

Métodos analíticos para determinar compuestos fenólicos y actividad antioxidante en alcachofa (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*)

Analytical methods to determine phenolic compounds and antioxidant activity in artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*)

Dantón Miranda-Cabrera¹, Norma Muguruza-Crispín²

RESUMEN

Objetivo: Describir los principales métodos analíticos utilizados para la determinación y cuantificación de polifenoles en la alcachofa (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). **Metodología:** Se realizó una investigación bibliográfica utilizando bases de datos especializadas como Medline, PubMed, CIMA, Google Scholar, ScienceDirect y Scielo. Los términos de búsqueda incluyeron palabras clave relacionadas con el cultivo, maduración, obtención y análisis de compuestos fenólicos en alcachofa, así como su capacidad antioxidante. **Resultados:** Se destacan los avances de los últimos siete años en la determinación cuali-cuantitativa de compuestos fenólicos en alcachofa. Se mencionan las estrategias más recientes para la extracción de los compuestos objetivo de la alcachofa junto con los enfoques analíticos adoptados para la separación, identificación y cuantificación de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos totales condensados. Se describen las principales características de los métodos de extracción “tradicionales” (maceración y extracción asistida por ultrasonidos), así como los protocolos más innovadores que involucran técnicas de extracción avanzadas, como la extracción asistida por microondas (MAE). **Conclusión:** Se han hecho avances considerables en la identificación de las estructuras químicas de los compuestos bioactivos de la alcachofa, las técnicas basadas en espectrometría de masas representan una herramienta poderosa para definir el perfil fenólico de la alcachofa, aunque existe ausencia de protocolos de validación completos para la mayoría de los procedimientos propuestos.

Palabras claves: Alcachofa, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, extracción, método de HPLC

ABSTRACT

Objective: To describe the main analytical methods used for the determination and quantification of polyphenols in artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). **Methodology:** A bibliographic review was conducted using specialized databases such as Medline, PubMed, CIMA, Google Scholar, ScienceDirect, and Scielo. The search terms included keywords related to cultivation, maturation, extraction, and analysis of phenolic compounds in artichoke, as well as its antioxidant capacity. **Results:** The advances of the last seven years in the qualitative-quantitative determination of phenolic compounds in artichoke are highlighted. The most recent strategies for the extraction of target compounds from artichoke are mentioned along with the analytical approaches adopted for the separation, identification and quantification of phenolic acids, flavonoids, anthocyanins and total condensed tannins. The main characteristics of “traditional” extraction methods (maceration and ultrasonic-assisted extraction) are described, as well as the most innovative protocols that involve advanced extraction techniques, such as microwave-assisted extraction (MAE). The predominant role of HPLC in defining the phenolic profile is examined and the most recent results obtained through the use of mass spectrometry-based detection systems are presented. Likewise, the most common procedures aimed at evaluating the antioxidant properties of artichoke phenolic extracts are described. **Conclusion:** Considerable progress has been made in the identification of the chemical structures of artichoke bioactive compounds, techniques based on mass spectrometry represent a powerful tool to define the phenolic profile of artichoke, although there's a lack of complete validation protocols for most of the proposed procedures.

Keywords: Artichoke, phenolic compounds, antioxidant activity, extraction, HPLC method

Recibido 02/04/2023 Aprobado 16/05/2022

Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)



¹ Facultad de Ingeniería Agraria, Industria Alimentaria y Ambiental, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-4000>, dmiranda@unjfsc.edu.pe

² Facultad de Bromatología y Nutrición, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7601-3049>, nmuguruza@unjfsc.edu.pe

INTRODUCCIÓN

En la actualidad llevar una vida saludable está estrechamente relacionada con los alimentos que se consumen y la actividad física que se realiza. Una alimentación saludable nos provee de nutrientes y sustancias funcionales necesarias para que nuestro cuerpo se desempeñe adecuadamente. Se ha demostrado que los alimentos naturales de origen vegetal tienen en su composición muchas sustancias funcionales, que, junto a una dieta adecuada, poseen beneficios curativos y efectos sobre factores de riesgo como propiedades hipoglucemiantes, hipolipemiantes, antihipertensivas y anticancerígena, por lo que cobran importancia en la mejoría del estado de salud y/o en la prevención de enfermedades (Sirtori y otros, 2009). En este contexto, la alcachofa (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) destaca por sus numerosos beneficios para la salud, especialmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares, como infartos y accidentes cerebrovasculares (Lattanzio et al., 2009).

