

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las brácteas de alcachofa son el residuo o subproducto del procesamiento de esta planta, y las posibles opciones de utilización son donarlas a los ganaderos para que alimenten a sus animales, o convertirlas en harina para mezclarla con alimentos debido a su alto contenido de fibra. El problema radica en que cualquiera de estas dos opciones representa una pérdida de recursos que podrían ser utilizados en otro proceso, tal como la extracción de principios activos.

1.2 Justificación

La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que nos permite dar soluciones a muchos problemas de la industria en nuestro país, como por ejemplo el desecho de los subproductos generados en el procesamiento de vegetales, utilizando herramientas de biotecnología industrial como la extracción de componentes activos de las plantas, para luego aplicarlos como sustancias antioxidantes, anticancerígenas, fungicidas, bactericidas en alimentos u otros productos. Esta herramienta está dentro de las prioridades del desarrollo de capacidades biotecnológicas de los países de Latinoamérica y el Caribe (Roca W., 2005), ya que se enfatiza que hay que aprovechar la gran biodiversidad que poseemos para generar productos que nos ayuden a desarrollarnos económica y tecnológicamente.

Dentro de la industria de los vegetales enlatados, la alcachofa tiene una gran demanda a nivel internacional por sus propiedades nutritivas y medicinales ampliamente conocidas. En Ecuador, la alcachofa se produce durante todo el año en comparación a los principales países productores (España, Francia, Argentina e Italia) que solo la producen por temporadas, debido a las características climáticas y del suelo que posee nuestro país, las cuales son óptimas para el desarrollo de la planta. Esta ventaja se convierte en una razón más para darle importancia al cultivo de alcachofas y su máximo aprovechamiento mediante biotecnología. (CIC-CORPEI, 2003)

Los corazones de alcachofa son el producto principal del procesamiento de esta planta, y las brácteas que los recubren son los subproductos. Estas brácteas, que representan 70% de la materia prima total, no son aprovechadas más que para deshidratarlas y hacer harina, lo que implica un proceso costoso por su alto requerimiento energético para eliminar la alta humedad que contienen; por esta razón los subproductos se acumulan en grandes cantidades (toneladas semanales), generando impacto ambiental y una pérdida potencial de dinero para las empresas. (INAEXPO, 2008)

Este proyecto propone una alternativa para aprovechar estos subproductos de forma adecuada, y consiste en elaborar un extracto vegetal que funcione como antibacteriano y antioxidante natural, mejorando la conservación del producto y aumentando las propiedades nutritivas del alimento, convirtiéndolo en un alimento funcional que aparte brinda beneficios para la salud de los consumidores; también mediante este procedimiento, se logrará utilizar toda la materia prima sin desperdiciar recursos valiosos. El problema a resolver es la acumulación de subproductos sin aprovechar que generan contaminación y pérdidas, los cuales después de ser tratados van a mejorar las propiedades del producto final, y se van a convertir en materia prima para un nuevo proceso: extracción de componentes activos de las brácteas de alcachofa.

La explotación del mercado de los alimentos funcionales, especialmente en Ecuador, el país con mayor biodiversidad del planeta; es de suma importancia ya que poseemos innumerables recursos, que identificando y aislando sus componentes activos podemos aprovecharlos para crear nuevos productos alimenticios que traerán grandes beneficios, tanto económicos, como para la salud de la gente que los consumirá. Esta investigación presenta un potencial beneficio para las empresas de alimentos que generan subproductos y no saben cómo aprovecharlos, ya que estos desechos posiblemente contengan sustancias que si son bien identificadas y aisladas pueden mejorar las cualidades del producto final, aumentando su demanda y aceptación en los mercados nacionales e internacionales. De esta manera se utilizará a la biotecnología como herramienta para dar solución a problemas reales que ocurren en las industrias de nuestro país.

1.3 Objetivos de la investigación

Objetivo General

Extraer componentes activos de las brácteas de alcachofa para elaborar un extracto con propiedades antioxidantes y antibacterianas que sirva como conservante de alimentos.

Objetivos específicos

- Aplicar técnicas de extracción sólido-líquido que sirvan para obtener extractos de compuestos fenólicos a partir de brácteas de alcachofa.
- Caracterizar los extractos obtenidos mediante técnicas cromatográficas para determinar la presencia de compuestos fenólicos.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos mediante la prueba de actividad con el radical libre DPPH para probar su eficacia como captador de radicales libres, y también en pruebas con alimentos.
- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos mediante la medición del halo de inhibición en dos cultivos bacterianos que comúnmente contaminan alimentos (Gram-negativo: *Salmonella* spp., y Gram-positivo: *Staphylococcus aureus*), para probar su utilidad como conservante natural de alimentos.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Principios activos presentes en las plantas

Las plantas son fuente de innumerables recursos útiles para el desarrollo de la ciencia, los más importantes son los conocidos principios activos o metabolitos secundarios, que en su mayoría son utilizados para aliviar dolencias (antipiréticos, analgésicos, antiespasmódicos, báquicos) o curar enfermedades (fitofármacos), para fortalecer las defensas del cuerpo (antiperiódicos, tónicos), para controlar la fisiología (laxantes, vasoconstrictores, colagogos, diuréticos) y hasta las emociones de quienes los consuman (depresores, euforizantes, afrodisíacos, estupefacientes). (Albornoz, 1980)

1.4.1.1 Metabolitos primarios y secundarios

Los metabolitos primarios son sustancias que la célula vegetal necesita para su funcionamiento normal (respiración, fotosíntesis), por eso su variación es mínima dentro de las plantas. Todas las células producen metabolitos primarios, ya que son esenciales para su funcionamiento básico en cualquier organismo viviente. (Martínez M., 2005) Los lípidos, ácidos carboxílicos del ciclo del ácido cítrico, los aminoácidos, los azúcares comunes y sus derivados, los polímeros de carbohidratos tales como almidón y celulosa, el ATP y DNP que actúan en la transferencia de enlaces ricos en energía y óxido-reducciones; son ejemplos de metabolitos primarios. (Albornoz, 1980)

Los metabolitos secundarios no son esenciales para el funcionamiento de las células vegetales y no participan en las transformaciones bioquímicas comunes. Su presencia puede llegar a ser tan específica que solo ciertas especies de una familia pueden producirlos, proporcionando así una forma de caracterizar quimiotaxonómicamente a las plantas. También es necesario saber que especies muy relacionadas taxonómicamente o del mismo género pueden tener distintos tipos de metabolitos secundarios, o tener los mismos en diferentes proporciones. Esta alteración de las proporciones también se da en la propia planta, pudiendo encontrarse mayor concentración de un metabolito en las hojas, en las raíces, en los tallos o en los frutos. (Albornoz, 1980)

Dentro de la planta, estos compuestos sufren transformaciones tales como degradaciones, reducciones, acilaciones, oxidaciones, alquilaciones, etc., porque aunque no sean esenciales, tampoco son un desecho o tienen funciones anormales. Estas transformaciones ocurren por su interacción con las enzimas de la planta, las cuales los llevan por distintas rutas metabólicas, razón por la cual no se debe asumir que una sustancia es sintetizada siempre de la misma forma. Los alcaloides, glicósidos, aceites esenciales, resinas, taninos, esteroides, flavonoides, etc., son un ejemplo de metabolitos secundarios de las plantas. (Albornoz, 1980)

La cantidad de metabolitos secundarios que existan en una planta pueden ser afectados por diversos factores, que pueden ser tanto extrínsecos como intrínsecos. Los factores extrínsecos son el clima y la temperatura, la humedad, o las condiciones del suelo; y los factores intrínsecos son de tipo genético (mutaciones, otras alteraciones), interacción con las enzimas para sufrir transformaciones, o variaciones diurnas, ontogénicas o estacionales. (Albornoz, 1980) Para conocer el origen y las transformaciones de los metabolitos secundarios en las plantas, se deben estudiar las rutas biosintéticas de cada uno. La ruta del ácido shikímico es la más utilizada por las plantas para crear metabolitos secundarios y algunos aminoácidos aromáticos (L-Fenilalanina, L-Tirosina, L-Triptófano). (Braca, 2008)

1.4.1.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy común de metabolitos secundarios presentes en las plantas, estos incluyen a los fenoles simples, polifenoles, flavonoides, taninos, entre otros. (Ver Cuadro 1.1). Una gran cantidad frutas y vegetales frescos, así como los granos de cereales, contienen cantidades importantes de fenoles naturales. Los flavonoides son el mayor grupo de fenoles vegetales y los más estudiados. (Palencia, 1999)

Se han identificado dos rutas biosintéticas para los compuestos fenólicos, una es la del ácido shikímico y otra es la poliquetídica. Algunos compuestos fenólicos se sintetizan mediante las dos rutas, lo cual se conoce como biogénesis mixta (Ver Cuadro 1.2). (Braca, 2008)

Cuadro 1.1 Principales clases de compuestos fenólicos en plantas (Braca, 2008)

Átomos de carbono	Esqueleto base	Clase
6	C ₆	Fenoles simples
6	C ₆	Benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas
8	C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos
9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos
9	C ₆ -C ₃	Fenilpropenos
9	C ₆ -C ₃	Cumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estibenos
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Isoflavonoides
18	C ₆ -C ₃	Lignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
N	(C ₆ -C ₃) _n	Lignina
N	(C ₆) _n	Melanina
N	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Cuadro 1.2 Rutas Biosintéticas de algunos compuestos fenólicos (Braca, 2008)

Ruta del ácido shikímico	Ruta Poliquetídica	Biogénesis Mixta
Fenoles simples (salicilatos, ácido gálico, arbutina)	Quinonas (juglona)	Flavonoides
Fenilpropanoides (ácido cafeico, ácido clorogénico)	Antranoides (antraquinonas, tetraciclina)	Xantonas
Fenilpropanoides cíclicos (cumarinas, ligninas, lignanos)		Antranoides Rubiáceas

La actividad biológica de los compuestos fenólicos es generalmente antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral y antitumoral, entre otras, (Ver Cuadro 1.3). Siendo los flavonoides los que presentan mayor actividad (Braca, 2008)

Cuadro 1.3 Actividad biológica de algunos compuestos fenólicos (Braca, 2008)

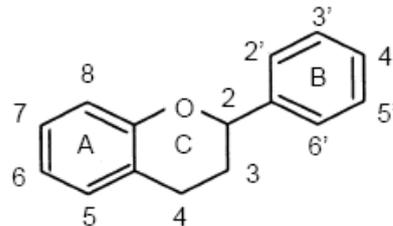
Fenoles simples	Antioxidante, antitumoral, antiviral, antibacteriana
Lignanós	Antitumoral, antiviral
Quinonas	Antitumoral, antiviral
Xantonas	Antitumoral, antiviral, citotóxica, mutagénica, antibacteriana, anti-inflamatoria
Flavonoides	Antiinflamatoria, antibacteriana, antialérgica, diurética, antiviral, antiproliferativa, captador de radicales libres, antihipertensivo, estrogénica
Cumarinas	Anticoagulante, antitumoral, fotosensibilizante, antiviral

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

Los flavonoides son pigmentos naturales que protegen a los vegetales contra el daño de agentes oxidantes como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, o el efecto de algunas sustancias químicas. Están presentes en plantas, frutas, verduras y bebidas como el vino y la cerveza. (Martínez Flores et al., 2002) Están agrupados en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y púrpuras. Las antoxantinas, que incluyen flavonoles, flavonas, e isoflavonas, son moléculas

incoloras o de colores que van desde el blanco hasta el amarillo. (Palencia, 1999)

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, compuestos por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). (Martínez Flores et al., 2002)



Flavonoide

Figura 1.1 Estructura básica de los flavonoides (Martínez Flores et al., 2002)

Se ha demostrado que dentro de las plantas, estas sustancias se encuentran ligadas a moléculas de carbohidratos, este tipo de combinación se denomina glicósido, y cuando se encuentran solas se las denomina agliconas flavonoides. Un ejemplo de aglicona flavonoide es la quercitina. (Martínez M., 2005) Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. (Martínez Flores et al., 2002)

Además de sus efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades como el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450. Otras funciones que cumplen estos compuestos son las de fungicida y bactericida, también pueden fijar metales como el hierro y el cobre. (Martínez Flores et al., 2002)

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide y su forma (libre o glicósido). Por ejemplo, las flavonas, y flavonoles son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul.

Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos. (Martínez M., 2005)

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural. (Martínez M., 2005)

1.4.1.2 Aplicaciones de los principios activos de las plantas en alimentos

Los alimentos que consumimos diariamente nos proporcionan nutrientes y otras sustancias como colorantes, aromáticos, o protectores naturales contra enfermedades; que no tienen una función nutritiva, pero si juegan un papel esencial dentro de nuestro cuerpo. Estas sustancias son conocidas como compuestos fitoquímicos o principios activos, los cuales pueden estar ya presentes o ser adicionados a los alimentos en algún momento de su procesamiento o preparación. (Palencia, 1999)

Los aditivos alimenticios son sustancias que se añaden intencionalmente a los alimentos con la finalidad de modificar sus características organolépticas o facilitar o mejorar su proceso de elaboración y/o conservación. Estos aditivos pueden ser sintéticos o de origen natural, (Santos Buelga, 2002) y previenen el deterioro del producto por efecto de enzimas presentes, de la luz, del oxígeno, de la pérdida de humedad o por la presencia de microorganismos. Los aditivos agregados pueden ser agentes anti rancidez, antioxidantes y antimicrobianos. (García Ruiz, 2004)

Los principios activos se encuentran en las frutas y verduras que consumimos, también se los puede encontrar en productos fermentados por

bacterias ácido lácticas como la leche, yogurt, o verduras fermentadas. Estas sustancias no son esenciales para nuestro cuerpo, pero pueden brindar muchos beneficios como prevención de infecciones, fortalecimiento de órganos y tejidos, o destoxificación de la sangre. El estudio de estas sustancias, sus fuentes, su función, y su caracterización, está a cargo de un nuevo campo de investigación conocido como Alimentos Funcionales. (Palencia, 1999)

Los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales, pueden reducir la peroxidación de los lípidos. El consumo frecuente de frutas y vegetales frescos se asocia con una menor incidencia de cáncer en humanos y en carcinogénesis experimental. Estos compuestos se hallan preferentemente en las capas superficiales de las verduras, frutas, cereales y semillas, para proteger de la oxidación a los tejidos de las capas inferiores. También son anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes, reguladores de la presión arterial y de la glucemia. (Palencia, 1999)

Después de muchas investigaciones se ha demostrado que los compuestos fenólicos tienen efectos protectores en nuestro cuerpo, en contraste a la idea que se tenía sobre el peligro de ingerirlos en la alimentación. Específicamente en las temas de nutrición y cáncer se ha demostrado que esos compuestos protegen los tejidos contra los efectos tóxicos y neoplásicos de un amplio rango de carcinógenos. Así, los compuestos fenólicos y sus derivados presentes en té verde y negro han manifestado sus propiedades protectoras contra el cáncer y enfermedades del corazón, por lo que su consumo en vegetales, frutas y té, reducen el riesgo de diversos tipos de cáncer en humanos. Por otra parte se ha observado que los fenoles (por ejemplo, ácidos cafeico y ferúlico) son altamente efectivos contra la formación de potentes carcinógenos a partir de aminas y amidas secundarias. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, especialmente las angiospermas y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. (Martínez M., 2005) Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran en hojas, semillas, frutas, flores, y bebidas como el vino, cerveza, té verde, té negro y soja. Los flavonoides se

encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo, cardo, mariano o crataegus. (Martínez Flores et al., 2002)

El valor medio de ingesta de flavonoides se estima en alrededor de 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16 mg/día; estos deben ser ingeridos en forma de alimento o suplemento, ya que el cuerpo humano no los puede sintetizar. Este valor medio de ingesta supera al de otros antioxidantes como el beta-caroteno (2-3 mg/día) o la vitamina E (7-10 mg/día), y es aproximadamente un tercio de la vitamina C (70-100 mg/día). Es por esto que los flavonoides son una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana. (Martínez Flores et al., 2002)

Aunque los fitoquímicos antioxidantes tienen una baja biodisponibilidad (Lutz, 2007), la mayoría de los flavonoides se absorben fácilmente en el intestino, y los metabolitos transformados y excesos se excretan por la orina y la bilis. (Martínez M., 2005) La biodisponibilidad de estos compuestos depende principalmente de su solubilidad en los fluidos orgánicos, estructura química, distribución, absorción y eliminación. (Martínez Flores et al., 2002)

Los antioxidantes también se utilizan como aditivos en alimentos para ayudar a preservarlos. La exposición al oxígeno y a la luz del sol son factores que provocan su oxidación, por eso siempre se busca mantenerlos en la oscuridad y sellarlos en envases. Sin embargo, como el oxígeno es importante para la respiración del alimento, por ejemplo un vegetal envasado, almacenarlo en condiciones anaerobias puede producir sabores y olores desagradables. (Sies, 1997) Es por esto que la adición de antioxidantes mantiene al producto en buen estado, sin tener que someterlo a condiciones que afecten sus propiedades organolépticas. El antioxidante debe ser bien incorporado a los alimentos de forma homogénea, ya que si no es así, varias moléculas quedarán desprotegidas y podrán sufrir oxidación, disminuyendo la vida útil del producto final. (Vieira, 2004)

1.4.1.2.1 Alimentos funcionales

Según el documento de “Biotecnología para el Desarrollo Sostenible de la biodiversidad” elaborado por Roca W., *et al.*(2005), los “alimentos funcionales” se han convertido en un término de rápida aceptación para describir alimentos que, en razón de la adición de componentes fisiológicamente activos, ofrecen beneficios que trascienden la nutrición básica y pueden prevenir las enfermedades o mejorar la salud. Ejemplos de los alimentos funcionales incluyen jugos fortificados, bebidas energéticas, alimentos para pérdida de peso, para prevención de ciertas dolencias, y otros.

