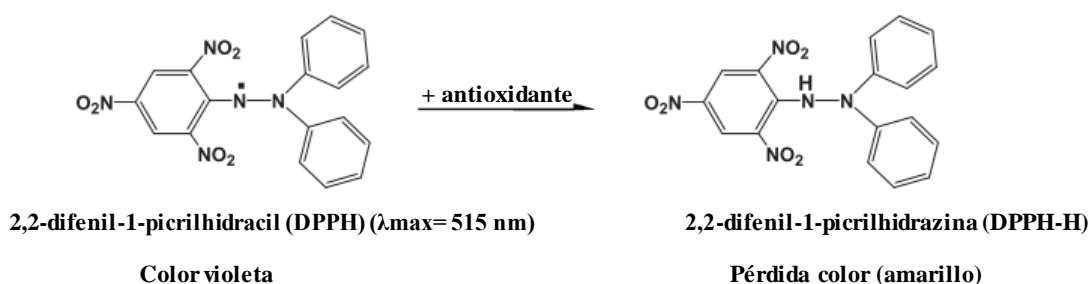


Figura 11. Reacción con electrones o átomos de hidrógeno en el ensayo DPPH (Fuente: Schaich et al., 2015).

Para realizar el ensayo en primer lugar, se preparó una disolución patrón con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). En un matraz se pesaron 24 mg del radical DPPH y se añadieron 100 ml de metanol. A continuación, se preparó la disolución de trabajo DPPH, para ello se tomaron 10 ml de la disolución patrón y se añadieron 45 ml de metanol. Se midió la absorbancia inicial (A_i) a 515 nm en un espectrofotómetro UV-vis (Jenaway, modelo 7315). La absorbancia de la disolución trabajo de DPPH debía encontrarse entre $1,10 \pm 0,02$, en el caso de que presentara mayor absorbancia se ajusta añadiendo metanol a la disolución.

Una vez obtenida la disolución de trabajo DPPH se procedió a la realización de la curva de calibrado. Se utilizó como estándar el antioxidante Trolox, por lo que los resultados obtenidos se expresaron en equivalentes de capacidad antioxidante de Trolox (TEAC). Para preparar las disoluciones de los diferentes puntos de la recta patrón se preparó una disolución madre de Trolox 5 mM, a partir de esta disolución se prepararon disoluciones patrón de diferentes concentraciones, 0,05 mM, 0,20 mM, 0,35 mM, 0,50 mM, 0,65 mM, 0,80 mM y 0,95 mM, utilizando como disolvente una disolución de metanol:agua al 50%. A continuación, se hizo la curva de calibrado añadiendo en las cubetas 150 μl de cada uno de los patrones de Trolox y 2,85 ml de la disolución trabajo

DPPH. Se dejaron en oscuridad durante 30 minutos y a continuación se agitaron y se leyó su absorbancia a 515 nm. Una vez obtenida la recta patrón (Figura 12) se procedió a analizar la muestra problema del extracto del residuo de alcachofa, para ello se tomaron 150 µl de cada extracto obtenido y 2,85 ml de la disolución trabajo DPPH, se dejaron 30 minutos en oscuridad, se agitaron y se midió su absorbancia, obteniendo el valor de absorbancia final (Af). Los extractos se analizaron por triplicado.

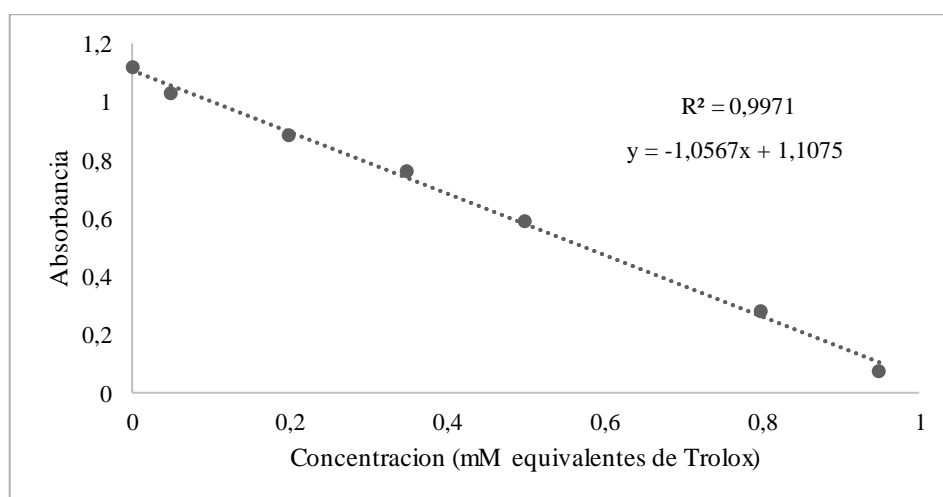


Figura 12. Curva de calibrado del ensayo DPPH

En la Figura 13 se observa la variación de color de los diferentes patrones en función de la concentración de Trolox añadida a la disolución trabajo del radical DPPH. En el Anexo 4 se presentan las imágenes de los extractos analizados.

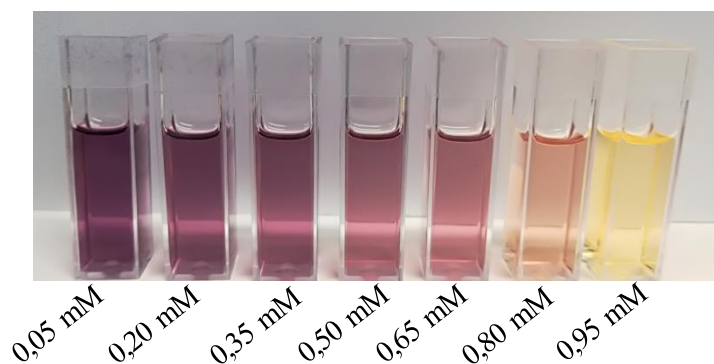


Figura 13. Variación del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo DPPH

c) Método de determinación de capacidad antioxidante FRAP

El método FRAP descrito por Benzie & Strain (1996) se basa en la capacidad del antioxidante en reducir el complejo férrico incoloro, formado por un cromógeno TPTZ

(2,4,6-tripiridil-5-tiazina) y hierro férrico (Fe^{3+}), a un complejo ferroso de color azul, Fe^{2+} -TPTZ (Figura 14) a un pH bajo de 3,6. La reducción se mide a través de la medida de absorbancia a 593 nm (Alam et al., 2013; Pinchuk et al., 2012).

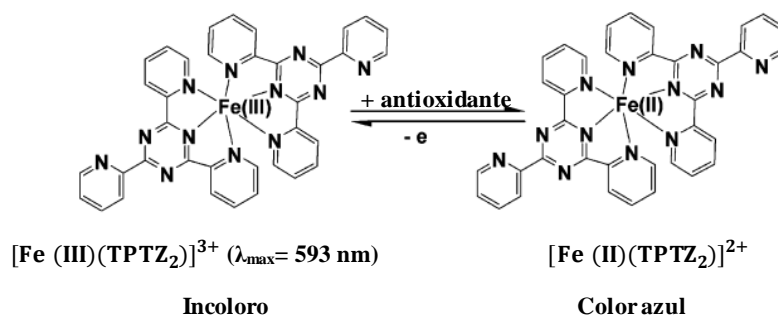


Figura 14. Reacción de transferencia de electrones en el ensayo FRAP (Fuente: Huang et al., 2005).

Para la preparación del reactivo FRAP utilizado para este ensayo de capacidad antioxidante, se prepararon 4 disoluciones diferentes: tampón de acetato 300 mM, disolución de HCl 40 mM, disolución TPTZ y disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, en los últimos dos casos, las disoluciones se prepararon de forma diaria.

En primer lugar, se preparó el tampón de acetato 300 mM, para ello en un matraz se pesaron 1,55 g de trihidrato de acetato de sodio y se añadieron 8 ml de ácido acético glacial, se ajustó a un pH de 3,6 y se enrasó hasta 500 ml con agua MilliQ. A continuación, se preparó la disolución de HCl 40 mM, en un matraz de 500 ml se añadieron 1,7 ml de HCl y se enrasó con agua MilliQ. En segundo lugar, se prepararon la disolución TPTZ, diluyendo 0,0312 g de TPTZ en 10 ml de HCl, y la disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, disolviendo 0,027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de agua desionizada.

Una vez preparadas las 4 disoluciones necesarias para elaborar el reactivo FRAP, se mezclaron 25 ml tampón de acetato con 2,5 ml de disolución TPTZ y 2,5 ml disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10:1:1).

En tercer lugar, se realizó la curva de calibrado (Figura 15), para ellos se utilizó el Trolox como estándar. Se prepararon diferentes concentraciones de Trolox a partir de una disolución madre 5 mM y una disolución metanol:agua al 50 %: 0,05 mM, 0,20 mM, 0,35 mM, 0,50 mM, 0,65 mM, 0,80 mM y 0,95 mM. Para medir las absorbancias de los diferentes patrones, en una cubeta se añadieron 2,85 ml del reactivo FRAP y 150 μl de patrón a analizar, se dejaron 30 minutos en oscuridad, posteriormente se agitaron y se midió la absorbancia a 595 nm.

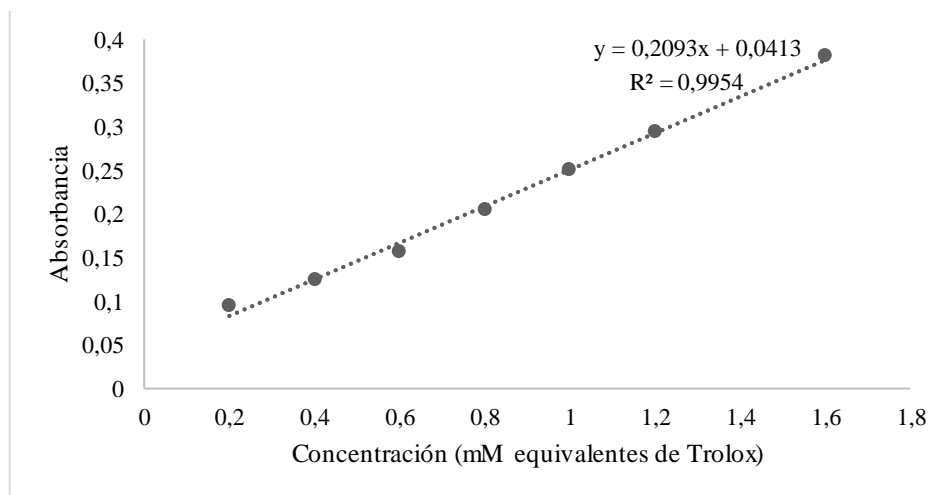


Figura 15. Curva de calibrado del ensayo FRAP

Tras obtener la curva de calibrado se procedió a analizar la capacidad antioxidante de las muestras problema (extractos de residuos de alcachofa). En una cubeta se añadieron 2,85 ml del reactivo FRAP y 150 μ l de extracto metanólico, tras 30 minutos en oscuridad, se agitaron y midió la absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro UV-visible. Los extractos se analizaron por triplicado.

En la Figura 16 se observa la variación de color de los diferentes patrones utilizados en la curva de calibrado del ensayo FRAP. En el Anexo 4 se observa la variación de color de los extractos analizados.

