

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

*NEKAZARITZAKO GOI MAILAKO
ESKOLA TEKNIKOA*

Análisis de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa

presentado por / *k aurkeztua*

MARÍA JOSÉ CIMMINELLI

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

Septiembre, 2018 / Iraila, 2018

El trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria titulada “Análisis de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa” ha sido realizado en el Departamento de Ciencias de la Universidad Pública de Navarra, bajo la dirección de la Dra. Carmen Ancín Azpilicueta y la Dra. Nerea Jiménez Moreno.

Pamplona, 17 de septiembre de 2018

Fdo. Dra. Carmen Ancín Azpilicueta

Fdo. Dra. Nerea Jiménez Moreno

Resumen

La alcachofa es una fuente de compuestos fenólicos con propiedades beneficiosas para la salud, no solo en su parte comestible sino también en las partes desechadas por la industria. Estos residuos se componen de brácteas externas, tallos y hojas que representan entre un 80-85% de la planta y que dada su composición presentan actividad antioxidante. Teniendo en cuenta que, actualmente existe una creciente demanda de aditivos naturales, los subproductos de alcachofa podrían ser considerados como una fuente potencial de estos compuestos.

Los objetivos del presente trabajo fueron: (a) estudiar distintos métodos de extracción de compuestos fenólicos de residuos de alcachofa, así como (b) determinar la composición y la concentración de los compuestos fenólicos para cada método de extracción ensayado. Las muestras extraídas con metanol al 60% presentaron un contenido de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides significativamente mayor que las extraídas con agua. La aplicación de ultrasonidos aumentó significativamente las concentraciones de ácido clorogénico, cinarina y luteolina-7-O-glucósido de las muestras tratadas con metanol al 60%, mientras que, en las extraídas con agua, incrementó levemente el contenido de apigenina y disminuyó el de narirutina. La presencia de compuestos antioxidantes en los residuos de alcachofa podría ser considerada como una fuente potencial para el reemplazo de antioxidantes sintéticos por naturales.

Palabras clave:

Antioxidantes, alcachofa, subproductos, extracción, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides.

Abstract

Artichokes are a source of phenolic compounds with beneficial health properties, not only from its consumable parts, but also from the residues disposed of during its production. These remainders are composed of the outer bracts, stems and leaves, which represent somewhere from 80 to 85% of the plant and which composition has demonstrated to have antioxidant properties. Taking into account the growing need for nutritional additives, artichoke residues could be considered as a potential source to obtain these nutritional additives.

The research objectives were: (a) study diverse methods of extracting phenolic compounds from artichoke residues, (b) determine the composition and concentration of the phenolic compounds for each method. Samples extracted using 60% methanol yielded significantly more hydroxycinnamic acids and flavonoids than samples extracted with water. The use of ultrasound yielded significantly increased the concentrations of chlorogenic acid, cynarins and luteolin-7-O-glycosides from samples extracted using 60% methanol, while in those extracted using water, it slightly increased the presence of apigenin and lowered the presence of narirutin. The presence of antioxidantizing compounds in artichoke residues could be considered as a potential source for replacing synthetic antioxidants.

Key words:

Antioxidant, artichoke, by-products, extraction, hydroxycinnamic acids, flavonoids.

Índice de contenido

1. Introducción	8
1.1. Origen de la oxidación. Importancia de los antioxidantes naturales	8
1.2. Antioxidantes en la alcachofa. Factores que afectan su concentración. Utilización en la industria agroalimentaria	11
1.3. Objetivos del trabajo	14
2. Materiales y métodos	16
2.1. Muestras	16
2.2. Extracción y cuantificación de antioxidantes en los residuos de alcachofa	17
2.2.1. Extracción de antioxidantes.....	17
2.2.2. Identificación y cuantificación de los antioxidantes presentes en las fracciones obtenidas por HPLC	19
2.3. Análisis estadístico	25
3. Resultados y discusión	26
3.1. Ácidos hidroxicinámicos presentes en los residuos de alcachofa.....	26
3.2. Flavonoides presentes en los residuos de alcachofa	30
4. Conclusiones	35
5. Bibliografía	36
6. Anexo de tablas y figuras	43

Índice de tablas

Tabla 1. Programa de gradiente de las fases A y B para separar los componentes de la fracción 1.	20
Tabla 2. Programa de gradiente de las fases A y B para separar los componentes de la fracción 2.	20
Tabla 3. Tiempo de retención y longitud de onda de los compuestos fenólicos.	21
Tabla 4. Concentración ($\bar{x} \pm s$) de ácidos hidroxicinámicos ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) presentes en los cuatro extractos obtenidos a partir de residuos de alcachofa ($n = 4$). ..	26
Tabla 5. Concentración ($\bar{x} \pm s$) de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) presentes en los cuatro extractos obtenidos a partir de residuos de alcachofa ($n = 4$).	31
Tabla 6. Contenido fenólico ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) en residuos de alcachofa extraídos con metanol:agua, con y sin ultrasonidos.	43
Tabla 7. Contenido fenólico ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) en residuos de alcachofa extraídos con agua, con y sin ultrasonidos.	44
Tabla 8. Resultados del ANOVA de un factor con cuatro modalidades aplicado a cada uno de los compuestos fenólicos analizados.	50
Tabla 9. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para el ácido clorogénico.	50
Tabla 10. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la cinarina.	51
Tabla 11. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina.	51
Tabla 12. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina-7-O-glucósido.	51
Tabla 13. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina-7-O-rutinósido.	52
Tabla 14. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina.	52
Tabla 15. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina-7-O-glucósido.	52
Tabla 16. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina-7-O-rutinósido.	52
Tabla 17. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la narirutina.	53
Tabla 18. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la naringenina-7-O-glucósido.	53

Índice de figuras

Fig. 1 Esquema general del mecanismo de oxidación, donde RH: ácido graso insaturado; R•: radical libre; ROO•: radical peróxido y ROOH: hidroperóxido. Fuente: Ramalho & Neuza (2006).	9
Fig. 2 Esquema del proceso de preparación de la muestra para la extracción de antioxidantes.....	17
Fig. 3 Métodos empleados en la extracción de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa.....	18
Fig. 4 Fraccionamiento y purificación del extracto para analizar por HPLC.....	19
Fig. 5 Recta de calibrado del ácido clorogénico.....	22
Fig. 6 Recta de calibrado de la luteolina.	22
Fig. 7 Cromatograma de la disolución patrón de ácidos hidroxicinámicos. Donde: 1, ácido clorogénico; 2, ácido cafeico y 3, cinarina.	23
Fig. 8 Cromatograma de la disolución patrón de flavonoides. Donde: 4, luteolina-7-O-rutinósido; 5, luteolina-7-O-glucósido; 6, narirutina; 7, naringenina-7-O-glucósido; 8, apigenina-7-O-rutinósido; 9, apigenina-7-O-glucósido; 10, luteolina y 11, apigenina..	23
Fig. 9 Cromatograma correspondiente a los ácidos hidroxicinámicos presentes en los residuos de alcachofa. Donde: 1, ácido clorogénico; 3, cinarina.	24
Fig. 10 Cromatograma correspondiente a los flavonoides presentes en los residuos de alcachofa. Donde: 4, luteolina-7-O-rutinósido; 5, luteolina-7-O-glucósido; 7, naringenina-7-O-glucósido; 8, apigenina-7-O-rutinósido; 9, apigenina-7-O-glucósido; 10, luteolina y 11, apigenina.....	24
Fig. 11 Contenido total de ácidos hidroxicinámicos ($\mu\text{g/g}$ residuo seco) obtenido según el método de extracción utilizado.....	27
Fig. 12 Contenido total de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ residuo seco) obtenido según el método de extracción utilizado.....	32
Fig. 13 Recta de calibrado del ácido cafeico.....	45
Fig. 14 Recta de calibrado de la cinarina.	45
Fig. 15 Recta de calibrado de la luteolina-7-O-glucósido.....	46
Fig. 16 Recta de calibrado de la luteolina-7-O-rutinósido.	46
Fig. 17 Recta de calibrado de la apigenina.....	47
Fig. 18 Recta de calibrado de la apigenina-7-O-glucósido.	47
Fig. 19 Recta de calibrado de la apigenina-7-O-rutinósido.....	48

Fig. 20 Recta de calibrado de la narirutina.....	48
Fig. 21 Recta de calibrado de la naringenina-7-O-glucósido.....	49

1. Introducción

La alcachofa es una fuente de compuestos bioactivos, con propiedades beneficiosas para la salud, no solo en su parte comestible sino también en las partes desechadas por la industria. La extracción de estos compuestos permitiría obtener antioxidantes naturales importantes para reemplazar el uso de antioxidantes sintéticos. Factores como la variedad, el momento de plantación y el momento de cosecha deben considerarse para optimizar el contenido de polifenoles totales (PT) y favorecer así la producción de alimentos saludables de alta calidad y con alto valor añadido.

1.1. Origen de la oxidación. Importancia de los antioxidantes naturales

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones, que se produce entre una sustancia que cede sus electrones a un agente oxidante que los recibe. Este último pasa a un estado reducido mientras que el dador adquiere la forma oxidada (González Jamanca & Alfaro Cruz, 2017). Durante los procesos metabólicos que ocurren en el organismo, muchas moléculas orgánicas como gliceraldehído, cisteína, dopamina, adrenalina se oxidan formando especies reactivas del oxígeno (ROS) como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estos radicales libres son especies muy reactivas e inestables que presentan uno o más electrones desapareados y, por lo tanto, requieren de otro electrón para completar su orbital y adquirir un estado estable (Willcox et al., 2004). Por esta razón, atacan principalmente a macromoléculas como hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, generando daño y disrupción del equilibrio celular (Young & Woodside, 2001). Las reacciones que se producen durante la oxidación pueden clasificarse en tres etapas (Figura 1) (Corrales & Ariza Muñoz, 2012):

- **Iniciación:** formación de un radical libre (R^{\cdot}) a partir de moléculas no radicales.
- **Propagación:** formación de radicales libres por reacción entre moléculas estables y los radicales libres generados en la etapa de iniciación.
- **Terminación:** reacción química de neutralización entre dos radicales libres que genera un producto estable.

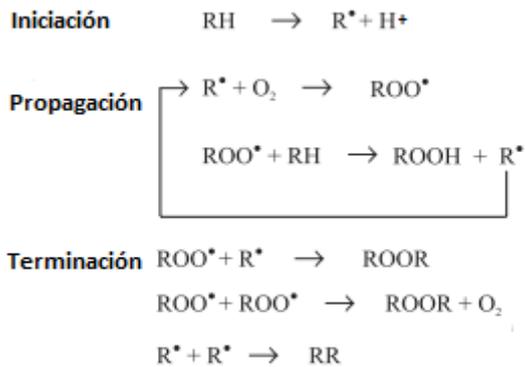


Fig. 1 Esquema general del mecanismo de oxidación, donde RH: ácido graso insaturado; R•: radical libre; ROO•: radical peróxido y ROOH: hidroperóxido. Fuente: Ramalho & Neuza (2006).

Los radicales libres, también se producen en el organismo por vía enzimática, durante el proceso de respiración, la síntesis de prostaglandinas y la fagocitosis. Los factores medioambientales como, la exposición a los rayos X, el ozono, el tabaquismo, los contaminantes del aire y los productos químicos industriales, también favorecen la producción de radicales libres (Lobo et al., 2010).

Aunque la presencia de ROS contribuye como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, cuando en el organismo se genera un desequilibrio entre la producción de ROS y los antioxidantes, se producen condiciones de estrés oxidativo generando daño celular irreversible (Punchard & Kelly, 1996; Salem et al., 2015). Las especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres como las especies nitrogenadas, comienzan reacciones en cadena que favorecen la iniciación y progresión de una gran cantidad de enfermedades principalmente neurodegenerativas y de inflamación crónica (Gutteridge & Halliwell, 2000). Por esta razón es importante que los niveles de antioxidantes en el organismo sean adecuados.

Los antioxidantes son moléculas que actúan retardando o previniendo la oxidación de otras moléculas, con el fin de evitar el daño celular. Principalmente interaccionan con especies reactivas del oxígeno, evitando que ataquen estructuras del organismo como el ADN, las membranas plasmáticas y las proteínas, retardando así el envejecimiento celular y el desarrollo de enfermedades degenerativas (Young & Woodside, 2001). En el organismo existen diversos grupos de antioxidantes que actúan como mecanismo de defensa ante el daño oxidativo generado por los radicales libres. La primera línea de defensa la constituyen proteínas y peroxidasas consideradas como antioxidantes preventivos, ya que actúan como quelantes de los metales e inhiben la formación de ROS

y radicales libres (Charles, 2013). Otro mecanismo de defensa se compone de antioxidantes que secuestran los radicales libres inhibiendo la etapa de iniciación de las reacciones de oxidación y por tanto previniendo las etapas de propagación y terminación. Dentro de este grupo de antioxidantes se encuentran la vitamina C y la vitamina E (Willcox et al., 2004). Una última línea de defensa del organismo se compone de enzimas como las proteasas, lipasas, enzimas reparadoras del ADN y transferasas encargadas de regenerar los tejidos y las membranas dañadas durante el estrés oxidativo (Niki, 1997).

En el organismo, los antioxidantes pueden proceder de síntesis endógena, como la catalasa y la superóxido dismutasa, enzimas responsables de la conversión de H_2O_2 en O_2 y H_2O y del $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 , respectivamente, o a través de la dieta. El consumo de ciertos alimentos como frutas y vegetales ricos en algunos antioxidantes naturales como vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles, pertenecen a la segunda línea del sistema de defensa del organismo y actúan inhibiendo las reacciones en cadena (Garbetta et al., 2014; Nimse & Pal, 2015). También se ha observado la presencia de antioxidantes en otros alimentos como especias, té, café y cacao. Diversos estudios epidemiológicos han concluido que el consumo de estos productos de origen vegetal está asociado con una disminución de la mortalidad y del riesgo de padecer enfermedades crónicas (Eberhardt et al., 2000; Ganesan et al., 2011).

