

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRINCIPIOS
ACTIVOS DE ESTRUCTURA FENÓLICA CON
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIBACTERIANAS,
A PARTIR DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE
ALCACHOFAS**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Elaborado por:

JUAN CARLOS DUEÑAS RICAURTE

Sangolquí, 24 de septiembre de 2009

Hoja de Legalización de firmas

ELABORADO POR

Juan Carlos Dueñas Ricaurte

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala J.

Sangolquí, de 24 de septiembre de 2009

Certificación

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el **Sr. JUAN CARLOS DUEÑAS RICAURTE** como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

24 de septiembre de 2009

Fecha

Dra. Blanca Naranjo

Directora del Proyecto

Ing. Pablo Araujo M.Sc.

Codirector del Proyecto

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis amigos y

mi familia, especialmente a mis papás

Juan Carlos, Janina, a mis abuelos

Rodrigo, Norma, Gustavo, y Judy, y a mi

hermana Gaby con sus monstruos

Alejandro y Cristian.

Juan Carlos Dueñas Ricaurte

Agradecimiento

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Blanquita Naranjo y al Ing. Pablo Araujo por su amistad, por aceptar dirigir esta investigación y por apoyarme durante el tiempo que duró. También quiero agradecer a Almita Koch, Karina Ponce, Marquito Taípe y Carlos Cárdenas por aportar con sus recursos y conocimientos, a Jessica Maisincho por su importante y constante colaboración en el laboratorio de biotecnología, y al profesor Wilson Tapia, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, por los valiosos análisis realizados.

A mis amigos Mauricio, Marcelo, Andres, Mario, Cristian, Vinicio, Alberto, Daniel, Francisco, Jaime, Patricio, Denisse, Andrea, Diana, Irina, Alejandra, Natalia, Pamela, Carolina, Johana, Oderay, Paulina, Verónica, Paola, etc..., por la ayuda brindada.

Y finalmente quiero agradecer a mi papás, Juan Carlos y Janina, por el constante apoyo y la paciencia.

Juan Carlos Dueñas Ricaurte

Índice de Contenidos

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS, **p. ii.**

CERTIFICACIÓN, **p. iii.**

DEDICATORIA, **p. iv.**

AGRADECIMIENTO. **p. v.**

ÍNDICE DE CONTENIDOS, **p. vi.**

LISTADO DE TABLAS, **p. ix.**

LISTADO DE CUADROS, **p. xi.**

LISTADO DE FIGURAS, **p. xi.**

LISTADO DE ANEXOS, **p. xiii.**

RESUMEN, **p. xiv.**

ABSTRACT, **p. xv.**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN, **p. 1.**

1.1 Formulación del Problema, **p. 1.**

1.2 Justificación del problema, **p. 1.**

1.3 Objetivos de la Investigación, **p. 3.**

1.3.1 Objetivo Principal, **p. 3.**

1.3.2 Objetivos específicos, **p. 3.**

1.4 Marco Teórico, **p. 4.**

1.4.1 Principios activos presentes en las plantas, **p. 4.**

1.4.2 Información sobre la alcachofa, **p. 13.**

1.4.3 Stress Oxidativo y antioxidantes, **p. 18.**

1.4.4 Compuestos antimicrobianos de origen vegetal, **p. 21.**

1.5 Preguntas de investigación, **p. 23.**

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS, p. 24.

2.1 Participantes, **p. 24.**

2.2 Zona de estudio, **p. 24.**

2.3 Período de tiempo de investigación, **p. 24.**

2.4 Diseño, **p. 24.**

2.5 Instrumentos, **p. 25.**

2.5.1 Reactivos, **p. 25.**

2.5.2 Equipos y Software, **p. 26.**

2.6 Procedimientos, **p. 27.**

2.6.1 Determinación de la humedad de las brácteas de alcachofa, **p. 28.**

2.6.2 Secado de las brácteas, **p. 28.**

2.6.3 Desengrasado de la muestra, **p. 29.**

2.6.4 Extracción de principios activos, **p. 29.**

2.6.5 Caracterización, **p. 31.**

2.6.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, **p. 32.**

2.6.7 Determinación de la actividad antioxidante, **p. 34.**

2.6.8 Determinación de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp., **p. 35.**

2.7 Análisis de Datos, **p. 37.**

CAPÍTULO 3: RESULTADOS, p. 39.