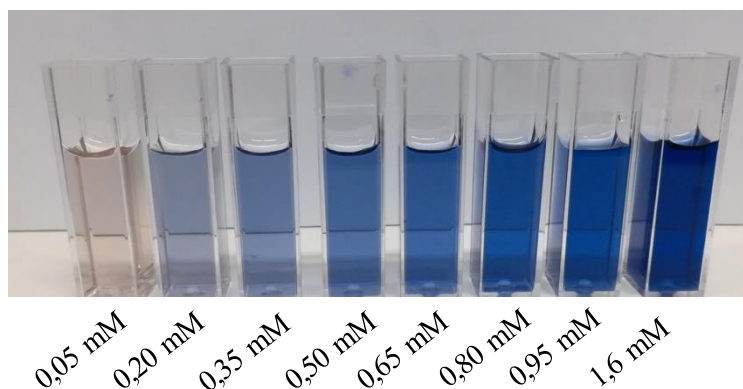


Figura 16. Evolución del color de los patrones utilizados para la curva de calibrado del ensayo FRAP

d) Método de determinación del contenido fenólico total

Por último, se analizó el contenido fenólico total mediante el método Folin Ciocalteu, se basa en lo descrito por Singleton et al. (1998).

En primer lugar, se prepararon disoluciones de ácido gálico con diferentes concentraciones, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM, 1,2 mM, 1,6 mM, 2 mM, 2,4 mM, 2,8 mM y 3,2 mM, para obtener la curva de calibrado. A continuación, se preparó la disolución trabajo, añadiendo en un matraz 0,1 ml del patrón de ácido gálico, 7,9 ml de agua desionizada, 0,5 ml de reactivo Folin y tras dos minutos, se añadieron 1,5 ml de Na_2CO_3 .

La disolución se colocó en un frasco opaco, y se dejó 2 horas en oscuridad. Transcurridas las dos horas, se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro UV-visible a 765 nm, añadiendo en una cubeta 3 ml de la disolución trabajo.

Tras obtener la curva de calibrado (Figura 17), se analizaron las muestras problemas, para ello en un frasco se añadieron 0,1 ml del extracto metanólico, 7,9 ml de agua desionizada, 0,5 ml de reactivo Folin, a los dos minutos 1,5 ml de Na_2CO_3 . A continuación, después de dejar la disolución dos horas en oscuridad se midió su absorbancia a 765 nm. Los extractos se analizaron por triplicado.

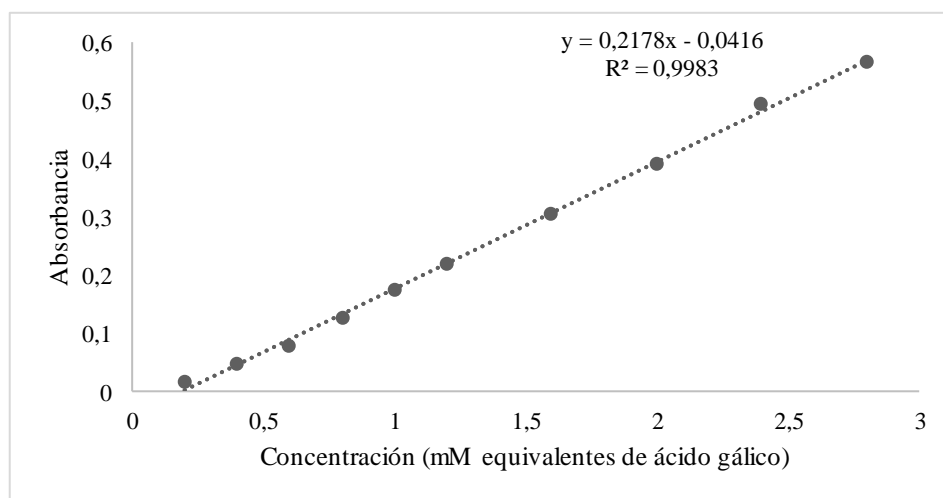


Figura 17. Curva de calibrado del ensayo Folin

En la Figura 18 se muestra el cambio de color en función del patrón de ácido gálico utilizado en el ensayo. En el Anexo 4 se muestran las imágenes de los diferentes extractos analizados.

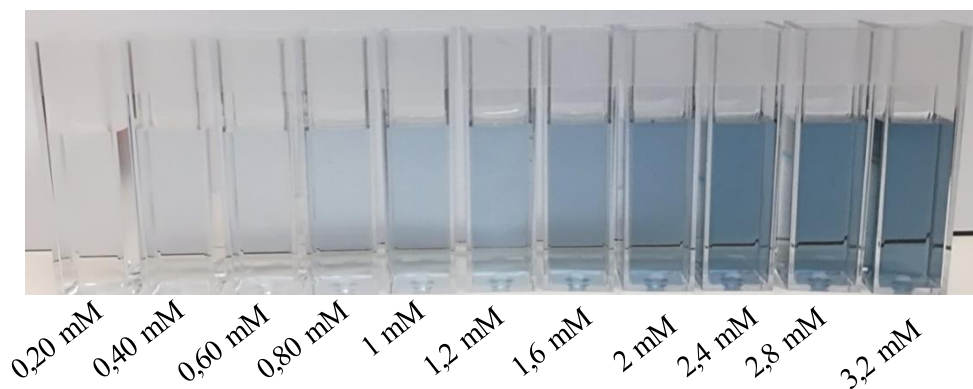


Figura 18. Evolución del color en función de la concentración de los patrones de ácido gálico.

En todos los métodos descritos anteriormente hubo que hacer diluciones de las muestras para que estuvieran dentro de las concentraciones de la recta de calibrado. En los métodos de capacidad antioxidante el tiempo de reacción fue de 30 minutos en cada caso, puesto que este tiempo de reacción corresponde con el periodo de incubación óptimo. Una prolongación del tiempo de reacción podría conducir a un resultado erróneo, debido a la adsorción de color en las paredes de la cubeta, evaporación del metanol y el consiguiente aumento de los valores de absorbancia (Stratil et al., 2006).

2.2.3. Análisis estadístico

El software utilizado para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos fue IBM SPSS Statistics 22. El estudio estadístico de los resultados obtenidos en cada ensayo de capacidad antioxidante y ensayo del contenido fenólico total se llevó a cabo mediante un análisis ANOVA de dos factores. Los dos factores analizados fueron el disolvente y ultrasonidos, cada uno de ellos con dos niveles. Para el factor disolvente 1=metanol:agua y 2=agua, y para ultrasonidos 0=sin ultrasonidos y 1=con ultrasonidos. Se fijó un nivel de significación al 5 % ($p < 0,05$). El análisis de la varianza compara las medias de cada uno de los métodos en función de los dos factores y establece si existen diferencias significativas entre las medias.

A continuación, para evaluar la relación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante medida por cada uno de los métodos ABTS, DPPH y FRAP, se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson con un nivel de confianza $p < 0,05$. En el Anexo 3 se muestra la matriz de correlaciones obtenida para cada método.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción de antioxidantes

La Tabla 2 muestra la cantidad extracto total (Et), fracción de ácidos hidroxicinámicos (F1) y de fracción de flavonoides (F2), obtenida aplicando los diferentes métodos de extracción. Se observó que la utilización de ultrasonidos no aumentó la cantidad de extracto total obtenida y tampoco varió en función del disolvente, sin embargo, en las fracciones 1 y 2 se obtuvo mayor cantidad utilizando la mezcla de metanol:agua (60:40) como disolvente.

Tabla 2. Extracto total, fracción 1 y fracción 2 obtenidos en cada tipo de extracción.

	µg/g materia seca		
	ET Extracto total	F1 Ác. Hidroxicinámicos	F2 Flavonoides
Tipo extracción			
Metanol:H ₂ O	286 ± 6	31 ± 2	15,6 ± 0,1
H ₂ O	267 ± 15	21 ± 4	6 ± 1
Metanol:H ₂ O+Ultrasonidos	273 ± 20	31,2 ± 0,6	13 ± 3
H ₂ O+Ultrasonidos	234 ± 30	21,9 ± 0,3	3 ± 1

Según lo descrito por Rastogi (2011) la combinación de ultrasonidos con una extracción convencional, mejora la tasa y el alcance de la transferencia de masa del interior al exterior del tejido. Esto se debe a la cavitación acústica generada por las ondas, que aumentan la penetración del disolvente dentro de la célula. En el estudio de Porto et al. (2013), el objetivo era comparar la extracción de compuestos fenólicos totales, fracción de ácidos cinámicos y flavonoides en semilla de uva, utilizando dos técnicas de extracción, Soxhlet y asistida con ultrasonidos. Los resultados de contenido total de polifenoles y fracciones fueron iguales para ambos tratamientos. Esto podría deberse a que con ultrasonidos se produce el colapso de las burbujas de cavitación, generándose puntos calientes localizados de corta duración, lo que podría influir en la estabilidad de los compuestos fenólicos e incluso causar la degradación de sus compuestos.

En este trabajo la cantidad de extracto de fracción de ácidos hidroxicinámicos es superior a la de fracción de flavonoides. Sin embargo el perfil fenólico puede variar en función de diferentes factores como la parte de la inflorescencia analizada, tipo de cosecha y genotipo (Lombardo et al., 2010).

Según lo descrito por Lattanzio et al. (2009) la composición química de la alcachofa incluye elevados niveles de compuestos polifenólicos. Se identificaron como principales compuestos fenólicos los ácidos mono y dicafeoilquínicos, entre los que destacan el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido criptoclorogénico (ácido 4-O-cafeoilquínico), ácido neoclorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico) y cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico). También Gouveia & Castilho (2012) identificaron los derivados cafeoilquínicos, además de otros compuestos fenólicos como flavonoides (apigenina, luteolina, quercetina y sus derivados). Estos compuestos pueden encontrarse tanto en las hojas como en los corazones de alcachofa (Pandino et al., 2013).

En el estudio de Lombardo et al. (2010) se analizó la composición química de distintas partes de la alcachofa (brácteas internas, brácteas externas y receptáculo) y encontraron que un derivado de la apigenina, representaba el 64 % del contenido fenólico total (entre 825 y 1228 mg/kg materia seca). En menor medida se detectaron diferentes ácidos hidroxicinámicos, como ácidos cafeoilquínicos (ácidos 1- y 3 -cafeoilquínicos) en el receptáculo y ácidos 1,5 y 3,5-cafeoilquínicos en el tallo floral (entre 239 y 684 mg/ kg materia seca).

3.2. Capacidad antioxidante del extracto total (Et), fracción de ácidos hidroxicinámicos (F1) y fracción de flavonoides (F2).

En la Tabla 3 se muestran los valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante diferentes tratamientos de extracción y cuantificados por diferentes métodos como ABTS, DPPH y FRAP. En el Anexo 1 se recogen todos los datos de capacidad antioxidante obtenidos para el extracto total. Los resultados de capacidad antioxidante se han expresado en $\mu\text{g Trolox/g}$ de materia seca (ms).

Tabla 3. Capacidad antioxidante de los extractos totales medidos mediante ABTS, DPPH y FRAP.

	$\mu\text{g Trolox/g ms}$		
	ABTS	DPPH	FRAP
Tipo extracción			
Metanol:H ₂ O	807 \pm 56	3143 \pm 57	5365 \pm 707
H ₂ O	165 \pm 12	363 \pm 19	1022 \pm 67
Metanol:H ₂ O+Ultrasonidos	752 \pm 38	2926 \pm 79	5391 \pm 290
H ₂ O+Ultrasonidos	168 \pm 15	293 \pm 7	774 \pm 13

En todos los casos con el método FRAP se obtuvieron valores de capacidad antioxidante superiores a los obtenidos con los métodos ABTS y DPPH. En cambio, los

valores más pequeños de capacidad antioxidante se obtuvieron en el ensayo ABTS, llegando a ser inferiores entre 5 y 7 veces respecto a los resultados de FRAP.