En los alimentos, los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético. Las principales familias de antioxidantes naturales son las vitaminas, los carotenoides y polifenoles como los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos. Los polifenoles son los antioxidantes predominantes en la alcachofa, y su mecanismo de acción se basa en la eliminación de radicales libres, por medio de la producción de un radical estable o en la formación de complejos con el hierro y el cobre, principales catalizadores de las reacciones de oxidación (Nimse & Pal, 2015). Ambos mecanismos evitan la formación de ROS y en consecuencia el daño oxidativo.

Los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), el galato de propilo (PG) y la terbutilhidroquinona (TBHQ) son muy utilizados en la industria alimentaria debido a su alta estabilidad, bajo coste, efectividad a bajas concentraciones y otras ventajas prácticas (Namiki, 1990; Bernal-Gómez et al., 2003). Sin embargo, existe cierto rechazo a estos compuestos, no sólo porque al ser aditivos sintéticos son percibidos como de calidad inferior sino también por su posible toxicidad. Si bien se ha informado que el empleo de bajas concentraciones de BHA y BHT no estaría

asociado con efectos cancerígenos en humanos (Botterweck et al., 2000), la agencia para la investigación del cáncer (IARC) ha concluido que existe evidencia científica de carcinogénesis en animales de experimentación, a los que se suministró BHA, pero que no hay evidencia suficiente para el BHT (IARC, 1986). No obstante, deben tenerse en cuenta las diferencias metabólicas entre animales y humanos, así como que la dosis de estos antioxidantes empleada en la dieta de los animales es superior a la utilizada habitualmente en alimentos (Botterweck et al., 2000).

Actualmente existe una creciente demanda de aditivos de fuentes naturales. Por lo que la sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales podría ser una alternativa, ya que no presentan efectos perjudiciales para la salud y su efecto para inhibir la oxidación es equivalente o mayor (Namiki, 1990). Por esta razón, resulta de interés recuperar los compuestos fenólicos que se hallan presentes en los residuos vegetales (Pandino et al., 2011). La sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales presentaría diferentes beneficios. Los antioxidantes naturales son más seguros para la salud y presentan diversas características de solubilidad, lo que permitiría aplicarlos en diferentes alimentos. Además, su extracción a partir de residuos sólidos de la industria reduciría la contaminación ambiental y tendría un impacto positivo en la economía (Dabbou et al., 2015).

1.2. Antioxidantes en la alcachofa. Factores que afectan su concentración. Utilización en la industria agroalimentaria

La alcachofa (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) es una planta perenne herbácea nativa de la cuenca del mediterráneo. En esta región se concentra un 70% de su producción mundial (1,5 millones de toneladas por año). Italia es el principal país productor con alrededor de 365.991 t/año, seguido de Egipto, España y de Francia con 236.314, 185.796 y 45.914 t/año, respectivamente (FAO, 2016). La alcachofa es un alimento tradicional de la dieta mediterránea y representa una fuente de compuestos fenólicos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud. Por esta razón, la alcachofa está considerada una planta medicinal con acción farmacológica, dada su eficacia contra enfermedades digestivas y trastornos de circulación, disminución del nivel de triglicéridos, estimulación del sistema inmune y propiedades antioxidantes que protegen el organismo contra algunos tumores. Además, presenta propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas (Llorach et al., 2002; Saénz Rodríguez et al., 2002; Coinu et al., 2007; Salata & Gruszecki, 2010; Fantini et al., 2011).

La parte comestible de la planta se limita a las brácteas internas y al receptáculo, y se ha observado que su capacidad antioxidante es superior a la de otras verduras como espárragos, brócoli, espinaca y apio (Brat et al., 2006; Halvorsen et al., 2006). Por otra parte, las brácteas externas, tallo y hojas descartados por la industria, corresponden aproximadamente al 80-85% de la biomasa total del vegetal, y representan una fuente potencial de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (Pandino et al., 2013a). Esta capacidad antioxidante se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos y flavonoides) que se encuentran presentes en las distintas partes del vegetal (Fратиanni et al., 2007). Los principales ácidos hidroxicinámicos son el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico), la cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico) y el ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico). Los flavonoides más abundantes son la apigenina y derivados (apigenina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-rutinósido, apigenina-7-O-glucurónido), la luteolina y derivados (luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, luteolina-7-O-rutinósido, luteolina-7-O-malonilglucósido), la narirutina (naringenina-7-O-rutinósido) y naringenina-7-O-glucósido (Lattanzio et al., 2009; Lombardo et al., 2010; Pandino et al., 2011; Garbetta et al., 2014; Dabbou et al., 2015; Colantuono et al., 2017).

El contenido total de polifenoles y el perfil de los mismos no es uniforme en la planta, sino que varía en función de cada una de las partes que la componen (Pandino et al., 2011). También se ve afectado por la variedad, el momento de plantación y el momento de cosecha de la planta (Lattanzio et al., 2009; Garbetta et al., 2014). Así, Lombardo et al. (2010) observaron que independientemente del genotipo, las brácteas internas, el receptáculo y el tallo contenían las concentraciones de PT más elevadas (en promedio, 4991, 4809, 4200 mg/kg de materia seca, respectivamente) seguido de las brácteas externas (971 mg/kg de materia seca). Zuorro (2014), encontró que el contenido de PT expresado como miligramos de ácido gálico por g de residuo seco, fue mayor en el tallo ($16,36 \pm 0,85$ mg/g) que en las brácteas externas ($10,23 \pm 0,68$ mg/g). En contraposición, Dabbou et al. (2015) observaron que las brácteas externas presentaban mayor capacidad antioxidante total, seguida del tallo y de las hojas. Por el contrario, Pandino et al. (2011) analizaron la alcachofa y observaron que las hojas fueron la parte de la planta más rica en PT (457,7 nmol/g de materia seca) en comparación con el tallo que mostró un contenido de PT intermedio (272,7 nmol/g de materia seca), seguido del receptáculo y las brácteas que mostraron el menor contenido de PT (promedio de 215,8 nmol/g de materia seca).

En cuanto al perfil fenólico, Negro et al. (2012) identificaron 14 compuestos pertenecientes al grupo de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides cuando evaluaron 6 variedades de alcachofa. El ácido clorogénico y la cinarina eran los ácidos hidroxicinámicos predominantes mientras que la luteolina-7-O-rutinósido y luteolina-7-O-glucósido fueron los principales flavonoides. De las partes analizadas las hojas fueron las que presentaron mayor contenido de flavonoides mientras que los ácidos hidroxicinámicos predominaron en el receptáculo y en las brácteas. Pandino et al. (2011) evaluaron los distintos polifenoles, y encontraron que los flavonoides fueron los polifenoles predominantes en hojas (95%), brácteas (84%) y receptáculo (59%), y los ácidos hidroxicinámicos predominaron en el tallo con un 86% (235,5 nmol/g de materia seca).

Dabbou et al. (2015) evaluaron el perfil fenólico de los residuos de dos variedades de alcachofa y encontraron los ácidos 3-O-cafeoilquínico, 5-O-cafeoilquínico, 3,5-O-dicafeoilquínico, 1,5-O-dicafeoilquínico y monosuccinilcafeoilquínico y los flavonoides, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, luteolina-7-O-malonilglucósido, luteolina, apigenina-7-O-glucósido y apigenina. Estos resultados son semejantes a los observados en el estudio de Lombardo et al. (2010).

En lo que respecta a la influencia de la variedad en el contenido total de polifenoles y en la concentración de cada uno de ellos, Dabbou et al. (2015) analizaron la actividad antioxidante de las variedades 'Violet d'Hyères' y 'Blanc d'Oran' mediante el ensayo de ABTS y observaron que las brácteas de ambas variedades presentaron la mayor actividad antioxidante, seguida del tallo de la variedad 'Blanc d'Oran'. Sin embargo, las hojas de esta última variedad fueron las de menor capacidad antioxidante. Pandino et al. (2011) analizaron el contenido PT en las distintas partes de la planta de las variedades de alcachofa 'Violetto di Sicilia', 'Blanc Hyérois' y 'Tondo di Paestum'. La variedad 'Violetto di Sicilia' presentó un mayor contenido de PT en las brácteas, hojas y tallo mientras que la variedad 'Tondo di Paestum' presentó mayor contenido en el receptáculo. En todas las partes de la planta analizadas, la variedad 'Blanc Hyérois' fue la que presentó menor contenido de estos compuestos.

El momento de plantación y el momento de cosecha pueden contribuir a incrementar el contenido de antioxidantes dependiendo de la época en la que se realicen. Rouphael et al. (2017) evaluaron la influencia del tiempo de plantación en la capacidad antioxidante total y el contenido de polifenoles, y observaron que fueron mayores cuando la plantación

se realizó durante el mes de septiembre en comparación con la plantación en el mes de octubre. Lombardo et al. (2010) estudiaron el efecto del momento de cosecha en el contenido de PT y de polifenoles individuales en brácteas internas y externas, tallo y receptáculo de la alcachofa, y encontraron que el contenido de PT fue aproximadamente 16 veces mayor en la cosecha de primavera que en la de invierno, observando una diferencia marcada principalmente en el tallo. En ambos momentos de cosecha el componente más abundante en las brácteas internas, brácteas externas y receptáculo fue el flavonoide apigenina-7-O-glucurónido, representando entre el 60-64% del contenido de PT. El receptáculo tuvo el mayor contenido de polifenoles totales principalmente en la cosecha de primavera (9382 mg/kg de materia seca). Además, en la cosecha de primavera se detectaron compuestos que no estuvieron presentes durante la cosecha de invierno, como el ácido 1-O-cafeoilquínico (receptáculo), 3-O-cafeoilquínico, ácido cafeico y naringenina-7-O-glucósido (receptáculo), narirutina (brácteas internas, brácteas externas y receptáculo) y 1,5- y 3,5-O-dicafeoilquínico (brácteas internas y tallo). Estos resultados sugieren que debería tenerse en cuenta el tiempo de plantación y de cosecha para optimizar el contenido de antioxidantes, y poder desarrollar productos con mayor valor añadido. Sin embargo, son necesarios más trabajos que analicen el efecto de estas variables, así como también el mecanismo por el cual la acumulación de antioxidantes se favorece en un momento determinado.

La utilización de antioxidantes naturales procedentes de extractos vegetales tiene una amplia variedad de aplicaciones en la industria agroalimentaria, principalmente en alimentos de origen animal. Entre ellas destacan el uso de extractos y aceites esenciales de romero para prevenir la oxidación en carne de vacuno procesada (Sánchez-Escalante et al., 2003) y productos cárnicos cocidos a base de cerdo (Estévez et al., 2005). El uso de extracto de *Rosa canina* en hamburguesas de cerdo (Ganhao et al., 2010), la utilización de extracto de orégano y romero en yemas de huevo enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (Bernal-Gómez et al., 2003) y los extractos de la fruta tropical curuba en bebida fermentada con lactosuero (Sánchez et al., 2013).

1.3. Objetivos del trabajo

Por lo mencionado anteriormente, el alto contenido de compuestos bioactivos en la parte desechable de la alcachofa debería considerarse como una fuente de antioxidantes naturales importantes para la industria agroalimentaria. Este trabajo de fin de máster

presenta los siguientes objetivos (a) estudiar distintos métodos de extracción de compuestos fenólicos para poder optimizar dicha extracción (b) determinar la composición y la concentración de los compuestos fenólicos presentes en los residuos de la alcachofa.

2. Materiales y métodos

En este apartado, se describirá el proceso de obtención de las muestras, seguido de la metodología empleada para la extracción de los antioxidantes y su posterior identificación y cuantificación mediante análisis por HPLC.

2.1. Muestras

Las alcachofas enteras fueron adquiridas en un mercado de Navarra procedentes de la cosecha realizada en Tudela los meses de enero y febrero de 2017. Para la preparación de las muestras, se llevó a cabo el procedimiento que se muestra en la Figura 2. En primer lugar, las alcachofas enteras se lavaron con agua, se escurrieron y se secaron. Posteriormente se realizó una separación manual de la parte comestible (brácteas internas y receptáculo) y de la parte desechable (brácteas externas, tallo y hojas). Los residuos obtenidos se cortaron y se liofilizaron (Telstar, modelo Cryodos-50, España) con el fin de eliminar el contenido de agua. El extracto seco obtenido se trituró y homogeneizó en un molinillo de café y se almacenó congelado a -20 °C hasta su utilización.