La alcachofa es rica en compuestos fenólicos, que pueden alcanzar hasta un 6% de su peso. Entre estos destacan los ácidos mono y dicafeoilquínicos, tales como el ácido 1-O-cafeoilquínico, el ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico), el ácido cafeico, el ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico y el 1,5-di ácido O-cafeoilquínico (cinarina). Además, puede contener hasta un 5% de lactonas sesquiterpénicas, entre ellas cinaropicrina, la deshdrocinaropicrina, el grosheimin y sus derivados. La alcachofa También contiene flavonoides, aporta cantidades que varían entre 0,35% y 0,75%, como la apigeina, luteolina y sus derivados escolimósido, cinarósido y cinarotriósido. Los contenidos en polifenoles varían según la variedad de alcachofa y las condiciones de cultivo, (Altavista & Prats, 2020).

Los extractos de alcachofa desempeñan un rol importante en la prevención de la arteriosclerosis a través de tres mecanismos: inhibición de la síntesis de colesterol, aumento de la excreción biliar y reducción de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Adicionalmente, el extracto de alcachofa podría tener efecto en la disminución de los niveles séricos de triglicéridos (Altavista & Prats, 2020).

El presente trabajo tiene como objetivo describir los principales métodos analíticos utilizados para la determinación y cuantificación de compuestos fenólicos en la alcachofa, así como explorar las técnicas más empleadas para medir su capacidad antioxidante total. Estos métodos se analizarán de acuerdo con los principios de transferencia de hidrógeno o electrones, permitiendo así una mejor comprensión de su fundamento científico.

METODOLOGÍA

Para la elaboración de este artículo de revisión, se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de literatura científica en formato digital, centrada en los métodos analíticos utilizados para la determinación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en la alcachofa (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). Se prestó especial

atención a los métodos más establecidos y reconocidos, así como a aquellos que están en proceso de investigación y desarrollo, ya que estos presentan numerosas variaciones y modificaciones.

Las bases de datos consultadas incluyeron Medline, PubMed, CIMA, Google Scholar, ScienceDirect y Scielo, seleccionadas por su amplia cobertura de temas relacionados con alimentos funcionales y análisis bioquímicos. Los términos de búsqueda empleados abarcaban temas relacionados con el cultivo, los procesos de maduración, la obtención de extractos, la determinación analítica de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los alimentos. Algunas de las palabras clave utilizadas fueron: "alcachofa", "cultivo de alcachofa", "almacenamiento", "tratamiento", "composición", "métodos analíticos", "análisis", "antioxidantes", "compuestos fenólicos", "HPLC" y "DPPH".

Palabras clave utilizadas: alcachofa, cultivo de alcachofa, almacenamiento, tratamiento, composición, métodos analíticos, análisis, antioxidantes, compuestos fenólicos, HPLC, DPPH.

La búsqueda se realizó tanto en español como en inglés, priorizando la información más actualizada disponible, y se seleccionaron artículos publicados desde 2016 en adelante para asegurar la inclusión de los avances más recientes en el campo. No obstante, es importante señalar que, a pesar de la amplitud de la búsqueda bibliográfica, el acceso a ciertos contenidos completos estuvo limitado, lo que, en algunos casos, restringió la recolección precisa y detallada de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tratamientos previos a la determinación de polifenoles