3.1 Determinación de la humedad de las brácteas, **p. 39.**

3.2 Secado de las brácteas de alcachofa, **p. 39.**

3.3 Caracterización de los extractos, **p. 40.**

3.3.1 Tamizaje o “screening” fitoquímico, **p. 40.**

3.3.2 Reacción con Cloruro férrico (FeCl₃), **p. 41.**

3.3.3 Cromatografía en Capa Fina, **p. 41.**

3.3.4 Cromatografía HPLC, **p. 43.**

3.4 Determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu, **p. 45.**

3.5 Determinación de la actividad antioxidante, **p. 49.**

3.5.1 Reacción con el radical libre DPPH (2,2-difenil,1-picrilhidracilo), **p. 49.**

3.5.2 Actividad de los extractos en alimentos, **p. 58.**

3.6 Determinación de la actividad antibacteriana, **p. 58.**

3.6.1 Actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *Salmonella* spp., **p. 58.**

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN, **p. 63.**

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES, **p. 65.**

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES, **p. 67.**

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA, **p. 68.**

ANEXOS, **p. 76.**

Listado de tablas

Tabla 3.1 Datos para determinar de la humedad de las brácteas de alcachofa, **p. 39.**

Tabla 3.2 Datos de pérdida de humedad de las brácteas de alcachofa a temperatura ambiente, **p. 39.**

Tabla 3.3 Rf de los compuestos identificados en los cromatogramas, **p. 43.**

Tabla 3.4 Datos de Abs760nm de las diluciones del estándar Quercetina, **p. 45.**

Tabla 3.5 Datos de Abs760nm de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu de los extractos de brácteas de alcachofa, **p. 46.**

Tabla 3.6 Concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina (EQT) como mg EQT/100g de brácteas frescas, **p. 47.**

Tabla 3.7 Concentración de fenoles totales de los extractos de brácteas de alcachofa, **p. 47.**

Tabla 3.8 ANOVA de los datos de concentración de fenoles totales en EQT, **p. 48.**

Tabla 3.9 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración de fenoles totales en EQT, **p. 48.**

Tabla 3.10 Datos de absorbancia a 517nm de las diluciones de DPPH, **p. 49.**

Tabla 3.11 Datos de la reducción de la absorbancia a 517nm del radical libre DPPH, **p. 50.**

Tabla 3.12 Concentración final de la solución 0,1mM del radical libre DPPH, **p. 51.**

Tabla 3.13 ANOVA de los datos de concentración final del DPPH, **p. 53.**

Tabla 3.14 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración final del DPPH, **p. 53.**

Tabla 3.15 Datos de reducción de concentración (mM) del radical libre DPPH para determinar la EC₅₀ del extracto alcohólico e hidroalcohólico, **p. 54.**

Tabla 3.16 Análisis de correlación entre la concentración de fenoles totales y la reducción de concentración del radical libre DPPH, **p. 57.**

Tabla 3.17 Datos de las mediciones de los halos de inhibición producidos por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *Staphylococcus aureus*, **p. 58.**

Tabla 3.18 ANOVA de los datos de actividad antibacteriana del extracto alcohólico e hidroalcohólico contra *Staphylococcus aureus*, **p. 59.**

Tabla 3.19 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración de fenoles totales en EQT, **p. 60.**

Tabla 3.20 Datos de las mediciones de los halos de inhibición producidos por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *Salmonella* spp., **p. 60.**

Tabla 3.21 ANOVA de los datos de actividad antibacteriana del extracto alcohólico e hidroalcohólico contra *Salmonella* spp., **p. 61.**

Tabla 3.22 Análisis de subconjuntos homogéneos de la concentración de fenoles totales en EQT, **p. 62.**

Listado de cuadros

Cuadro 1.1 Principales clases de compuestos fenólicos en plantas, **p. 6.**

Cuadro 1.2 Rutas Biosintéticas de algunos compuestos fenólicos, **p. 6.**

Cuadro 1.3 Actividad biológica de algunos compuestos fenólicos, **p. 7.**

Tabla 3.1 Resumen del tamizaje fitoquímico realizado a las brácteas de alcachofa, **p. 40.**

Cuadro 3.2 Determinación cualitativa de la presencia de compuestos fenólicos mediante la reacción de los extractos con cloruro férrico, **p. 41.**

Listado de figuras

Figura 1.1 Estructura básica de los flavonoides, **p. 8.**

Figura 1.2 Estructura del ácido clorogénico y del ácido cafeico, **p. 15.**

Figura 1.3 Estructura del ácido clorogénico y del ácido cafeico, **p. 17.**

Figura 2.1 Diagrama de bloques general de los procedimientos, **p. 27.**

Figura 2.2 Posición de los discos para la prueba de actividad antimicrobiana, **p. 37.**

Figura 3.1 Cromatograma del extracto alcohólico, **p. 41.**

Figura 3.2 Cromatograma del extracto hidroalcohólico, **p. 42.**

Figura 3.3 Cromatograma del hidrolizado sin calor, **p. 42.**

Figura 3.4 Cromatograma HPLC del extracto alcohólico, **p. 44.**

Figura 3.5 Cromatograma HPLC del extracto hidroalcohólico, **p. 44.**

Figura 3.6 Curva de calibración Quercetina, regresión lineal, **p. 46.**

Figura 3.7 Curva de calibración DPPH, regresión lineal, **p. 50.**

Figura 3.8 Curvas de reducción de la Abs_{517nm} de la solución 0,1mM del radical DPPH, **p. 51.**