Los diez alimentos principales que se reconoce que pueden tener beneficios adicionales para la salud además de la nutrición básica son el brócoli, las naranjas/jugo de naranjas, verduras de hoja verde, pescado/aceite de pescado/frutos del mar, zanahorias, ajo, tomates, leche, avena/salvado de avena y las fibras. (IFIC, 2002)

Se sabe también que muchas personas hacen una relación componente alimenticio/enfermedad, siendo identificadas como las más importantes el calcio/osteoporosis, antioxidantes/cáncer y proteína de soya/enfermedades cardíacas. Las tendencias actuales llevan a los consumidores a buscar alimentos saludables con el fin de poder prevenir o controlar enfermedades cardiovasculares, coronarias, hipertensivas, síndrome metabólico, colesterol, obesidad, depresión, anemia, infecciones del aparato urinario, diabetes, cáncer de mama, osteoporosis, etc. (IFIC, 2002; Fábregas, 2003)

Los compuestos activos presentes en los alimentos funcionales son fitoestrógenos, carotenoides, flavonoides, ácidos grasos insaturados, proteínas, vitaminas, minerales, oligoelementos, fibras, aminoácidos, péptidos, oligosacáridos, alcoholes, antioxidantes, y bacterias. (Fábregas, 2003)

Según IADSA (2008) el mercado global de suplementos alimenticios está valorado en 50 000 millones de dólares. Las evaluaciones más conservadoras estiman que el mercado mundial alcanzará los 550 000 millones de euros en el 2010. (Fábregas, 2003)

Los alimentos funcionales que tienen mayor demanda son los que pueden mejorar el funcionamiento del sistema inmunológico, reducir el riesgo de cáncer, prevenir enfermedades cardiovasculares y disminuir el exceso de colesterol. (Fábregas, 2003)

La explotación del mercado de los alimentos funcionales, especialmente en Ecuador, un país con gran biodiversidad; es de suma importancia ya que poseemos innumerables recursos, que identificando y aislando sus componentes activos podemos aprovecharlos para crear nuevos productos alimenticios que traerán grandes beneficios tanto económicos, como en la salud de la gente que los consumirá.

1.4.2 Información sobre la alcachofa

La alcachofa (*Cynara scolymus* L.), es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia *Asteraceae*. Es una gimnosperma dicotiledónea, robusta y perenne, de polinización cruzada, posee un genoma diploide con 34 cromosomas en total. La planta crece hasta una altura de 1 m – 1,5 m o más y cubre un área de 1,5 m – 2 m aproximadamente de diámetro; de color verde plateado. (Nicho, 2004) Estas y otras características varían dependiendo de la variedad de alcachofa.

Como alimento, la alcachofa es nutritiva y saludable, recomendado en dietas para disminuir peso, colesterol, y retención de líquidos puesto que es baja en grasas, sodio y carbohidratos. Contiene proteínas, calcio, hierro, fósforo y vitaminas A, E B1, B2 y C. (CIC-CORPEI, 2003)

Esta planta también es conocida por otros nombres como: alcaucil, alcachofero, morrillera, artichoke (inglés), artichaut (francés), artischoke (alemán), carciofo (italiano), alcachofra (portugués), alcarxuf (árabe,) artisjok (holandés). (Ramírez, 2004)

Nicho (2004), también determinó las siguientes características botánicas de las alcachofas:

Raíz: Sistema radicular ramificado. La raíz principal alcanza hasta 1,2 m de profundidad y las raíces secundarias cubren un área de 0,5 m – 0,6 m de diámetro y sirve como un órgano de almacenamiento.

Tallo: Erguido, grueso con 10 – 14 cm de diámetro en la base, ramificado y con nervaduras longitudinales y superficiales. Al inicio de su ciclo biológico se produce una roseta de hojas en un tallo comprimido, seguido del crecimiento de un tallo floral. El tallo produce una yema terminal (inflorescencia primaria), tres o cuatro yemas secundarias (inflorescencias secundarias), cuatro o cinco yemas terciarias (inflorescencias terciarias) cuatro a seis inflorescencias cuaternarias y varias yemas pequeñas que dependen del manejo agronómico. La yema terminal es la primera en aparecer y se desarrolla a medida que el tallo crece, las yemas secundarias, terciarias y cuaternarias se desarrollan ligeramente más tarde.

Hojas: Alcanzan más de 1 m de largo con 0,3 m de ancho, con bordes lobulados y aserrados, de nervaduras pinnatinervadas y pecíolo que se une en vaina al tallo; de color grisáceo en la cara superior y vellosa en la inferior, de nervadura central gruesa.

Inflorescencia: Las yemas florales (cabezuelas) consisten de brácteas superpuestas con base carnosas sobre un receptáculo expandido; su uso es antes que las partes florales estén bien desarrolladas. Los flósculos inmaduros en la etapa de yemas son como cabellos y al madurar se abren, expandiendo los flósculos de color lila que son muy atractivos para la vista.

Semilla: Las semillas son aquenios de forma oblonga, de color grisáceo con manchas pardas.

La clasificación taxonómica de la alcachofa según Ramírez (2004), es la siguiente:

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsidae*
Sub-Clase: *Asteridae*
Orden: *Asterales*
Familia: *Asteraceae*
Género: *Cynara*
Especie: *Cynara scolymus* L.



Figura 1.2 Alcachofa (Seedcount, 2009)

La variedad que va a ser utilizada en esta investigación se llama Imperial Star, según el dato proporcionado por INAEXPO, (2008).

Según Barahona (2008), la variedad conocida como Imperial Star es una de las más utilizadas por la agroindustria ecuatoriana debido a características favorables como su alta densidad cultivo, la cual supera las 6 000 plantas por hectárea, y que no posee espinas en las puntas de las brácteas, lo cual facilita el manejo durante el procesamiento. Las alcachofas de esta variedad son plantas anuales o bianuales, son pequeñas (~ 1 m), y no producen hijuelos, lo cual es una desventaja. Para ser procesadas, es necesario que la cabeza posea entre 12 y 15 cm de diámetro, porque después las brácteas se vuelven fibrosas y dificultan el consumo. Esta variedad fue traída al Ecuador desde Norteamérica.

En Ecuador las zonas de producción de alcachofa más representativas se encuentran en Bolívar, Zuleta, Quinche, Yaruquí, Minas, Latacunga, Machachi, Salcedo, Izamba, Pelileo, Cebadas, Biblián, Nabón y San Joaquín, porque cuentan con las condiciones ideales, por su clima, altura y suelos de las siguientes características: franco arcilloso-arenoso; franco arenoso, ricos en materia orgánica, de profundidad media y con buen drenaje, con un pH de 6.5 - 7.5. (CIC-CORPEI, 2003)

1.4.2.1 Principios activos en hojas y brácteas de alcachofa

La alcachofa tiene principalmente como principios activos algunos ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cafeilquínico, y el ácido dicafeilquínico. La cinarina, uno de los más representativos, es el ácido 1,3-O-dicafeilquínico o el 1,5-O-dicafeilquínico. También posee flavonoides derivados de la luteolina; inulina, ácidos alcoholes como el ácido málico, láctico, fumárico; aceites esenciales, fitoesteroles, triterpenos, taninos, lactonas sesquiterpénicas amargas como la cinaropicrina. (Carretero, 2000) Mabeau et al., (2005), determinó que los compuestos fenólicos más representativos en las alcachofas son el ácido Cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), el ácido Clorogénico (ácido 3-Cafeilquinico), la cinarina, el cinarósido, la isorhoifolina, y la narirutina, todos estos con propiedades antioxidantes.

La hoja de alcachofa, gracias a sus principios activos, posee propiedades diuréticas, coleréticas, hepatoestimulantes; disminuye los niveles séricos de lípidos y colesterol. Los compuestos responsables de la actividad son principalmente los ácidos cafeilquínicos y los flavonoides. Las hojas de alcachofa poseen también una marcada actividad antioxidante. (Carretero, 2000)

Muchas fuentes de información mencionan que los principios activos de la alcachofa se encuentran únicamente en sus hojas y no en otra parte como sus brácteas o el corazón, pero estudios recientes como el de Fratianni et al., (2007), y Coinu et al., (2006), demostraron que las brácteas de alcachofa de algunas variedades poseen concentraciones importantes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, es decir que contienen las mismas especies de compuestos fenólicos que las hojas, y que las diferencias entre estas partes vegetales son principalmente cuantitativas. Los principales compuestos fenólicos encontrados en las brácteas fueron el ácido 1,5-O-dicafeilquínico (cinarina), seguido del ácido clorogénico y la 7-O-glucuronida.

Otro compuesto que se puede encontrar en las brácteas de alcachofa es el ácido cafeico, que al igual que el ácido clorogénico tiene actividad biológica de gran importancia como antioxidante, antiviral, antibacteriano y antifúngico.

Ambos compuestos también han demostrado efectividad en la prevención de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (Chengdu, 2008).

Coinu et al., (2006), concluyeron que el efecto antioxidante (prueba de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad - LDL) de los extractos etanólicos de brácteas de alcachofa versus los extractos etanólicos de hojas no está relacionada a la cantidad total de compuestos fenólicos o alguna subclase en particular presente en las partes vegetales, esto sugiere que la actividad no está en función de las concentraciones de los compuestos fenólicos por sí mismos, sino que también influyen factores como la interacción con otras moléculas. La actividad antioxidante de los extractos fue medida mediante la prueba de inhibición de la oxidación del LDL humano por iones de cobre. Esta prueba demostró que el extracto etanólico de las brácteas de alcachofa tiene una mejor actividad que el extracto de etilacetato de hojas, aunque este tuviera casi el doble de la concentración de compuestos fenólicos totales.

Según Fratianni et al., (2007), las brácteas de alcachofa son una importante fuente de compuestos fenólicos con propiedades beneficiosas para el organismo, y pueden llegar a ser un recurso alternativo para las aplicaciones farmacéuticas tradicionales que solo utilizaban extractos de las hojas. Esto resalta la importancia de utilizar los subproductos o mal llamados desechos que constituyen las brácteas de alcachofa como material para obtener este tipo de sustancias.

Aunque estas drogas carecen de toxicidad, pueden producir alergia, especialmente en personas sensibles a productos provenientes de especies de la familia *Asteraceae*. (Carretero, 2000)

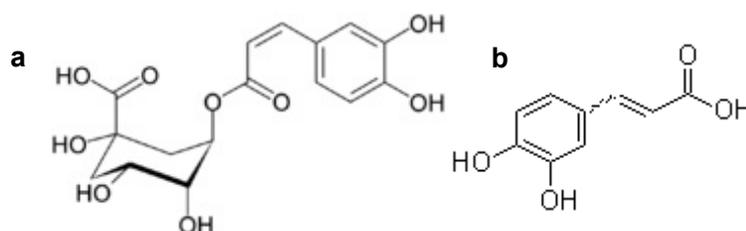


Figura 1.3 Estructura del ácido clorogénico (a) y del ácido cafeico (b)

(Chengdu, 2008)

1.4.3 Stress Oxidativo y antioxidantes

La oxidación dentro de las células, también conocida como stress Oxidativo, se da cuando existe un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, lo cual produce desordenes muy peligrosos como enfermedades cardíacas o cáncer. Este fenómeno puede ser provocado por condiciones ambientales, hábitos como fumar o inclusive una mala alimentación. Por otro lado, una buena alimentación rica en frutas, verduras y otros vegetales, puede ayudar a nuestras células a controlar el stress oxidativo ya que se proveen de antioxidantes de origen natural. (Urquiaga & Leighton, 2000)

Vieira (2004), indica que el proceso de oxidación de lípidos en los alimentos se puede dividir en tres etapas: Iniciación, Propagación y Terminación. La etapa de iniciación es donde se forman los radicales libres a partir de una molécula grasa, la etapa de propagación es donde el oxígeno interactúa con el radical libre formando un peróxido que a su vez ataca a otra molécula de grasa formando un hidroperóxido y otro radical libre, y la última etapa, de terminación, es cuando los peróxidos se combinan, formando moléculas más estables y los hidroperóxidos forman otras diversas moléculas con funcionalidades ácidas, aldehídicas, alcohólicas, cetónicas... En esta etapa, todo el material es degradado irreversiblemente, llevando a la descomposición total del producto, generando olor rancio y cambio de color, demostrando la oxidación. La adición de antioxidantes hace que la etapa de terminación ocurra artificialmente, ya que esta sustancia reacciona con los radicales libres formados en la primera etapa, evitando de esta manera, la propagación a otras moléculas y la formación de nuevos radicales libres.

El pardeamiento enzimático es otra forma de oxidación de los alimentos. La enzima responsable de este fenómeno es la polifenoloxidasas o tirosinasa, esta tiene como sustrato principal al oxígeno molecular o, en el caso de los vegetales, a compuestos fenólicos como el ácido clorogénico. Esta reacción puede provocar coloraciones marrones, rojizas o negras, afectando la presentación y características del alimento, debido a la formación de nuevas sustancias. (Calvo, n.f.)

Los antioxidantes son definidos como cualquier sustancia que, estando en baja concentración comparado a un sustrato oxidable, pueden retrasar significativamente o inhibir por completo la oxidación del sustrato. Estos compuestos pueden ser de naturaleza enzimática tanto como no enzimática. (Sies, 1997)

Existen distintos tipos de antioxidantes y, de acuerdo a su origen pueden ser naturales o sintéticos. Los antioxidantes sintéticos fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y económica en relación a los antioxidantes naturales. Los antioxidantes pueden ser efectivos cuando se aplican separadamente, sin embargo, cuando se utilizan en combinación de dos o más, su acción es reforzada. Como efecto secundario, algunos antioxidantes también presentan acción antimicrobiana. (Vieira, 2004)

Los antioxidantes más utilizados como aditivos alimenticios son: ácido ascórbico, ascorbato de sodio o calcio, ácidos grasos ésteres del ácido ascórbico, tocoferoles, galatos, ácido eridórbico, eridorbato de sodio, hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). (UK Food Guide, 2002).

1.4.3.1 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de las propiedades REDOX de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Los grupos hidroxilo fenólicos tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Es por eso que desempeñan un papel muy importante en la protección frente a los fenómenos oxidativos, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. (Martínez Flores et al., 2002)

Los flavonoides son compuestos fenólicos que funcionan como potentes antioxidantes de origen natural, poseen una alta capacidad de quelar hierro y otros metales de transición debido a la presencia de sus grupos hidroxifenólicos. Sus propiedades anti-radicales libres actúan sobre el radical hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas relacionadas con el inicio de la cadena de peroxidación lipídica. Pueden unirse a los polímeros

biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. (Martínez Flores et al., 2002)

Algunos estudios afirman que la acción antioxidante de los flavonoides radica esencialmente en el enlace doble C-2 C-3, el carbonilo C-4, y los hidroxilos en C-3 y C-5. (Martínez M., 2005) Otros criterios químicos considerados para que los flavonoides tengan propiedades antioxidantes son los siguientes:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. (Martínez Flores et al., 2002)

Los flavonoides retiran el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos; de esta manera bloquean la acción de dichas sustancias en las células. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas. (Martínez Flores et al., 2002)

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y las protege de la acción de los radicales libres, también tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles, es decir; se disuelven en lípidos o en agua. Esta última es una característica que los pone en ventaja frente a otros antioxidantes. (Martínez Flores et al., 2002) Estos compuestos también tienen la capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides, de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. (Martínez Flores et al., 2002) Sus propiedades antioxidantes también pueden ser utilizadas para conservar alimentos, mediante la aplicación de extractos.

1.4.4 Compuestos antimicrobianos de origen vegetal

Un antimicrobiano es toda sustancia, que en bajas concentraciones, es capaz de actuar sobre los microorganismos, inhibiendo su crecimiento o destruyéndolos, sin provocar toxicidad. Las sustancias que solo detienen el crecimiento y multiplicación de microorganismos son conocidas como microbiostáticos (bacteriostáticos/fungistáticos), y las que los eliminan definitivamente son conocidas como microbicidas (bactericidas/fungicidas). (Tournier, 2007; García Ruiz, 2004) Estas sustancias pueden ser de origen microbiano, animal o vegetal. (Santos Buelga, 2002) Las primeras incluyen compuestos producidos por microorganismos, las de origen animal incluyen proteínas enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas o proteasas y polisacáridos como el quitosán, y las de origen vegetal incluyen compuestos como polifenoles provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

Los antimicrobianos de origen vegetal provienen de plantas superiores, estos se encuentran presentes en sus tejidos en forma de precursores inactivos, pero cuando la planta sufre alguna herida o daño se activan por interacción con algunas enzimas, convirtiéndose en moléculas activas. Por ejemplo, la allicina del ajo se activa por acción de la allinasa sobre la alliína. (Albornoz, 1980) Los isotiocianatos, la allicina, los fenoles y polifenoles como fenoles simples, derivados del ácido hidroxicinámico, flavonoides, taninos, antioxidantes fenólicos y parabenos son algunos compuestos antimicrobianos de origen vegetal. Estos actúan sobre las membranas plasmáticas de los microorganismos, tienen un importante efecto sobre las propiedades organolépticas del alimento, y en el caso de que sean antioxidantes, van a producir beneficios para la salud. (Santos Buelga, 2002)

Muchas especias y hierbas de uso gastronómico tienen actividad antimicrobiana; como ejemplo están el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, etc. Los compuestos que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente. Las bacterias patogénicas más afectadas por estos compuestos son *C. botulinum*,

B. cereus, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, y *V. parahaemolyticus*. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

Todas estas propiedades pueden ser transferidas hacia alimentos que no las poseen, como por ejemplo todos los alimentos procesados y envasados, mediante la aplicación de estos compuestos en forma de aditivos.

1.4.4.1 Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos

Compuestos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico, p-cumárico, ferúlico y quínico están presentes en partes de plantas que son usadas como especias. La actividad antimicrobiana de esos y otros ácidos, como el hidroxicinámico y cinámico, pueden retardar la invasión microbiana así como también la putrefacción de frutas y vegetales. Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mohos y levaduras comúnmente encontradas como organismos contaminantes, son sensibles a los derivados del ácido hidroxicinámico. Los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, por ejemplo, inhiben *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus*. Otros compuestos fenólicos que han demostrado tener actividad antimicrobiana son los flavonoles, los taninos y el ácido tánico, que es inhibitorio para *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *A. hydrophila* y *S. faecalis*. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

La actividad antimicrobiana identificada en los flavonoides y otras evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales, sugieren que estas sustancias también son un mecanismo químico de defensa vegetal. (Martínez M., 2005)

1.4.4.2 Antimicrobianos como aditivos alimenticios

El objetivo primordial de las empresas procesadoras de alimentos es suministrar a sus consumidores alimentos seguros y nutricionalmente adecuados, que cubran expectativas de sabor, aroma, apariencia y comodidad al consumirlos. (García Ruiz, 2004) Por esta razón se investiga constantemente como hacer que estos productos se conserven en mejores condiciones y por mucho más tiempo, asegurando condiciones de calidad. Este es el campo donde se aplican los aditivos alimenticios de preferencia de

origen natural, que tengan la capacidad de conservar a los alimentos durante su procesamiento y posterior almacenamiento.