En general, para la determinación de polifenoles es necesario un pretratamiento de la muestra antes de proceder con la extracción. En el caso de la alcachofa, este proceso comienza con el lavado con agua, la selección y el picado de las muestras. Cuando se trabaja con alcachofa fresca, se emplean diferentes métodos de preservación y almacenamiento. Comúnmente, las muestras se almacenan a -80°C y posteriormente se secan mediante liofilización antes de ser almacenadas a -18°C (Domínguez-Fernández et al., 2021; Rouphael et al., 2016). Si se trabaja con alcachofas frescas, las muestras pueden ser molidas y analizadas inmediatamente después de su preparación (Messoudene et al., 2018; Isabela et al., 2020). Alternativamente, las muestras pueden ser secadas al aire o bajo sombra durante un período de 20 días, como lo propone Ben Salem (2019), mientras que Mahmudi (2022) menciona el uso de secadores artesanales y estufas a 37°C (Echavarría et al., 2016). Otros autores han utilizado temperaturas de secado de 40°C a 50°C (Zeinab, 2017; Mona et al., 2016). Para la molienda, se emplean diversos equipos como morteros, molinos o licuadoras, y las muestras molidas se almacenan en bolsas de polietileno a 4°C (Kayan & Saloglu, 2021).

Seda y Didem (2020) describen un tratamiento a 50°C

para el secado de subproductos de alcachofa antes de ser molidos y almacenados a 4° C hasta su análisis. En otro estudio, López-Salas et al. (2021) utilizaron almacenamiento a -45° C seguido de liofilización durante 24 horas..

Extracción

La extracción de compuestos fenólicos en alcachofa es un paso crucial y representa un desafío debido a la necesidad de aislar diversas clases de compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas, al mismo tiempo que se minimizan las posibles interferencias. La selección del procedimiento de extracción adecuado depende del tipo de información analítica que se busca obtener, ya sea el perfil cualitativo, el contenido total de polifenoles o flavonoides, o la actividad antioxidante. Adicionalmente, la elección del método también está influenciada por la naturaleza de las fracciones fenólicas que se desean cuantificar, como los compuestos fenólicos libres o los compuestos fenólicos unidos (Putnik et al., 2018).

Dado que los polifenoles tienen diferentes características químicas y físicas, su extracción óptima requiere ajustar las condiciones experimentales, tales como el tipo de solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la proporción de solvente/agua. Las condiciones experimentales deben ser cuidadosamente seleccionadas para maximizar la eficiencia de extracción sin comprometer la integridad de los compuestos.

La extracción de compuestos fenólicos libres en alcachofas pulverizadas se llevó a cabo utilizando soluciones de metanol, según diversas condiciones experimentales. Messaoudene y otros (2018) probaron diferentes proporciones de metanol/agua y variaron las temperaturas de incubación. Sammia y otros (2017) emplearon una solución de 80% de hidrometanol, agitando las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego filtrarlas y almacenar el extracto a -20°C. Roupael y otros (2016) utilizaron una solución al 75% en volumen, la cual fue sometida a centrifugación y filtración. Biel y otros (2019) trabajaron con una solución al 70%, agitaron por 2 horas, centrifugaron, filtraron y almacenaron el extracto a -22°C.

Djenidi y otros (2020) realizaron la maceración de hojas de alcachofa en una solución de metanol/agua (80:20) durante 3 días a 4°C, filtraron y evaporaron el extracto a presión reducida a 45°C. Posteriormente, el extracto fue secado y almacenado a 4°C. Guillen y otros (2019) utilizaron la misma proporción de hidrometanol, mientras que Mona y otros (2016) emplearon una solución al 60%, homogeneizándola a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración, los extractos se evaporaron al vacío a 30°C, y el residuo fue disuelto en metanol a una concentración de 10 mg/mL.

Sedam y Didem (2021) emplearon metanol puro en un baño maría a 70°C durante 2 horas, luego centrifugaron y almacenaron los extractos a -20°C. Por su parte, Domínguez-Fernández y otros (2021) añadieron 0,5 mL de metanol/agua acidificada (0,1% de ácido fórmico) y sometieron las muestras a ultrasonido durante 25

minutos. Posteriormente, centrifugaron y extrajeron nuevamente el residuo con 0,25 mL de la misma solución de metanol/agua acidificada (80:20 v/v), almacenando el extracto a 4°C o a -18°C, dependiendo del caso.