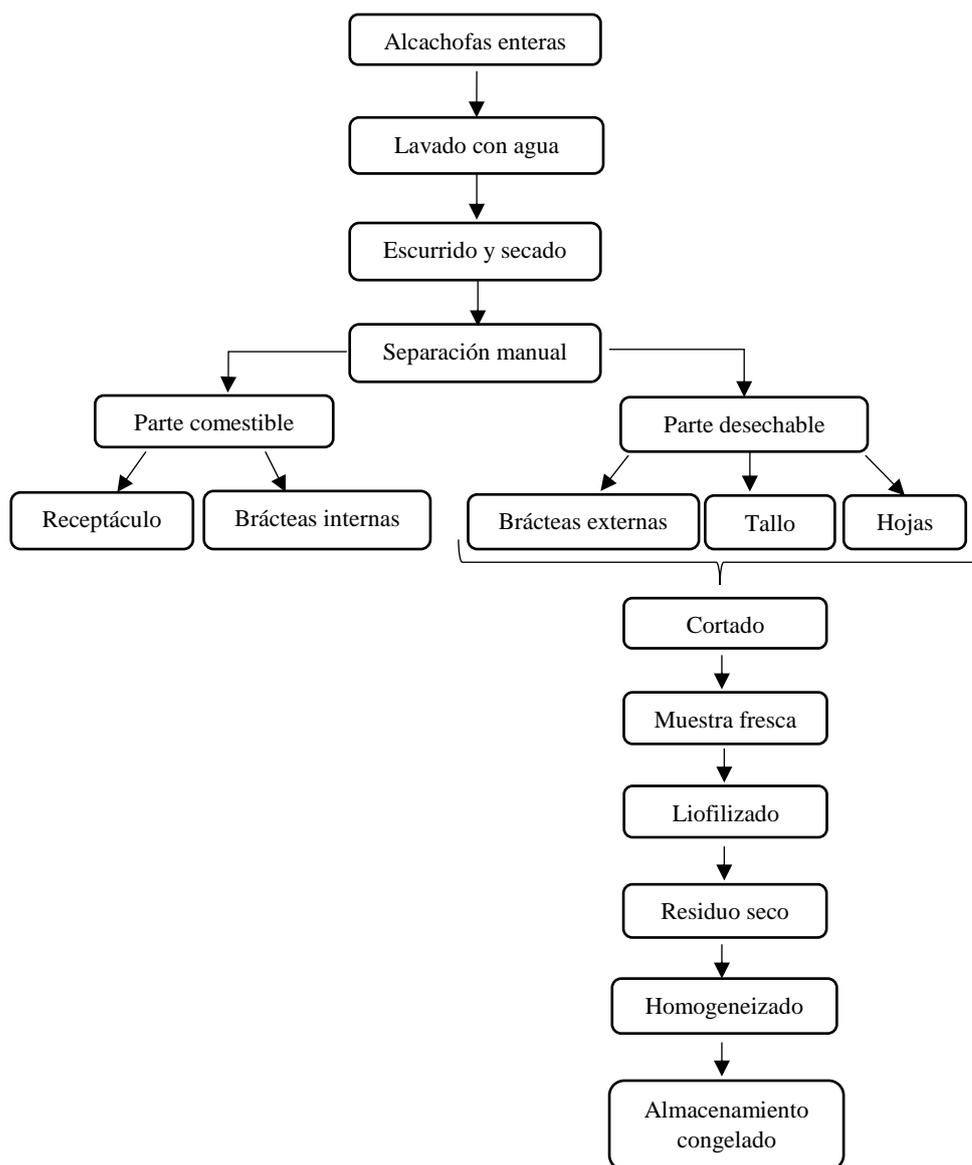


Fig. 2 Esquema del proceso de preparación de la muestra para la extracción de antioxidantes.

2.2. Extracción y cuantificación de antioxidantes en los residuos de alcachofa

2.2.1. Extracción de antioxidantes

Para el proceso de extracción de compuestos fenólicos se llevaron a cabo 4 métodos de extracción partiendo de residuo seco de subproductos de alcachofa (4g). Para ello se utilizaron 100 mL de agua y mezcla de metanol:agua (60:40 v/v). Por cada tipo de extractante se aplicaron dos tratamientos, uno con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y el otro de 30 minutos en baño de ultrasonidos (US) seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Por cada método de extracción empleado se realizaron dos repeticiones. En la Figura 3 se resumen los métodos utilizados.

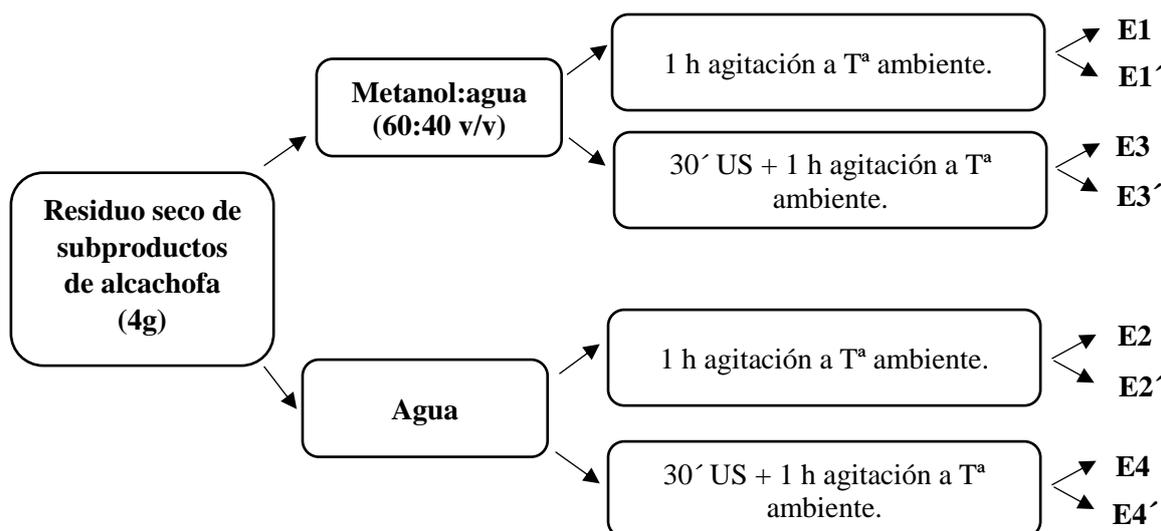


Fig. 3 Métodos empleados en la extracción de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa.

Posteriormente, los extractos obtenidos con metanol:agua se filtraron en un embudo Buchner con ayuda de un sistema de vacío mientras que las muestras de agua, dadas sus características, se centrifugaron (Thermo Scientific Sorvall ST 8) a 8000 rpm durante 15 min. En todos los casos, el sobrenadante obtenido se liofilizó. Como resultado de esta fase se obtuvo el extracto total. A continuación, el extracto se disolvió en agua MilliQ y se ajustó el pH a 7 mediante la adición de NaOH 2M. Posteriormente se centrifugó y se procedió a la purificación y fraccionamiento (ácidos hidroxicinámicos y flavonoides) de cada extracto mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) empleando un cartucho Chromabond C-18 (Scharlab S.L., Barcelona) previamente acondicionado (5 mL de metanol y 10 mL de agua MilliQ). Los ácidos hidroxicinámicos se extrajeron con 50 mL de metanol al 10% (fracción 1) y los flavonoides con 50 mL de metanol (fracción 2). Las fracciones recogidas se liofilizaron. A continuación, la fracción 1 y la fracción 2 se disolvieron con 4 mL y 1 mL de metanol:agua (50:50 v/v), respectivamente y se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC (Figura 4).

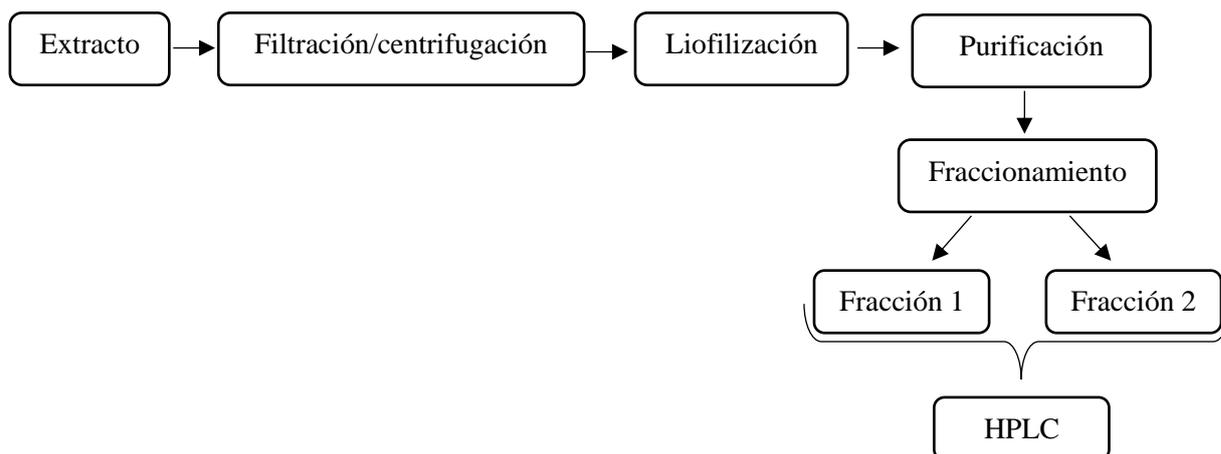


Fig. 4 Fraccionamiento y purificación del extracto para analizar por HPLC.

2.2.2. *Identificación y cuantificación de los antioxidantes presentes en las fracciones obtenidas por HPLC*

Los compuestos fenólicos presentes en las fracciones de los residuos de alcachofa se separaron por medio de HPLC usando un cromatógrafo equipado con dos bombas 515 y un inyector U6K (Waters Div., Milford, MA). Dado que estos compuestos presentan la propiedad de absorber en el espectro UV-visible a diversas longitudes de onda, para su identificación y cuantificación se utilizó un detector Photodiode Array 996 programado a diferentes longitudes de onda para compuestos individuales (de 200 a 600 nm). Se utilizó una columna de fase reversa (Phenomenex Synergi HidroRP, 150 x 3 mm y tamaño de partícula de 4 μm) estabilizada a 25 $^{\circ}\text{C}$. El control del cromatógrafo y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo con el software Empower 2.0.

Para la separación de los compuestos de ambas fracciones se utilizó el método de Lombardo et al. (2010) con alguna modificación. Se emplearon dos fases móviles, A (2% v/v de ácido acético en agua) y B (mezcla 50:50 v/v de acetonitrilo y ácido acético al 0,5%) empleando un programa de gradiente para la fracción 1 (Tabla 1) y otro para la fracción 2 (Tabla 2). El caudal fue de 1 mL/min, el volumen de muestra inyectado fue de 10 μL y el tiempo total de análisis fue de 90 min para la fracción 1 y de 100 min para la fracción 2. Todas las muestras se analizaron por duplicado, y entre cada análisis se realizó una limpieza de la columna con metanol. Todos los reactivos empleados fueron de la marca Scharlau calidad HPLC.

Tabla 1. Programa de gradiente de las fases A y B para separar los componentes de la fracción 1.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	90	10
20	82	18
30	76	24
45	70	30
65	70	30
70	45	55
75	0	100
83	0	100
85	90	10
90	90	10

Tabla 2. Programa de gradiente de las fases A y B para separar los componentes de la fracción 2.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	90	10
30	82	18
40	76	24
55	70	30
75	70	30
80	45	55
85	0	100
93	0	100
95	90	10
100	90	10

La identificación de los compuestos se realizó mediante el procedimiento de doble coincidencia. Por un lado, se utilizó el espectro UV-visible característico de la longitud de onda de cada compuesto, y, por otro lado, el tiempo de retención de su correspondiente estándar (Tabla 3). Todos los estándares usados fueron de la marca Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Tabla 3. Tiempo de retención y longitud de onda de los compuestos fenólicos.

Compuesto antioxidante	Tiempo de retención (minutos)	Longitud de onda (nm)
Ácido clorogénico	15,4	320
Ácido cafeico	17,8	320
Cinarina	29,7	320
Luteolina-7-O-rutinósido	59,1	350
Luteolina-7-O-glucósido	59,6	350
Narirutina	62,3	280
Naringenina-7-O-glucósido	64,5	280
Apigenina-7-O-rutinósido	70,9	330
Apigenina-7-O-glucósido	73,6	330
Luteolina	86,9	350
Apigenina	88,8	330

La cuantificación de los antioxidantes se llevó a cabo utilizando recta de calibrado para cada compuesto analizado. Cada recta se construyó empleando 5 concentraciones (5, 20, 50, 100 y 200 mg/L) del patrón correspondiente. A modo de ejemplo se presenta la recta de calibrado de un compuesto hidroxicinámico (Figura 5) y de un compuesto flavonoide (Figura 6). Las rectas de calibrado del resto de los compuestos se pueden consultar en el Anexo (Figuras 12 a 20). En las Figuras 7 y 8 se pueden observar los cromatogramas obtenidos a partir de la disolución patrón de 200 mg/mL de los ácidos hidroxicinámicos y de los flavonoides, respectivamente.

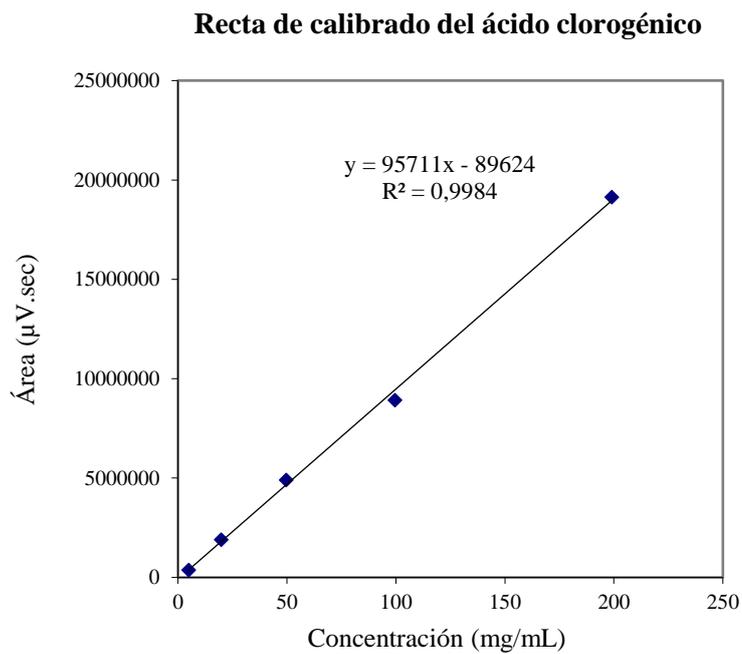


Fig. 5 Recta de calibrado del ácido clorogénico.