En el estudio realizado por Tiveron et al. (2012) se determinó la capacidad antioxidante de diferentes extractos vegetales obtenidos con una mezcla de etanol:agua al 80%. Se utilizaron como métodos para determinar la capacidad antioxidante el ensayo ABTS, DPPH y FRAP. El extracto de alcachofa obtuvo los valores más altos de capacidad antioxidante con el método FRAP ($98,7 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g ms}$), seguido del método DPPH ($70,1 \mu\text{mol TEAC}/\text{g ms}$) y ABTS ($39,9 \mu\text{mol TEAC}/\text{g ms}$).

Al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo, Llorach et al. (2002) analizaron la capacidad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de subproductos de alcachofa. Estos autores obtuvieron unos valores más elevados de capacidad antioxidante mediante el método DPPH, en comparación con el método ABTS, tanto el extracto metanólico como en el acuoso.

Los elevados valores de capacidad antioxidante obtenidos mediante el método FRAP pueden ser debidos al potencial de reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} , cuyo valor es de $0,77 \text{ V}$. Cualquier compuesto con un potencial de redox inferior a este valor, podría reducir el Fe^{3+} sobreestimando el valor del FRAP (Ou et al., 2002). Por otra partes, los valores más bajos de capacidad antioxidante del ensayo DPPH frente a los valores obtenidos en el ensayo FRAP, pueden ser debidos a la presencia de compuestos antioxidantes no reactivos frente a DPPH. Además los compuestos antioxidantes pueden ser agentes reductores más eficaces frente al hierro férrico pero no eliminar el radical DPPH de forma tan eficiente debido al impedimento estérico (Tiveron et al., 2012). El DPPH es un radical muy estable en comparación con el ABTS. Por ello, la menor capacidad antioxidante cuantificada mediante el método ABTS podría deberse a la inestabilidad del reactivo ABTS y a su lenta degradación en las condiciones experimentales dadas (Stratil et al., 2006). Además en función del tipo de reacción, puede llevar mucho tiempo alcanzar el punto final, y por tanto obtener unos resultados de ABTS menores, al no haber terminado la reacción (Prior et al., 2005).

Si se comparan los distintos tipos de extracción, la capacidad antioxidante en los extractos totales medida con los ensayos ABTS, DPPH y FRAP, fue mayor en los extractos obtenido con metanol:agua como disolvente y los valores más pequeños los obtenidos únicamente utilizando agua (Figura 19).

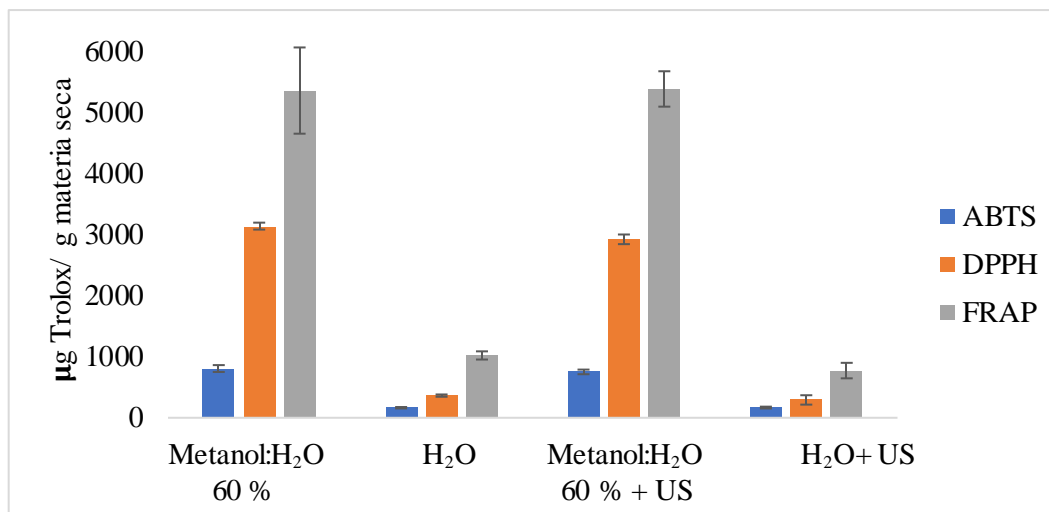


Figura 19. Capacidad antioxidante de los extractos totales obtenidos en cada tipo de extracción .

Por tanto, aunque el peso del extracto total obtenido con agua fuera prácticamente el mismo que con metanol:agua (Tabla 2), presentó menor capacidad antioxidante. Esto puede ser debido a la elevada polaridad del agua, que extrajo diferentes compuestos a los obtenidos en la extracción con metanol:agua, como fibra soluble, hidratos de carbono, impurezas y otros compuestos, que no presentan capacidad antioxidante.

A partir de los resultados obtenidos con los diferentes métodos de determinación de capacidad antioxidante se realizó un análisis ANOVA de dos factores para cada método, con el fin de conocer el efecto del disolvente y el tratamiento con ultrasonidos. Los resultados de los análisis de varianza aplicados se presentan en la Tabla 4 (en el Anexo 2 se muestran todos los análisis de varianza realizados para cada método).

Tabla 4. Valores F del análisis ANOVA del extracto total. Se presentan los resultados de 3 análisis de la varianza, uno por cada método de determinación de la capacidad antioxidante.

	ABTS	DPPH	FRAP
Disolvente	5474,032**	33518,789**	2392,007**
Ultrasonidos	9,917**	94,458**	1,465
Disol.*Ultrasonidos	12,380**	24,301**	2,234

** nivel de significación al 1%

Al aplicar el ANOVA a los datos obtenidos con el método FRAP solo se observaron diferencias significativas debidas al disolvente utilizado en la extracción. Sin embargo, en los resultados obtenidos en los métodos ABTS y DPPH existieron diferencias

significativas por el disolvente, el tratamiento de ultrasonidos y la interacción de ambos factores. Por lo que, en este último caso, la interacción no permite estudiar el efecto de los factores por separado.

El tipo de disolvente utilizado afecta en gran medida a la extracción de antioxidantes. Llorach et al. (2002) obtuvo valores de capacidad antioxidante más elevados para el extracto metanólico (0,20 g TEAC/ g ms) que para el extracto acuoso (0,17 g TEAC/ g ms) analizados mediante el ensayo ABTS. También Jin et al., (2018) obtuvieron un extracto metanólico de polen con mayor porcentaje de inhibición que el extracto acuoso, lo que generó un IC₅₀ menor para el extracto metanólico (1,72 mg/ml) que para el acuoso (2,36 mg/ml), esto fue debido a que el extracto metanólico presentaba mayor contenido de compuestos fenólicos.

En el estudio llevado a cabo por Zuorro et al. (2014), se investigó la extracción de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa mediante un proceso de extracción con diferentes disolventes (acetona, agua, etanol, etanol:agua 50:50, hexano y lactato de etilo). El tipo de disolvente afectó de forma significativa a la extracción de compuestos fenólicos. Se obtuvo la mayor cantidad utilizando como disolvente etanol-agua 50:50, mientras que los extractos de agua o hexano presentaron el menor contenido fenólico. La eficiencia en la extracción con etanol:agua pudo ser debida a la alta afinidad de los compuestos fenólicos por los disolvente polares. Aunque estos autores también sugirieron que pudo ser debido al proceso de hinchamiento de los tejidos vegetales. De esta forma, se produce la adsorción de las moléculas del disolvente a la superficie del material vegetal, facilitaría la penetración del disolvente y la consiguiente extracción de compuestos fenólicos unidos a la matriz.

Ghasemzadeh & Jaafar (2011) investigaron el efecto de diferentes disolventes en la extracción de fenoles totales y flavonoides en jengibre. Estos autores utilizaron como disolventes mezclas acuosas de metanol al 80 %, acetona al 80 % y cloroformo al 80 %. El disolvente que proporcionó una mayor extracción de fenoles y flavonoides fue el metanol. Además, los extractos metanólicos presentaron mayor capacidad antioxidante respecto al resto de disolventes, debido a su elevada polaridad (superior al cloroformo y acetona).

En el trabajo de Ben Salem et al. (2017) se analizó la composición química de hojas de alcachofa, a partir de extractos obtenidos mediante maceración con diferentes

disolventes como hexano, butanol, acetato de etilo, etanol-agua al 75 % y agua. Se determinó la capacidad antioxidante mediante tres métodos de ensayo (ABTS, DPPH y FRAP), y en todos los casos los extractos de etanol presentaron los valores más altos de capacidad antioxidante (527,8 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ en FRAP, 400 μg ácido ascórbico/ml en DPPH y 499,4 mmol TEAC/g ms). Los autores concluyeron que la variabilidad de los valores de capacidad antioxidante obtenidos usando los diferentes disolventes, pudo ser debida al rango de polaridades que abarcaba el disolvente, el grado de polimerización de los compuesto fenólicos e interacciones.

Gouveia & Castilho (2012) investigaron el perfil fenólico de extractos de alcachofa, y estudiaron la relación entre la composición fenólica y la capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos colorimétricos ABTS, DPPH y FRAP. La extracción se realizó con metanol y asistida por ultrasonidos y se obtuvieron valores de capacidad antioxidante superiores con los ensayos ABTS (6940 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g ms) y FRAP (6750 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g ms), que con el ensayo DPPH (3770 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g ms).

Respecto al efecto del tratamiento con ultrasonidos sobre la extracción de compuestos con capacidad antioxidante, Porto et al. (2013) analizaron la capacidad antioxidante de extractos de uva obtenidos por dos tratamientos diferentes de extracción, maceración con ultrasonidos y sin ultrasonido (mediante Soxhlet), mediante el método DPPH. Observaron que los extractos tratados con ultrasonidos presentaban una menor capacidad antioxidante, 67,7 mol de equivalente de tocoferol/g ms con ultrasonidos frente a 72,7 mol de equivalente de tocoferol/ g ms obtenidos con la extracción con Soxhlet.

En el estudio realizado por Oroian & Escriche (2015) la extracción asistida con ultrasonidos proporcionó menores valores de capacidad antioxidante respecto a la extracción por maceración. Esto pudo ser debido a que el baño de ultrasonidos genera ondas sonoras de alta intensidad y frecuencia, lo que altera la propagación e interacción de las ondas, generándose de forma heterogénea en la muestra y afectando con distinta intensidad.

Kollia et al. (2017) compararon la capacidad antioxidante de los extractos de diferentes partes de la alcachofa (corazón, brácteas y tallos) mediante técnicas de extracción por maceración y asistida por ultrasonidos. En este caso la extracción se realizó con metanol:agua al 80%. Los resultados de capacidad antioxidante obtenidos en el ensayo

ABTS mostraron que no hubo diferencias significativas entre los extractos obtenidos mediante maceración y los extractos obtenidos con ultrasonidos.

Por tanto, la mezcla acuosa de metanol al 60 % utilizada en el presente trabajo abarca un mayor rango de polaridades que el agua, lo que permite extraer mayor número de compuestos fenólicos. Sin embargo, parece que la aplicación de ultrasonidos no influyó en la extracción de este tipo de compuestos.

En la Tabla 5 se observa la capacidad antioxidante de la fracción F1 correspondiente a los ácidos hidroxicinámicos obtenidos por los tres métodos empleados (en el Anexo 1 se recogen todos los datos de capacidad antioxidante obtenidos para fracción 1).

Tabla 5. Capacidad antioxidante de la fracción rica en ácidos hidroxicinámicos (F1) medida mediante ABTS, DPPH y FRAP.