La extracción de compuestos fenólicos unidos se llevó a cabo mediante la hidrólisis del residuo (pellet) obtenido después de la extracción de los compuestos libres. Para ello, el residuo fue hidrolizado con 0,75 mL de NaOH 2 M durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la hidrólisis alcalina, el pH se ajustó a 3 mediante la adición de 675 µL de ácido cítrico 3 M. Tras la hidrólisis, las muestras se liofilizaron y los compuestos fenólicos enlazados se extrajeron añadiendo 0,5 mL de metanol/agua acidificada (0,1% de ácido fórmico) (80:20 v/v) al residuo liofilizado, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para los compuestos libres.

Stumpf y otros (2019) también incluyeron la aplicación de ultrasonido en la extracción clásica con metanol a 70°C durante 1 hora. Posteriormente, el filtrado fue tratado nuevamente y ambos extractos fueron combinados y diluidos con agua hasta alcanzar una concentración final del 40% de metanol. Zeinab (2017) utilizó tanto soluciones etanólicas como metanólicas para la maceración, mientras que Isabela y otros (2020) emplearon una solución hidroetanólica al 70% en volumen para macerar alcachofa pulverizada, filtrando y secando a presión reducida para eliminar el disolvente orgánico, con el extracto almacenado a -20°C.

Seda y Didem (2020) aplicaron microondas para la extracción hidroetanólica, utilizando entre 5 y 25 mL de una solución de alcohol/agua. Renata y otros (2016) evaluaron la extracción con etanol al 25%, 50% y 75% en agua (v/v), sometiendo las muestras a 60 minutos de extracción a 25±1°C, seguido de filtración y concentración de los extractos. Lavacchia y otros (2018) trabajaron con etanol acuoso al 50% y 100%, utilizando un baño maría a 60°C con agitación por 90 minutos, después centrifugaron las muestras por 5 minutos y secaron los extractos a 50°C.

Mahmudi (2022) empleó el equipo Soxhlet con una solución de etanol al 70% v/v como solvente durante 6 horas, mientras que Ben Salem (2019) utilizó soluciones hídricas de hexano y butanol al 75%. Tras 48 horas, filtró los extractos y los almacenó en oscuridad a 4°C. Nuria García-Martínez (2017) utilizó una solución tampón de fosfato 0.1 M, homogenizando durante 2 minutos y filtrando antes de centrifugar durante 3 minutos a 5°C, almacenando el extracto a temperatura ambiente en la oscuridad. Los extractos obtenidos se evaporaron a sequedad utilizando un evaporador rotatorio.

Finalmente, los extractos etanólicos obtenidos fueron parcialmente purificados mediante extracción líquido-líquido utilizando éter de petróleo para eliminar pigmentos y lípidos, seguido de purificación con cloroformo. Los extractos acuosos fueron extraídos tres veces con acetato de etilo (100 mL), adicionando 20% de sulfato de amonio y 2% de ácido metafosfórico. Las fases orgánicas resultantes fueron agrupadas y secadas con sulfato de sodio anhidro. El solvente fue evaporado utilizando un evaporador rotatorio a 50°C, y los residuos

se almacenaron en viales de vidrio a 4°C.

Análisis del perfil cuali-cuantitativo de compuestos fenólicos en alcachofa

La caracterización cualitativa y cuantitativa de los polifenoles presentes en la alcachofa implica la separación, identificación y cuantificación de los analitos extraídos en los procedimientos anteriores. En este contexto, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más comúnmente adoptada. Las características seleccionadas de los métodos cromatográficos más recientes para el análisis de compuestos fenólicos en alcachofa se resumen en la **Tabla 1**. El principal desafío en la determinación cualitativa de polifenoles radica en establecer las condiciones cromatográficas óptimas para los distintos analitos que pertenecen a diferentes clases químicas. Aunque existe una amplia variedad de métodos propuestos, la tendencia es realizar una sola corrida cromatográfica para la separación de ácidos fenólicos y flavonoides (Dominguez-Fernandez et al., 2021; Farhan et al., 2018; Ben Salem et al., 2019). Generalmente, se prefieren las columnas C18 para esta tarea.