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, pero los alimentos procesados y envasados requieren un tratamiento especial con aditivos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural con fines antimicrobianos requiere un procedimiento adecuado de aislamiento, purificación, estabilización e incorporación, de manera que no se afecte negativamente las características sensoriales, nutritivas y sanitarias del producto. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

El deterioro de los alimentos por efecto de los microorganismos no depende únicamente del tipo de microorganismo presente, sino también de la composición química del producto, y del tipo de carga inicial que este posea. (García Ruiz, 2004)

El aspecto más importante del uso de compuestos antimicrobianos es el toxicológico, ya que se piensa que los compuestos naturales que tienen actividad antimicrobiana son menos tóxicos que los sintéticos, y no siempre es así. Para que un compuesto con actividad antimicrobiana se considere para ser utilizado en alimentos hay que demostrar que no tiene efectos tóxicos o que no es responsable de alteraciones de la salud. El problema está en que las concentraciones necesarias de estas sustancias para lograr la inhibición del crecimiento microbiano normalmente son mayores a las consumidas con regularidad. También es importante que se demuestre que esas sustancias son metabolizadas, excretadas, no dejan residuos y que tampoco destruyen nutrientes importantes presentes en los alimentos. (Raybaudi-Massilia et al., 2006)

1.5 Preguntas de investigación

¿Las brácteas de alcachofa pueden ser utilizadas como coproducto del procesamiento de la planta para extraer principios activos útiles como antioxidantes y antibacterianos?

¿Los extractos de brácteas de alcachofa pueden ser utilizados como conservantes para alimentos?

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

- Dra. Blanca Naranjo, Directora del proyecto
- Ing. Pablo Araujo MSc., Codirector del proyecto
- MSc. Alma Koch, Docente colaborador (ESPE)
- Dr. Carlos Cárdenas, Docente colaborador (IASA)
- MSc. Wilson Tapia, Docente colaborador de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS).
- Juan Carlos Dueñas Ricaurte, Estudiante tesista.
- Escuela Politécnica del Ejército / Universidad Politécnica Salesiana.

2.2 Zona de estudio

El proyecto de graduación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la carrera de ingeniería en biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, localizados en Sangolquí, provincia de Pichincha; y en el laboratorio de principios activos de la carrera de ingeniería agropecuaria (IASA), localizados en Selva Alegre, provincia de Pichincha.

2.3 Período de tiempo de investigación

El proyecto de graduación arrancó en el mes de octubre de 2008. La parte práctica, que comprende la elaboración de los extractos, la caracterización, y las pruebas de actividad, terminó en mayo de 2009. El análisis de los datos obtenidos, la estadística, las correcciones, y la redacción del documento final terminaron a finales del mes de julio del 2009. En síntesis la investigación se desarrolló durante 10 meses, desde octubre de 2008 hasta julio de 2009.

2.4 Diseño

Para la determinación de humedad, de contenido de fenoles totales, de actividad antioxidante y de actividad antibacteriana, cada ensayo fue realizado por triplicado.

Para la prueba de actividad antibacteriana de los extractos de brácteas de alcachofa se prepararon 12 cajas, 6 de las cuales eran para *Staphylococcus aureus* y 6 para *Salmonella* spp. De estas 6 cajas correspondientes a cada bacteria, 3 eran para probar el extracto alcohólico y 3 para el extracto hidroalcohólico, cada uno con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.

2.5 Instrumentos

2.5.1 Reactivos

- Ácido Cafeico $\geq 98\%$, (HPLC) SIGMA,
- Ácido clorogénico Hemihidratado $\geq 98\%$, FLUKA,
- Ácido Clorhídrico 36%, grado reactivo JT BAKER,
- Ácido Acético Glacial 99.7%, grado reactivo JT BAKER,
- Ácido Sulfúrico 98%, grado reactivo, PANREAC,
- Alcohol butílico, grado reactivo MALLINCKRODT,
- Caldo de cultivo Trypticase Soya (TSB), DIFCO,
- Cloruro de bario dihidratado 99%, grado reactivo, PANREAC
- Dimetil Sulfóxido 99.5% (DMSO), SIGMA,
- Etanol 99.6%, desnaturalizado grado reactivo PANREAC,
- Hexano 95%, grado reactivo JT BAKER,
- Metanol, grado reactivo MALLINCKRODT,
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, SIGMA-ALDRICH,
- Radical libre DPPH (2,2-difenil 1-picrilhidracilo), SIGMA,
- Quercetina Dihidratada $\geq 98\%$, (HPLC) SIGMA,
- Medio de cultivo Mueller-Hinton, DIFCO

2.5.2 Equipos y Software

- Autoclaves
- Balanza analítica KERN ABJ
- Cámara de vidrio para cromatografía
- Cámara de visualización de luz ultravioleta UVP
- Espectrofotómetro UV-VIS Dual Beam 8 Auto Cell LABOMED, INC
- Estufa para secado PRECISION
- Hot Plate con agitador magnético CIMAREC
- Equipo HPLC
- Incubadora WISECUBE
- Lámpara de luz ultravioleta UVP (254 – 365 nm)
- Licuadora OSTERIZER
- Liofilizador TELSTAR CRYODOS
- Malla de Calentamiento GLAS-COL
- Micropipetas EPPENDORF
- Purificador de agua MILLIPORE
- Rotavapor HEIDOLPH LABOROTA 4001
- Secador de hojas artesanal
- Super Congelador DR. DAREI
- SPSS 15 para Windows, Microsoft EXCEL, Microsoft WORD, y Microsoft PowerPoint.

2.6 Procedimientos

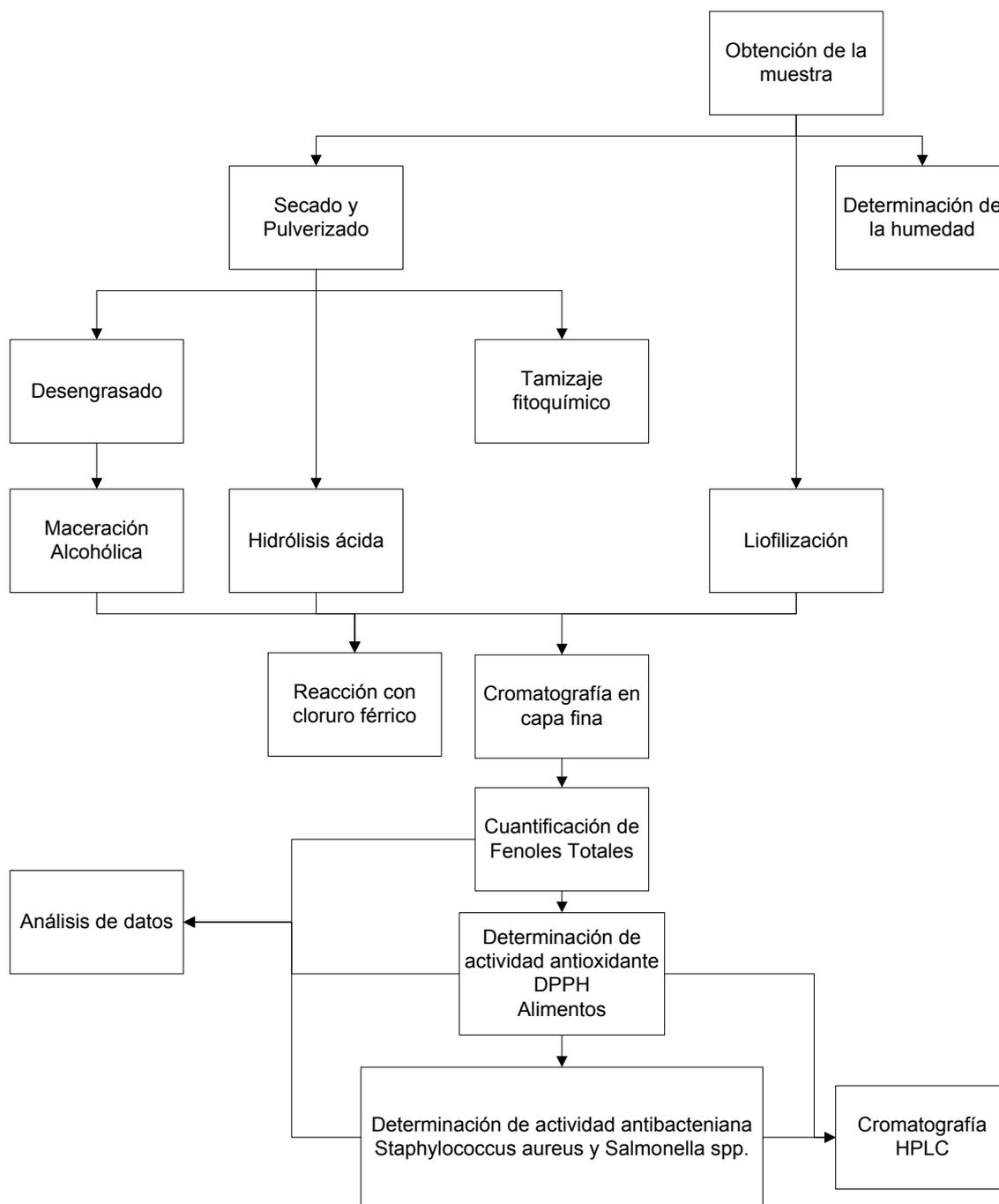


Figura 2.1 Diagrama de bloques general de los procedimientos

2.6.1 Determinación de la humedad de las brácteas de alcachofa

El método sugerido por Naranjo (2008), en comunicación personal, estableció que para determinar la humedad de las brácteas de alcachofa se realiza el proceso en cápsulas de porcelana: limpias y taradas durante una noche en estufa a una temperatura de 105-110°C. Después, sacar las cápsulas de la estufa, enfriar en desecador con sílica granulada y deshidratada durante 30 minutos.

Pesar las cápsulas vacías y luego adicionar aproximadamente 2 – 3 g de brácteas de alcachofa.

Secar las muestras en la estufa durante 4 horas a una temperatura de 105-110°C. Sacar las cápsulas y dejarlas en desecador durante 30 minutos.

Pesar las cápsulas con la muestra seca hasta peso constante

Calcular el porcentaje de humedad y el peso seco de muestra.

Para determinar el porcentaje de humedad se utiliza la siguiente fórmula:

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

2.6.2 Secado de las brácteas

El método sugerido por Naranjo (2008), en comunicación personal para el secado de las brácteas de alcachofa manifestó que estas deben ser almacenadas durante 10-15 días, espaciadamente en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente para que los principios activos no sufran alteraciones. Es necesario vigilar las brácteas y moverlas para permitir un buen secado y evitar un proceso de pudrición por hongos.

Un método adicional para secar las brácteas de alcachofa es someterlas a un secado rápido a una temperatura no mayor a 40°C en el secador artesanal de hojas durante varias horas, hasta que estas queden crujientes. Cuando el material vegetal se encuentra seco, se lo pulveriza utilizando un molino y un tamiz para recuperar la muestra molida.

2.6.3 Desengrasado de la muestra

Según Naranjo (2008), mediante comunicación personal, para desengrasar las muestras de brácteas de alcachofa molidas, es necesario dejarlas en maceración dentro de envases de vidrio ámbar con hexano durante 2 semanas, para que se extraigan las grasas y los componentes apolares que puedan interferir en las pruebas de actividad que deben realizarse posteriormente. Después de ese tiempo se debe retirar el hexano del envase y dejar que evapore el residuo de solvente de la muestra. El hexano extraído puede ser recuperado en el rotavapor.

Se puede realizar el desengrasado mediante un equipo de extracción Soxhlet, pero según Braca (2008), mediante comunicación personal, la mejor forma es realizarlo a temperatura ambiente para evitar la alteración o destrucción de principios activos.

2.6.4 Extracción de principios activos

2.6.4.1 Liofilización

El protocolo sugerido por Cárdenas (2008), en comunicación personal, estableció que para liofilizar brácteas de alcachofa se deben pesar 50 g de brácteas de alcachofa, licuar con 1 L de agua destilada desionizada hasta conseguir homogeneidad, y dejar reposar el licuado durante unos minutos para sedimentar la fibra. En esta etapa se van a observar tres fases dentro de la licuadora, una es la fibra localizada en el fondo, otra es la espuma formada por las saponinas presentes en las brácteas de alcachofa, y la última es el extracto acuoso de color marrón.

Después, verter cuidadosamente el contenido de la licuadora en los envases de vidrio, aproximadamente 200 mL de extracto por envase, utilizando gasas esterilizadas como filtro, para que estas retengan la fibra de alcachofa que no sedimentó.

Antes de poner los envases de vidrio en el liofilizador es necesario congelar el contenido de los mismos en las paredes, para que haya una mayor superficie de contacto con el vacío y la baja temperatura generada por el equipo, y de esta manera el proceso sea más rápido. Este congelamiento se lo realiza en un supercongelador, para esto se recomienda utilizar menos

volumen de extracto acuoso por envase. El congelado tendrá a una temperatura aproximada de - 73°C.

Con los envases y los extractos congelados, preparar el liofilizador, limpiándolo y estabilizándolo a 0.034 mBar y - 71°C. La estabilización del liofilizador dura aproximadamente diez minutos. Después, se debe poner los envases de vidrio en las tomas del liofilizador y abrir la válvula de vacío.

Finalmente, dejar el equipo en funcionamiento durante 24 o 48 horas, hasta que todo el contenido de los envases haya sido transformado en polvo de color marrón. Una vez terminado el procedimiento se debe almacenar el liofilizado en envases limpios, secos y bien cerrados.

2.6.4.2 Maceración con Etanol

Este procedimiento sugerido por Naranjo (2008), en comunicación personal, estableció que después de desengrasar las brácteas de alcachofa durante 2 semanas en hexano, se debe poner a la muestra en maceración con etanol al 99.6% durante 4 semanas, tomando aproximadamente 50 mL de alcohol por cada 10 g de muestra. Cada semana se debe cambiar el alcohol para evitar la saturación del solvente y permitir una extracción continua de los principios activos. También se preparó un extracto hidroalcohólico de brácteas de alcachofa utilizando una solución hidroalcohólica al 70%. El procedimiento fue el mismo que para el extracto alcohólico puro. Ambos extractos, el alcohólico y el hidroalcohólico deben ser concentrados en el rotavapor en condiciones de vacío y a una temperatura no mayor a 40 °C para conservar los principios activos.

Las muestras en maceración y los recuperados deben estar almacenados en envases de vidrio, a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar.

2.6.4.3 Hidrólisis ácida

El método sugerido por Naranjo (2008), en comunicación personal, estableció que para realizar la hidrólisis ácida de las brácteas de alcachofa se deben pulverizar 15 g de brácteas de alcachofa y ponerlas en contacto con 200 mL una solución de ácido clorhídrico (HCl) 6N. Para preparar la solución

de HCl 6N, se deben mezclar dos volúmenes iguales de HCl y de agua destilada, esto porque el HCl utilizado viene en una concentración 12N.

Una vez preparada la solución, se vierte sobre la muestra y se deja en maceración en un balón de vidrio durante 3 días con el fin de que las brácteas pulverizadas se pongan en contacto con el ácido, de esta manera se romperán los glicósidos (azúcares) para liberar los compuestos fenólicos presentes en forma de agliconas. Después de los 3 días de maceración, se pone el balón en una malla de calentamiento, acoplada a un refrigerante para dejar el sistema en reflujo durante 12 horas. El sistema debe tener una temperatura en la cual el HCl 6N no pueda evaporarse.

Como método alternativo, otra muestra de brácteas de alcachofa pulverizadas se deja en maceración con la solución de HCl 6N durante 3 semanas, a temperatura ambiente y en la oscuridad, para poder determinar de qué manera influye el calor en el proceso de extracción.

Acabada la hidrólisis ácida se debe filtrar la solución obtenida usando lana de vidrio, y luego de filtrar se debe neutralizar la solución con bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hasta que el pH sea neutro. El hidrolizado debe ser almacenado en un envase de vidrio. Los extractos obtenidos deben ser concentrados en el rotavapor en condiciones de vacío y a una temperatura no mayor a 40 °C para conservar los principios activos.

2.6.5 Caracterización

2.6.5.1 Tamizaje fitoquímico

Una muestra de brácteas de alcachofa, secas y pulverizadas, fue enviada al laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) de Quito, donde se realizó un tamizaje o “screening” fitoquímico en el cual se identificaron cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en las brácteas, el análisis estuvo a cargo del MSc. Wilson Tapia.

2.6.5.2 Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina del extracto de brácteas de alcachofa se realizó según el procedimiento indicado por Naranjo (2009), en comunicación personal. En el primer paso se preparó la fase móvil con butanol, ácido

acético glacial y agua destilada en la proporción (4:1:5) y se la colocó dentro de la cámara cromatográfica, se aplicaron las muestras de los estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina y el extracto de brácteas de alcachofa en la cromatoplaque de sílica gel, utilizando capilares de vidrio, esto con el fin de poder identificar alguno de estos compuestos en el momento de observar la cromatoplaque en la cámara de luz UV.

Preparada la placa se realiza corrida en la cámara cromatográfica hasta por lo menos dos centímetros del límite superior. Una vez finalizado el recorrido de la fase móvil se sacó la placa de la cámara, se la dejó secar durante 30 minutos y se la observó dentro de la cámara de luz UV ajustando la lámpara a 365 nm de longitud de onda.