	µg Trolox/g ms		
	ABTS	DPPH	FRAP
Tipo extracción			
Metanol:H ₂ O	95 ± 5	131,7 ± 0,4	515 ± 37
H ₂ O	13 ± 1	30 ± 3	56 ± 5
Metanol:H ₂ O+Ultrasonidos	100 ± 5	130,1 ± 0,6	555 ± 24
H ₂ O+Ultrasonidos	12 ± 5	30 ± 3	67,0 ± 0,6

Al igual que en los extractos totales, la fracción rica en ácidos hidroxicinámicos (F1) presentó los valores de capacidad antioxidante más altos utilizando el método FRAP. El método que presentó unos valores más reducidos de capacidad antioxidante fue el ABTS. Los resultados del ensayo DPPH presentaron unos valores intermedios, a los obtenidos en el resto de los ensayos de capacidad antioxidante estudiados.

En esta fracción también se observó que el tipo de extracción presentaba gran influencia en la capacidad antioxidante, como se observa en la Figura 20.

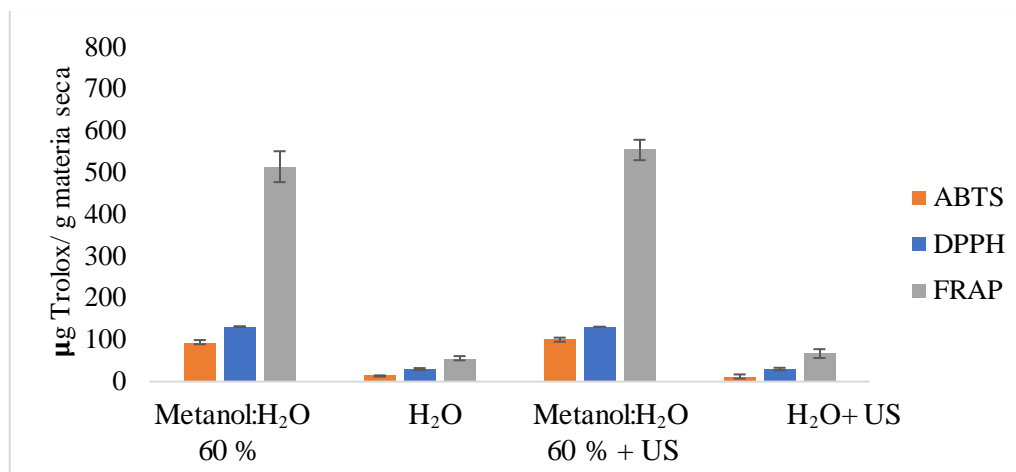


Figura 20. Capacidad antioxidante de las fracciones de ácidos hidroxicinámicos obtenidos en los diferentes tipos de extracción.

La capacidad antioxidante de la fracción de ácidos hidroxicinámicos, alcanzó el valor más elevados en las muestras obtenidas con metanol:agua como disolvente y el valor más bajo se observó en las muestras obtenidas con agua.

En la Tabla 6 se muestra el resultado del análisis estadístico aplicado a los resultados de capacidad antioxidante obtenidos para la fracción 1 (ácidos hidroxicinámicos). Se realizó un análisis ANOVA para cada método, con el fin de conocer si existen diferencias significativas en función del tipo de disolvente y el tratamiento con ultrasonidos en cada caso. En el Anexo 2 se recogen los ANOVA realizados para cada método.

Tabla 6. Valores F del análisis ANOVA de la fracción 1. Se presentan los resultados de 3 análisis de la varianza, uno por cada método de determinación de la capacidad antioxidante.

	ABTS	DPPH	FRAP
Disolvente	6691,589**	46509,117**	9044,756**
Ultrasonidos	4,843*	0,246	0,106
Disol.*Ultrasonidos	12,090**	1,453	52,847**

* nivel de significación al 5%

** nivel de significación al 1%

En el análisis de varianza realizado a los datos obtenidos por el método ABTS se observaron diferencias significativas debidas al disolvente, tratamiento con ultrasonidos y la interacción entre los dos factores. Con el método DPPH solo existían diferencias significativas por el disolvente. Por último, los resultados obtenidos para el método FRAP mostraron diferencias significativas en función del disolvente y la interacción entre los dos factores.

A continuación, se muestran los resultados de capacidad antioxidante obtenidos en la fracción 2, rica en flavonoides, de cada uno de los métodos utilizados (Tabla 7). En el Anexo 1 se recogen todos los datos de capacidad antioxidante obtenidos para fracción 2.

Tabla 7. Capacidad antioxidante de la fracción de flavonoides (F2) medida mediante ABTS, DPPH y FRAP.

Tipo extracción	$\mu\text{g Trolox/g ms}$		
	ABTS	DPPH	FRAP
MetOH:H ₂ O	93 ± 3	131,6 ± 0,6	659 ± 15
H ₂ O	20,8 ± 0,9	45 ± 3	102 ± 8
MetOH:H ₂ O+Ultrasonidos	92 ± 6	131,1 ± 0,5	769 ± 31
H ₂ O+Ultrasonidos	21 ± 4	44 ± 9	106 ± 10

Los resultados de capacidad antioxidante obtenidos mediante ABTS, DPPH y FRAP para la fracción de flavonoides (F2) presentaron la misma tendencia que los resultados de la fracción 1, donde se observó una mayor capacidad antioxidante utilizando el método FRAP, seguido de DPPH y ABTS.

En la Figura 21 se muestran los valores de capacidad antioxidante de las fracciones de flavonoides analizadas.

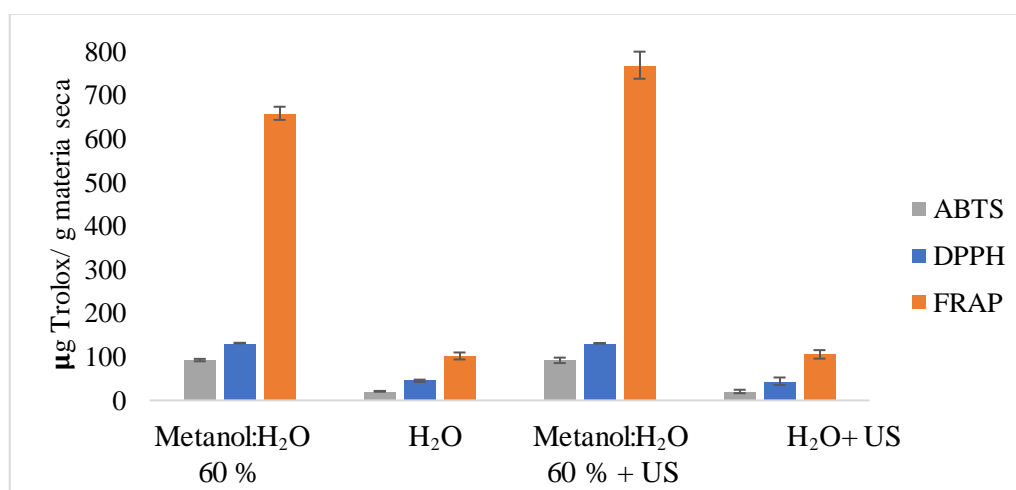


Figura 21. Capacidad antioxidante de las fracciones de flavonoides obtenidos por lo diferentes tipos de extracción.

De nuevo, en todos los ensayos realizados para evaluar la capacidad antioxidante, las concentraciones equivalentes de Trolox más altas se observaron en los extractos obtenidos con metanol:agua como disolvente.

Por otro lado, las fracciones de flavonoides obtenidas en la extracción con agua presentaron los valores más bajos de capacidad antioxidante para todos los métodos, 20,8 µg Trolox/g ms en el ensayo ABTS, 45 µg Trolox/g ms en DPPH y 102 µg Trolox/g ms en FRAP.

Tabla 8. Valores F del análisis ANOVA de la fracción 2. Se presentan los resultados de 3 análisis de la varianza, uno por cada método de determinación de la capacidad antioxidante.

	ABTS	DPPH	FRAP
Disolvente	5759,326**	6475,527**	23667,341**
Ultrasonidos	0,292	0,517	22,745**
Disol.*Ultrasonidos	0,024	0,068	457,563**

* nivel de significación al 5%

** nivel de significación al 1%

Se aplicó un tratamiento estadístico para determinar la influencia del disolvente y tratamiento con ultrasonidos, en la capacidad antioxidante de la fracción 2 (en el Anexo 2 se muestran los análisis de varianza obtenidos en los diferentes métodos). El análisis de varianza realizado para cada método de capacidad antioxidante mostró que para los métodos ABTS y DPPH solo existían diferencias significativas debido al disolvente (Tabla 8). En cambio, con el método FRAP al igual que en el extracto total comentado anteriormente, existían diferencias significativas por del disolvente, ultrasonidos y la interacción de los factores.

3.3. Contenido fenólico total

El contenido fenólico total de cada extracto se muestra en la Tabla 9 (en el Anexo 1 se recogen todos los datos de contenido fenólico obtenidos para cada extracto). Los resultados se expresan en equivalente de ácido gálico (GAE)/g materia seca (ms). Se observa que el contenido fenólico del extracto total fue aproximadamente 4 veces mayor que el de la suma de la fracción 1 y la fracción 2. Además, se encontró mayor contenido fenólico en los extractos obtenidos con metanol:agua, mientras que los extractos acuosos con tratamiento de ultrasonidos mostraron el contenido fenólico total más pequeño. En

todas las extracciones el contenido fenólico de la fracción de flavonoides es mayor que el de la fracción de ácidos hidroxicinámicos.

Tabla 9. Contenido fenólico de los extractos medidos mediante el método Folin.

	µg GAE/ g ms		
	ET Extracto total	F1 Ác. Hidroxicinámico	F2 Flavonoides
Tipo extracción			
Metanol:H ₂ O	2230 ± 244	243 ± 20	268 ± 21
H ₂ O	804 ± 110	31 ± 8	46 ± 5
Metanol:H ₂ O+Ultrasonidos	1909 ± 216	260 ± 23	294 ± 30
H ₂ O+Ultrasonidos	612 ± 117	31 ± 2	45 ± 4

Gouveia & Castilho (2012) obtuvieron un contenido fenólico total en extracto de alcachofa (2336 µg GAE/ g ms) muy similar al obtenido en el presente trabajo (2230 µg GAE /100 g ms).

Para determinar el efecto del tipo de disolvente utilizado y la aplicación de ultrasonidos, se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA para cada uno de los extractos obtenidos, extracto total, fracción 1 y fracción 2 (Tabla 10). En el Anexo 2 se recogen los análisis de varianza obtenidos en los diferentes extractos. En el extracto total existieron diferencias significativas debidas al disolvente y al tratamiento con ultrasonidos. En cambio, en los resultados de contenido fenólico de la fracción 1 y 2, existieron diferencias significativas por el disolvente, el tratamiento con ultrasonidos y la interacción de los dos factores.

Tabla 10. Valores F del análisis ANOVA realizado a partir del ensayo Folin. Se presentan los resultados de 3 análisis de la varianza, uno por cada tipo de extracto obtenido.

	ET Extracto total	F1 Ác. hidroxicinámicos	F2 Flavonoides
Disolvente	955,393**	3439,065**	2908,665**
Ultrasonidos	33,833**	5,340*	8,130**
Disol.*Ultrasonidos	2,144	5,129*	9,702**

* nivel de significación al 5%

** nivel de significación al 1%

Wondra et al. (2005) analizaron el efecto del disolvente en extractos de grosella roja y negra utilizando tres disolventes distintos, agua, etanol al 70 % y metanol al 70 %. Los extractos de metanol y etanol presentaron dos veces mayor contenido fenólico. Asimismo, Becker & Siddhuraju (2003) observaron un mayor contenido fenólico en los extracto de hojas de *Moringa oleifera* obtenidos con metanol al 80 % y etanol al 70 % en lugar de utilizar únicamente agua.