En cuanto a la fase móvil, las opciones más comunes incluyen el ácido trifluoracético como fase A (Farhan et al., 2018; Rouphael et al., 2016; Montesano et al., 2022) o ácido fórmico (Ben Salem et al., 2019; Mona et al., 2016). También se han utilizado ácidos como el fosfórico en algunos casos (Seda & Didem, 2021; Stumpf et al., 2019). La fase B generalmente se compone de acetonitrilo, a veces en combinación con otro solvente como el ácido fórmico (Abdel et al., 2016; Ben Salem et al., 2019).

El uso de la espectrometría de masas (MS) como un sistema de detección combinado con HPLC ha permitido avances significativos en el estudio de la fracción fenólica de la alcachofa. Esta combinación ha permitido el rastreo de ciertos compuestos fenólicos por primera vez en esta matriz alimentaria, debido a la capacidad del MS para revelar patrones de fragmentación específicos. Los experimentos dirigidos mediante espectrometría de masas son sumamente útiles para dilucidar las estructuras moleculares, especialmente en casos donde

las similitudes estructurales entre los compuestos dificultan su discriminación. En comparación con los detectores UV, el MS ofrece una mayor capacidad para caracterizar compuestos con estructuras químicas complejas y pertenecientes a diferentes clases.

Sin embargo, la espectrometría de masas también presenta limitaciones, particularmente en la identificación y atribución precisa de los compuestos, especialmente cuando no se dispone de estándares comerciales. En los últimos años, muchos estudios sobre la fracción fenólica de la alcachofa han recurrido al uso de técnicas basadas en espectrometría de masas, utilizando en la mayoría de los casos fuentes de ionización por electropulverización (ESI). Estas fuentes suelen configurarse en modo negativo para la detección de ácidos fenólicos y flavonoides, y en modo positivo para la detección de antocianinas. Además de la cromatografía líquida, algunos estudios han empleado técnicas complementarias como la cromatografía de gases (GC) (Zeinab, 2017) o cromatografía en capa fina (TLC) (Sohuila et al., 2022) para investigar el perfil cualitativo de los compuestos fenólicos.

Aunque el HPLC sigue siendo el método más adecuado para la identificación y cuantificación de fenoles, algunos estudios también han reportado resultados interesantes utilizando técnicas alternativas.

Es fundamental tener en cuenta que, cuando el estudio incluye la cuantificación de compuestos fenólicos en matrices, la validación del método es un requisito indispensable para garantizar la confiabilidad de los datos obtenidos. Según las directrices de la norma ISO/IEC (2018), un método debe validarse cuando se trata de (a) un método no estándar; (b) un método diseñado o desarrollado en un laboratorio; (c) un método estándar utilizado fuera de su alcance previsto; o (d) una ampliación o modificación de un método estándar. Los métodos propuestos deben evaluarse en términos de sensibilidad, rango de trabajo, precisión y veracidad. Desafortunadamente, muchos de los métodos presentados en la tabla 1 no han sido validados adecuadamente, lo que genera ciertas dudas sobre la fiabilidad de los resultados cuantitativos.

Tabla 1

Métodos seleccionados para la determinación de compuestos fenólicos en alcachofa

Técnica Cromatográfica	Fase estacionaria	Fase móvil	Origen de las muestras	Analitos objetivos	Referencia
LC-MS/MS	CORTECS C18 (3×75 mm, 2,7 µm)	fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % (v/c) en agua	Alcachofas frescas	Compuestos polifenólicos	Dominguez - Fernández y otros (2021)
		fase móvil B: acetonitrilo	Tudela (España)	Diecinueve eran ácidos fenólicos, específicamente derivados del ácido hidroxicinámico, incluidos los derivados cafeicos, ferúlico y p-cumárico; diez flavonoides pertenecientes a la familia de las flavonas (derivados de apigenina y luteolina); y dos lignanos (derivados de pinoresinol)	