Figura 3.9 Reducción de la concentración del radical DPPH, **p. 52.**

Figura 3.10 Porcentaje de reducción de la concentración del radical DPPH, **p. 52.**

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, **p. 54.**

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, **p. 55.**

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, **p. 55.**

Figura 3.14 Regresión lineal de los datos de reducción de concentración (mM) del radical libre DPPH para el extracto alcohólico, **p. 56.**

Figura 3.15 Regresión lineal de los datos de reducción de concentración (mM) del radical libre DPPH para el extracto hidroalcohólico, **p. 56.**

Figura 3.16 Tinción Gram de las muestras de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, **p. 58.**

Figura 3.17 Halos de inhibición formados por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *Staphylococcus aureus*, **p. 59.**

Figura 3.18 Halos de inhibición formados por el extracto alcohólico e hidroalcohólico en el cultivo de *Salmonella* spp., **p. 61.**

Listado de anexos

ANEXO 1 Abreviaturas, **p. 76.**

ANEXO 2 Resultados presentados del tamizaje fitoquímico realizado a la muestra de brácteas de alcachofa , **p. 78.**

ANEXO 3 Resultados de la cromatografía HPLC del extracto alcohólico de brácteas de alcachofa, **p. 80.**

ANEXO 4 Resultados de la cromatografía HPLC del extracto hidroalcohólico de brácteas de alcachofa, **p. 82.**

Resumen

Las brácteas de alcachofa son el subproducto principal del procesamiento de esta planta. El uso que se le da a este subproducto es el de alimento para el ganado o el de materia prima para hacer harina de alcachofa.

En esta investigación se logró determinar la presencia de compuestos fenólicos en las brácteas, utilizando métodos como liofilización, maceración alcohólica e hidrólisis ácida, y después caracterizando los extractos con procedimientos como el de Folin-Ciocalteu, cromatografía en capa fina y HPLC para determinar compuestos fenólicos específicos como el ácido cafeico, el ácido clorogénico y la quercetina.

Los resultados indican que el extracto con mayor concentración de fenoles totales en equivalentes de quercetina es el extracto hidroalcohólico (0,160mgEQT/100g brácteas frescas), seguido del extracto alcohólico (0,153mgEQT/100g brácteas frescas), del hidrolizado sin calor (0,142mgEQT/100g brácteas frescas), y del hidrolizado con calor (0,001mgEQT/100g brácteas frescas).

Se evaluó la actividad antioxidante mediante la prueba de captura de radicales libres del DPPH la cual demostró que solo el extracto alcohólico e hidroalcohólico fueron capaces de reducir la concentración del DPPH 91,46% y 91,28% respectivamente.

También se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos en cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. La prueba determinó que ambos extractos tienen propiedades antibacterianas.

Con base en los resultados, es posible afirmar que las brácteas de alcachofa son un valioso recurso para obtener principios activos útiles como antioxidantes y antibacterianos.

Palabras clave: alcachofa, brácteas, compuestos fenólicos, fenoles totales, actividad antioxidante, DPPH, actividad antibacteriana.

Abstract

Artichoke bracts are the principal sub product of the industrial process of this plant. Those bracts were commonly used as food for cattle and also to make artichoke sour.

In this investigation it was possible to determine the presence of phenolic compounds by using extraction methods as freeze-drying, alcoholic maceration, and acid hydrolysis, then by characterization of the extracts with procedures such as total phenolics of Folin-Ciocalteu, thin layer chromatography, and HPLC, to determine the presence of specific compounds like caffeic acid, chlorogenic acid and quercetin. The total phenolics analysis indicated that the extract with the highest concentration, expressed in Quercetin equivalents (EQT), is the hydro-alcoholic extract (0,160mgQTE/100g fresh bracts), followed by the alcoholic extract (0,153mgQTE/100g fresh bracts), non-heat hydrolyzed (0,142mgQTE/100g fresh bracts), and heat hydrolyzed (0,001mgQTE/100g fresh bracts). It wasn't possible to determine the concentration of total phenolics of the freeze-dried.

Antioxidant activity was evaluated using the free radical scavenging test with DPPH. Results demonstrate that only alcoholic and hydro-alcoholic extract were capable to reduce the concentration of DPPH 91,46 % and 91,28% respectively.

Antibacterial activity of hydro-alcoholic and alcoholic extract, in different concentrations, was also evaluated using *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. cultures. Antibacterial activity test determined that both extracts are antagonists of those bacteria.

Based on the results, artichoke bracts are valuable resources of active principles with antioxidant and antibacterial activity.

Keywords: artichoke, bracts, phenolic compounds, total phenolics, antioxidant activity, DPPH, antibacterial activity.