A continuación, se estudió el coeficiente de correlación entre la capacidad antioxidante medida a partir de los diferentes ensayos y el contenido fenólico total. En la Tabla 11 se muestran los coeficientes de correlaciones de Pearson (en el Anexo 3 se muestran las matrices de correlaciones obtenidas para cada método). Se observa que existe una elevada correlación entre la capacidad antioxidante analizada y el contenido fenólico total de las muestras, con coeficientes muy próximos a 1 y un nivel de significación de $p < 0,05$.

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre el contenido fenólico y el tipo de ensayo de capacidad antioxidante realizado.

		Correlaciones		
		ABTS	DPPH	FRAP
ET - Extracto total				
Folin	Correlación Pearson	0,966	0,963	0,956
	Sig.	0,000	0,000	0,000
F1 – Ác. Hidroxicinámicos				
Folin	Correlación Pearson	0,994	0,988	0,992
	Sig.	0,000	0,000	0,000
F2 – Flavonoides				
Folin	Correlación Pearson	0,993	0,981	0,989
	Sig.	0,000	0,000	0,000

En el extracto total el ensayo de capacidad antioxidante que obtuvo un mayor coeficiente de correlación fue el ensayo ABTS (0,966) seguido del ensayo DPPH (0,963) y FRAP (0,956). Aunque las diferencias son muy pequeñas. Asimismo, en el caso de las fracciones ricas en ácidos hidroxicinámicos y flavonoides el mayor coeficiente de correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante fue el obtenido para el método ABTS, pero seguido del FRAP y por último el DPPH.

Gouveia & Castilho (2012) concluyeron que existía una alta correlación entre los resultados obtenidos en el método Folin-Ciocalteu y los resultados obtenidos en los ensayos de capacidad antioxidante FRAP, DPPH y ABTS. Siendo el ensayo ABTS el método que presentó la mayor correlación con el contenido fenólico total, seguido del ensayo FRAP.

Del mismo modo Dudonné et al. (2009) encontraron una elevada correlación entre el contenido fenólico total de diferentes extractos de plantas y la capacidad antioxidante medida mediante ABTS, DPPH y FRAP, con unos coeficientes de correlación de 0,966, 0,939 y 0,906, respectivamente.

En general, los valores de absorbancia final obtenidos en los ensayos de determinación de la capacidad antioxidante, y el ensayo de contenido fenólico total, son proporcionales al número de grupos hidroxilos fenólicos reactivos. Además la estructura de la molécula también influye en el resultado (Stratil et al., 2006).

Según el estudio de Tiveron et al. (2012), el contenido fenólico total de la alcachofa mostró una relación directa con la capacidad antioxidante analizada por los métodos ABTS, DPPH y FRAP, con unos coeficientes de correlación de Pearson muy próximos a 1 en los tres métodos (0,79 en ABTS, 0,82 en FRAP y 0,89 en DPPH). Estos autores explicaron estas diferencias debido a los diferentes mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en los extractos, así como a los principios utilizados en cada método para medir su capacidad antioxidante. Los tres métodos de capacidad antioxidante, así como el método de análisis del contenido fenólico total se basan en la capacidad que presenta antioxidante para reducir el oxidante, lo que genera un cambio de color al reducirse. Debido a los diferentes principio en los que se basa cada ensayo, es necesario utilizar varios métodos de medida, para conocer los mecanismos de acción de los antioxidantes analizados (Dudonné et al., 2009).

4. Conclusiones

1. La mezcla metanol:agua (60:40) usada como disolvente, permite obtener un extracto fenólico con mayor capacidad antioxidante, que la del extracto acuoso. El tratamiento con ultrasonidos no afectó a la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.
2. Los métodos para medir la capacidad antioxidante utilizados, ABTS, DPPH y FRAP, presentan distintos mecanismos de acción, lo que da lugar a resultados diferentes. Los valores más elevados de capacidad antioxidante se obtuvieron con el método FRAP, en cambio con el método ABTS se observó menor capacidad antioxidante en todos los casos.
3. Se observó una elevada correlación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante por los diferentes métodos estudiados.

5. Bibliografia

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- Becker, K., & Siddhuraju, P. (2003). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 2144–2155.
- Ben Salem, M., Affès, H., Athmouni, K., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., Zeghal, K. M. (2017). Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4951937>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, J., & Krause, K. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, (August), 1–14. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- Charles, D. J. (2013). *Antioxidant properties of spices herbs and other sources*. New York: Springer-Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0>.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.
- Cömert, E. D., & Gökmen, V. (2017). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105(October 2017), 76–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.056>.
- Dabbou, S., Dabbou, S., Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Chahdoura, H., Gasco, L., Helal, A. N. (2015). In vitro antioxidant activities and phenolic content in crop residues of Tunisian globe artichoke. *Scientia Horticulturae*, 190, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.014>.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (57), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>.

- FAO (Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2016). FAOSTAT. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. (2011). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts, (April).
- Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48(2), 712–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.029>.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- Jin, T. Y., Saravanakumar, K., & Wang, M. H. (2018). In vitro and in vivo antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13 (December 2017), 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.010>.
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>.
- Kollia, E., Markaki, P., Zoumpoulakis, P., & Proestos, C. (2017). Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques. *Natural Product Research*, 31(10), 1163–1167. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1219864>.
- Ku, Y. G., Bae, J. H., Namie, J., & Barasch, D. (2017). Detection of Bioactive Compounds in Organically and Conventionally Grown Asparagus Spears. *Food Anal. Methods*, 11(1), 309–318.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.002>.
- Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3458–3464. <https://doi.org/10.1021/jf0200570>.
- Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knödler, M., Carle, R., & Schieber, A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, 119(3), 1175–1181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.033>.

- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, *763*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente). (2016). Producción Hortalizas 2016.
- Mármol, I., Sánchez De Diego, C., Jiménez Moreno, N., Ancín Azpilicueta, C., & Rodríguez Yoldi, M. (2017). Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms18061137>.
- McDonnell, C., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants. *Comprehensive Analytical Chemistry*, *76*, 111–129. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.03.005>.
- Mercado Sánchez, J. M. (2010). *Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides de plantas medicinales e identificación por electroforesis capilar*. Instituto Politécnico Nacional México.
- Moon, J., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(January), 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, *129*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauro, R. P., & Mauromicale, G. (2012). Variation in polyphenol profile and head morphology among clones of globe artichoke selected from a landrace. *Scientia Horticulturae*, *138*, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.032>.
- Pandino, G., Lombardo, S., & Mauromicale, G. (2013). Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, *44*, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.022>.
- Petropoulos, S. A., Pereira, C., Ntatsi, G., Danalatos, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Nutritional value and chemical composition of Greek artichoke genotypes. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.159>.

- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, (165), 638–647. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1415-8>.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>.
- Porto, C. Da, Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Ultrasonics Sonochemistry Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Rastogi, N. K. (2011). Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 705–722. <https://doi.org/10.1080/10408391003770583>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Ruiz-Cano, D., Pérez-Llamas, F., Frutos, M. J., Arnao, M. B., Espinosa, C., López-Jiménez, J. Á., ... Zamora, S. (2014). Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. *Food Chemistry*, 160, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.091>.
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays.” *Journal of Functional Foods*, 18, 782–796. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>.
- Tiveron, A. P., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Vieira, T. M. F. S., Regitano-d’Arce, M. A. B., & Alencar, S. M. (2012). Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and

- Its Relation with Phenolic Composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8943–8957. <https://doi.org/10.3390/ijms13078943>.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Wondra, A. G., Lapornik, B., & Pros, M. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71 (2), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>.
- Zuorro, A., Maffei, G., & Lavecchia, R. (2014). Effect of Solvent Type and Extraction Conditions on the Recovery of Phenolic Compounds from Artichoke Waste. *Chemical Engineering Transactions* 39, 463–468. <https://doi.org/10.3303/CET1439078>.
- Zuorro, A., Maffei, G., & Lavecchia, R. (2016). Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 111, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.011>.

Anexos

ANEXO 1: Medidas de capacidad antioxidante.

Tabla 12. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con metanol:H₂O (E1)

	ABTS ($\mu\text{g TEAC/g ms}$)	DPPH ($\mu\text{g TEAC/g ms}$)	FRAP ($\mu\text{g TEAC/g ms}$)	Folin ($\mu\text{g GAE/g ms}$)
ET	802,13	3183,85	5619,42	2090,44
	804,40	3177,40	5639,15	2116,34
	804,40	3174,18	5645,72	2124,97
	752,30	3206,42	6000,76	2219,91
	752,30	3199,97	6020,48	2228,54
	752,30	3199,97	6020,48	2237,17
	817,99	3212,87	6290,05	2435,69
	815,72	3209,64	6290,05	2444,32
	815,72	3203,19	6296,62	2435,69
	738,21	3084,15	4415,50	1828,98
	736,03	3081,04	4428,21	1828,98
	729,46	3081,04	4434,57	1837,33
	838,95	3105,97	5203,64	2571,59
	836,76	3102,85	5222,71	2571,59
	836,76	3102,85	5222,71	2588,28
	895,89	3084,15	4593,47	2187,77
	895,89	3077,92	4612,54	2196,11
	906,84	3077,92	4618,89	2196,11
F1	93,67	132,10	467,97	242,06
	93,67	132,10	469,04	243,25
	93,67	132,10	469,75	242,65
	84,92	132,10	467,61	206,99
	84,92	131,97	468,32	207,58
	84,54	131,70	469,04	207,58
	100,90	131,30	550,94	265,24
	100,90	131,04	551,29	265,84
	100,90	131,04	551,29	266,43
	95,00	131,97	510,17	235,52
	95,00	131,84	510,88	235,52
	94,81	131,70	511,24	235,52
	95,76	131,84	543,78	239,68
	95,57	131,84	544,86	240,87
	95,76	131,70	545,57	240,28
	96,90	131,30	547,00	264,65
96,90	131,30	547,72	264,65	
96,90	131,17	548,43	265,24	
F2	90,44	131,84	650,36	245,03
	90,24	131,57	651,08	245,63
	90,24	131,44	651,43	245,63
	91,20	130,50	676,11	259,30
	91,20	130,37	677,54	259,30
	91,01	130,24	677,90	259,30
	89,29	132,37	655,72	243,84
	89,29	132,24	656,44	244,44
	89,10	132,10	656,80	244,44
	92,53	131,70	631,41	268,81
	92,34	131,70	632,84	270,00
	92,34	131,70	632,84	270,00
	96,33	132,10	667,88	296,75
	96,52	132,10	668,96	296,75
	96,33	131,97	669,31	297,34
	95,76	131,84	669,67	289,02
	95,76	131,70	670,03	289,61
95,76	131,57	670,74	289,61	

Tabla 13. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con H₂O (E2)