Finalmente se debe medir el factor de retardo "Rf" de cada uno de los compuestos revelados en las placas. La fórmula para calcular el Rf es:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuestos desde el origen}}{\text{distancia recorrida por el frente eluyente desde el origen}}$$

2.6.5.3 Cromatografía HPLC

El análisis del extracto alcohólico e hidroalcohólico mediante HPLC fue realizado en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana UPS de Quito, el análisis estuvo a cargo del MSc. Wilson Tapia. Los estándares de compuestos fenólicos utilizados fueron ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), ácido clorogénico (ácido 3-Cafeilquínico) y quercetina.

2.6.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

2.6.6.1 Reacción con Cloruro férrico (FeCl₃)

Para determinar cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de brácteas de alcachofa se disolvió una fracción del extracto en 1 mL de etanol y se añadió 0,5 mL de una solución de cloruro férrico (FeCl₃) al 5% en solución salina. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos. Para extractos acuosos la aparición de un color rojizo demuestra la presencia de compuestos fenólicos (Naranjo, n.f.)

2.6.6.2 Determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu

Para determinar el contenido de fenoles totales de los extractos de brácteas de alcachofa se utilizó el procedimiento de Rivero (2006) con ciertas modificaciones. En primer lugar se realizó una curva de calibración con una solución metanólica de un compuesto fenólico estándar (Quercetina), la cual fue diluida desde una concentración de 2 mg/mL hasta 0,2 mg/mL en intervalos de 0,2 mg/mL, midiendo la absorbancia de cada dilución a 760nm. Con estos datos se elaboró la curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina (EQT).

La ecuación de la regresión lineal utilizada fue:

$$y = ax + b$$

$$y = \text{Abs}_{760\text{nm}}$$

x = concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina (EQT)

Despejando x:

$$[\text{EQT}] = \frac{y - b}{a}$$

El procesamiento de las muestras, para estándar y extractos, consistió en mezclar dentro de un balón aforado 1 mL de muestra y 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, agitar y esperar que pase 1 minuto (no más de 8) para agregar 1,5 mL de carbonato de calcio (CaCO_3) y 7mL de agua destilada, llegando a un volumen final de 10 mL. Para este procedimiento es recomendable usar una Micropipeta de 2500 μL de capacidad.

Después de 2-3 horas de reposo a temperatura ambiente y en la oscuridad, la reacción provocará que la mezcla se torne de color azul oscuro, debido a la formación de sales de tungsteno y molibdeno provenientes del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Después se midió la absorbancia de cada muestra diluyendo una alícuota de la mezcla con agua destilada (1:20), esto porque el color azul es muy intenso y no puede ser medido directamente por el espectrofotómetro. Las diluciones deben hacerse siempre con micropipetas.

Finalmente, obtenidos los datos de absorbancia de los extractos se reemplazó el valor de la absorbancia en la ecuación obtenida mediante la regresión potencial y el resultado es el contenido de fenoles totales expresado en equivalentes de quercetina (EQT). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para calcular la concentración de fenoles totales por cada 100 g de brácteas frescas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg}^{\text{EQT}} / 100\text{g brácteas frescas} = \frac{\left(\left[\text{EQT} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right] * \text{mL extracto} \right)}{\text{g muestra fresca}} * \frac{100}{\text{g muestra fresca}}$$

2.6.7 Determinación de la actividad antioxidante

2.6.7.1 Radical libre DPPH (2,2-difenil,1-picrilhidracilo)

Para determinar actividad antioxidante de los extractos de brácteas de alcachofa se utilizó el procedimiento de Rivero (2006). En primer lugar se realizó una curva de calibración con una solución metanólica del radical libre DPPH, la cual fue diluida desde una concentración de 0,1 mM hasta 0,01 mM en intervalos de 0,02 mM, midiendo la absorbancia de cada dilución a 517nm. Estos datos sirven para obtener la ecuación de concentración de DPPH a partir de la regresión lineal de la curva de calibración.

La ecuación de la regresión lineal utilizada fue:

$$y = ax + b$$

$$y = \text{Abs}_{517\text{nm}}$$

x = concentración de DPPH

Despejando x:

$$[\text{DPPH}] = \frac{y - b}{a}$$

Para medir el poder antioxidante de cada extracto se procedió a mezclar 50 µL de extracto con 2 mL de solución 0,1 mM de DPPH en una celda de cuarzo donde se midió la variación de la absorbancia a 517nm durante 30 minutos.

Para determinar la EC_{50} de cada extracto se hicieron varias diluciones de cada uno y se tomaron los datos de concentración final del DPPH después de 30 minutos. Con esos datos se realizaron regresiones lineales, de las cuales se obtuvieron ecuaciones en donde se reemplazo el valor de x por 0,05 el cual corresponde a la concentración media de la solución 0,1mM de DPPH, para obtener el valor de y , el que indica la dilución necesaria para obtener la EC_{50} .

2.6.7.2 Prueba con alimentos

Para determinar el efecto de los extractos de brácteas de alcachofa contra la oxidación en alimentos, se utilizó banano, aguacate, pera y manzana, a los cuales se les hicieron cortes para poder aplicar los extractos sobre su superficie. Después de 5 horas se observó cual fue el efecto de los extractos versus el control que no tenía nada aplicado y versus el conservante comercial.

2.6.8 Determinación de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp.

Para determinar si los extractos de brácteas de alcachofa tienen actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en agar por discos (Cavalieri, 2005), mediante el cual, la presencia de un halo de inhibición en el cultivo bacteriano demuestra que el extracto sirve como agente antibacteriano.

Para realizar esta prueba fue necesario conseguir muestras de cepas puras de *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella* spp. del laboratorio de microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Para tener la certeza de que las bacterias eran las correctas fue necesario hacer la tinción Gram a ambas muestras.

El medio de cultivo que se debe utilizar para este tipo de estudio es el agar Mueller-Hinton. Su preparación consiste en diluir 38 g de medio Mueller-Hinton en 1 L de agua purificada, dejar hervir hasta que se disuelva todo, autoclavar durante 15 minutos a 15 psi y dejar enfriar a 45-50°C. Una vez preparado el medio se debe utilizar un dispensador autoclavado para distribuir 25 mL en cada una de las cajas petri (10 cm Ø), de esta forma todas tendrán

4 mm de altura de agar. Las cajas pueden ser almacenadas, con la tapa hacia abajo, a 2-8°C en el refrigerador.

El inóculo de bacterias utilizado para esta prueba debe ser exacto, por eso es necesario estandarizarlo mediante la comparación con una solución de turbidez conocida, como McFarland 0,5 equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente. Para preparar la solución McFarland 0,5 se deben mezclar 0,5 mL de cloruro de bario dihidratado (1,18 % p/v) con 99,5 mL de ácido sulfúrico (1% v/v), y agitar con el vortex hasta que el precipitado quede uniformemente esparcido. La absorbancia a 625nm de esta solución debe estar entre 0,08 y 0,1. Esta solución debe ser agitada cada vez que vaya a hacerse una medición o una comparación visual.

Las cepas puras de *S. aureus* y *Salmonella* spp. fueron sembradas e incubadas en caldo de cultivo tripticosa soya (TSB) a 35°C durante 18-24 horas. La turbidez del caldo debe ser igualada a la turbidez de la solución McFarland aumentando la cantidad de caldo hasta que se vean iguales y su absorbancia sea igual a la del estándar. De esta forma sabremos que el inóculo de bacterias será el mismo en todas las cajas.

Las concentraciones de los extractos a probarse fueron de 100%, 75%, 50%, y 25% diluidos en Dimetil sulfóxido (DMSO), el control negativo del experimento fue DMSO y el control positivo fue conservante de enlatados, el cual contiene agua (94,1%), sal (4,4%) y ácido ascórbico (1,5%). Cada sustancia fue vertida en una caja petri estéril con algunos discos de papel filtro, con el fin de que los discos las absorban.

Con todos los elementos listos, se procedió a inocular 100 µL de las bacterias del caldo ajustado a McFarland 0,5 en las cajas petri con agar Mueller-Hinton utilizando un asa de vidrio para esparcirlas, asegurándose de cubrir toda la superficie para obtener un buen crecimiento. Una vez sembradas las bacterias se introducen los discos empapados de los extractos en sus diferentes diluciones y los respectivos controles como lo indica la figura 2.2.

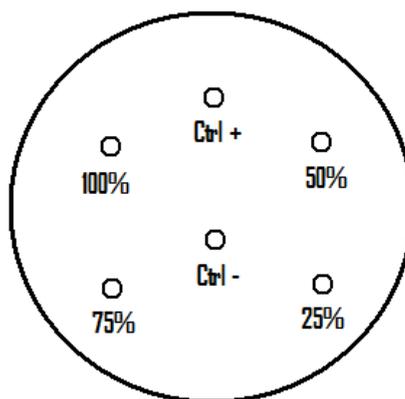


Figura 2.2. Posición de los discos para la prueba de actividad antimicrobiana.

Las cajas fueron incubadas a 35°C durante 18-24 horas con la tapa hacia abajo. Al día siguiente se midieron los halos de inhibición formados en los medios con una regla especial para el efecto.

2.7 Análisis de Datos

Para la determinación de humedad, contenido de fenoles totales, y actividad antioxidante de los extractos de brácteas de alcachofa se calcularon promedios, desviación estándar y error de muestreo de los datos obtenidos.

Para el análisis del contenido de fenoles totales presentes en los extractos de brácteas de alcachofa se realizó un ANOVA de un factor para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y también una prueba de Tukey para agruparlos y encontrar el mejor tratamiento para extraer compuestos fenólicos.

Para la determinación del poder antioxidante de los extractos de brácteas de alcachofa se realizó un ANOVA de un factor para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y también una prueba de Tukey para agruparlos y encontrar el mejor extracto reductor de concentración de radical libre DPPH. Después se determinó la correlación, mediante el análisis de Pearson, entre la concentración de fenoles totales y la concentración final de radical libre DPPH para determinar si la actividad antioxidante está relacionada con el contenido de fenoles totales.

Para la prueba de actividad antibacteriana de los extractos de brácteas de alcachofa se realizó un ANOVA factorial para determinar diferencias entre los extractos utilizados y también una prueba de Tukey para agruparlos y encontrar el extracto de mejor actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *Salmonella* spp.

El análisis de los datos fue realizado en los programas Microsoft EXCEL y SPSS v.15 para Windows.

3 RESULTADOS

3.1 Determinación de la humedad de las brácteas

Las brácteas de alcachofa tienen 85,07% ($\pm 0,646$) de humedad.

Tabla 3.1 Datos para determinar de la humedad de las brácteas de alcachofa. (Dueñas, 2009)

	Muestra húmeda	Muestra seca	Peso de Agua	% de Humedad
Muestra 1	2,5601	0,3887	2,1714	84,82
Muestra 2	2,7165	0,4162	2,3003	84,68
Muestra 3	2,9675	0,4235	2,5440	85,73
			Humedad Promedio	85,07
			Desviación Estándar	0,570
			Error de muestreo	$\pm 0,646$

Datos expresados en gramos (g) y porcentaje (%).

3.2 Secado de las brácteas de alcachofa

Las brácteas de alcachofa perdieron 84,35% ($\pm 0,471$) de agua al estar protegidas de la luz solar y a temperatura ambiente durante 10 días.

Tabla 3.2 Datos de pérdida de humedad de las brácteas de alcachofa a temperatura ambiente. (Dueñas, 2009)

	Muestras						Promedio % perdido		
Día 1	13,533	17,657	9,109	8,636	15,192	7,885	0		
Día 2	6,003	5,267	-	-	-	-	62,91		
Día 3	-	3,655	-	-	-	-	79,30		
Día 4	-	3,286	-	-	-	-	81,39		
Día 5	-	-	1,602	1,504	2,942	1,374	82,05		
Día 6	2,213	-	1,530	1,384	2,560	1,272	83,56		
Día 7	2,195	-	1,519	1,314	2,380	1,241	84,10		
Día 8	2,145	-	1,513	1,329	2,316	1,235	84,25	Desviación	Error de
Día 9	-	-	1,509	1,326	2,287	1,229	84,36	Estándar	muestreo
Día 10	-	-	1,511	1,325	2,288	1,229	84,35	0,481	0,471

Datos expresados en gramos (g) y porcentaje (%)

3.3 Caracterización de los extractos

3.3.1 Tamizaje o “screening” fitoquímico

El screening fitoquímico realizado a la muestra de brácteas de alcachofa en el laboratorio de productos naturales de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) se resume en la cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Resumen del tamizaje fitoquímico realizado a las brácteas de alcachofa (Dueñas, 2009)

Fase	Compuestos	Presencia
Etérea	Agliconas Flavonoides	+
Etérea	Carotenoides	+
Alcohólica	Cumarinas	+
Acuosa, Alcohólica	Taninos catéquicos	+
Alcohólica	Esteroles	+
Acuosa	Flavonoides	+
Acuosa	Saponinas	+
Acuosa	Compuestos reductores	+

+ Presencia de compuestos

Según estos resultados, el polvo de brácteas de alcachofa contiene compuestos fenólicos tales como flavonoides, cumarinas y taninos catéquicos, aparte de otros tipos de compuestos como azúcares reductores, saponinas, esteroles, y carotenoides.

Alcaloides, antocianidinas, lactonas y mucílagos no fueron hallados en el screening.

3.3.2 Reacción con Cloruro férrico (FeCl₃)

La reacción de los extractos de brácteas de alcachofa con cloruro férrico determinó que el extracto alcohólico, hidroalcohólico y los hidrolizados poseen compuestos fenólicos como parte de su composición.

Cuadro 3.2 Determinación cualitativa de la presencia de compuestos fenólicos mediante la reacción de los extractos con cloruro férrico. (Dueñas, 2009)

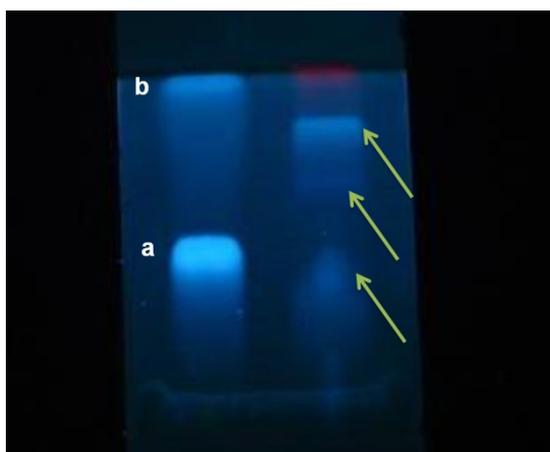
Extracto	Resultado
Alcohólico	+
Hidroalcohólico	+
Hidrolizado sin calor	+
Hidrolizado con calor y liofilizado	-

+ Presencia de compuestos fenólicos

- Ausencia de compuestos fenólicos

3.3.3 Cromatografía en Capa Fina

En el cromatograma del extracto alcohólico (Figura 3.1) se observó una banda que corresponde al ácido clorogénico. También se observaron otras dos bandas entre las de los estándares de ácido cafeico y clorogénico que corresponden otro tipo de compuestos. La banda roja con R_f 0,98 es clorofila.



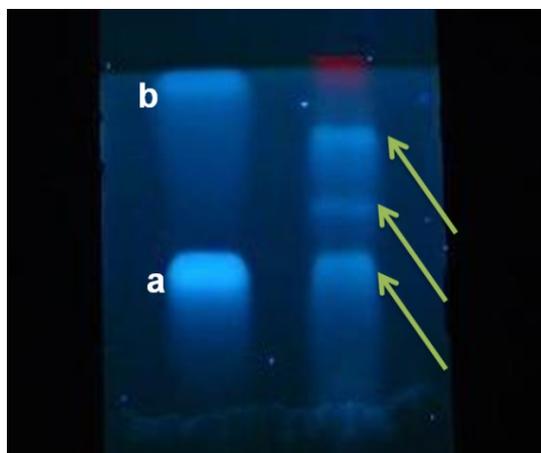
Ác. Cafeico	0,96	0,97
		0,84
		0,71
Ác. clorogénico	0,54	0,59

Figura 3.1 Cromatograma del extracto alcohólico. (Dueñas, 2009)

(a: ácido clorogénico; b: ácido cafeico)

En el cromatograma del extracto hidroalcohólico (Figura 3.2) se observó una banda que corresponde al ácido clorogénico, la cual se presenta mucho

más clara y definida que la del extracto alcohólico. También se observaron otras dos bandas, igualmente mejor definidas, entre las de los estándares de ácido clorogénico y ácido cafeico que corresponden a compuestos desconocidos. La banda roja con Rf 0,99 es clorofila.



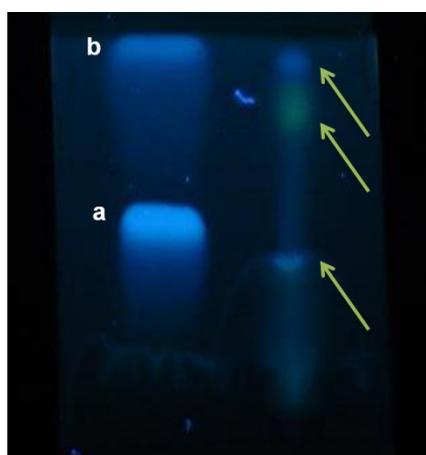
		0,99
Ác. Cafeico	0,95	
		0,82
		0,65
Ác. clorogénico	0,54	0,52

Figura 3.2 Cromatograma del extracto hidroalcohólico. (Dueñas, 2009)

(a: ácido clorogénico; b: ácido cafeico)

Los Rf de los estándares de los estándares y de los extractos alcohólico e hidroalcohólico son muy parecidos, los diferencia la intensidad y la claridad de sus bandas. Por esta razón es posible afirmar que ambos extractos poseen los mismos compuestos.

En el cromatograma del hidrolizado sin calor (Figura 3.3) se observaron 3 bandas, una de las cuales corresponde al ácido cafeico.



Ác. Cafeico	0,95	0,90
		0,76
Ác. clorogénico	0,53	
		0,42

Figura 3.3 Cromatograma del hidrolizado sin calor. (Dueñas, 2009)

(a: ácido clorogénico; b: ácido cafeico)

En el cromatograma del hidrolizado con calor no se observó separación alguna. El tratamiento de las brácteas con HCl 6N y temperatura mayor a 40°C no sirvió para elaborar un extracto que contenga compuestos fenólicos.

En los cromatogramas de los hidrolizados no se identificó la presencia de clorofila.