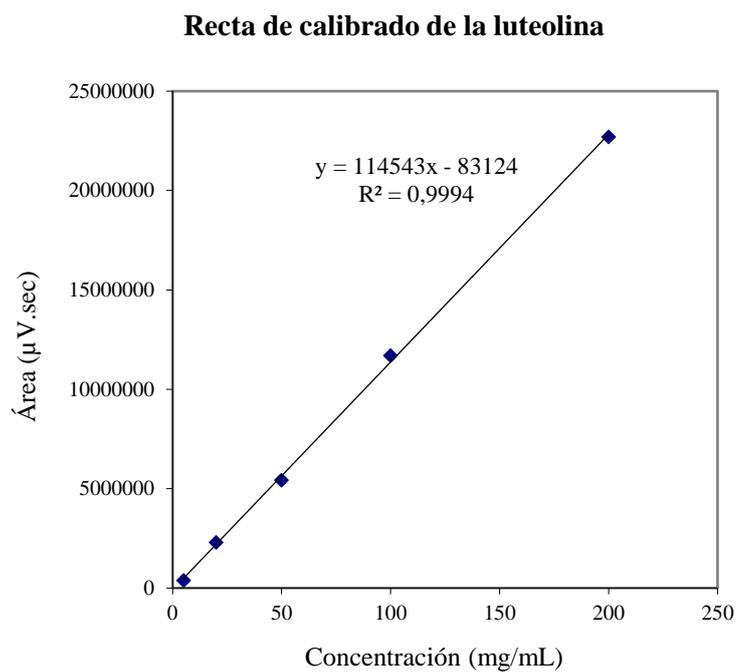


Fig. 6 Recta de calibrado de la luteolina.

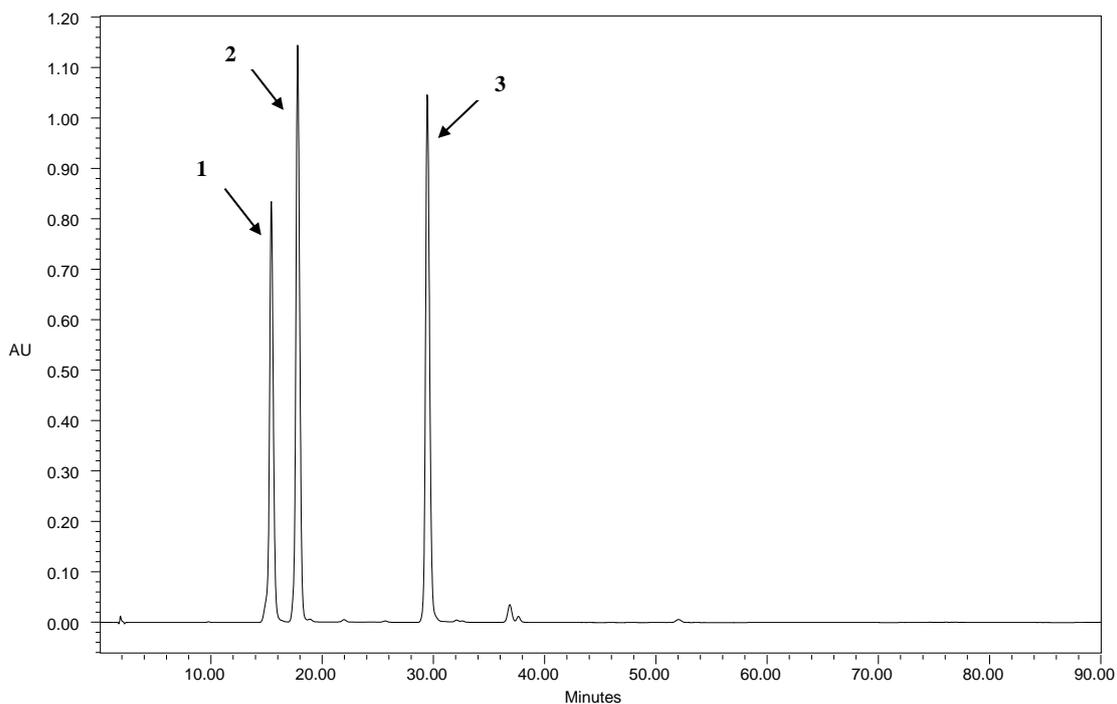


Fig. 7 Cromatograma de la disolución patrón de ácidos hidroxicinámicos. Donde: 1, ácido clorogénico; 2, ácido cafeico y 3, cinarina.

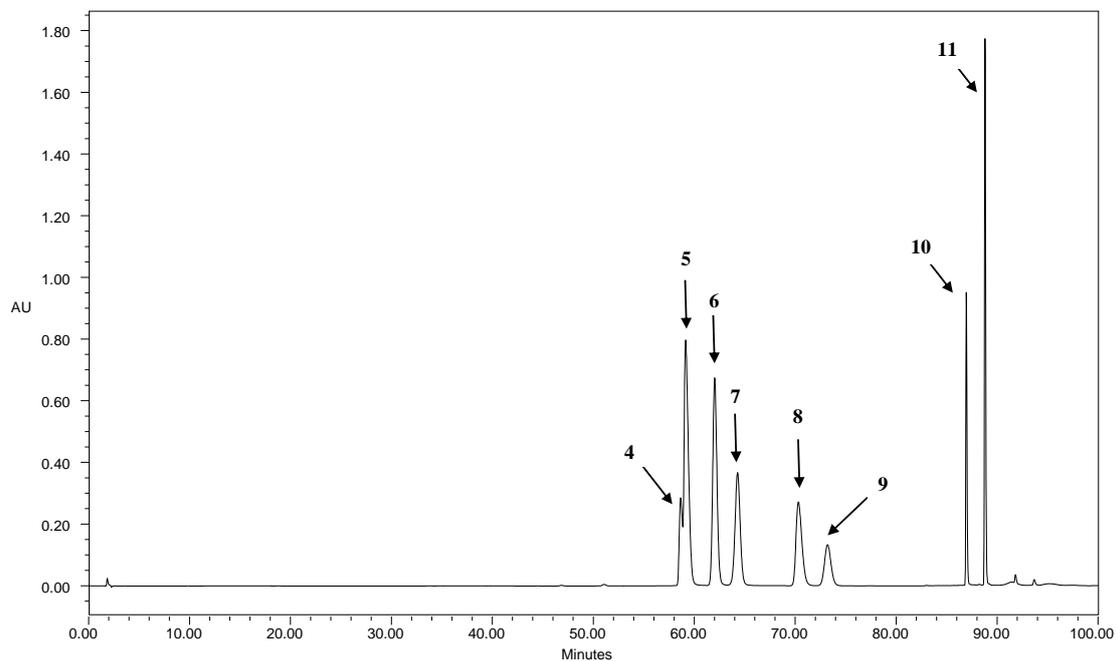


Fig. 8 Cromatograma de la disolución patrón de flavonoides. Donde: 4, luteolina-7-O-rutinósido; 5, luteolina-7-O-glucósido; 6, narirutina; 7, naringenina-7-O-glucósido; 8, apigenina-7-O-rutinósido; 9, apigenina-7-O-glucósido; 10, luteolina y 11, apigenina.

Por último, en las Figuras 9 y 10 se muestran dos cromatogramas obtenidos a partir de muestras de residuos de alcachofa, donde se pueden observar los compuestos

antioxidantes encontrados en la fracción 1 (ácidos hidroxicinámicos) y en la fracción 2 (flavonoides), respectivamente.

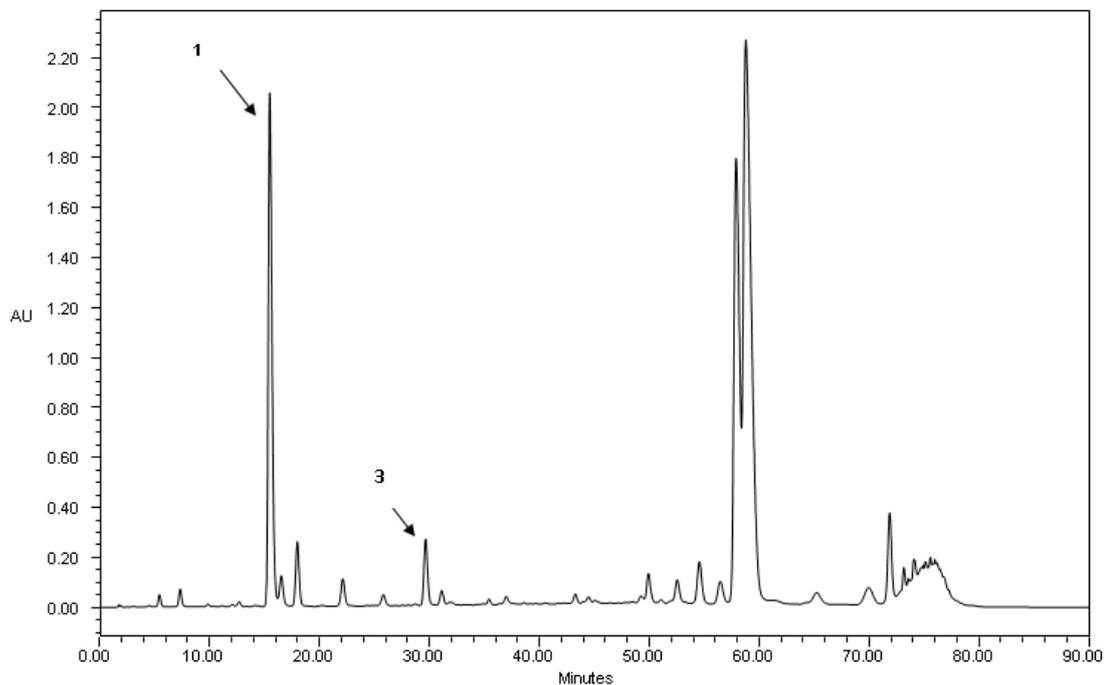


Fig. 9 Cromatograma correspondiente a los ácidos hidroxicinámicos presentes en los residuos de alcachofa. Donde: 1, ácido clorogénico; 3, cinarina.

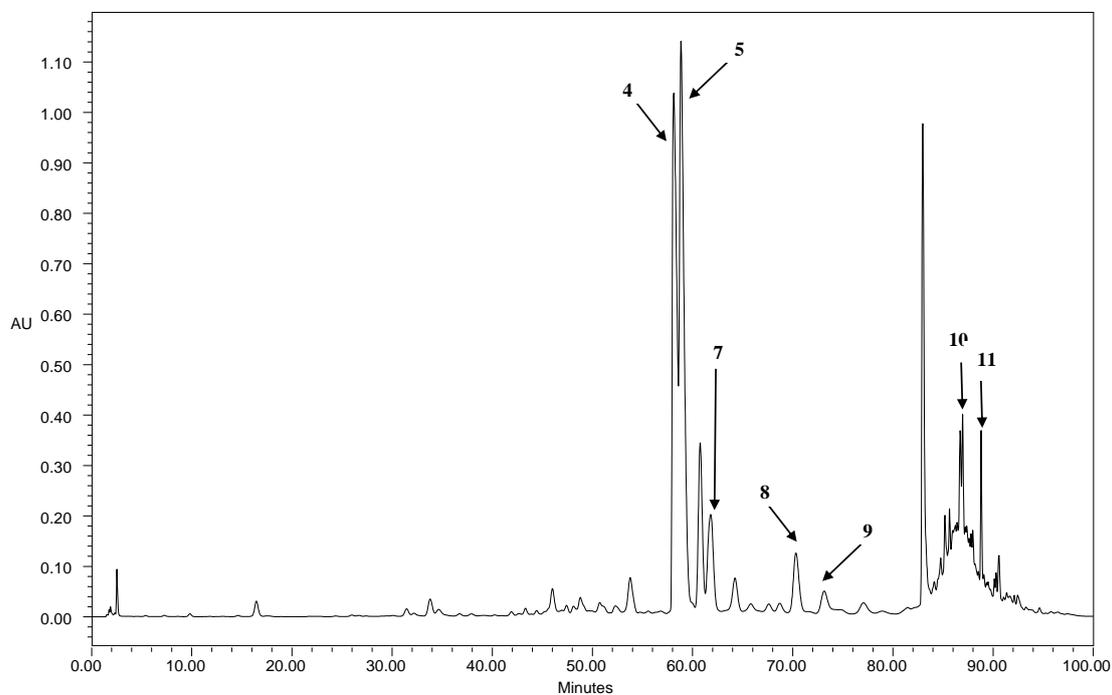


Fig. 10 Cromatograma correspondiente a los flavonoides presentes en los residuos de alcachofa. Donde: 4, luteolina-7-O-rutinósido; 5, luteolina-7-O-glucósido; 7, naringenina-7-O-glucósido; 8, apigenina-7-O-rutinósido; 9, apigenina-7-O-glucósido; 10, luteolina y 11, apigenina.

2.3. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se llevó a cabo un test ANOVA de un factor con 4 modalidades. Posteriormente, se realizó la prueba post hoc Ryan-Einot-Gabriel-Weisch F para determinar si había diferencias significativas entre los diferentes métodos de extracción en el perfil de antioxidantes ($p < 0,05$).

3. Resultados y discusión

En los siguientes apartados, se describirá el perfil de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos y flavonoides) presentes en los residuos de alcachofa según el método de extracción empleado.