	ABTS (µg TEAC/g ms)	DPPH (µg TEAC/g ms)	FRAP (µg TEAC/g ms)	Folin (µg GAE/g ms)
ET	149,21	343,84	955,69	143,16
	153,46	343,84	974,22	143,50
	149,21	343,84	968,04	143,16
	153,46	358,99	1023,64	154,07
	151,33	355,96	1036,00	154,56
	153,46	352,93	1036,00	154,89
	179,00	343,84	1128,66	146,14
	179,00	337,78	1147,19	146,63
	176,88	337,78	1141,02	146,30
	179,67	377,42	1063,45	128,86
	179,67	374,55	1028,34	129,33
	177,66	371,68	1063,45	129,96
	165,56	377,42	1004,92	141,90
	165,56	374,55	999,07	142,05
	163,54	374,55	1004,92	141,90
	163,54	394,64	946,40	145,98
	161,52	388,90	917,13	146,29
161,52	388,90	952,25	146,14	
F1	14,99	33,78	59,15	14,97
	14,89	33,51	59,15	15,01
	14,89	33,51	59,15	15,02
	14,33	31,78	59,69	15,43
	14,24	31,64	60,23	15,44
	14,24	31,64	59,69	15,47
	14,52	31,11	62,14	15,53
	14,52	30,84	62,68	15,54
	14,43	30,98	62,68	15,56
	13,02	27,11	49,37	14,74
	13,02	26,85	49,37	14,77
	13,02	26,85	49,64	14,78
	13,12	27,78	52,08	13,90
	12,83	27,51	53,44	13,91
	12,83	27,51	53,44	13,93
	10,77	28,18	54,53	14,01
	10,87	28,05	54,53	14,03
11,06	28,05	53,99	14,04	
F2	19,76	40,17	100,45	19,51
	19,76	40,04	101,53	19,53
	19,76	40,04	101,53	19,54
	22,38	46,57	97,46	19,71
	22,38	46,57	98,00	19,74
	22,38	46,43	97,73	19,76
	21,07	45,90	89,03	19,80
	21,07	45,77	89,58	19,81
	20,98	45,63	89,85	19,82
	19,85	42,97	111,31	21,24
	19,85	43,10	111,86	21,26
	19,76	42,97	111,31	21,27
	20,98	46,30	110,50	21,27
	20,88	46,17	111,31	21,29
	20,98	46,03	111,04	21,30
	21,17	48,03	98,81	21,33
	21,07	48,03	99,36	21,35
20,98	48,03	99,36	21,35	

Tabla 14. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con metanol:H₂O + ultrasonidos (E3)

	ABTS (µg TEAC/g ms)	DPPH (µg TEAC/g ms)	FRAP (µg TEAC/g ms)	Folin (µg GAE/g ms)
ET	771,56	23,20	174,215	84,80
	771,56	23,97	180,015	84,63
	769,43	22,94	172,281	84,55
	724,55	24,75	185,816	85,41
	726,69	24,49	183,882	85,23
	726,69	24,49	183,882	85,23
	820,71	23,97	180,015	85,58
	818,57	23,72	178,082	85,49
	816,43	25,00	187,750	85,32
	731,38	22,09	165,876	82,15
	731,38	22,09	165,876	82,07
	731,38	21,87	164,202	82,07
	761,85	20,08	150,812	82,73
	759,82	19,86	149,138	82,65
	759,82	19,64	147,464	82,65
	707,01	20,08	150,812	82,15
	704,98	19,86	149,138	81,98
702,95	19,86	149,138	81,98	
F1	101,85	1,91	14,332	3,52
	101,47	1,91	14,332	3,52
	101,47	1,90	14,238	3,52
	100,14	2,00	14,987	3,52
	100,14	1,97	14,800	3,52
	100,71	1,98	14,893	3,51
	109,65	1,97	14,800	3,50
	109,27	1,96	14,706	3,49
	109,46	1,97	14,800	3,49
	93,67	0,16	1,226	3,52
	93,67	0,16	1,226	3,51
	93,67	0,15	1,133	3,51
	97,66	1,72	12,927	3,51
	97,66	1,71	12,834	3,51
	97,66	1,71	12,834	3,51
	99,38	1,95	14,612	3,50
99,57	1,93	14,519	3,50	
99,38	1,95	14,612	3,49	
F2	84,92	2,81	21,071	3,51
	84,73	2,81	21,071	3,50
	84,92	2,79	20,978	3,50
	89,67	3,38	25,377	3,48
	89,48	3,37	25,284	3,47
	89,48	3,37	25,284	3,47
	87,39	3,43	25,752	3,53
	87,58	3,42	25,658	3,52
	87,58	3,42	25,658	3,52
	88,72	2,20	16,485	3,51
	88,72	2,17	16,297	3,51
	88,91	2,17	16,297	3,51
	100,90	2,27	17,046	3,52
	100,71	2,27	17,046	3,52
	100,71	2,26	16,953	3,52
	99,38	2,32	17,421	3,51
99,95	2,32	17,421	3,51	
100,14	2,32	17,421	3,50	

Tabla 15. Valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con H₂O + ultrasonidos (E4)

	ABTS (µg TEAC/g ms)	DPPH (µg TEAC/g ms)	FRAP (µg TEAC/g ms)	Folin (µg GAE/g ms)
ET	174,215	84,80	3183,849	9,16
	180,015	84,63	3177,401	9,16
	172,281	84,55	3174,177	9,16
	185,816	85,41	3206,418	9,56
	183,882	85,23	3199,970	9,48
	183,882	85,23	3199,970	9,40
	180,015	85,58	3212,867	9,16
	178,082	85,49	3209,642	9,00
	187,750	85,32	3203,194	9,00
	165,876	82,15	3084,152	10,05
	165,876	82,07	3081,035	9,98
	164,202	82,07	3081,035	9,90
	150,812	82,73	3105,970	10,05
	149,138	82,65	3102,853	9,98
	147,464	82,65	3102,853	9,98
	150,812	82,15	3084,152	10,51
	149,138	81,98	3077,918	10,36
149,138	81,98	3077,918	10,36	
F1	14,332	3,52	132,101	0,90
	14,332	3,52	132,101	0,89
	14,238	3,52	132,101	0,89
	14,987	3,52	132,101	0,85
	14,800	3,52	131,968	0,84
	14,893	3,51	131,702	0,84
	14,800	3,50	131,302	0,83
	14,706	3,49	131,035	0,82
	14,800	3,49	131,035	0,83
	1,226	3,52	131,968	0,72
	1,226	3,51	131,835	0,72
	1,133	3,51	131,702	0,72
	12,927	3,51	131,835	0,74
	12,834	3,51	131,835	0,73
	12,834	3,51	131,702	0,73
	14,612	3,50	131,302	0,75
	14,519	3,50	131,302	0,75
14,612	3,49	131,169	0,75	
F2	21,071	3,51	131,835	1,07
	21,071	3,50	131,568	1,07
	20,978	3,50	131,435	1,07
	25,377	3,48	130,502	1,24
	25,284	3,47	130,369	1,24
	25,284	3,47	130,236	1,24
	25,752	3,53	132,368	1,22
	25,658	3,52	132,235	1,22
	25,658	3,52	132,101	1,22
	16,485	3,51	131,702	1,14
	16,297	3,51	131,702	1,15
	16,297	3,51	131,702	1,14
	17,046	3,52	132,101	1,23
	17,046	3,52	132,101	1,23
	16,953	3,52	131,968	1,23
	17,421	3,51	131,835	1,28
	17,421	3,51	131,702	1,28
17,421	3,50	131,568	1,28	

ANEXO 2: Resultados ANOVA del extracto total (ET), fracción 1 (F1) y fracción 2 (F2)

Tabla 16. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para el extracto total (ET) obtenido con los diferentes métodos de extracción analizados.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ABTS_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	6803174,84 ^a	3	2267724,948	1832,110	,000
Interceptación	16103226,62	1	16103226,62	13009,901	,000
Disolvente	6775576,343	1	6775576,343	5474,032	,000
Ultrasonidos	12274,937	1	12274,937	9,917	,002
Disolvente * Ultrasonidos	15323,563	1	15323,563	12,380	,001
Error	84168,157	68	1237,767		
Total	22990569,62	72			
Total corregido	6887343,000	71			

a. R al cuadrado = ,988 (R al cuadrado ajustada = ,987)

Variable dependiente: DPPH_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	132294300 ^a	3	44098099,87	11212,519	,000
Interceptación	203487651,9	1	203487651,9	51739,399	,000
Disolvente	131827227,6	1	131827227,6	33518,798	,000
Ultrasonidos	371496,632	1	371496,632	94,458	,000
Disolvente * Ultrasonidos	95575,380	1	95575,380	24,301	,000
Error	267439,524	68	3932,934		
Total	336049391,0	72			
Total corregido	132561739,1	71			

a. R al cuadrado = ,998 (R al cuadrado ajustada = ,998)

Variable dependiente: FRAP_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	361911566 ^a	3	120637188,6	798,569	,000
Interceptación	709002118,2	1	709002118,2	4693,305	,000
Disolvente	361352640,6	1	361352640,6	2392,007	,000
Ultrasonidos	221369,321	1	221369,321	1,465	,230
Disolvente * Ultrasonidos	337556,039	1	337556,039	2,234	,140
Error	10272536,74	68	151066,717		
Total	1081186221	72			
Total corregido	372184102,7	71			

a. R al cuadrado = ,972 (R al cuadrado ajustada = ,971)

Variable dependiente: Folin_μgAc_gálico_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	34637836,6 ^a	3	11545945,53	330,456	,000
Interceptación	138851726,1	1	138851726,1	3974,075	,000
Disolvente	33380839,35	1	33380839,35	955,393	,000
Ultrasonidos	1182097,470	1	1182097,470	33,833	,000
Disolvente * Ultrasonidos	74899,767	1	74899,767	2,144	,148
Error	2375878,122	68	34939,384		
Total	175865440,8	72			
Total corregido	37013714,71	71			

a. R al cuadrado = ,936 (R al cuadrado ajustada = ,933)

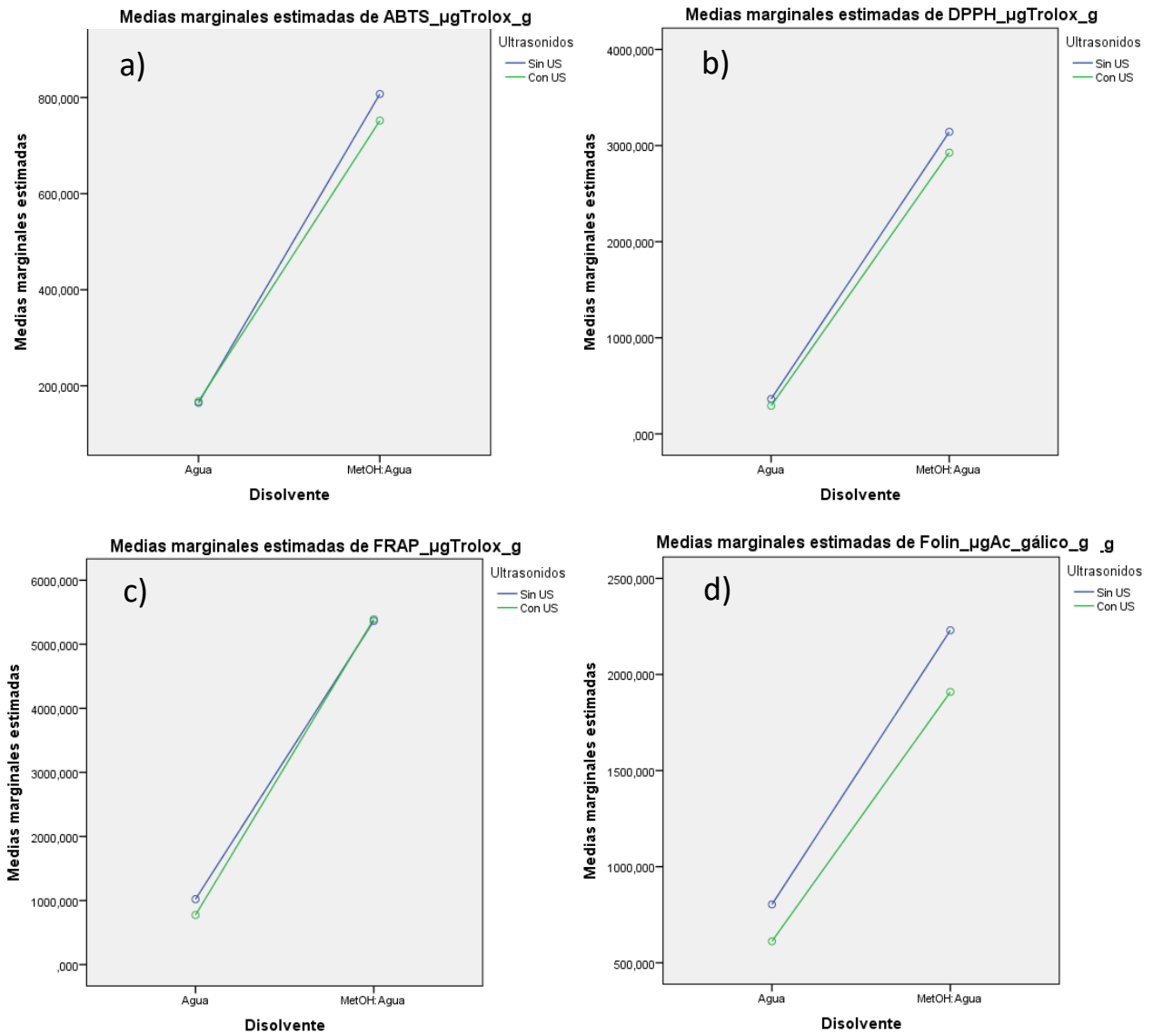


Figura 22. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin.