HPLC-UV	phenomenex C-18	fase A: (0,1% de ácido trifluoracético) en agua	Alcachofas frescas	ácido clorogénico	Farhan y otros (2018)
	5 m (100 × 4,6 mm DI)	Desionizada	Universidad Al-Nahrain. Bagdad	cinarina, luteolina, ácido cafeico y ácido salicílico	
LC-MS/MS	a Zorbax 300 Å Extend-C-18 Column (2.1 × 150 mm)	fase B (100% de acetonitrilo). 95% solvent A (0.1% formic acid in water) 5% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile)	Alcachofas Frescas Facultad de Sciences, Universidad de Sfax, Túnez	Ácido salicílico-o-hexósido Ácido clorogénico Ácido 3-mono-o-cafeoilquinico Apigenina-7-glucósido Desconocido Luteolin-7-o-rutinósido Dihidroxihipofenodihexósido Kampferol 3-o-rutinósido Quercetina-o-pentósido ácido cafeico	Ben Salem y otros (2019)
UHPLC (UHPLC/Q-TOF-MS)	Zorbax Extend-C18 (75 × 2,1 mm de d.i., 1,8 µm).	fase A: (0,1% de ácido trifluoracético) en agua fase móvil B: fue metanol Ácido fórmico 0,1% (v/v) y formiato de amonio (5 mM)	Alcachofas Frescas Agencia regional de Lazio-Italia	flavonoides, ácidos hidroxycinámicos, tirosoles y lignanos	Rouphael y otros (2016)
HPLC-UV	ReproSil-Pur C18-AQ	fase A: 0.5% ácido fosfórico fase B: acetonitrilo	Hojas secas de alcachofa Alemania	Ácido clorogénico ciranósidos, ácidos cadeoilquinicos flavonoides totales	Stumpt y otros (2019)
Crom. gases		Helio	Hojas de Alcachofa del mercado	incluyen luteolina, éster metílico de	Zeinab (2017)
Espect. de masas			Egipto	avenantramida-C, 8-metoxicumarina-3-carboxilato de etilo, ácido trimetoxicinámico, 4-hidroxi-7-metoxicumarina y 5,3'-dihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona	
HPLC	reversa hypersil C18 (25 × 4,6 mm)	solvente A (4,5% de ácido fórmico)	Alcachofa fresca	ácido hidroxycinámico y los derivados de	Abdel y otros (2016)
	5 µm	el solvente B (80% de acetonitrilo y 20% de solvente A)	Instituto de Investigación Hortícola Egipto	flavonoides	
HPLC	columna de cromatografía de 150 mm de largo, 4,6 mm de ancho y un tamaño de partícula de 2,6 mm	fase A: ácido fosfórico en agua fase B: acetonitrilo	Alcachofa fresca Turquía	ácido clorogénico cinarina, apigenina, cinarósido, luteolina, rhoifolina y siringina	Kayan y Saloglu (2021)

Cromatografía	placas de gel de sílice TLC con	Cloroformo/acetato de etilo/ácido fórmico	Alcachofas frescas	compuestos fenólicos.	Sohuila y otros (2022)
Capa fina	indicador fluorescente (20 × 20 cm, 60 F254)	(5/4/1, v/v/v) n-butanol/ácido acético/agua (4/1/5, v/v/v).	departamento de Bourmerdes Argelia	flavonoides. terpenoides, derivados de fenilpropano y fenoles	
HPLC	fase reversa Luna C18 (250×4,6 mm de d.i., tamaño de partícula 5µmetro	Fase A: 0.01% de ácido trifluoracético en agua Fase B: 95% acetonitrilo (conteniendo 0.01% ácido trifluoracético	Alcachofas frescas Instituto de Investigación Hortícola Policoro-Italia	cafeoilquinico, ácido cafeico, apigenina 7-O-glucósido, luteolina 7-O-glucósido	Montesano y otros (2022)

Contenido total de polifenoles, flavonoides, taninos y antocianinas

Además del análisis cualitativo de los fenoles, es posible cuantificar el contenido total de clases específicas de compuestos fenólicos. Entre los procedimientos más destacados se encuentra el método Folin-Ciocalteu, utilizado para la determinación del contenido fenólico total. Este método es ampliamente reconocido y utilizado no solo en el análisis de la alcachofa, sino también en diversas matrices de alimentos y vegetales. La técnica se basa en un método colorimétrico que mide la formación de complejos de color azul, compuestos por molibdeno y tungsteno, los cuales pueden ser detectados espectrofotométricamente. El procedimiento, descrito por autores como Domínguez et al. (2021), Messaoudene et al. (2018) y Vidal-Casenalla et al. (2021), consiste en la dilución de una alícuota del extracto fenólico en agua destilada, seguida de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu.