3.1. Ácidos hidroxicinámicos presentes en los residuos de alcachofa

En la Tabla 4, se presenta el contenido medio de ácidos hidroxicinámicos encontrado en los residuos de alcachofa para cada método de extracción utilizado. En esta tabla se muestra también el resultado del análisis de la varianza. El análisis de ANOVA completo se adjunta en la Tabla 8 y las pruebas post hoc en las Tablas 9 y 10 disponibles en el Anexo. La concentración de cada compuesto fenólico obtenida en cada repetición del análisis de las muestras extraídas con metanol:agua y agua, se adjunta en las Tablas 6 y 7, respectivamente, del Anexo.

Tabla 4. Concentración ($\bar{X} \pm s$) de ácidos hidroxicinámicos ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) presentes en los cuatro extractos obtenidos a partir de residuos de alcachofa ($n = 4$).

Compuesto antioxidante	Extracción				F
	E1 (MetOH:H ₂ O)	E3 (MetOH:H ₂ O+US)	E2 (H ₂ O)	E4 (H ₂ O+US)	
Ácido cafeico	nd	nd	nd	nd	-
Ácido clorogénico	815 ± 50a	1006 ± 113b	10 ± 1c	8 ± 1c	289,798
Cinarina	9,8 ± 0,7a	12 ± 2b	nd	nd	120,634

Valores con letras diferentes en las filas son significativamente diferentes ($p < 0,05$)
nd, no detectado.

Como puede observarse en la Tabla 4, el perfil de los ácidos hidroxicinámicos varió de forma cualitativa y cuantitativa dependiendo del método de extracción utilizado, aunque la mayor eficiencia de extracción de los compuestos antioxidantes se obtuvo empleando la mezcla MetOH:H₂O. Esto puede observarse en la Figura 11, donde se presenta el contenido total de ácidos hidroxicinámicos obtenido según el método de extracción utilizado. En concordancia con estos resultados, Wang et al. (2003) observaron que el uso de MetOH:H₂O al 70% permitió extraer el mayor contenido de compuestos fenólicos presentes en la parte comestible y en las hojas de alcachofa. Asimismo, Llorach et al. (2002) observaron que el contenido fenólico total de subproductos de alcachofa extraído con metanol (15,42 g/100 g de extracto seco) fue superior al obtenido en agua (9,89 g/100 g de extracto seco). No obstante, en un estudio posterior, se encontró una

elevada concentración de compuestos fenólicos (100000 $\mu\text{g/g}$ de residuo seco) en extracto acuoso, aunque la muestra evaluada incluía residuos y partes comestibles (Llorach et al., 2005). En otros trabajos, se comparó la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos utilizando otros disolventes. Así, en el estudio de Zuorro et al. (2014) se observó que una mezcla de etanol:agua (50:50, v/v) permitió obtener mayor eficiencia de recuperación de compuestos fenólicos presentes en brácteas externas y tallos de alcachofa, que otros disolventes como lactato de etilo, acetona, etanol, agua y hexano. Según estos autores, las diferencias en la eficiencia de extracción se debieron principalmente a la mayor afinidad de los compuestos fenólicos por disolventes polares de bajo peso molecular como el etanol y el agua, lo cual facilitó la absorción del disolvente, provocando el hinchamiento del vegetal y en consecuencia la extracción de compuestos fenólicos ligados a la matriz. Contrariamente, Angelov et al. (2015) concluyeron que la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos presentes en tallos y hojas de alcachofa utilizando agua como disolvente (8,8 mg/g de materia fresca) es similar a la obtenida con concentraciones de etanol del 20, 50 y 70% (8,6; 8,5 y 8,3 mg/g de materia fresca, respectivamente) y que debido a su bajo coste sería más conveniente realizar este proceso con agua.

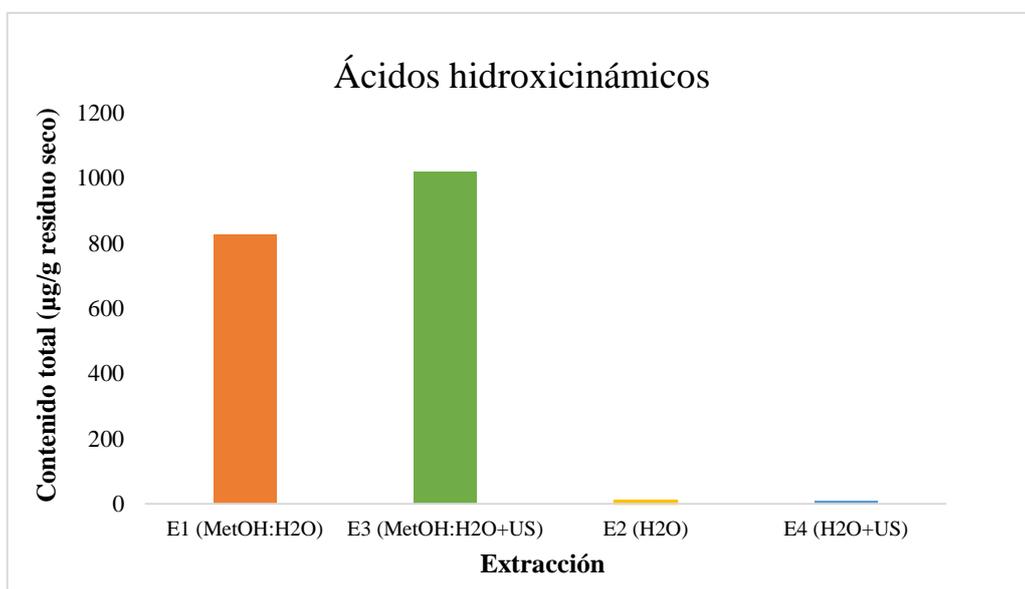


Fig. 11 Contenido total de ácidos hidroxicinámicos ($\mu\text{g/g}$ residuo seco) obtenido según el método de extracción utilizado.

Por otra parte, en nuestro trabajo, la aplicación de ultrasonidos permitió obtener concentraciones significativamente mayores de antioxidantes cuando se utilizó la mezcla MetOH:H₂O, aunque no se observaron diferencias significativas cuando se utilizó el agua

como disolvente. Estos mismos resultados se encontraron en el trabajo de Song et al. (2010), en el que se evaluó la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos de hojas de alcachofa con distintas concentraciones de metanol (20, 40, 60, 80 y 100%), etanol (50, 70 y 95%) y agua, junto con la aplicación de ultrasonidos. Los autores concluyeron que, dada la mayor concentración de compuestos fenólicos obtenidos, la mezcla MetOH:H₂O al 60% fue la más eficiente. Otros autores observaron que el uso de ultrasonidos mejora el proceso de extracción de compuestos bioactivos presentes en extractos vegetales deshidratados, ya que por un lado favorece la rehidratación del tejido y por otra parte provoca daño en la pared celular aumentando la adsorción del disolvente y el rendimiento de extracción (Toma et al., 2001; Soria & Villamiel, 2010). Además, la aplicación de tratamientos suaves de US no muestran cambios significativos en las propiedades estructurales/moleculares y en la funcionalidad de la mayoría de los compuestos bioactivos, siendo este un aspecto relevante en el caso de componentes de alimentos sensibles al calor, como es el caso de los antioxidantes (Soria & Villamiel, 2010). No obstante, si se aplica por tiempos prolongados, puede generar efectos negativos ocasionando colapso del material vegetal (Ngnitcho et al., 2017). Considerando que, los polifenoles actúan como antioxidantes primarios neutralizando los radicales libres (Grace, 2005), es de suma importancia optimizar su eficiencia de extracción.

En lo que respecta al análisis individual de los compuestos fenólicos de los residuos de alcachofa, el ácido cafeico no se detectó en ninguno de los extractos evaluados, esto concuerda con los resultados hallados por Lombardo et al. (2010) cuando evaluaron las brácteas externas y tallos de alcachofa. Sin embargo, en ese mismo estudio, se observó que algunos genotipos de alcachofa contenían ácido cafeico en las partes comestibles como el receptáculo y las brácteas internas. En el trabajo de Lutz et al. (2011), se detectó ácido cafeico en el corazón de alcachofa, aunque en baja concentración, y en el estudio de Nouraei et al. (2018), se observó que el ácido cafeico fue el compuesto predominante en la parte comestible de la alcachofa tratada con metanol:agua (80:20, v/v) encontrándose en una concentración de 275 mg/kg de extracto seco. Por el contrario, Schütz et al. (2004) no detectaron ácido cafeico en la parte comestible de la alcachofa pero sí en zumo y pulpa obtenido a partir de subproductos de alcachofa cuando emplearon una mezcla de agua:metanol 60% v/v como medio extractante. También se detectó este compuesto antioxidante en otras partes desechables de la planta. En el trabajo de Mulinacci et al. (2004), se encontró ácido cafeico (685 µg/g de residuo seco) en extracto

de hojas de alcachofa cuando se empleaba el método de extracción con agua y US pero no se detectó cuando se utilizaba una mezcla de etanol:agua 1:1 a 70 °C. En contraposición, Colla et al. (2013) no detectaron ácido cafeico en hojas de alcachofa de las variedades 'Romolo', 'Violetto di Provenza' y 'Violetto di Romagna'. Considerando que el ácido cafeico inhibe la proliferación de las células de cáncer de mama (Kampa et al., 2004) y del fibrosarcoma (Rajendra Prasad et al., 2011), y que actúa favorablemente en el metabolismo de la glucosa, suprimiendo la gluconeogénesis hepática y la hiperglucemia (Jackson et al., 2017) se requiere de más estudios para determinar con mayor exactitud el contenido de ácido cafeico en los residuos de alcachofa, así como para conseguir un método de extracción más eficiente para extraer este compuesto antioxidante.

El ácido clorogénico fue el ácido hidroxicinámico predominante en todas las extracciones estudiadas, obteniéndose un mayor rendimiento de extracción de este compuesto con la mezcla MetOH:H₂O que con agua (Tabla 4). Otros autores, Song et al. (2010) y Wang et al. (2003), observaron estos mismos resultados empleando concentraciones de metanol:agua similares a las utilizadas en este trabajo. En el estudio de Pasqualone et al. (2017), se analizó el perfil fenólico de residuos de alcachofa de la variedad 'Catanese', empleando como medio de extracción etanol:agua (30:70, v/v) con y sin aplicación de US, observándose que la concentración de compuestos fenólicos fue significativamente mayor cuando se aplicó US, y que independientemente del tratamiento empleado el ácido clorogénico fue el ácido hidroxicinámico predominante. También se observaron estos resultados en el trabajo de Lattanzio et al. (2005) en brácteas externas y receptáculo de alcachofas frescas empleando como medio de extracción una mezcla de etanol:metanol 1:1. Por su parte, Shen et al. (2010) cuantificaron los ácidos hidroxicinámicos presentes en la parte comestible y en las hojas de la alcachofa empleando etanol al 50%, y observaron que el contenido de ácidos hidroxicinámicos (ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico y ácido clorogénico) era superior en la parte comestible que en las hojas. Sin embargo, Pérez-Esteve et al. (2018) evaluaron el contenido fenólico presente en tallo, brácteas externas y parte comestible, empleando metanol al 80% y se observó que el ácido clorogénico fue el compuesto fenólico predominante en todas las partes evaluadas y que se encontró en mayor concentración en el tallo. En concordancia con estos resultados, Pandino et al. (2011) estudiaron los compuestos fenólicos presentes en los residuos de alcachofa (brácteas externas, tallo y hojas) extraídos a partir de una

mezcla de metanol:agua (70:30, v/v) y observaron que los ácidos hidroxicinámicos fueron más abundantes en el tallo (86% del contenido total de compuestos fenólicos). Teniendo en cuenta que el ácido clorogénico, es uno de los compuestos más abundantes presente en los residuos de alcachofa, y que es el responsable de la actividad antioxidante y del efecto protector contra el estrés oxidativo (de Falco et al., 2015) resulta de interés la recuperación de este compuesto.

La cinarina sólo se encontró en nuestro trabajo en muy baja concentración en las extracciones realizadas con metanol:agua, aumentando significativamente cuando se aplicó US y no se detectó en las extracciones realizadas con agua (Tabla 4). Lombardo et al. (2010) extrajeron los compuestos fenólicos de distintas partes (brácteas externas e internas, receptáculo y el tallo) de 9 genotipos de alcachofa utilizando metanol al 60% y detectaron cinarina en todas las partes analizadas, aunque la mayor concentración de este compuesto se encontró en el tallo (21,5 - 90,2 mg/kg extracto seco). Sin embargo, Shen et al. (2010) no detectaron cinarina en hojas de alcachofa cuando fueron tratadas con etanol al 50%. Roupheal et al. (2017) observaron que la aplicación de US junto con una mezcla de metanol:agua (70:30, v/v) permitió extraer cinarina de la parte comestible de la alcachofa. En contraposición con lo encontrado en este trabajo, se detectó cinarina en subproductos de alcachofa extraídos con agua hirviendo durante 1 hora (Llorach et al., 2005). Asimismo, Mulinacci et al. (2004) observaron que la cinarina fue el ácido hidroxicinámico predominante en extracto de hojas de alcachofa (2425 mg/kg de residuo seco) tratadas con agua y ultrasonidos. Aunque la cinarina es uno de los compuestos cafeoilquínicos que se encuentra en menor concentración en la alcachofa, debe ser tenido en cuenta ya que presenta actividad colerética (Gebhardt, 1997).

3.2. Flavonoides presentes en los residuos de alcachofa

El análisis realizado permitió identificar 8 compuestos antioxidantes pertenecientes al grupo de flavonoides: luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-rutinósido, apigenina, apigenina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-rutinósido, narirutina y naringenina-7-O-glucósido. En la Tabla 5, se presenta la concentración media de cada compuesto fenólico individual hallada en los extractos obtenidos, así como el análisis de la varianza. En las Tablas 6 y 7 del Anexo se encuentra la concentración de cada compuesto fenólico. Los resultados del ANOVA completo se presentan en la Tabla 8 y las pruebas post hoc de las Tablas 11 a la 18 del Anexo.