Tabla 17. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para fracción 1 (F1) obtenida con los diferentes métodos de extracción analizados.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ABTS_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	129335,829 ^a	3	43111,943	2236,174	,000
Interceptación	218518,360	1	218518,360	11334,331	,000
Disolvente	129009,384	1	129009,384	6691,589	,000
Ultrasonidos	93,367	1	93,367	4,843	,031
Disolvente * Ultrasonidos	233,078	1	233,078	12,090	,001
Error	1310,995	68	19,279		
Total	349165,183	72			
Total corregido	130646,824	71			

a. R al cuadrado = ,990 (R al cuadrado ajustada = ,990)

Variable dependiente: DPPH_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	184684,255 ^a	3	61561,418	15503,606	,000
Interceptación	468048,862	1	468048,862	117873,259	,000
Disolvente	184677,505	1	184677,505	46509,117	,000
Ultrasonidos	,979	1	,979	,246	,621
Disolvente * Ultrasonidos	5,771	1	5,771	1,453	,232
Error	270,013	68	3,971		
Total	653003,130	72			
Total corregido	184954,268	71			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998)

Variable dependiente: FRAP_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	4469800,18 ^a	3	1489933,394	3032,570	,000
Interceptación	5917260,548	1	5917260,548	12043,830	,000
Disolvente	4443784,066	1	4443784,066	9044,756	,000
Ultrasonidos	51,893	1	51,893	,106	,746
Disolvente * Ultrasonidos	25964,222	1	25964,222	52,847	,000
Error	33409,116	68	491,311		
Total	10420469,85	72			
Total corregido	4503209,297	71			

a. R al cuadrado = ,993 (R al cuadrado ajustada = ,992)

Variable dependiente: Folin_μgAc_gálico_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	880463,638 ^a	3	293487,879	1149,875	,000
Interceptación	1431232,411	1	1431232,411	5607,518	,000
Disolvente	877768,396	1	877768,396	3439,065	,000
Ultrasonidos	1363,052	1	1363,052	5,340	,024
Disolvente * Ultrasonidos	1332,191	1	1332,191	5,219	,025
Error	17355,952	68	255,235		
Total	2329052,001	72			
Total corregido	897819,590	71			

a. R al cuadrado = ,981 (R al cuadrado ajustada = ,980)

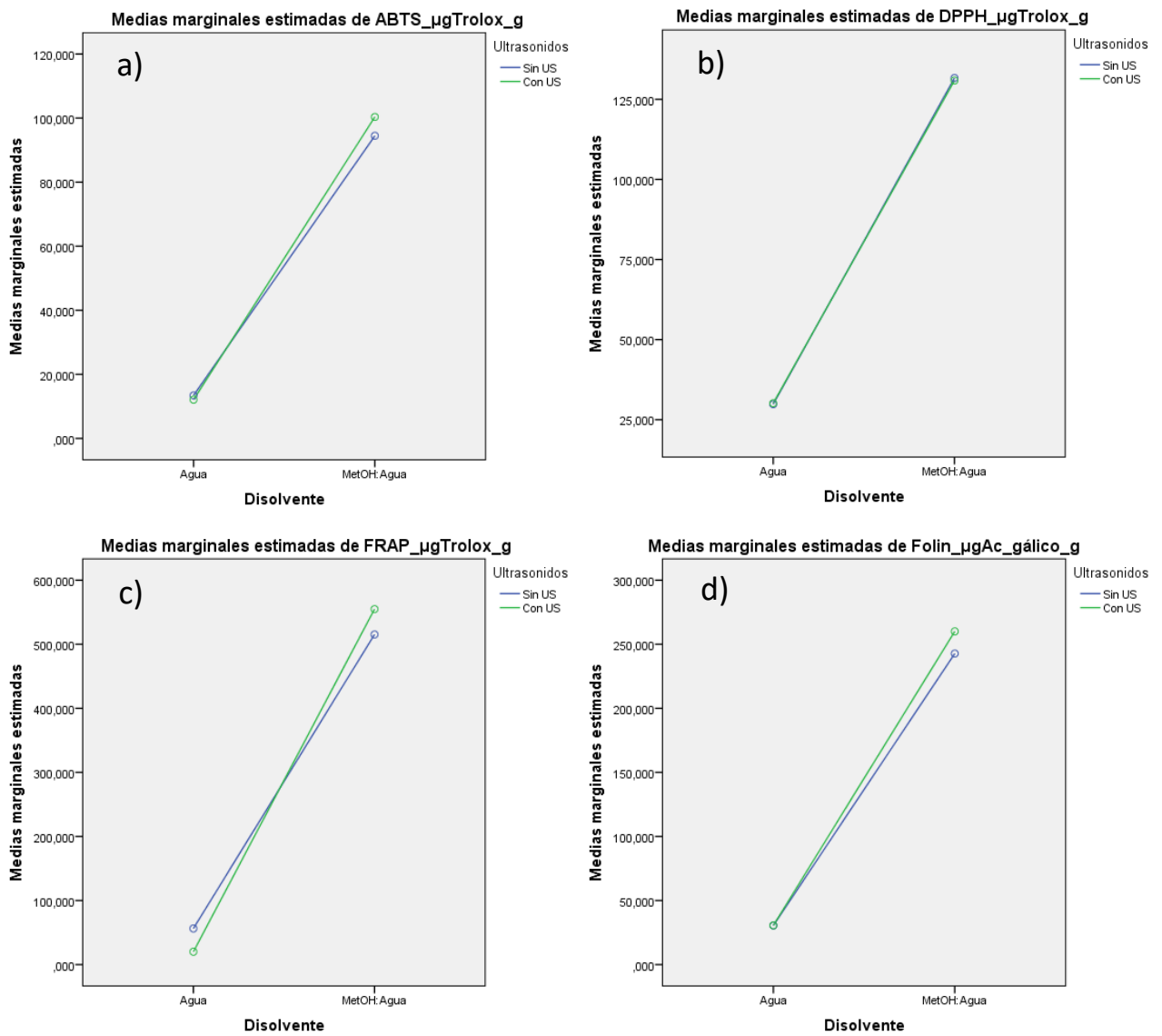


Figura 23. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin.

Tabla 18. Resultados del ANOVA aplicado a los datos de capacidad antioxidante y contenido fenólico total para fracción 2 (F2) obtenida con los diferentes métodos de extracción analizados

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ABTS_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	92166,484 ^a	3	30722,161	1919,881	,000
Interceptación	229295,084	1	229295,084	14329,044	,000
Disolvente	92161,427	1	92161,427	5759,326	,000
Ultrasonidos	4,675	1	4,675	,292	,591
Disolvente * Ultrasonidos	,382	1	,382	,024	,878
Error	1088,144	68	16,002		
Total	322549,712	72			
Total corregido	93254,628	71			

a. R al cuadrado = ,988 (R al cuadrado ajustada = ,988)

Variable dependiente: DPPH_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	136143,580 ^a	3	45381,193	2158,704	,000
Interceptación	556079,720	1	556079,720	26451,740	,000
Disolvente	136131,283	1	136131,283	6475,527	,000
Ultrasonidos	10,873	1	10,873	,517	,475
Disolvente * Ultrasonidos	1,424	1	1,424	,068	,795
Error	1429,525	68	21,022		
Total	693652,825	72			
Total corregido	137573,105	71			

a. R al cuadrado = ,990 (R al cuadrado ajustada = ,989)

Variable dependiente: FRAP_μgTrolox_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	7703736,02 ^a	3	2567912,006	8049,216	,000
Interceptación	10980007,27	1	10980007,27	34417,243	,000
Disolvente	7550505,174	1	7550505,174	23667,341	,000
Ultrasonidos	7256,125	1	7256,125	22,745	,000
Disolvente * Ultrasonidos	145974,720	1	145974,720	457,563	,000
Error	21693,792	68	319,026		
Total	18705437,09	72			
Total corregido	7725429,811	71			

a. R al cuadrado = ,997 (R al cuadrado ajustada = ,997)

Variable dependiente: Folin_μgAc_gálico_g

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	1002270,34 ^a	3	334090,115	975,499	,000
Interceptación	1910011,840	1	1910011,840	5576,980	,000
Disolvente	996163,460	1	996163,460	2908,665	,000
Ultrasonidos	2784,272	1	2784,272	8,130	,006
Disolvente * Ultrasonidos	3322,612	1	3322,612	9,702	,003
Error	23288,733	68	342,481		
Total	2935570,917	72			
Total corregido	1025559,077	71			

a. R al cuadrado = ,977 (R al cuadrado ajustada = ,976)