En el cromatograma del liofilizado no se observó ninguna banda, solo una mancha a lo largo del recorrido del eluyente. No se determinaron valores de Rf de compuestos del liofilizado.

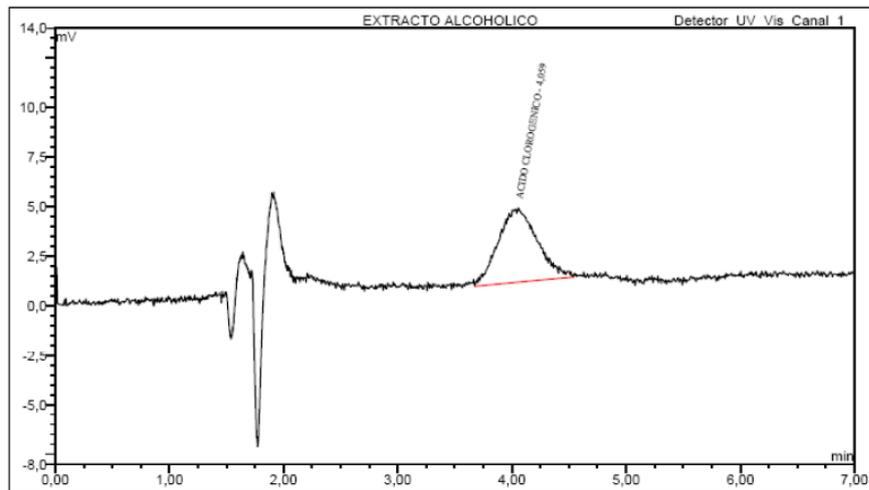
La tabla 3.3 resume los valores calculados de los Rf en todos los cromatogramas.

Tabla 3.3 Rf de los compuestos identificados en los cromatogramas. (Dueñas, 2009)

	Alcohólico	Hidroalcohólico	Hidrolizado sin calor
Ác. Cafeico	0,96	0,95	0,95
Ác. clorogénico	0,54	0,54	0,53
	0,84	0,82	0,90
Muestra	0,71	0,65	0,76
	0,59	0,52	0,42

3.3.4 Análisis Cromatográfico por HPLC

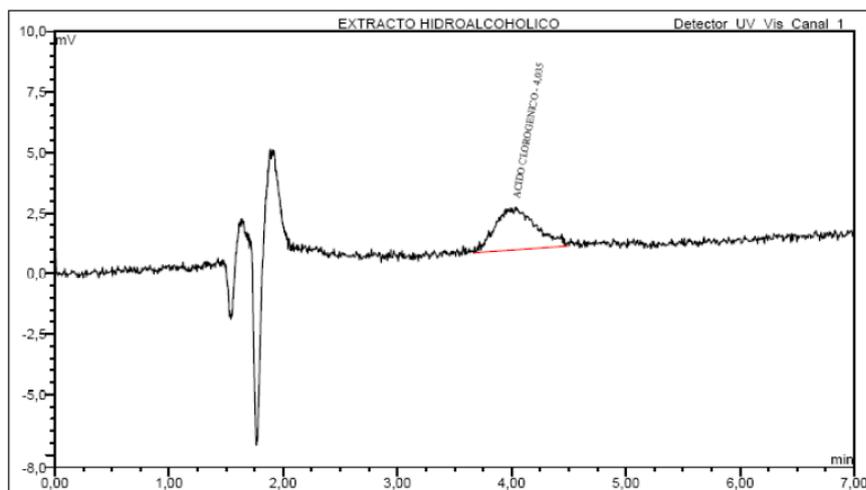
El resultado del análisis realizado al extracto alcohólico mediante HPLC indica que el tiempo de retención del ácido clorogénico fue 4,06 minutos y su concentración 82,8560mg/L. Este extracto no contiene ni ácido cafeico, ni quercetina. El cromatograma (Figura 3.4) indica la presencia de otros picos, los cuales no pudieron ser identificados por no contar con los estándares necesarios para hacerlo.



No.	Ret. Time min	NOMBRE	Area mV	Height mV	Concentracion mg/L
1	4,06	ACIDO CLOGENICO	1,47810	3,750	82,8560

Figura 3.4 Cromatograma HPLC del extracto alcohólico. (Dueñas, 2009)

El resultado del análisis realizado al extracto hidroalcohólico mediante HPLC indica que el tiempo de retención del ácido clorogénico fue 4,04 minutos y su concentración 40,0613mg/L. Este extracto no contiene ni ácido cafeico, ni quercetina. El cromatograma (Figura 3.5) indica la presencia de otros picos, los cuales no pudieron ser identificados por no contar con los estándares necesarios para hacerlo.



No.	Ret. Time min	NOMBRE	Area mV	Height mV	Concentracion mg/L
1	4,04	ACIDO CLOGENICO	0,71467	1,756	40,0613

Figura 3.5 Cromatograma HPLC del extracto hidroalcohólico. (Dueñas, 2009)

3.4 Determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu

La ecuación para determinar la concentración de fenoles totales fue obtenida a partir de regresión lineal de los datos de absorbancia a 760nm del estándar de quercetina (Tabla 3.4). La regresión lineal (Figura 3.6) tuvo $R^2 = 0,9647$.

Tabla 3.4 Datos de Abs760nm de las diluciones del estándar Quercetina. (Dueñas, 2009)

Muestra	Medición 1 (Abs760nm)	Medición 2 (Abs760nm)	Medición 3 (Abs760nm)	Concentración Quercetina (mg/mL)
1	0,092	0,093	0,098	0,20
2	0,159	0,164	0,161	0,40
3	0,211	0,210	0,212	0,60
4	0,231	0,233	0,231	0,80
5	0,245	0,245	0,245	1,00
6	0,263	0,260	0,265	1,20
7	0,292	0,294	0,292	1,40
8	0,325	0,328	0,324	1,60
9	0,350	0,353	0,351	1,80
10	0,375	0,370	0,378	2,00

No fue posible cuantificar el contenido de fenoles totales del liofilizado debido a que los valores de absorbancia obtenidos están fuera del rango de los datos de las concentraciones del estándar.

La ecuación obtenida de la regresión lineal fue:

$$[\text{eq quercetina}] = \frac{\text{Abs760nm} - 0,1009}{1,1401}$$

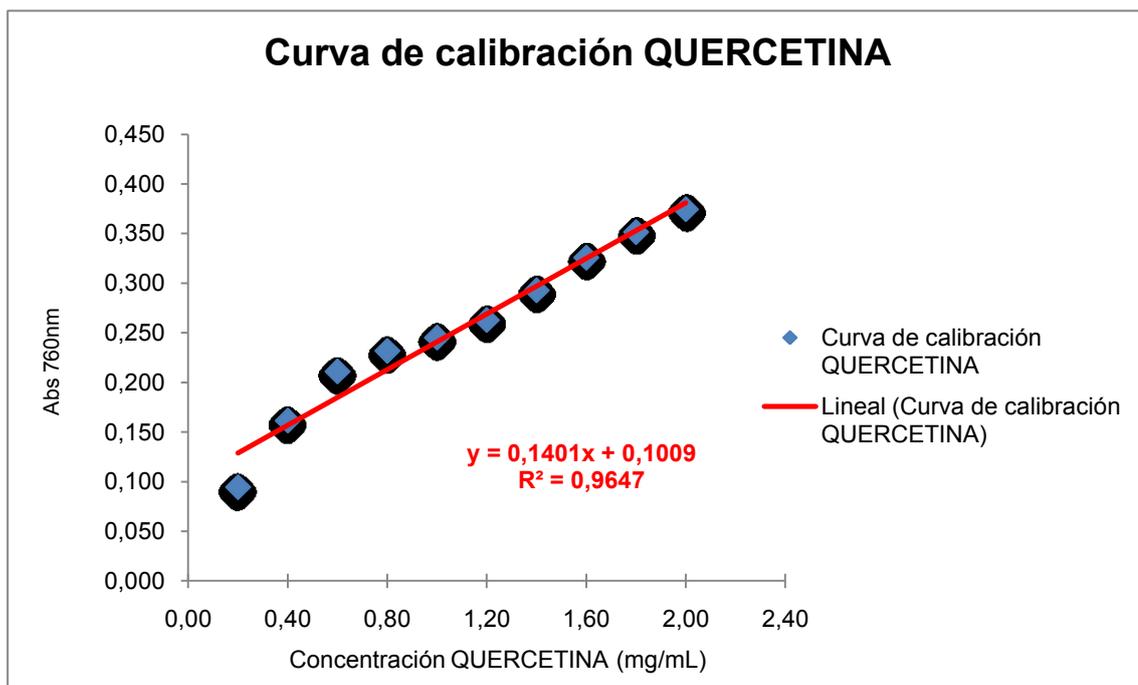


Figura 3.6 Curva de calibración Quercetina, regresión lineal. (Dueñas, 2009)

Los valores de absorbancia de las muestras y las concentraciones de fenoles totales obtenidas durante el procedimiento de cuantificación con el reactivo de Folin-Ciocalteu se presentan en la Tabla 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5 Datos de Abs760nm de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu de los extractos de brácteas de alcachofa. (Dueñas, 2009)

Extracto	Medición 1 (Abs760nm)	Medición 2 (Abs760nm)	Medición 3 (Abs760nm)
Alcohólico	0,300	0,308	0,301
Hidroalcohólico	0,320	0,328	0,328
Liofilizado ^{N.C.}	0,015	0,019	0,017
Hidrólisis con calor	0,101	0,100	0,102
Hidrólisis sin calor	0,166	0,166	0,169

N.C.: Concentración de fenoles totales no cuantificable. Valores fuera de rango.

Tabla 3.6 Concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina (EQT) como mg EQT/100g de brácteas frescas. (Dueñas, 2009)

Muestra	Fenoles totales			Promedio	Desviación Estándar	Error de muestreo
Alcohólico	0,151	0,157	0,152	0,153	0,00331	0,004
Hidroalcohólico	0,156	0,162	0,162	0,160	0,00330	0,004
Hidrólisis con calor	0,000	0,000	0,002	0,001	0,00130	0,001
Hidrólisis sin calor	0,139	0,139	0,146	0,142	0,00371	0,004

Datos expresados en mg EQT/100g brácteas frescas

La tabla 3.7 muestra los valores obtenidos de la concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina (EQT) como mg EQT/100g de brácteas frescas y en concentración $\mu\text{M/g}$ brácteas frescas.

Tabla 3.7 Concentración de fenoles totales de los extractos de brácteas de alcachofa. (Dueñas, 2009)

Extractos	mg EQT/100g brácteas frescas
Alcohólico	0,153 ($\pm 0,004$)
Hidroalcohólico	0,160 ($\pm 0,004$)
Hidrólisis con calor	0,001 ($\pm 0,001$)
Hidrólisis sin calor	0,142 ($\pm 0,004$)

De acuerdo a los resultados de los análisis, el extracto que presenta mayor concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina es el extracto hidroalcohólico (0,160mg/100g brácteas frescas), seguido de la concentración del extracto alcohólico (0,153mg/100g brácteas frescas), del hidrolizado sin calor (0,142mg/100g brácteas frescas) y finalmente del hidrolizado con calor (0,001mg/100g brácteas frescas).

El análisis estadístico de los valores de concentración de fenoles totales se encuentra en las tablas 3.8 y 3.9

Tabla 3.8 ANOVA de los resultados de concentración de fenoles totales en EQT. (Dueñas, 2009)

ANOVA					
Concentración de fenoles totales (mg EQT/100 g brácteas frescas)					
	Suma de		Media		
	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,052	3	,017	1725,456	1,39E-011
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,052	11			

El ANOVA indica que las medias poblacionales de cada tratamiento son diferentes significativamente una de otra. Esto quiere decir que cada método de extracción va a tener una concentración de fenoles totales diferentes.

El coeficiente de variación calculado fue de 2,77%, este valida el estudio realizado porque demuestra que el error humano y el experimental no tuvieron efecto sobre los datos obtenidos. El máximo valor aceptable del coeficiente de variación para estudios de laboratorio es de 8%.

Tabla 3.9 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración de fenoles totales en EQT. (Dueñas, 2009)

Concentración de fenoles totales (mg EQT/100 g brácteas frescas)					
Subconjunto para alfa = .05					
		N	1	2	3
DHS de Tukey	Tratamientos	Extracto Hidroalcohólico	3	,16000	
		Extracto Alcohólico	3	,15333	
		Hidrolizado sin calor	3		,14133
		Hidrolizado con calor	3		,00067
		Sig.		,120	1,000

El análisis de subconjuntos homogéneos indica que los mejores tratamientos para elaborar un extracto de brácteas de alcachofa con alto contenido de fenoles totales son los extractos, alcohólico e hidroalcohólico, seguidos del hidrolizado sin calor. El hidrolizado con calor es el último tratamiento en esta agrupación por tener la menor concentración.

3.5 Determinación de la actividad antioxidante

3.5.1 Reacción con el radical libre DPPH (2,2-difenil,1-picrilhidracilo)

Al realizar la curva de calibración con los valores de las diluciones del radical DPPH (Tabla 3.10) se elaboró la regresión lineal (Figura 3.7), reportando un valor de $R^2 = 0,99$.

Tabla 3.10 Datos de Abs_{517nm} de las diluciones de DPPH. (Dueñas, 2009)

Muestra	Medición 1 (Abs _{517nm})	Medición 2 (Abs _{517nm})	Medición 3 (Abs _{517nm})	Promedio	Concentración DPPH (mM)
1	1,129	1,133	1,137	1,133	0,1
2	0,890	0,894	0,896	0,893	0,08
3	0,674	0,676	0,677	0,676	0,06
4	0,437	0,440	0,440	0,439	0,04
5	0,221	0,223	0,223	0,222	0,02
6	0,089	0,088	0,088	0,088	0,01

La ecuación obtenida de la regresión lineal fue:

$$[\text{DPPH}] = \frac{\text{Abs}_{517\text{nm}} + 0,0181}{11,484}$$

El valor de Abs _{517nm} que equivale a una concentración de DPPH de 0,05mM es 0,556. Este valor es muy importante para determinar la EC₅₀ de los extractos con actividad antioxidante.

Las mediciones de la disminución de la Abs _{517nm} del radical libre DPPH se encuentran en la tabla 3.11, donde también se pudo encontrar la concentración final del radical DPPH después de 30 minutos de reacción con los extractos elaborados a partir de brácteas de alcachofa.

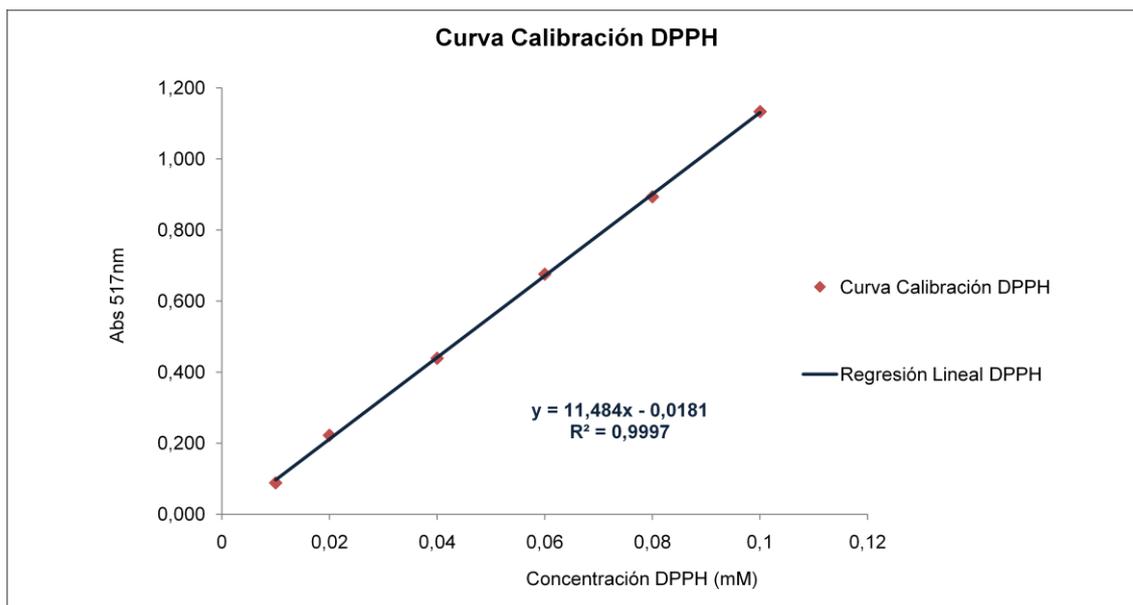


Figura 3.7 Curva de calibración DPPH, regresión lineal. (Dueñas, 2009)

Tabla 3.11 Datos de la reducción de la Abs517nm del radical libre DPPH. (Dueñas, 2009)

Muestra	Tiempo de reacción (minutos)							Concentración final DPPH (mM)
	0	5	10	15	20	25	30	
Alcohólico	1,130	0,096	0,078	0,079	0,079	0,080	0,080	0,0085
Hidroalcohólico	1,135	0,210	0,180	0,165	0,130	0,099	0,082	0,0087
Liofilizado	1,131	1,084	1,081	1,083	1,083	1,083	1,084	0,0960
Hidrólisis con calor	1,140	1,062	1,037	1,025	1,020	1,017	1,012	0,0897
Hidrólisis sin calor	1,137	1,027	0,999	0,983	0,976	0,972	0,965	0,0856

Datos expresados en Abs 517nm y en concentración mili molar (mM)

Esta tabla de resultados demuestra que el extracto alcohólico e hidroalcohólico reducen una buena concentración del radical DPPH, mientras que el resto de extractos no disminuyen la concentración de la misma manera.