Tabla 5. Concentración ($\bar{X} \pm s$) de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) presentes en los cuatro extractos obtenidos a partir de residuos de alcachofa ($n = 4$).

Compuesto antioxidante	Extracción				F
	E1 (MetOH:H ₂ O)	E3 (MetOH:H ₂ O+US)	E2 (H ₂ O)	E4 (H ₂ O+US)	
Luteolina	5,2 ± 0,3a	4,5 ± 0,9a	2,4 ± 0,4b	2,4 ± 0,3b	30,33
Luteolina-7-O-glucósido	442 ± 14a	469 ± 6b	2,7 ± 0,1c	2,9 ± 0,6c	4967,69
Luteolina-7-O-rutinósido	984 ± 66a	1034 ± 20a	17 ± 2b	10 ± 2b	1116,20
Apigenina	2,46 ± 0,01a	2,49 ± 0,01a	3,3 ± 0,4b	4,1 ± 0,6c	18,86
Apigenina-7-O-glucósido	7,3 ± 0,1a	7,2 ± 0,3a	nd	nd	3055,69
Apigenina-7-O-rutinósido	20,9 ± 0,6a	20,2 ± 0,9a	5,5 ± 0,3b	4,6 ± 0,3b	986,94
Narirutina	nd	nd	2,14 ± 0,02a	2,11 ± 0,02b	27206,41
Naringenina-7-O-glucósido	2,96 ± 0,02a	2,9 ± 0,2a	2,2 ± 0,03b	2,19 ± 0,05b	62,95

Valores con letras diferentes en las filas son significativamente diferentes ($p < 0,05$).
nd, no detectado.

El contenido total y el perfil de flavonoides encontrado difirieron entre las extracciones realizadas. Al igual que lo observado en los ácidos hidroxicinámicos, en los extractos obtenidos a partir de MetOH:H₂O, la concentración total de flavonoides fue mucho mayor que en los que se utilizó agua (Figura 12). Sin embargo, cuando se empleó metanol al 60%, no se detectó narirutina y la concentración de apigenina extraída fue menor en comparación a la obtenida con agua (Tabla 5). Desde el punto de vista cuantitativo, los flavonoides suelen representar menos del 10% del contenido de compuestos fenólicos totales presentes en los tejidos de la alcachofa (Lattanzio et al., 2009). Sin embargo, en este trabajo, el contenido total de flavonoides extraído de los productos desechables de la alcachofa (Figura 12) fue mayor al de los ácidos hidroxicinámicos (Figura 11), representando entre un 60-64% y un 78% del contenido de compuestos fenólicos totales, en las muestras extraídas con metanol:agua y agua, respectivamente. Si bien los ácidos hidroxicinámicos predominan en tallo floral (68% del contenido de PT) y los flavonoides en las hojas y en las brácteas externas (95 y 84% del contenido de PT, respectivamente) (Pandino et al., 2011), se observó que las propiedades beneficiosas para la salud, surgen del efecto sinérgico obtenido de estas dos clases de compuestos fenólicos (Speroni et al., 2003; Schütz et al., 2006).

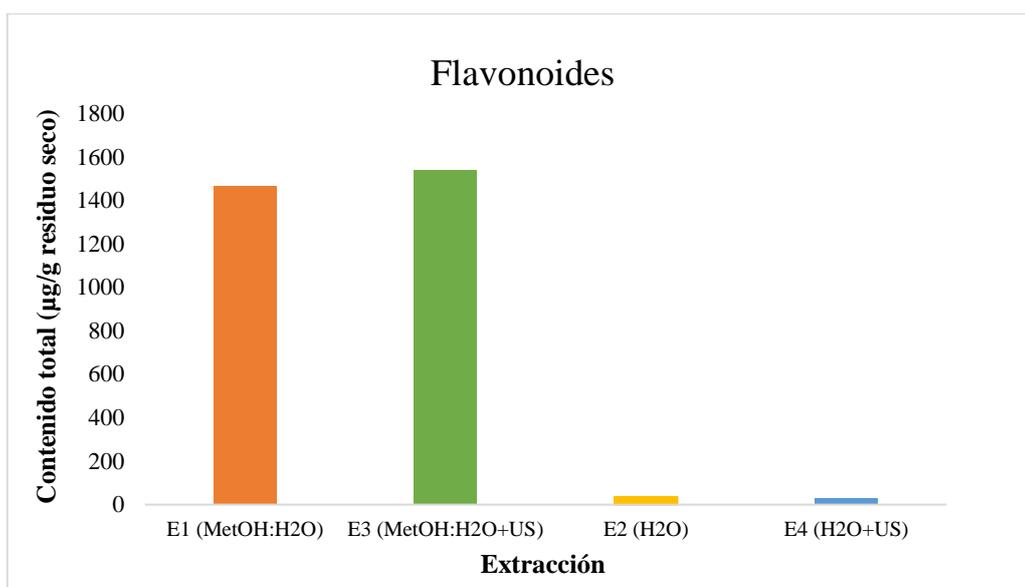


Fig. 12 Contenido total de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ residuo seco) obtenido según el método de extracción utilizado.

La aplicación de US favoreció el contenido total de compuestos fenólicos de las extracciones realizadas con metanol:agua, pero provocó una ligera disminución en las muestras extraídas con agua. Sin embargo, sólo existieron diferencias significativas debidas al uso de US en la concentración de apigenina y narirutina cuando se realizó la extracción con agua y en el caso de la luteolina-7-O-glucósido cuando se utilizó metanol al 60% (Tabla 5). Rechner et al. (2009) observaron que utilizando metanol al 70% con US, la luteolina-7-O-glucósido era el compuesto más abundante obtenido en extracto de alcachofa, representando un 79% del extracto total. En otros trabajos se observó que la aplicación de ultrasonidos resultó satisfactoria para la extracción de compuestos fenólicos a partir de semillas de uva (Ghafoor et al., 2009) y de flavonoides presentes en la planta medicinal *Folium eucommiae* (Huang et al., 2009). Además, en este último trabajo, se concluyó que la aplicación de US es más eficiente para la extracción de flavonoides que otras técnicas como tratamiento enzimático y microondas.

En cuanto al análisis de cada compuesto individual, en las extracciones realizadas con metanol:agua los compuestos más abundantes fueron luteolina-7-O-rutinósido, luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-rutinósido y apigenina-7-O-glucósido (Tabla 5). Estos resultados coinciden con lo observado en otros trabajos donde también se estudió el perfil de compuestos fenólicos en residuos de alcachofa empleando para la extracción mezclas hidroalcohólicas (Fritsche et al., 2002; Schütz et al., 2004; Zhu et al., 2004). Al igual que ocurre en el presente trabajo Pandino et al. (2013b) observaron que la luteolina-7-O-

rutinósido fue el flavonoide predominante tanto en hojas como tallos de alcachofa de las variedades 'Violetto di Sicilia' y 'Spinoso di Palermo' tratadas con metanol al 70%. Sin embargo, su concentración fue mayor en las hojas (1109 mg/kg de materia seca en la variedad 'Violetto di Sicilia' y 1340 mg/kg en la variedad 'Spinoso di Palermo') que en los tallos (39 mg/kg de materia seca en 'Violetto di Sicilia' y 46 mg/kg de materia seca en 'Spinoso di Palermo'). La luteolina-7-O-glucósido fue el segundo compuesto más abundante en las hojas encontrándose en una concentración de 1067 mg/kg de materia seca en la variedad 'Violetto di Sicilia' y 561 mg/kg de materia seca en la variedad 'Spinoso di Palermo'. Sin embargo, este flavonoide no se detectó en el tallo de 'Spinoso di Palermo' y se encontró en muy baja concentración en el de 'Violetto di Sicilia' (25 mg/kg de materia seca). Por otra parte, la apigenina 7-O-rutinósido no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas por estos autores. Brown & Rice-Evans (1998), observaron que la luteolina y la luteolina-7-O-glucósido obtenidas de extractos de hojas de alcachofa presentan una fuerte actividad antioxidante, que permite evitar la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, al actuar como donantes de hidrógeno y quelantes de iones metálicos. Es interesante observar que, la concentración de luteolina-7-O-glucósido obtenida en este trabajo con metanol:agua (442 µg/g de residuo seco) es superior a la encontrada por Schütz et al. (2004) en la parte comestible de la alcachofa (188,4 µg/g de residuo seco) cuando se aplicó un tratamiento similar (agua:metanol 60%, v/v). Este resultado, junto con otros, indicaría la importancia de recuperar los compuestos bioactivos presentes en las partes desechables de la alcachofa.

La apigenina se extrajo en muy baja concentración en ambos disolventes, aunque su concentración fue mayor en las muestras tratadas con agua (Tabla 5). Pérez-Esteve et al. (2018) observaron que este compuesto más abundante en la parte comestible de la alcachofa (637 mg/100 g materia seca), aunque alcanza niveles medios similares en el tallo (638 mg/100 g de materia seca) cuando se extrae con metanol al 80%. Pandino et al. (2013b) encontraron apigenina en hojas de alcachofa en una concentración entre 13 y 51 mg/kg de materia seca, en las variedades 'Spinoso di Palermo' y 'Violetto di Sicilia', respectivamente. La apigenina es considerada uno de los flavonoides más importantes en lo que respecta a su efecto beneficioso para la salud y para aplicaciones farmacéuticas (Williamson et al., 2005; Wang et al., 2011). Además, tiene la propiedad de ser uno de los compuestos con mayor actividad inhibitoria de las especies reactivas del oxígeno, por lo que evita la peroxidación de lípidos y el daño oxidativo en condiciones de estrés hídrico

(Mierziak et al., 2014). Teniendo en cuenta las propiedades de la apigenina resulta de interés optimizar su extracción y considerar el uso residuos de alcachofa para elaborar extractos ricos en este compuesto.

La narirutina y la naringenina-7-O-glucósido fueron los flavonoides minoritarios. Además, la narirutina no se detectó en las muestras tratadas con MetOH:H₂O (Tabla 5). En contraposición a estos resultados, Lombardo et al. (2010) encontraron este compuesto en brácteas externas y tallos de alcachofa utilizando una mezcla de agua:metanol (60%, v/v). Asimismo, Schütz et al. (2004) hallaron estos compuestos en la parte comestible y en pulpa y zumo de alcachofa empleando el mismo medio extractante. La narirutina y la naringenina-7-O-glucósido presentan efectos beneficiosos para la salud, entre los que destacan sus propiedades anticancerígenas y antioxidantes (Erlund et al., 2001). Por esta razón, y dado que se encuentran en muy baja concentración en los residuos de alcachofa utilizando nuestro método de extracción, se requiere de más estudios que permitan conocer los métodos de extracción óptimos para estos compuestos.

4. Conclusiones

1. La mezcla metanol:agua (60:40) utilizada como extractante, permitió obtener mayor contenido total de compuestos fenólicos que el agua. Con esta mezcla de disolventes, el ácido clorogénico y la luteolina-7-O-glucósido fueron los compuestos extraídos más abundantes.
2. La aplicación de ultrasonidos incrementó significativamente la concentración de los ácidos hidroxicinámicos en las muestras tratadas con metanol:agua, pero no afectó cuando se empleó agua como disolvente.
3. En el caso de los flavonoides, la aplicación de ultrasonidos incrementó significativamente la concentración de luteolina-7-O-glucósido de las muestras tratadas con metanol:agua, mientras que en las extraídas con agua, incrementó levemente el contenido de apigenina y disminuyó el de narirutina.
4. No se detectó ácido cafeico en los residuos de alcachofa analizados.
5. No se extrajo cinarina y apigenina-7-O-glucósido en los subproductos tratados con agua mientras que en los extraídos con metanol:agua no se detectó narirutina.
6. Los residuos de alcachofa pueden considerarse una buena fuente de antioxidantes naturales para la industria alimentaria.

5. Bibliografía

- Angelov, G., Georgieva, S., Boyadzhieva, S., & Boyadzhiev, L. (2015). Optimizing the extraction of globe artichoke wastes. *Institute of Chemical Engineering Bulgarian Academy of Sciences*, 68(10), 1235–1240.
- Bernal-Gómez, M. E., de Mendonça-Junior, C. X., & Mancini-Filho, J. (2003). Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4), 425–432. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400010>.
- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hidroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599–605.
- Brat, P., Georgé, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, M. J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *The Journal of Nutrition*, 136(9), 2368–2373. <https://doi.org/136/9/2368>.
- Brown, J. E., & Rice-Evans, C. A. (1998). Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radical Research*, 29(3), 247–255. <https://doi.org/10.1080/10715769800300281>.
- Charles, D. J. (2013). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York, Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0>.
- Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P. P., Mulinacci, N., Pinelli, P., Franconi, F., & Romani, A. (2007). Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. *Food Chemistry*, 101(2), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.009>.
- Colantuono, A., Vitaglione, P., Ferracane, R., Campanella, O. H., & Hamaker, B. R. (2017). Development and functional characterization of new antioxidant dietary fibers from pomegranate, olive and artichoke by-products. *Food Research International*, 101, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.001>.
- Colla, G., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Svecova, E., Rea, E., & Lucini, L. (2013). Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1119–1127. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5861>.
- Corrales, L. C., & Ariza Muñoz, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 10(18), 213–225.
- 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>.
- de Falco, B., Incerti, G., Amato, M., & Lanzotti, V. (2015). Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 993–1018. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9428-y>.

- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, *405*(6789), 903–904. <https://doi.org/10.1038/35016151>.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., & Aro, A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, *131*(2), 235–241. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.235>.
- Estévez, M., Ventanas, S., Ramírez, R., & Cava, R. (2005). Influence of the addition of rosemary essential oil on the volatiles pattern of porcine frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(21), 8317–8324. <https://doi.org/10.1021/jf051025q>.
- Fantini, N., Colombo, G., Giori, A., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., & Carai, M. A. M. (2011). Evidence of glycemia-lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats. *Phytotherapy Research*, *25*(3), 463–466. <https://doi.org/10.1002/ptr.3285>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2016). FAOSTAT. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fратиanni, F., Tucci, M., De Palma, M., Pepe, R., & Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, *104*(3), 1282–1286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.044>.
- Fritsche, J., Beindorff, C. M., Dachtler, M., Zhang, H., & Lammers, J. G. (2002). Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *European Food Research and Technology*, *215*(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0507-0>.
- Ganesan, K., Kumar, K. S., & Rao, P. V. S. (2011). Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *12*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.11.005>.
- Ganhao, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Tryptophan depletion and formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in porcine burger patties with added phenolic-rich fruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(6), 3541–3548. <https://doi.org/10.1021/jf903356m>.
- Garbetta, A., Capotorto, I., Cardinali, A., D'Antuono, I., Linsalata, V., Pizzi, F., & Minervini, F. (2014). Antioxidant activity induced by main polyphenols present in edible artichoke heads: Influence of in vitro gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *10*, 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.019>.
- Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *144*, 279–286.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>.

- González Jamanca, N. C., & Alfaro Cruz, S. (2017). *Antioxidantes en los alimentos*. Lima, UNAB.
- Grace, S. C. (2005). "Phenolics as Antioxidants", En Smirnoff, Nicholas (ed.) *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, UK, Blackwell publishing, 141–168. <https://doi.org/10.1002/9780470988565.ch6>.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136–147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x>.
- Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bøhn, S. K., Holte, K., Jacobs, D. R., & Blomhoff, R. (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) en Foods consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 95–135.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chemistry*, 114(3), 1147–1154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.079>.
- IARC (Agencia internacional para la investigación del cáncer). (1986). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. en *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to Humans*, 444.
- Jackson, K. M. P., Rathinasabapathy, T., Esposito, D., & Komarnytsky, S. (2017). Structural constraints and importance of caffeic acid moiety for anti-hyperglycemic effects of caffeoylquinic acids from chicory. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(9), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201601118>.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6(2), 63–74. <https://doi.org/10.1186/bcr752>.
- Lattanzio, V., Cicco, N., & Linsalata, V. (2005). Antioxidant activities of artichoke phenolics. *Acta Horticulturae*, 681, 421–428.
- 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>.
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2005). Functionalisation of commercial chicken soup with enriched polyphenol extract from vegetable by-products. *European Food Research and Technology*, 220(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1054-7>.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and

- functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- 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>.
- Lutz, M., Henríquez, C., & Escobar, M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.06.001>.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>.
- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2004). Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00552-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00552-1).
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29(4), 273–300. <https://doi.org/10.1080/10408399009527528>.
- Negro, D., Montesano, V., Grieco, S., Crupi, P., Sarli, G., De Lisi, A., & Sonnante, G. (2012). Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *Journal of Food Science*, 77(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02531.x>.
- Ngnitcho, P. F. K., Khan, I., Tango, C. N., Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017). Inactivation of bacterial pathogens on lettuce, sprouts, and spinach using hurdle technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.033>.
- Niki, E. (1997). "Free Radicals in Chemistry and Biochemistry", En Hiramatsu M., Yoshikawa T., Inoue M. (eds), *Food and Free Radicals*, Boston, Springer, 1–10.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>.
- Nouraei, S., Rahimmalek, M., & Saeidi, G. (2018). Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* Hayek L.) as affected by drought stress. *Scientia Horticulturae*, 233, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.060>.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011). Characterization of phenolic acids and flavonoids in leaves, stems, bracts and edible parts of globe artichokes. *Acta Horticulturae*, 942, 413–418. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.942.61>.
- Pandino, G., Lombardo, S., Williamson, G., & Mauromicale, G. (2013a). Flavonoids content of *Cynara cardunculus* L. wild and cultivated germplasm accessions. *Acta*

Horticulturae, 983, 81–86.

- Pandino, G., Lombardo, S., & Mauromicale, G. (2013b). 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>.
- Pasqualone, A., Punzi, R., Trani, A., Summo, C., Paradiso, V. M., Caponio, F., & Gambacorta, G. (2017). Enrichment of fresh pasta with antioxidant extracts obtained from artichoke canning by-products by ultrasound-assisted technology and quality characterisation of the end product. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 2078–2087. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13486>.
- Pérez-Esteve, É., Salata, A., Barat, J. M., Stępniewska, A., López-Galarza, S., & Nurzyńska-Wierdak, R. (2018). Polyphenolic composition of spanish cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 17(2), 177–184. <https://doi.org/10.24326/asphc.2018.2.15>.
- Punchard, N. A., & Kelly, F. J. (1996). *Free radicals: a practical approach*. New York, Oxford University Press.
- Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Venkata Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349, 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0655-7>.
- Ramalho, V. C., & Neuza, J. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>.
- Rechner, A. R., Pannala, A. S., & Rice-evans, C. A. (2009). Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Radical Research*, 35, 195–202. <https://doi.org/10.1080/10715760100300741>.
- Rouphael, Y., Colla, G., Graziani, G., Ritieni, A., Cardarelli, M., & De Pascale, S. (2017). Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chemistry*, 234, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.175>.
- Saénz Rodríguez, T., García Giménez, D., & De la Puerta Vázquez, R. (2002). Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*, 9(8), 687–693. <https://doi.org/10.1078/094471102321621278>.
- Salata, A., & Gruszecki, R. (2010). The quantitative analysis of polyphenolic compounds in different parts of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) depending on growth stage of plants. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 9(3), 175–181.
- Salem, M. B., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., & Zeghal, K. M. (2015). Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0503-8>.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A., & Roncales, P. (2003). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef

- patties. *Journal of Food Science*, 68(1), 339–344.
- Sánchez, N. Y., Sepúlveda, J. U., & Rojano, B. A. (2013). Desarrollo de una bebida láctea con extractos de curuba (*Passiflora mollissima* Bailey) como antioxidante natural. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 164–173.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4090–4096. <https://doi.org/10.1021/jf049625x>.
- Schütz, K., Muks, E., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8812–8817. <https://doi.org/10.1021/jf062009b>.
- Shen, Q., Dai, Z., & Lu, Y. (2010). Rapid determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. by ultra-fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on a fused core C18 column. *Journal of Separation Science*, 33(20), 3152–3158. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000397>.
- Song, S., He, H., Tang, X., & Wang, W. (2010). Determination of polyphenols and chlorogenic acid in artichoke (*Cynara Scolymus* L.). *Acta Horticulturae*, 856, 167–172. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.856.22>.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>.
- Speroni, E., Cervellati, R., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C., & Guerra, M. C. (2003). Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *Journal of Ethnopharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00076-X).
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X).
- Wang, J., Zhang, W., Zhu, D., Zhu, X., Pang, X., & Qu, W. (2011). Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in mice fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1446–1451. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4331>.
- Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q.Y., & Tadmor, Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 601–608. <https://doi.org/10.1021/jf020792b>.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275–295. <https://doi.org/10.1080/10408690490468489>.
- Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K., & Terao, J. (2005). *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Research*, 39(5), 457–469. <https://doi.org/10.1080/10715760500053610>.

- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, *54*, 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.
- Zhu, X., Zhang, H., & Lo, R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24), 7272–7278. <https://doi.org/10.1021/jf0490192>.
- Zuorro, A. (2014). Response surface methodology analysis of polyphenol recovery from artichoke waste. *American Journal of Applied Sciences*, *11*(9), 1463–1471. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2014.1463.1471>.
- 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>.

6. Anexo de tablas y figuras

Tabla 6. Contenido fenólico ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) en residuos de alcachofa extraídos con metanol:agua, con y sin ultrasonidos.

Compuesto antioxidante	Inyección	Extracción			
		E1	E1'	E3	E3'
Ácido cafeico	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
Ácido clorogénico	1	773	870	912	1119
	2	774	844	905	1088
Cinarina	1	8,9	10,5	14	10
	2	9,5	10,3	13	10
Luteolina	1	5,3	4,8	5,2	4,0
	2	5,5	5,0	5,3	3,6
Luteolina-7-O-glucósido	1	424	449	465	464
	2	440	456	470	477
Luteolina-7-O-rutinósido	1	905	1028	1006	1036
	2	955	1048	1042	1051
Apigenina	1	2,47	2,45	2,49	2,49
	2	2,47	2,46	2,50	2,48
Apigenina-7-O-glucósido	1	7,2	7,3	7,3	7,0
	2	7,4	7,3	7,5	6,9
Apigenina-7-O-rutinósido	1	20,1	21,3	19,0	20,7
	2	20,8	21,4	20,9	20,2
Narirutina	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
Naringenina-7-O-glucósido	1	2,97	2,96	2,75	3,09
	2	2,98	2,94	2,74	3,11

E1, E1' (metanol:agua 60:40, v/v) y E3, E3' (metanol:agua 60:40, v/v con ultrasonidos).
nd, no detectado.

Tabla 7. Contenido fenólico ($\mu\text{g/g}$ de residuo seco) en residuos de alcachofa extraídos con agua, con y sin ultrasonidos.

Compuesto antioxidante	Inyección	Extracción			
		E2	E2'	E4	E4'
Ácido cafeico	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
Ácido clorogénico	1	12	10	7	9
	2	10	9	7	9
Cinarina	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
Luteolina	1	2,9	2,1	2,7	2,1
	2	2,6	2,1	2,7	2,2
Luteolina-7-O-glucósido	1	2,8	2,6	3,4	2,3
	2	2,8	2,6	3,4	2,3
Luteolina-7-O-rutinósido	1	15	19	11	8
	2	15	19	12	8
Apigenina	1	3,8	2,9	4,6	3,6
	2	3,5	2,9	4,6	3,7
Apigenina-7-O-glucósido	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
Apigenina-7-O-rutinósido	1	5,8	5,2	4,8	4,3
	2	5,7	5,3	4,9	4,3
Narirutina	1	2,13	2,17	2,12	2,09
	2	2,12	2,16	2,13	2,10
Naringenina-7-O-glucósido	1	2,19	2,24	2,23	2,14
	2	2,21	2,25	2,25	2,16

E2, E2' (agua) y E4, E4' (agua con ultrasonidos).
nd, no detectado.

Recta de calibrado del compuesto ácido cafeico

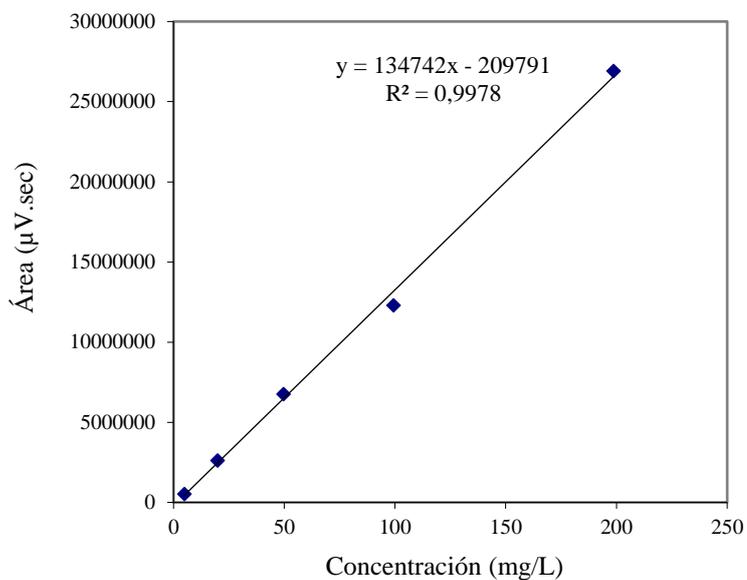


Fig. 13 Recta de calibrado del ácido cafeico.

Recta de calibrado del compuesto cinarina

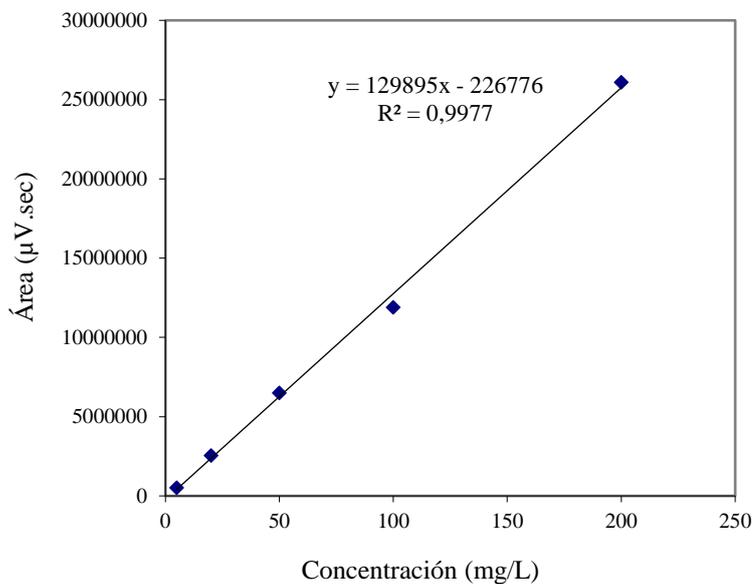


Fig. 14 Recta de calibrado de la cinarina.