De manera similar, la espectrofotometría también se emplea para cuantificar el contenido total de flavonoides en la alcachofa. El procedimiento más eficiente utiliza la complejación de los analitos con cloruro de aluminio, ya sea en metanol o etanol, lo que provoca un efecto hipercrómico que se puede detectar sin interferencias de otros fenoles. Este método ha sido descrito por diversos autores, incluyendo Isabela et al. (2020), Lavacchio et al. (2018), y Seddik & Amel (2020). Alternativamente, se puede emplear cloruro de aluminio en etanol, como describen Youssef et al. (2016) y Samia et al. (2017).

En el caso de los taninos condensados (proantocianidinas), el ensayo de vainillina es el procedimiento más utilizado. En este método, un aldehído aromático (vainillina) reacciona con el anillo meta-sustituido de los flavanoles para formar un aducto rojo que puede medirse espectrofotométricamente. Ben Salem et al. (2017) y Samia et al. (2017) detallan el

proceso, que consiste en mezclar un volumen pequeño de extracto metanólico con ácido sulfúrico/metanol y una solución de vainillina al 1%. La mezcla se calienta a 30°C durante 15 minutos en un baño de agua, y la absorbancia se mide a 500 nm, utilizando catequina como estándar externo. Los resultados se expresan en mg de catequina por gramo de materia seca. Debido a que las antocianinas pueden interferir en esta determinación, se prepara una mezcla de control con metanol al 100% en lugar de vainillina para corregir la absorbancia.

Para la cuantificación de antocianinas totales (TAC), los autores suelen medir la absorbancia de los extractos a longitudes de onda específicas y calcular la TAC utilizando la absorptividad molar de una antocianina característica, como la cianidina-3-glucósido, que se encuentra en variedades de alcachofas de color. El cálculo se basa en la diferencia de absorbancia a longitudes de onda de 530 y 653 nm (Samia et al., 2017), empleando la absorptividad molar de la cianidina-3-glucósido.

Si bien los procedimientos espectrofotométricos descritos son adecuados para la cuantificación de polifenoles en las clases mencionadas, es importante tener en cuenta que estos métodos pueden ser inespecíficos. Por ejemplo, la determinación del contenido de fenoles totales mediante el protocolo de Folin-Ciocalteu puede verse afectada por la presencia de otras sustancias reductoras, como proteínas y aminoácidos. Del mismo modo que en el análisis cualitativo, la confiabilidad de los datos cuantitativos puede ser cuestionada debido a la falta de validación de los protocolos empleados. Esto, junto con las variaciones en los métodos de extracción y calibración, dificulta la comparación de los resultados obtenidos en diferentes estudios. Por ejemplo, cuando la cuantificación de flavonoides se realiza utilizando diferentes compuestos de referencia, como catequina o quercetina, los resultados no son directamente comparables. Sin

embargo, los datos obtenidos mediante estos procedimientos pueden ser útiles si se comparan dentro de un mismo contexto y utilizando curvas de calibración homogéneas (Ciulu et al., 2018).

Ensayos de actividad antioxidante

Los ensayos para medir la actividad antioxidante se dividen principalmente en dos categorías: ensayos de transferencia de un solo electrón (SET) y ensayos de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT). Dentro de los métodos basados en SET, uno de los más ampliamente utilizados en extractos de alcachofa es el ensayo de decoloración del catión 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺). Este ensayo es aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos. En el estudio de Lavacchia et al. (2018), el catión radical preformado ABTS⁺ se genera por la oxidación de ABTS mediante persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes. La actividad antioxidante se determina considerando tanto la concentración de antioxidantes como la duración de la reacción. Este protocolo también fue seguido por Ben Salem et al. (2017). Es importante mencionar que, en diversos estudios que utilizan el ensayo ABTS, el tiempo de reacción varía considerablemente.