Tabla 3.12 Concentración final de la solución 0,1mM de radical libre DPPH. (Dueñas, 2009)

Muestra	Concentración final DPPH			Promedio	Desviación Estándar	Error de muestreo
Alcohólico	0,0085	0,0090	0,0085	0,0087	2,80E-04	3,17E-04
Hidroalcohólico	0,0087	0,0088	0,0090	0,0088	1,33E-04	1,51E-04
Liofilizado	0,0960	0,0954	0,0957	0,0957	3,06E-04	3,46E-04
Hidrólisis con calor	0,0897	0,0894	0,0898	0,0896	2,30E-04	2,61E-04
Hidrólisis sin calor	0,0856	0,0859	0,0860	0,0858	2,19E-04	2,48E-04

Resultados expresados en concentración mili molar (mM)

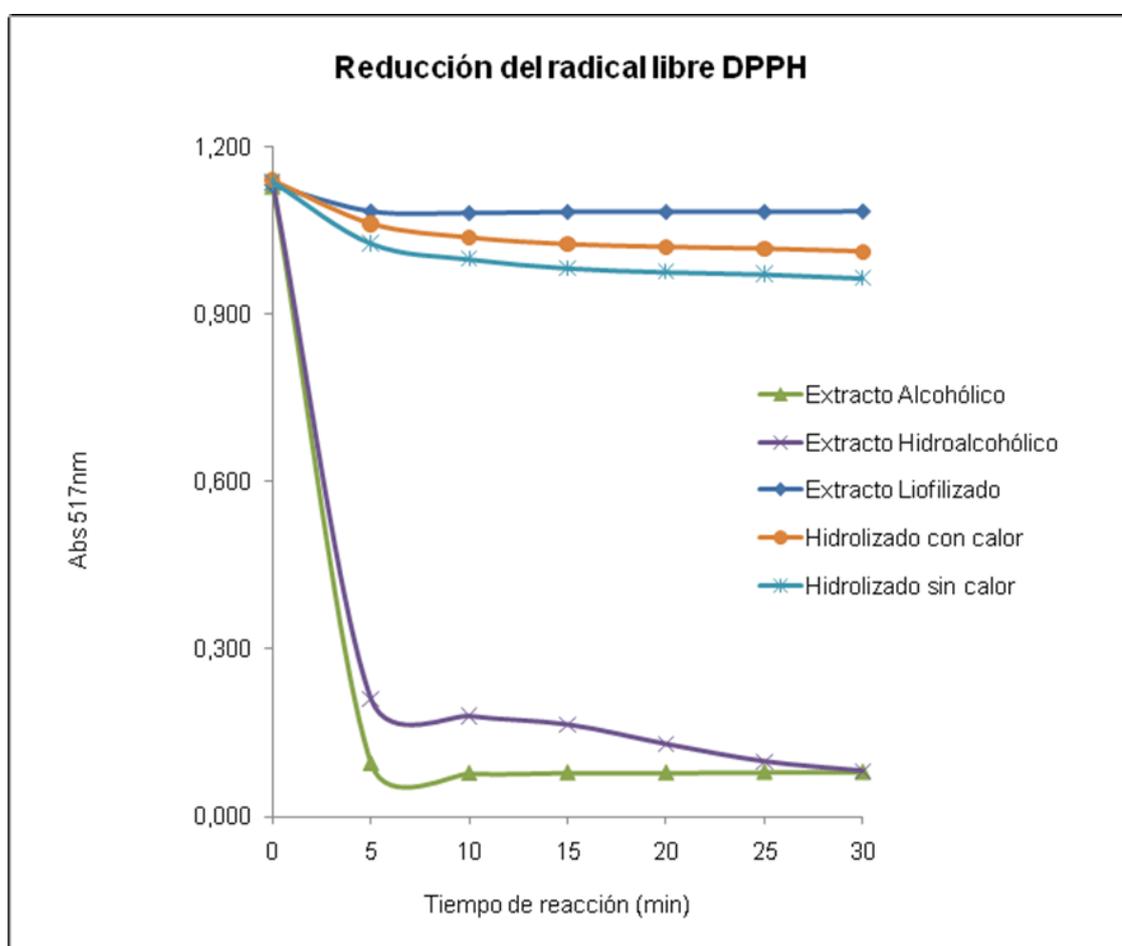


Figura 3.8 Curvas de reducción de la Abs517nm de la solución 0,1mM del radical DPPH. (Dueñas, 2009)

Las figuras 3.9 y 3.10 indican la reducción de DPPH tanto en concentración como en porcentaje.

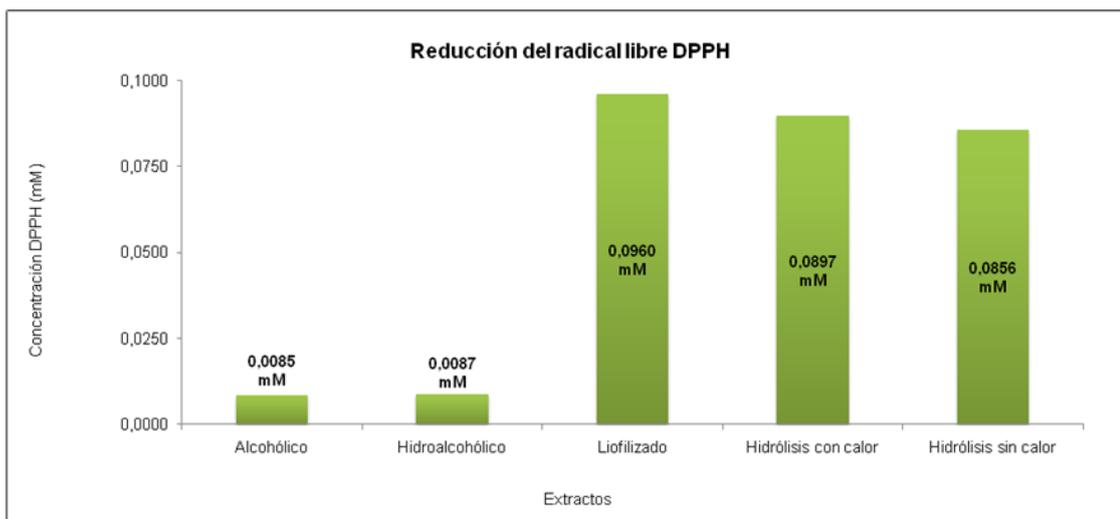


Figura 3.9 Reducción de la concentración de radical DPPH. (Dueñas, 2009)

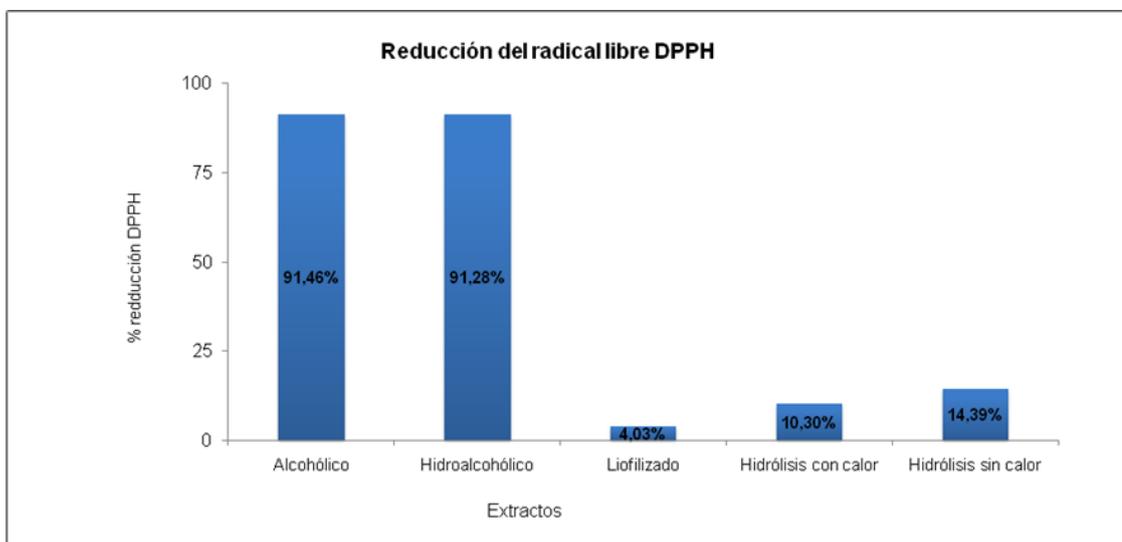


Figura 3.10 Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH. (Dueñas, 2009)

El extracto alcohólico e hidroalcohólico redujo la concentración de radical DPPH en 91,46% y 91,28%, respectivamente, esto indica que poseen la capacidad de capturar radicales libres del medio en el que se apliquen. Por otro lado, los hidrolizados de brácteas de alcachofa, aunque presentan una concentración importante de fenoles totales no tienen la capacidad de capturar radicales libres en un gran porcentaje. Esto hace suponer, que el tratamiento con HCl no es el más adecuado para elaborar un extracto con propiedades antioxidantes, y que esta actividad no está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos. Estos resultados

también demuestran que el liofilizado de brácteas de alcachofa no posee actividad antioxidante.

El análisis estadístico de los resultados de concentración final del DPPH se encuentra en las tablas 3.13 y 3.14

Tabla 3.13 ANOVA de los datos de concentración final de DPPH. (Dueñas, 2009)

ANOVA					
Concentración final DPPH (mM)					
	Suma de		Media		
	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,024	4	,006	106510,176	,000
Intra-grupos	,000	10	,000		
Total	,024	14			

El ANOVA indica que las medias poblacionales de cada tratamiento son diferentes significativamente una de otra. Esto quiere decir que cada extracto va a tener un efecto diferente sobre la concentración de DPPH.

El coeficiente de variación calculado fue de 0,4124%, este valida el estudio realizado porque demuestra que el error humano y el experimental no tuvieron efecto sobre los datos obtenidos. El máximo valor aceptable del coeficiente de variación para estudios de laboratorio es de 8%.

Tabla 3.14 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración final de DPPH. (Dueñas, 2009)

Concentración final DPPH (mM)					
DHS de Tukey (alfa 0,05)					
Subconjunto para alfa = .05					
	N	1	2	3	4
Tratamientos	Extracto Alcohólico	3	,0086667		
	Extracto Hidroalcohólico	3	,0088333		
	Hidrolizado sin calor	3		,0858333	
	Hidrolizado con calor	3			,0896333
	Liofilizado	3			,0957000
	Sig.		,906	1,000	1,000

El análisis de subconjuntos homogéneos indica que los mejores tratamientos para elaborar un extracto con propiedades antioxidantes son el extracto alcohólico y el extracto hidroalcohólico, seguidos del hidrolizado sin calor y con calor, y por último del liofilizado, los cuales no redujeron la concentración del radical libre DPPH en gran medida.

Los datos obtenidos para determinar la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico se encuentran en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Datos de reducción de concentración de radical libre DPPH para determinar la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico. (Dueñas, 2009)

	Dilución		
	9 veces	10 veces	11 veces
Extracto Alcohólico	0,0486	0,0368	0,0298
Extracto Hidroalcohólico	0,0800	0,0604	0,0487

Datos expresados en concentración mili molar (mM)

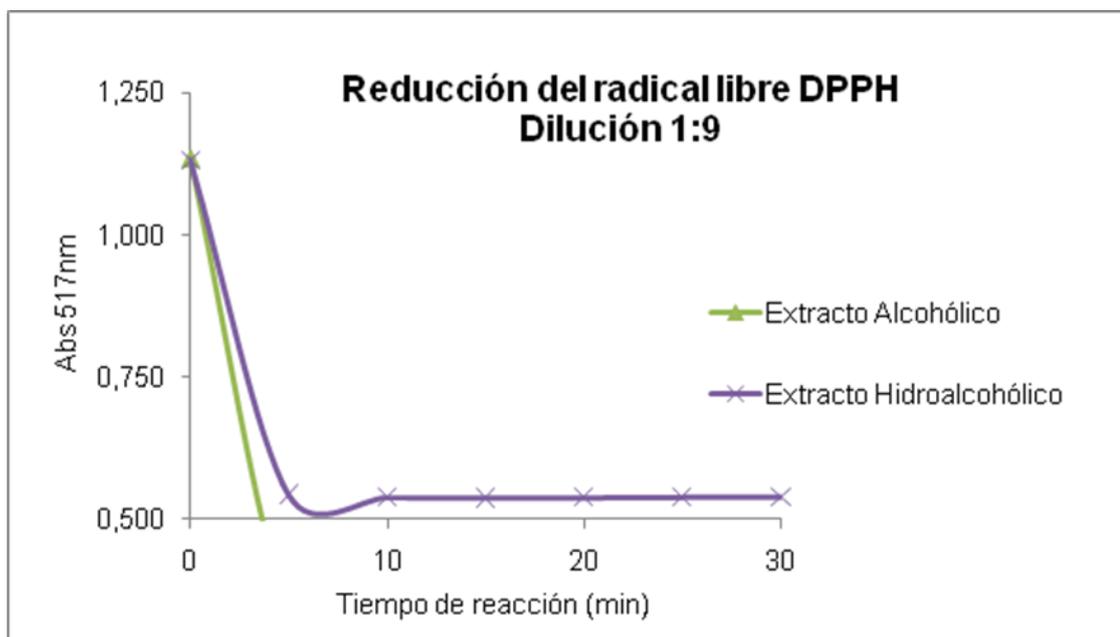


Figura 3.11 Curvas de reducción de la concentración del radical DPPH para determinar la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico diluidos 9 veces.

(Dueñas, 2009)

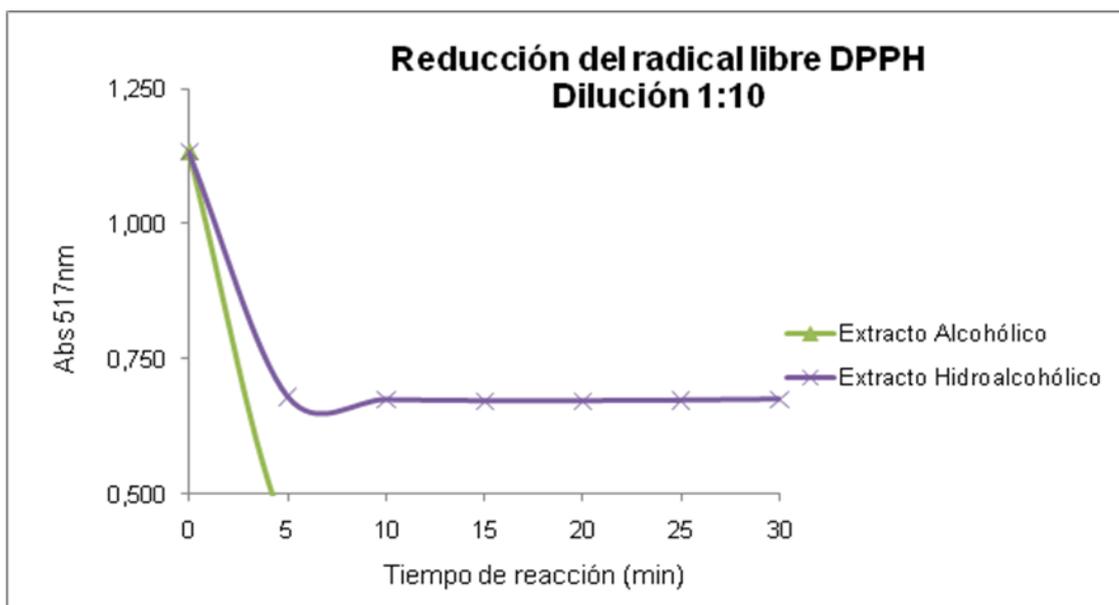


Figura 3.12 Curvas de reducción de la concentración del radical DPPH para determinar la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico diluidos 10 veces. (Dueñas, 2009)

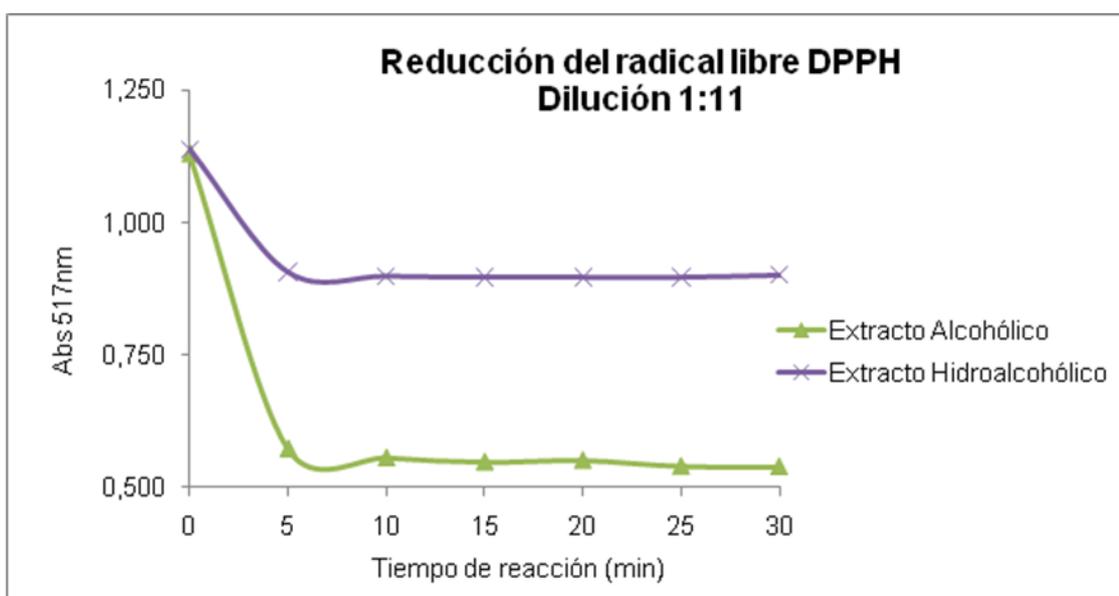


Figura 3.13 Curvas de reducción de la concentración del radical DPPH para determinar la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico diluidos 11 veces. (Dueñas, 2009)

Las ecuaciones con las que se calculó la EC_{50} del extracto alcohólico e hidroalcohólico se obtuvieron de las regresiones lineales (ver figuras 3.15 y 3.16) de los datos de la tabla 3.15.