Recta de calibrado luteolina-7-O-glucósido

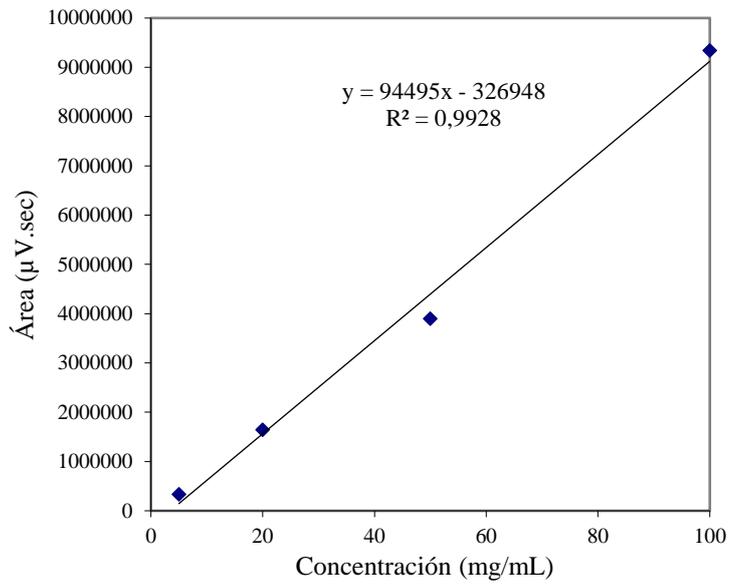


Fig. 15 Recta de calibrado de la luteolina-7-O-glucósido.

Recta de calibrado de luteolina-7-O-rutinósido

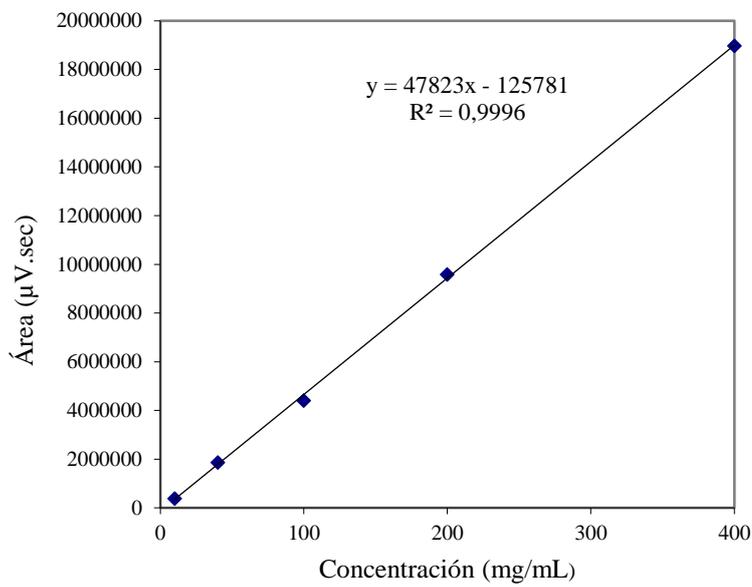


Fig. 16 Recta de calibrado de la luteolina-7-O-rutinósido.

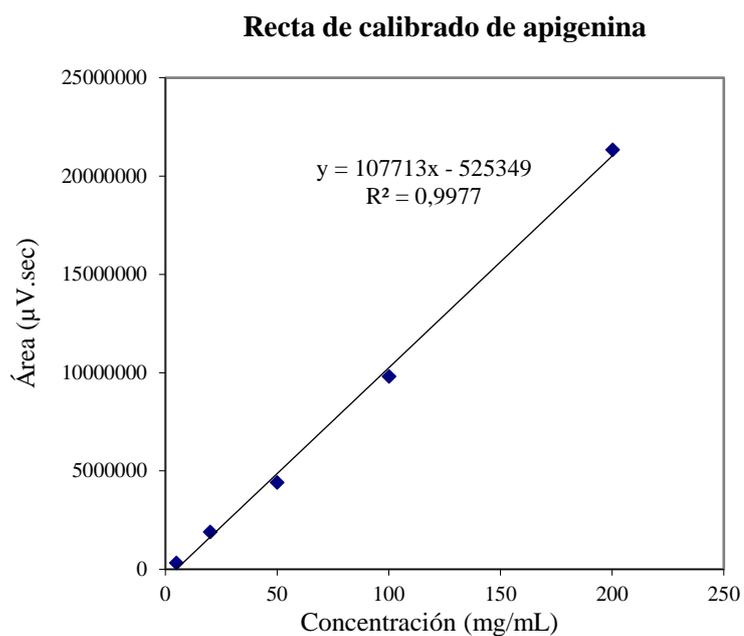


Fig. 17 Recta de calibrado de la apigenina.

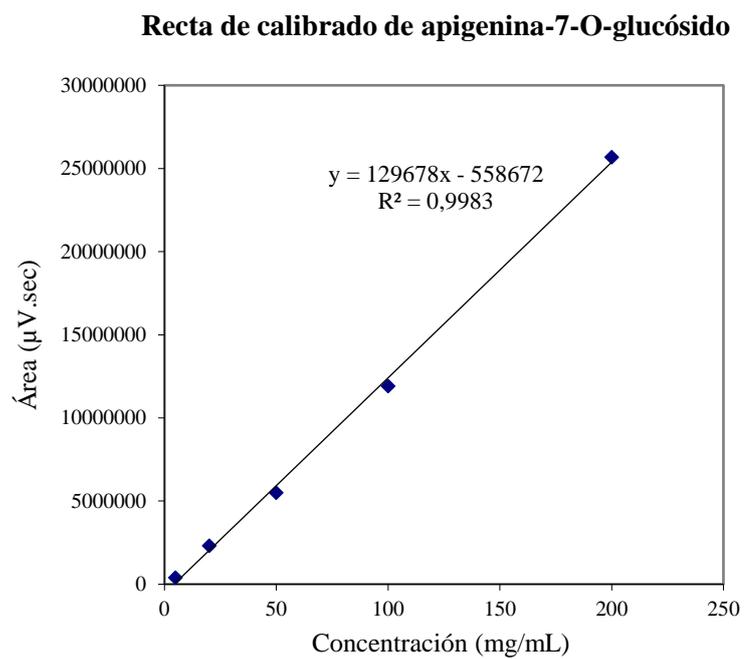


Fig. 18 Recta de calibrado de la apigenina-7-O-glucósido.

Recta de calibrado de apigenina-7-O-rutinósido

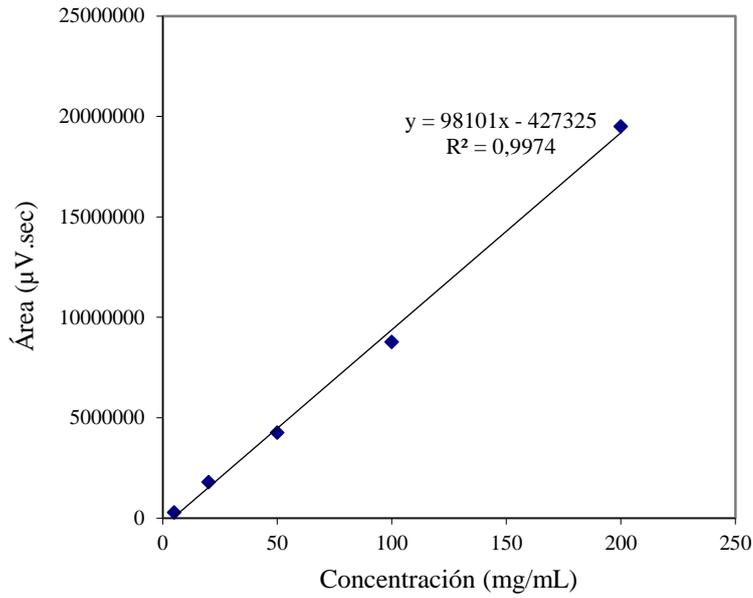


Fig. 19 Recta de calibrado de la apigenina-7-O-rutinósido.

Recta de calibrado de narirutina

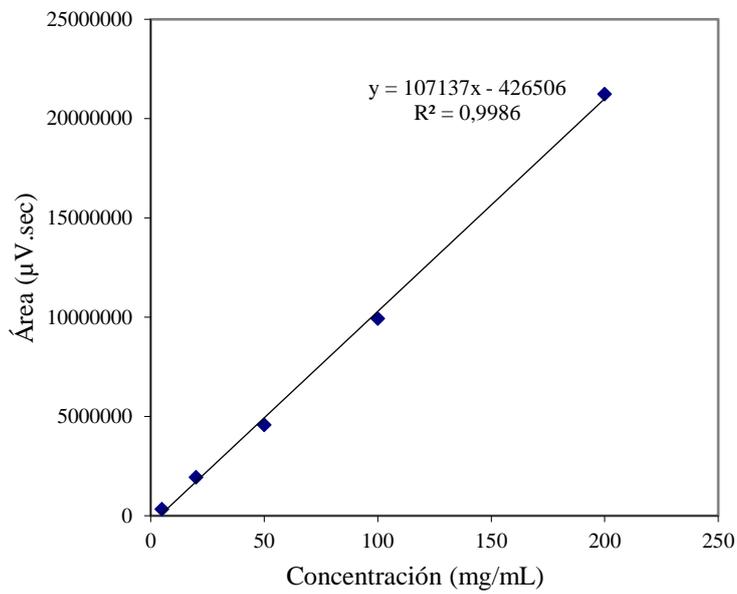


Fig. 20 Recta de calibrado de la narirutina.

Recta de calibrado de naringenina-7-O-glucósido

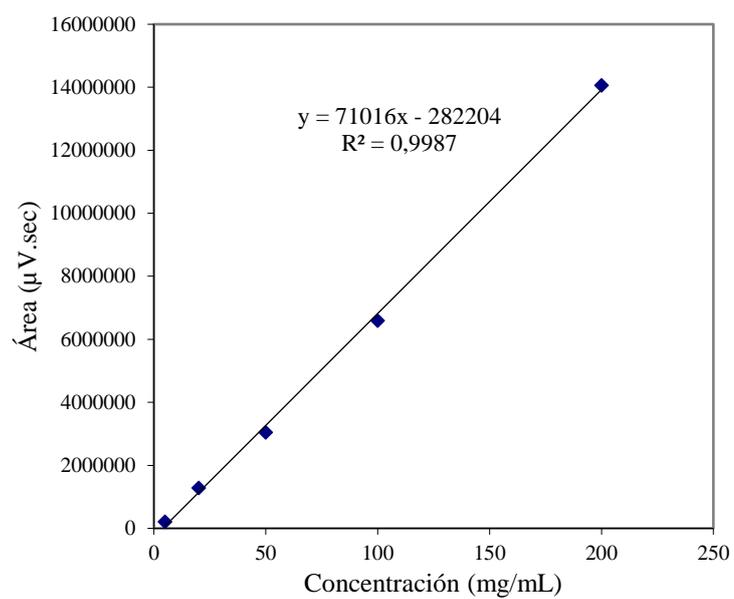


Fig. 21 Recta de calibrado de la naringenina-7-O-glucósido.

Tabla 8. Resultados del ANOVA de un factor con cuatro modalidades aplicado a cada uno de los compuestos fenólicos analizados.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
clorogenico	Entre grupos	3,322	3	1,107	289,798	,000
	Dentro de grupos	,046	12	,004		
	Total	3,368	15			
cinarina	Entre grupos	,000	3	,000	120,634	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			
luteolina	Entre grupos	,000	3	,000	30,327	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			
luteolinglucosido	Entre grupos	,821	3	,274	4967,685	,000
	Dentro de grupos	,001	12	,000		
	Total	,822	15			
luteolinrutinosido	Entre grupos	3,969	3	1,323	1116,198	,000
	Dentro de grupos	,014	12	,001		
	Total	3,983	15			
apigenina	Entre grupos	,000	3	,000	18,856	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			
apigeninglucosido	Entre grupos	,000	3	,000	3055,689	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			
apigeninrutinosido	Entre grupos	,001	3	,000	986,944	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,001	15			
narinrutina	Entre grupos	,000	3	,000	27206,407	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			
naringeninglucosido	Entre grupos	,000	3	,000	62,951	,000
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	,000	15			

En las siguientes Tablas (9 a 18) se presentan las pruebas post hoc de cada uno de los compuestos fenólicos analizados. En todos los casos los números 1 al 4 se corresponden con las muestras E1 a E4.

Tabla 9. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para el ácido clorogénico.

NUEVA_TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4,00	4	,008292		
2,00	4	,010064		
1,00	4		,814978	
3,00	4			1,005992
Sig.		,999	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 10. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la cinarina.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2,00	4	,000000		
4,00	4	,000000		
1,00	4		,009782	
3,00	4			,011891
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 11. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2,00	4	,002411	
4,00	4	,002438	
3,00	4		,004538
1,00	4		,005177
Sig.		,997	,203

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 12. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina-7-O-glucósido.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2,00	4	,002709		
4,00	4	,002866		
1,00	4		,442167	
3,00	4			,468938
Sig.		,999	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 13. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la luteolina-7-O-rutinósido.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4,00	4	,009794	
2,00	4	,016945	
1,00	4		,983894
3,00	4		1,033718
Sig.		,949	,122

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 14. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1,00	4	,002465		
3,00	4	,002490		
2,00	4		,003308	
4,00	4			,004121
Sig.		,994	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 15. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina-7-O-glucósido.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2,00	4	,000000	
4,00	4	,000000	
3,00	4		,007187
1,00	4		,007287
Sig.		1,000	,599

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 16. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la apigenina-7-O-rutinósido.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4,00	4	,004554	
2,00	4	,005486	
3,00	4		,020184
1,00	4		,020886
Sig.		,078	,204

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 17. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la narirutina.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1,00	4	,000000		
3,00	4	,000000		
4,00	4		,002109	
2,00	4			,002144
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tabla 18. Prueba post hoc subconjuntos homogéneos para la naringenina-7-O-glucósido.

NUEVA TOTAL	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4,00	4	,002198	
2,00	4	,002225	
3,00	4		,002922
1,00	4		,002962
Sig.		,924	,846

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.