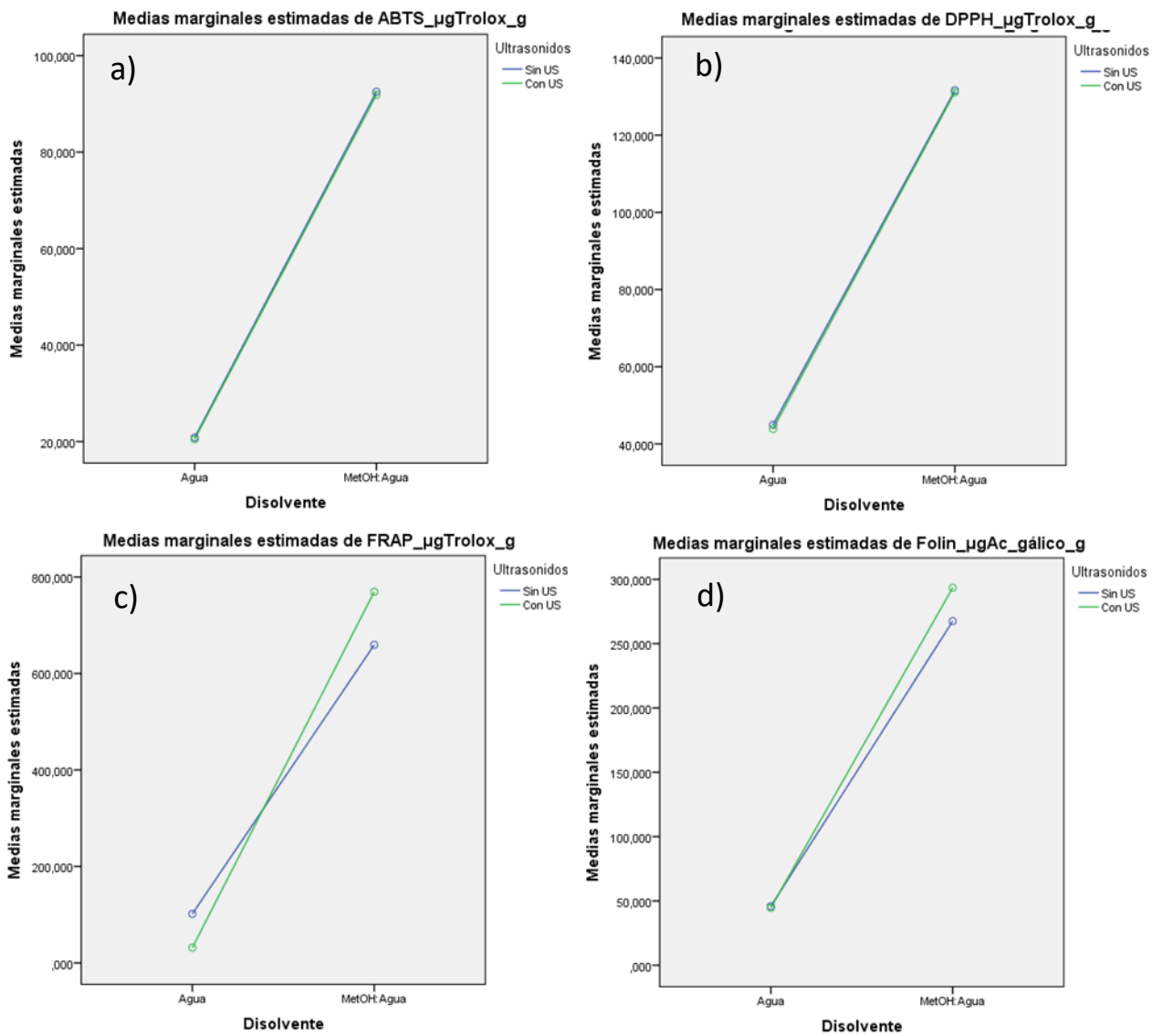


Figura 24. Representación gráfica de valores medios obtenidos en cada ensayo. a) ABTS, b) DPPH, c) FRAP y d) Folin.

ANEXO 3: Matriz de correlaciones de Pearson entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante

Tabla 19. Matriz de correlaciones de Pearson en el extracto total (ET)

		Correlaciones			
		ABTS_μgTrolox_g	DPPH_μgTrolox_g	FRAP_μgTrolox_g	Folin_μgAc_gálico_g
ABTS_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	1	,993**	,976**	,966**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	72	72	72	72
DPPH_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,993**	1	,988**	,963**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	72	72	72	72
FRAP_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,976**	,988**	1	,956**
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	72	72	72	72
Folin_μgAc_gálico_g	Correlación de Pearson	,966**	,963**	,956**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	72	72	72	72

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 20. Matriz de correlaciones de Pearson en la fracción 1 (F1)

		Correlaciones			
		ABTS_μgTrolox_g	DPPH_μgTrolox_g	FRAP_μgTrolox_g	Folin_μgAc_gálico_g
ABTS_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	1	,994**	,995**	,994**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	72	72	72	72
DPPH_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,994**	1	,992**	,988**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	72	72	72	72
FRAP_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,995**	,992**	1	,992**
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	72	72	72	72
Folin_μgAc_gálico_g	Correlación de Pearson	,994**	,988**	,992**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	72	72	72	72

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 21. Matriz de correlaciones de Pearson en la fracción 2 (F2)

		Correlaciones			
		ABTS_μgTrolox_g	DPPH_μgTrolox_g	FRAP_μgTrolox_g	Folin_μgAc_gálico_g
ABTS_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	1	,994**	,986**	,993**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	72	72	72	72
DPPH_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,994**	1	,984**	,981**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	72	72	72	72
FRAP_μgTrolox_g	Correlación de Pearson	,986**	,984**	1	,989**
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	72	72	72	72
Folin_μgAc_gálico_g	Correlación de Pearson	,993**	,981**	,989**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	72	72	72	72

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

ANEXO : Muestras de los extractos analizadas mediante ABTS, DPPH, FRAP y Folin.

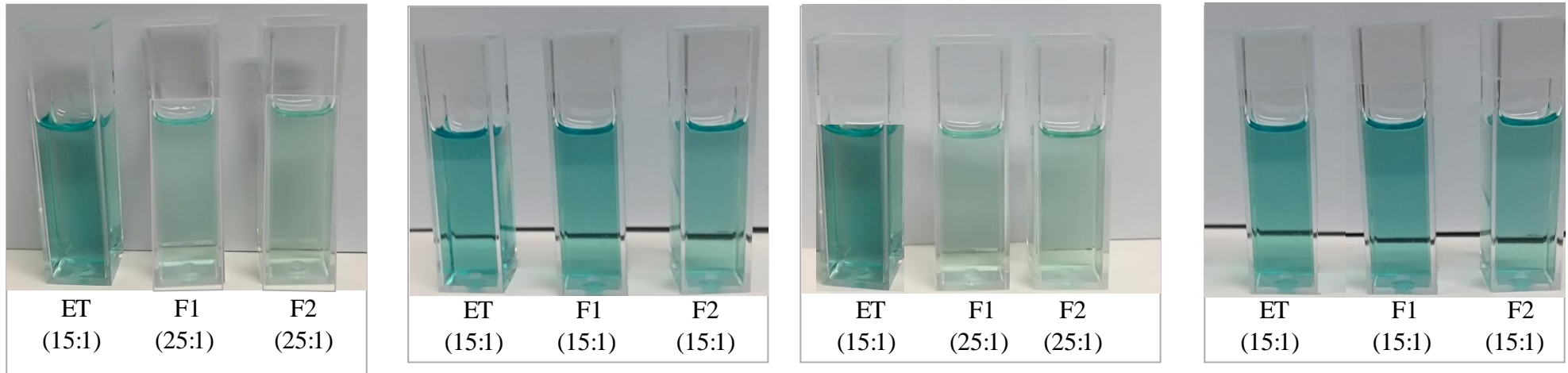


Figura 25. Extractos analizados mediante el método ABTS. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos.

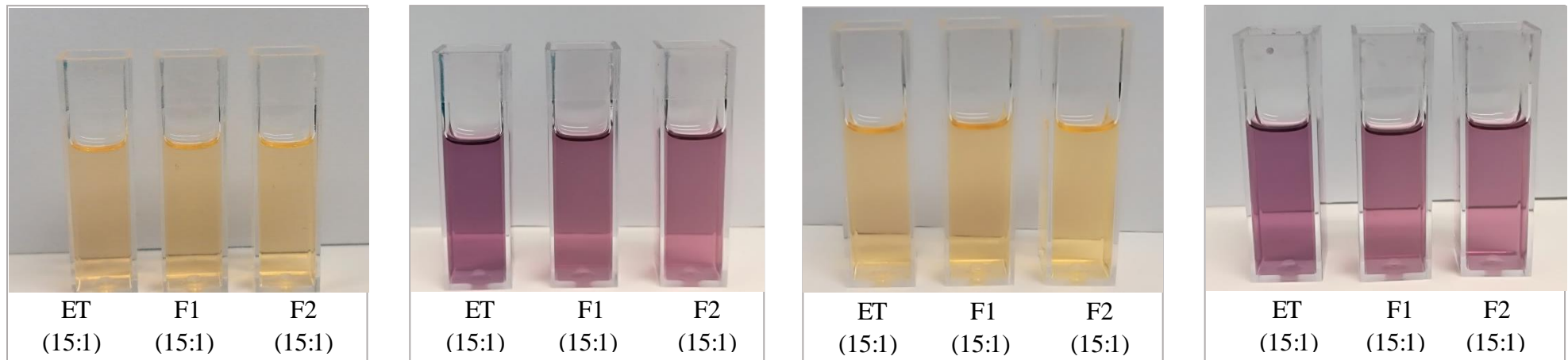


Figura 26. Extractos analizados mediante el método DPPH. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos.

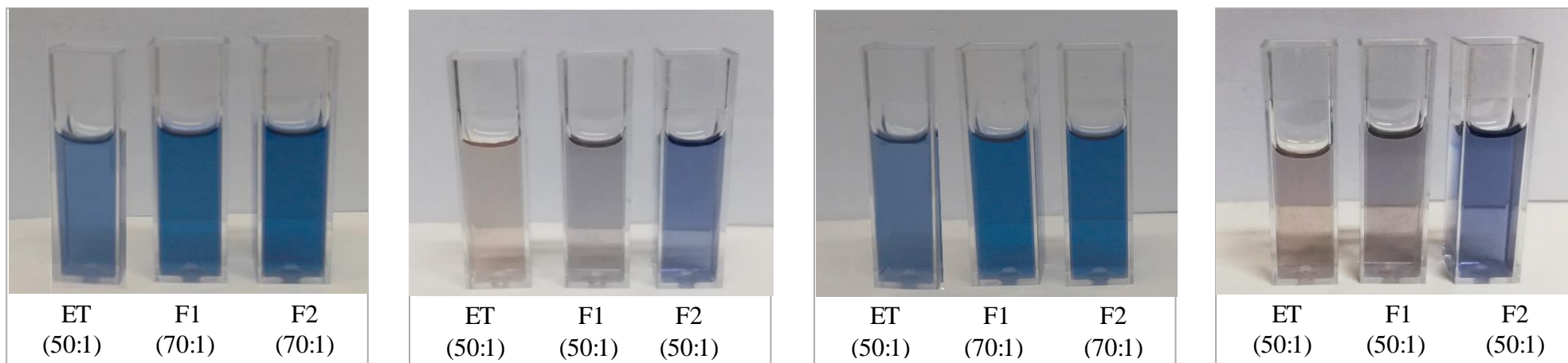


Figura 27. Extractos analizados mediante el método FRAP. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos.

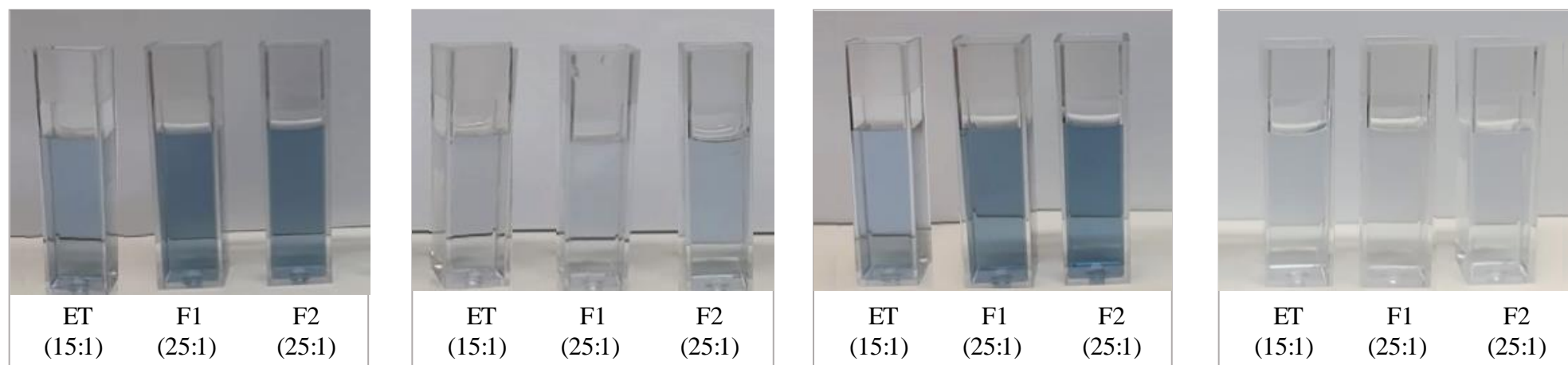


Figura 28. Extractos analizados mediante el método Folin. a) Extracción con metanol:agua al 50 %, b) extracción con agua, c) extracción con metanol:agua al 50 % + ultrasonidos y d) extracción con agua + ultrasonidos.