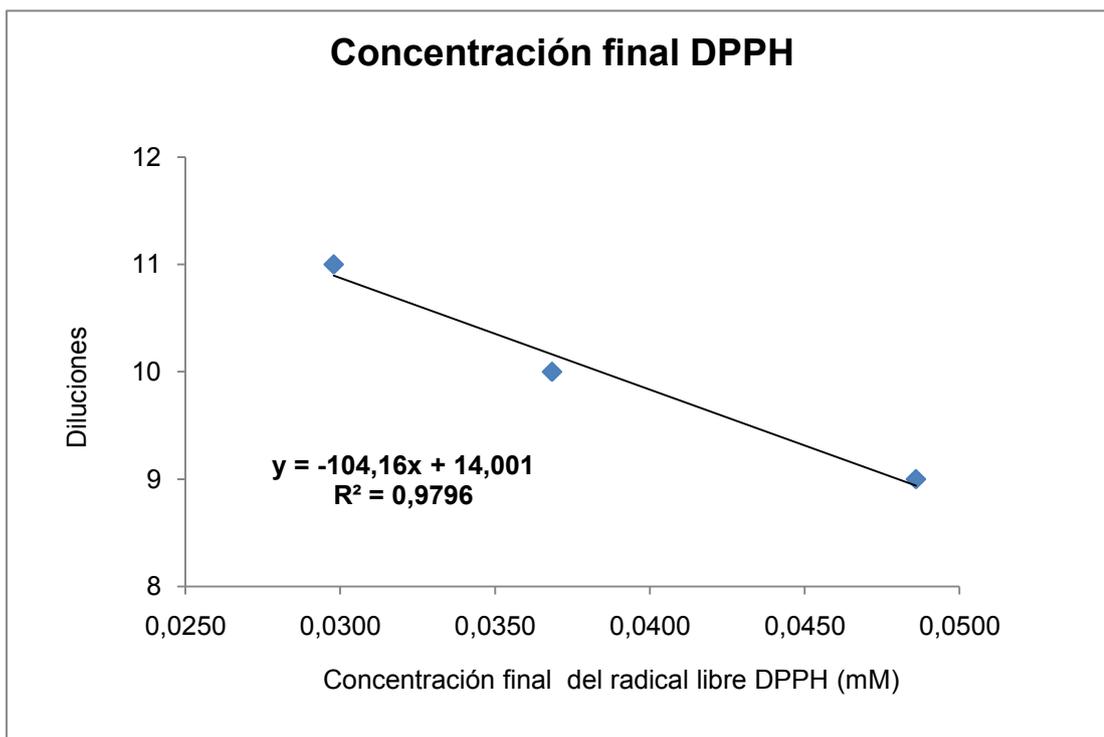


Figura 3.14 Regresión lineal de los datos de reducción de concentración (mM) de radical libre DPPH para el extracto alcohólico. (Dueñas, 2009)

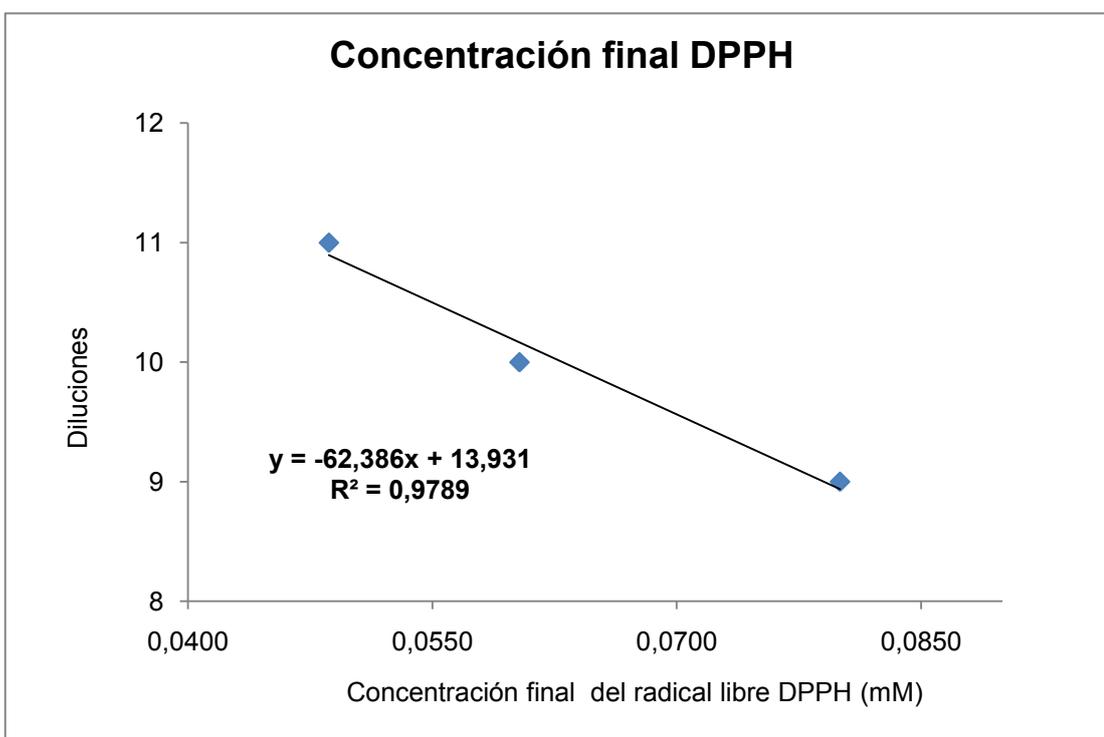


Figura 3.15 Regresión lineal de los datos de reducción de concentración (mM) de radical libre DPPH para el extracto hidroalcohólico. (Dueñas, 2009)

La concentración eficiente (EC_{50}) para reducir la concentración del DPPH en un 50% es 0,164 mgEQT/mL para el extracto alcohólico y 0,148 mgEQT/mL para el extracto hidroalcohólico.

El análisis de correlación entre la concentración de fenoles totales y la capacidad de reducir la concentración de radical libre DPPH se encuentra en la tabla 3.16.

Tabla 3.16 Análisis de correlación entre la concentración de fenoles totales y la reducción de concentración de radical libre DPPH. (Dueñas, 2009)

Correlaciones			
		Concentración final DPPH	Concentración de fenoles totales
Concentración final DPPH	Correlación de Pearson	1	-,689*
	Sig. (bilateral)		,013
	Suma de cuadrados y productos cruzados	,021	-,023
	Covarianza	,002	-,002
	N	12	12
Concentración de fenoles totales	Correlación de Pearson	-,689*	1
	Sig. (bilateral)	,013	
	Suma de cuadrados y productos cruzados	-,023	,052
	Covarianza	-,002	,005
	N	12	12

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Este análisis indica que existe correlación media entre la concentración de fenoles totales y la capacidad de reducir la concentración del radical libre DPPH, esto significa que el análisis solo puede explicar el 50% de correlación entre las variables. La interacción con otras moléculas y las condiciones del medio también influyen en la capacidad de captación de radicales libres.

El valor del coeficiente de correlación de Pearson negativo indica que mientras mayor sea la concentración de fenoles totales menor será la concentración final del radical libre DPPH.

3.5.2 Actividad de los extractos en alimentos

Los extractos probados no protegieron a los alimentos como el banano, manzana, aguacate y pera del fenómeno de pardeamiento enzimático porque los componentes fenólicos de los extractos son sustrato de la reacción de pardeamiento al igual que el oxígeno del ambiente.

3.6 Determinación de la actividad antibacteriana

3.6.1 Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp.

La tinción Gram realizada a los cultivos traídos del cepario de la Universidad San Francisco demostró que efectivamente trabajamos con *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Salmonella* spp. (Gram negativa).

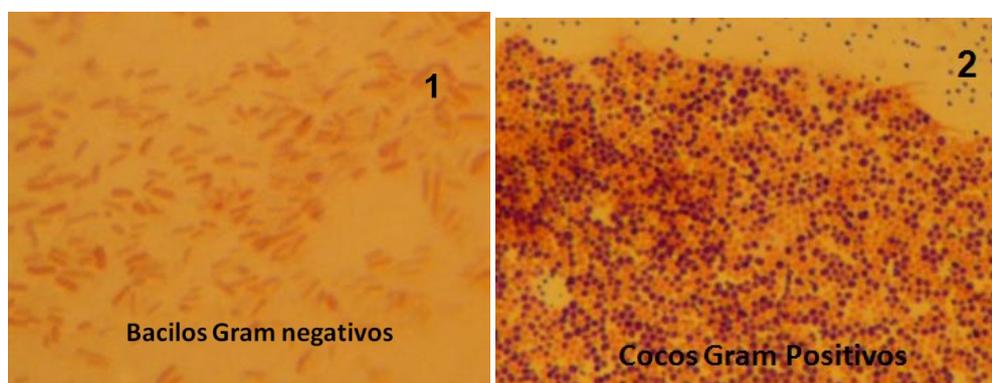


Figura 3.16 Tinción Gram de las muestras de *Salmonella* spp. (1) y *Staphylococcus aureus* (2). (Dueñas, 2009)

Los datos de la prueba de susceptibilidad de *S. aureus* frente al extracto alcohólico e hidroalcohólico se muestran en la tabla 3.17.

Tabla 3.17 Datos de las mediciones de los halos de inhibición producidos por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *S. aureus*. (Dueñas, 2009)

	Extracto 100%	Extracto 75%	Extracto 50%	Extracto 25%	Control +	Control -
Extracto	16	13	11	0	10	0
Alcohólico	16	14	12	0	11	0
	15	13	10	0	10	0
Extracto	16	10	5	0	10	0
Hidroalcohólico	17	9	5	0	11	0
	16	9	6	0	11	0

Los datos están expresados en milímetros (mm).

Estos datos indican que tanto el extracto alcohólico como el hidroalcohólico poseen actividad antibacteriana frente a *S. aureus.*, siempre y cuando estén presentes en una concentración igual o mayor al 50%.

El extracto hidroalcohólico y alcohólico al 25% y el DMSO no presentan actividad antibacteriana.

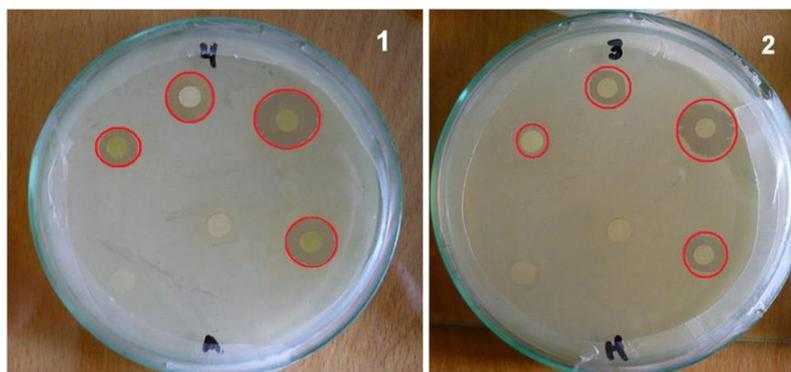


Figura 3.17 Halos de inhibición formados por el extracto alcohólico (1) e hidroalcohólico (2) en el cultivo de *S. aureus.* (Dueñas, 2009)

El análisis estadístico de los datos obtenidos se encuentra en las tablas 3.18 y 3.19.

Tabla 3.18 ANOVA de los datos de actividad antibacteriana del extracto alcohólico e hidroalcohólico contra *Staphylococcus aureus.* (Dueñas, 2009)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1325,167	9	147,241	560,233	1,98E-027
Intra-grupos	6,833	26	,263		
Total	1332,000	35			

Este análisis indica que cada tratamiento es diferente significativamente uno de otro, lo cual significa que cada concentración de extracto va a tener un efecto diferente sobre *S. aureus.*

El coeficiente de variación calculado fue de 6,68%, el cual valida el estudio realizado porque demuestra que el error humano y el experimental no tuvieron efecto sobre los datos. El máximo valor del coeficiente de variación para estudios de laboratorio es de 8%.

Tabla 3.19 Análisis de subconjuntos homogéneos de los datos de actividad antibacteriana de los extractos en *Staphylococcus aureus*. (Dueñas, 2009)

Halos de inhibición (mm) formados por el efecto de los extractos sobre *Staphylococcus aureus*
DHS Tukey (alfa 0,05)

	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
Extracto Hidroalcohólico 100%	3	16,33					
Extracto Alcohólico 100%	3	15,67					
Extracto Alcohólico 75%	3		13,33				
Extracto Alcohólico 50%	3			11,00			
Conservante	6			10,50	10,50		
Extracto Hidroalcohólico 75%	3				9,33		
Extracto Hidroalcohólico 50%	3					5,33	
DMSO	6						0,00
Extracto Hidroalcohólico 25%	3						0,00
Extracto Alcohólico 25%	3						0,00
Significación		0,797	1,000	0,954	0,145	1,000	1,000

Basado en el análisis de subconjuntos homogéneos es posible afirmar que el extracto alcohólico e hidroalcohólico al 100% son los mejores tratamientos contra *S. aureus*, seguidos del extracto alcohólico al 75% y 50%, del conservante, y de los extractos hidroalcohólicos al 75% y 50%.

Los datos de la prueba de susceptibilidad de *Salmonella* spp. frente al extracto alcohólico e hidroalcohólico se muestran en la tabla 3.20.

Tabla 3.20 Datos de las mediciones de los halos de inhibición producidos por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *Salmonella*. (Dueñas, 2009)

	Extracto 100%	Extracto 75%	Extracto 50%	Extracto 25%	Control +	Control -
Extracto Alcohólico	16	14	11	5	13	5
	17	13	11	5	15	5
	17	13	10	5	13	5
Extracto Hidroalcohólico	15	13	5	5	15	5
	15	11	7	5	13	5
	15	13	5	5	13	5

Los datos están expresados en milímetros (mm).

Estos datos indican que tanto el extracto alcohólico como el hidroalcohólico poseen actividad antibacteriana frente a *Salmonella* spp., siempre y cuando estén presentes en una concentración igual o mayor a 50%. El control negativo (Dimetil Sulfóxido) si presentó actividad antibacteriana frente a *Salmonella* spp. La actividad de los extractos concentrados 25% puede ser provocada por el DMSO en el cual están diluidos.

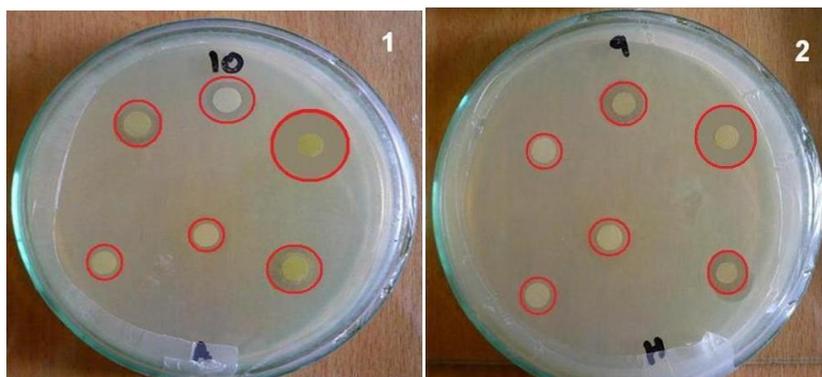


Figura 3.18 Halos de inhibición formados por el extracto alcohólico (1) e hidroalcohólico (2) en el cultivo de *Salmonella* spp. (Dueñas, 2009)

El análisis estadístico de los datos obtenidos se encuentra en las tablas 3.21 y 3.22.

Tabla 3.21 ANOVA de los datos de actividad antibacteriana del extracto alcohólico e hidroalcohólico contra *Salmonella* spp. (Dueñas, 2009)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	696,083	9	77,343	158,756	2,12E-020
Intra-grupos	12,667	26	,487		
Total	708,750	35			

Este análisis indica que cada tratamiento es diferente significativamente uno de otro, lo cual significa que cada concentración de extracto va a tener un efecto diferente sobre *Salmonella* spp.

El coeficiente de variación calculado fue de 6,92%, el cual valida el estudio realizado porque demuestra que el error humano y el experimental no tuvieron efecto sobre los datos. El máximo valor del coeficiente de variación para estudios de laboratorio es de 8%.

Tabla 3.22 Análisis de subconjuntos homogéneos de los datos de actividad antibacteriana de los extractos en *Salmonella* spp. (Dueñas, 2009)

Halos de inhibición (mm) formados por el efecto de los extractos sobre *Salmonella* spp.

DHS Tukey (alfa 0,05)

	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Extracto Alcohólico 100%	3	16,67				
Extracto Hidroalcohólico 100%	3	15,00	15,00			
Conservante	6		13,67	13,67		
Extracto Alcohólico 75%	3		13,33	13,33		
Extracto Hidroalcohólico 75%	3			12,33	12,33	
Extracto Alcohólico 50%	3				10,67	
Extracto Hidroalcohólico 50%	3					5,67
DMSO	6					5,00
Extracto Hidroalcohólico 25%	3					5,00
Extracto Alcohólico 25%	3					5,00
Significación		0,109	0,109	0,331	0,109	0,960

Basado en el análisis de subconjuntos homogéneos es posible afirmar que el extracto alcohólico e hidroalcohólico al 100% son los mejores tratamientos contra *Salmonella* spp., seguidos del conservante y de el extracto alcohólico e hidroalcohólico al 75%. Luego le siguen el extracto alcohólico e hidroalcohólico al 50%, y por último el DMSO y el extracto alcohólico e hidroalcohólico al 25%, de los cuales la actividad posiblemente sea provocada por el DMSO.

4 DISCUSIÓN

Cabe resaltar que no existe una caracterización previa de la presencia de compuestos fenólicos en la variedad Imperial Star de alcachofa, por ende constituye un estudio pionero en análisis cualitativo y cuantitativo de estos metabolitos.

El porcentaje de humedad de las brácteas de alcachofa, 85,07% ($\pm 0,646$), es mayor al dato teórico (70%) obtenido mediante comunicación personal con el representante de la empresa INAEXPO (Villacís, 2008).

La caracterización determinó la presencia de compuestos fenólicos en los extractos realizados en brácteas de alcachofa, confirmando que estos metabolitos no están presentes solamente en las hojas, como lo afirmaron Coinu et al. (2006) y Fratianni et al. (2007) en sus estudios en brácteas de alcachofas.

Los datos obtenidos de la concentración de fenoles totales (4,683 – 5,300 $\mu\text{M/g}$), son menores a los obtenidos en una investigación realizada sobre la composición polifenólica de algunas variedades de alcachofa existentes en Italia (Fratianni *et al.*, 2007), en la cual, las concentraciones de fenoles totales encontradas en brácteas de alcachofa se encuentran entre 0,50 mM/g y 1,79 mM/g brácteas frescas. Esta variación se debe a las características propias de cada variedad de alcachofas.

La cromatografía en capa fina y HPLC confirmó la presencia del ácido clorogénico y ácido cafeico en la composición de los extractos, alcohólico e hidroalcohólico, de brácteas de alcachofa, los cuales también fueron encontrados en los estudios de Coinu et al. (2006) y Fratianni et al. (2007).

Los extractos, alcohólico e hidroalcohólico, presentaron actividad antioxidante al capturar radicales libres del DPPH en medio líquido, confirmando la actividad antioxidante estudiada por Coinu et al. (2006) y Fratianni et al. (2007) en el análisis de oxidación del LDL. Lo que no concuerda con estos estudios es la correlación encontrada entre el contenido

de fenoles totales y la capacidad de disminuir la concentración de radical libre DPPH, debido a que los investigadores italianos no encontraron correlación, por lo que concluyeron que hay otros factores aparte de la concentración de fenoles totales que pueden afectar la actividad antioxidante, tales como la interacción con otras moléculas y las condiciones del medio en el cual se encuentren los extractos. Esta correlación puede darse dependiendo del análisis de actividad que se estudie.

La evaluación de actividad antibacteriana confirma que los compuestos fenólicos presentes en los extractos, alcohólico e hidroalcohólico, tienen efecto sobre *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, bacterias pertenecientes al grupo de microorganismos afectadas por estos compuestos según Raybaudi-Massilia et al. (2006).

5 CONCLUSIONES

- Las brácteas de alcachofa de la variedad Imperial Star tienen 85,07% ($\pm 0,646$) de humedad.
- Las brácteas de alcachofa contienen compuestos fenólicos como: fenilpropanoides, taninos catéquicos, flavonoides y cumarinas además saponinas, carotenoides, azúcares reductores y esteroides.
- La caracterización cualitativa (cloruro férrico y cromatografía en capa fina) y cuantitativa (Folin-Ciocalteu y HPLC) demostró que los extractos alcohólico e hidroalcohólico y el hidrolizado sin calor contienen compuestos fenólicos en su composición.
- La cromatografía en capa fina de los extractos, hidroalcohólico y alcohólico, basada en los valores del Rf (0,52 - 0,59), determinó que estos contienen ácido clorogénico (Rf 0,54).
- La cromatografía en capa fina del hidrolizado con calor y del liofilizado no determinó la presencia de ningún compuesto.
- La cromatografía HPLC determinó que el extracto alcohólico contiene 82,86 mg/L de ácido clorogénico, y que no contiene ni ácido cafeico, ni quercetina.
- La cromatografía HPLC determinó que el extracto hidroalcohólico contiene 40,06 mg/L de ácido clorogénico y que no contiene ni ácido cafeico, ni quercetina.
- El mayor contenido de fenoles totales (mgEQT/100g brácteas frescas) lo presenta el extracto hidroalcohólico 0,160($\pm 0,004$), seguido del alcohólico 0,153($\pm 0,004$), del hidrolizado sin calor 0,142($\pm 0,004$) y por último del hidrolizado con calor 0,001($\pm 0,001$).
- Solo los extractos alcohólico e hidroalcohólico, presentaron actividad captora de radicales libres frente al DPPH, reduciéndolo 91,46% y 91,28% respectivamente.

- La actividad antioxidante de los extractos de alcachofa se debe a la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y ácido clorogénico, y también a la de otros como son los carotenoides.
- Las EC₅₀ calculadas para los extractos con actividad antioxidante fueron 0,164mgEQT/mL para el extracto alcohólico y 0,148mgEQT/mL para el extracto hidroalcohólico.
- Existe correlación media entre la concentración de fenoles totales y la capacidad de reducir la concentración del radical libre DPPH, la cual indica que mientras mayor sea la concentración de fenoles, menor será la concentración final del radical libre en el medio. Esta actividad también depende de la interacción que ocurra con otras moléculas y las condiciones del medio.
- Los extractos alcohólico e hidroalcohólico, poseen actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp.
- Los extractos, alcohólico e hidroalcohólico, son mayor o igualmente efectivos que el conservante comercial siempre y cuando estén en una concentración mayor o igual a 75%.

6 RECOMENDACIONES

- Para secar las brácteas de alcachofa de una manera que no provoque descomposición o degradación de los metabolitos estudiados se debe cuidar que la temperatura no supere los 40°C.
- Se recomienda estudiar las saponinas presentes en las brácteas porque estas pueden ser aplicadas en varios productos como controladores de plagas o productos farmacéuticos dependiendo de sus propiedades.
- Estandarizar un método de extracción de los compuestos fenólicos analizando varias soluciones hidroalcohólicas hasta determinar la que mayor contenido de fenoles totales contenga.
- Utilizar un mayor número de estándares de compuestos fenólicos como la cinarina, cinarósido, luteolina y flavonoides, para obtener un mayor perfil de estos compuestos.
- Evaluar la actividad antioxidante mediante otros análisis, por ejemplo con la prueba de oxidación del LDL, para determinar si el extracto puede funcionar fisiológicamente y como un aditivo para crear alimentos funcionales.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto en alimentos mediante otros métodos, como por ejemplo dentro de un enlatado durante todo el período de duración del producto.
- Evaluar la actividad antibacteriana con un número mayor de microorganismos que contaminen alimentos.
- Estudiar el escalamiento del proceso de extracción de principios activos para su industrialización.
- Se recomienda utilizar soluciones hidroalcohólicas para extraer los compuestos activos de las brácteas de alcachofa porque representan menos costos y porque tienen la misma actividad que los extractos alcohólicos puros.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Albornoz Américo (1980), Productos Naturales: Sustancias y drogas extraídas de plantas, Ediciones de la Universidad Central de Venezuela, Caracas.

2. Barahona Marco (2008), Docente de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Escuela Politécnica del Ejército, Comunicación personal. Octubre de 2008.

3. Braca Alessandra (2008), Estudio Químico Biológico de Plantas Medicinales – Flora Ecuatoriana, Curso teórico dictado en la Escuela Politécnica del Ejército.

4. Calvo Miguel (n.f.), Bioquímica de los alimentos. Universidad de Zaragoza Consultado el 19 de junio de 2009 en:

<<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>>

5. Cárdenas Tello Carlos (2008), Docente de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Escuela Politécnica del Ejército, Comunicación personal. Octubre de 2008.

6. Carretero Accame M. Emilia (2000), Plantas Medicinales: Compuestos fenólicos [en línea], Panorama Actual Med 24 (232): 340-344.

Consultado el 3 de marzo de 2008 en:

<[www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/232.pdf](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/232.pdf)>

7. Carrión M. Olivera (2006), Alimentos Funcionales En Argentina [en línea], Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Consultado el 25 de febrero de 2008 en:

<www.publitem.com/LAL%20272/lal_272_pag_6.pdf>

8. Cavalieri Stephen (2005), Manual de pruebas de susceptibilidad antibacteriana. Organización Panamericana para la Salud.

Consultado el 24 de abril de 2009 en:

<www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_sucep_antimicro.pdf>

9. CEPAL & CAF - Comisión Económica para América Latina y el Caribe & Corporación Andina de Fomento (2003). Estudio de las capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina, Informe preparado para la CEPAL y la CAF [en línea]. Perú: Roca W. 93-111

Consultado el 19 de febrero de 2008 en:

<www.eclac.cl/caf/noticias/paginas/7/21327/estudio.pdf>

10. CEPAL & CAF - Comisión Económica para América Latina y el Caribe & Corporación Andina de Fomento (2005). Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales [en línea]. Caracas, Venezuela: Roca W., *et al.* 43-45,63

Consultado el 25 de febrero de 2008 en:

<www.eclac.org/publicaciones/xml/4/21344/biodiversidad_1.pdf>

11. Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (2009), Product: Chlorogenic Acid [en línea]. China.

Consultado el 2 de febrero de 2009 en:

<<http://www.biopurify.com/details.asp?id=146>>

12. CIC & CORPEI (2003), Alcachofa [en línea], Ecuador.

Consultado el 13 de septiembre de 2007 en:

<www.ecuadorexporta.org/productos_down/perfil_producto_alcachofa539.pdf>

13. Coinu Rita, Carta Stefania, Urgeghe Pier Paolo, Mulinacci Nadia, Pinelli Patrizia, Franconi Flavia, Romani Annalisa (2006), Dose-effect study on the

antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke [en línea], Food Chemistry 101 (2007) 524-531.

Consultado y comprado el 15 de mayo de 2008 en:

<www.sciencedirect.com>

14. Duke James A. (n.f), Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Chemicals in *Cynara cardunculus* subsp. *Cardunculus* (Asteraceae) – Artichoke [en línea], United States Department of Agriculture.

Consultado el 28 de enero de 2009 en:

<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl?344>

15. Fábregas Jaime (2003), Aplicaciones de los alimentos funcionales [en línea], Universidad de Santiago de Compostela, España.

Consultado el 26 de febrero de 2008 en:

<www.gen-es.org/06 NEWS/docs7/jfabregas201103.pdf>

16. Fratianni Florinda, Tucci Marina, De Palma Mónica, Pepe Rosa, Nazzaro Filomena (2007), Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori) [en línea], Food Chemistry 104 (2007) 1282-1286.

Consultado y comprado el 15 de mayo de 2008 en:

<www.sciencedirect.com>

17. García Ruiz Martha (2004), Inhibición de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium digitatum* con mezclas sinérgicas de antimicrobianos naturales y sintéticos en sistemas modelo de puré de manzana mínimamente procesado [en línea], Capítulo 4: Revisión Bibliográfica, Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título en Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, México. Consultado el 16 de junio de 2008 en:

<http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/garcia_r_mi/capitulo4.pdf>

18. García Ruiz Pedro (n.f.), Fenoles [en línea], Universidad de Murcia, España.

Consultado el 3 de marzo de 2008 en:

<www.um.es/qcba/fenoles/fengoles.ppt>

19. Gómez Virginia (2008), Alimentos funcionales ¿son necesarios? [en línea], Artículo Diario Expreso, Sección: Semana.

Consultado el 20 de febrero de 2008 en:

<www.expreso.ec/semana/html/notas.asp?codigo=20070624135752>

20. IADSA - International Alliance of Dietary/Food Supplement Assosiation (2008), Press Release: Regulatory change a boost for emerging supplement markets [en línea], Estados Unidos.

Consultado el 27 de febrero de 2008 en:

<www.iadsa.org/documents/IADSAMarketsPR_000.pdf>

21. Instituto de Biotecnología IBT (2007), Biotecnología Industrial [en línea], Información sobre investigaciones realizadas en el área de biotecnología industrial, Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú.

Consultado el 20 de febrero de 2008 en:

<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/biolo_industrial.html>

22. IFIC - International Food Information Council (2002), Actitudes del consumidor ante los alimentos funcionales [en línea], ESTADOS UNIDOS.

Consultado el 20 de febrero de 2008 en:

<www.ific.org/sp/research/funcfoodsres02sp.cfm>

23. INAEXPO 2008, Ing. Jaime Villacís, Ing. Paul Chávez, Ingenieros responsables del control del procesamiento de alcachofas, Comunicación personal. Febrero de 2008

24. IOCD – International Organization for chemical sciences in development, métodos de aislamiento: destilación por arrastre de vapor y extracción continua [en línea]. Estados Unidos.

Consultado el 3 de marzo de 2008 en:

<132.248.103.112/organica/1311/1311pp10.ppt>

25. Mabeau Serge *et al.* (2005), Antioxidant activity of extracts of artichoke and by-products [en línea], BBV Applied Research Center for plant breeding, biotechnology and quality, Canadá.

Consultado el 11 de enero de 2008 en:

<www.lareal.com/mediastore/7/202-2.pdf>

26. Martínez Flores S., Gonzales Gallego J., Culebras J.M., Tuñón M. (2002), Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes [en línea], Revista Nutrición Hospitalaria 17:271-278, Universidad de León, España.

Consultado el 5 de mayo de 2008 en:

<www.grupoaulamedica.com/web/nutricion/pdf/062002/03_Los_flavonoides.pdf>

27. Martínez M. (2005), Flavonoides [en línea], Documento de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Colombia.

Consultado el 5 de mayo de 2008 en:

<farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

28. Missouri Botanical Garden (2007), Angiosperm Phylogeny Website, Order: Asterales, Estados Unidos.

Consultado el 5 de mayo de 2008 en:

<www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/asteralesweb.htm#Asterales>

29. Naranjo Blanca (n.f.), Prácticas de laboratorio de fitoquímica, Biblioteca del laboratorio de biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.

30. Naranjo Blanca (2008, 2009), Docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, Comunicación personal.

Septiembre de 2008 – Abril 2009

31. Nicho S. Pedro, Catacora P. Edmundo (2004), Cultivo De Alcachofa [en línea], Estación Experimental Donoso-CICH-KM-Huaral INIA, Perú.

Consultado el 26 de septiembre de 2007 en:

<www.minag.gob.pe/dgpa1/ARCHIVOS/alcachofa_doc0007.pdf>

32. López Mariana, Triana Jorge, Pérez Francisco (2005), Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas [en línea], Universidad de las Palmas de Gran Canarias, España.

Consultado el 3 de marzo de 2008 en:

<bdigital.ulpgc.es/digital/texto/pdf/0312269_00000_0000.pdf>

33. Lutz Riquelme Mariane (2007), Antioxidantes [en línea], Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos Funcionales. CIDAF, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Chile.

Consultado el 5 de mayo de 2008 en:

<www.sochinut.cl/pdf/Mesa_redonda_Importancia_de_la_industria_alimentaria_en_la_prevencion_de_EC/Antioxidantes.pdf>

34. Palencia Mendoza Yanet (1999), Sustancias Bioactivas en Alimentos [en línea], Universidad de Zaragoza, España.

Consultado el 9 de febrero de 2008 en:

<www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf>

35. Raybaudi-Massilia Rosa, Soliva Fortuny Robert, Martín Belloso Olga (2006), Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas [en línea], I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, SP Brasil: pp. 15-21

Consultado el 16 de junio de 2008 en:

<http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf>

36. Ramírez López Erika (2004), Alcachofa [en línea], México.

Consultado el 9 de febrero de 2008 en:

<www.doctorneo.com/News-pdf-sid-15.htm>

37. Rivero Argimiro (2006), Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas (Guía de laboratorio), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC),

Consultado el 10 de marzo de 2009 en:

<old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-3.pdf>

38. Sánchez Castellanos Francisco (2006), Extracción De Aceites Esenciales, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia.

Consultado el 3 de marzo de 2008 en:

<www.sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS_PDF/AROMATICAS/c05.pdf>

39. Santos Buelga Jesús (2002), Nuevas tendencias en el uso de conservadores en la industria alimentaria [en línea], Documento del Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León.

Consultado el 16 de junio de 2008 en:

<<http://www.inbiotec.com/Archivos/4-Jesus%20Santos%20Buelga-Presentacion.pdf>>

40. SENC - Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (n.f), Guía de alimentos funcionales [en línea], España: Aranceta Javier & Sierra Luis

Consultado el 26 de febrero de 2008 en:

<www.indecu.gov.ve/educacion/educacion_portal_web/educacion_para_el_consumidor/temas-de-consumo/guia-alimentos-funcionales.pdf>

41. SeedCount, Seeds & Agriculture, Artichoke Imperial Star [en línea], Consultado el 23 de junio de 2008 en:

<<http://seedcount.com/images/Artichoke-Imperial%20Star-.jpg>>

42. Sies Helmut (1997), Oxidative Stress: oxidants and antioxidants [en línea], Experimental Physiology 82, 291-295.

Consultado el 11 de junio de 2008 en:

<ep.physoc.org/cgi/reprint/82/2/291.pdf>

43. Tapia Wilson (2009), Docente de la carrera Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.

44. Tournier (2007), Agentes Antibacterianos [en línea], Documento de la facultad de ciencias veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Consultado el 16 de junio de 2008 en:

<<http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/16/material/antibact.pdf>>

45. UK Food Guide (2002), Antioxidants, United Kingdom

Consultado el 12 de junio de 2008 en:

<www.ukfoodguide.net/enumeric.htm#antioxidants>

46. Urquiaga Ines & Leighton Federico (2000), Plant Polyphenols Antioxidants and Oxidative Stress [en línea], Biological Research 33: 55-64.

Consultado el 12 de junio de 2008 en:

<<http://www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/biolresrevision.doc>>

47. Vieira Alexandre (2004), La Oxidación Lipídica y el Uso de Antioxidantes Sintéticos en productos cárnicos [en línea], Rev. Énfasis Alimentación Año 9, N ° 6. Consultado el 12 de junio de 2008 en:

<www.alfaeditores.com/historico/canilac/Junio%20Julio%202004%20CI%20%20La%20oxidaci%F3n%20lip%EDdica.pdf>

8 ANEXOS

ANEXO 1. Abreviaturas.

Abs:	Absorbancia
ANOVA:	Análisis de varianza.
DHS Tukey:	Diferencia honestamente significativa de Tukey
°C:	Grados Celsius o centígrados.
g:	Gramo.
mg:	Miligramo.
L:	Litro.
mL:	Mililitro.
mBar:	Milibar.
EC₅₀:	Concentración efectiva media.
μL:	Microlitro.
mM:	Milimolar.
μM:	Micromolar.
m:	Metro
cm:	Centímetro
nm:	Nanómetro
EQT:	Equivalentes de quercetina.
DPPH:	1,1-difenil-2-picrilhidracilo.
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad.
Rf:	Factor de retención.

UV:	Ultravioleta
UFC:	Unidades formadoras de colonias.
p/v:	Peso/Volumen
v/v:	Volumen/Volumen
psi:	libra cuadrada por pulgada
N:	Normalidad

ANEXO 2. Resultados presentados del tamizaje fitoquímico realizado a la muestra de brácteas de alcachofa.

ANEXO 3. Resultados de la cromatografía HPLC del extracto alcohólico de brácteas de alcachofa.

ANEXO 4 Resultados de la cromatografía HPLC del extracto hidroalcohólico de brácteas de alcachofa.