Otro método SET comúnmente utilizado es el ensayo de captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Renata et al. (2016) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos de alcachofa mediante este ensayo, agregando los extractos diluidos a una solución metanólica de DPPH. Después de incubar durante 30 minutos en la oscuridad, la absorbancia se midió a 517 nm usando un espectrofotómetro. Al igual que en el caso del ensayo ABTS, existen diferencias en los procedimientos DPPH, especialmente en el tiempo de reacción, que varía según los autores. Por lo general, la absorbancia se mide a 515 o 517 nm, aunque algunos estudios han utilizado 540 nm como longitud de onda de detección.

Por otro lado, el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) mide el aumento de la absorbancia

cuando los compuestos antioxidantes reaccionan con un reactivo cromogénico. Este método, considerado robusto, sensible y rápido, es frecuentemente empleado en estudios experimentales y clínicos para investigar la relación entre el estado antioxidante, los hábitos dietéticos y el riesgo de enfermedades. El protocolo FRAP, tal como lo describen Ben Salem et al. (2017), implica la adición de una alícuota de extracto de alcachofa a una solución de FRAP, la cual se prepara con 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) y cloruro férrico en un tampón de acetato de sodio (pH 3,6). La actividad antioxidante FRAP de diferentes cultivares de alcachofa italianos fue evaluada utilizando este método por Rouphael et al. (2016).


En el método CUPRAC (capacidad antioxidante de reducción cúprica), los polifenoles del extracto de alcachofa reducen una solución de cobre, generando un complejo coloreado cuya absorbancia se mide mediante espectrofotometría UV, según lo descrito por Kanmaz et al. (2020).

En cuanto a los métodos HAT, el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se ha utilizado en estudios sobre las propiedades nutraceuticas de extractos de alcachofa (Stumpf et al., 2019; Rouphael et al., 2016). El ensayo ORAC se basa en la oxidación inducida por radicales peroxilo, iniciada por la descomposición térmica de azocompuestos como el [2,2'-azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH)]. La reacción entre este radical y una sonda fluorescente, como la fluoresceína, produce una disminución de la intensidad de fluorescencia. En presencia de antioxidantes, se observa una señal de fluorescencia más estable debido a la inhibición del radical peroxilo. En el procedimiento descrito por Stumpf et al. (2019), se utilizó una mezcla de reacción que contenía fluoresceína, AAPH y el extracto diluido de alcachofa. La reacción se llevó a cabo a 37°C en tampón fosfato (pH 7,4) durante 300 minutos, midiendo la intensidad de fluorescencia cada minuto y medio ($\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{emi} = 538 \text{ nm}$), y registrando las áreas bajo la curva de disminución de la fluorescencia (AUC) después de restar el valor del blanco.

Tabla 2

Métodos para determinar la capacidad antioxidante total

Método de transferencia	Método	Medida	Fundamento y técnica	Referencia
Átomo de hidrógeno	ORAC	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL	Pérdida de fluorescencia $X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$ Fluorometría	Stumpf y otros (2019) Rouphael y otros (2016)
	DPPH	El antioxidante dona hidrógeno u otra especie radicalaria a DPPH y se reduce a DPPH-H, el color va haciéndose más débil y disminuye la absorbancia	Espectrofotometría abs UV-visible Pérdida de fluorescencia $DPPH + (AH)_n \rightarrow DPPH-H + (A)_n$	Renata y otros (2016) Messoudene y otros (2018) Ben Salem y otros (2017) Samia y otros (2017)

Electrón	CUPRAC	Los polifenoles (-OH) se oxidan a sus formas quinolinicas (=?) y el Cu ²⁺ es reducido a Cu ⁺ coloreado.	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción Cu ²⁺ a Cu ⁺	Seda y Didem (2020) Nergiz Kanmaz y otros (2020)
			$2\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + \text{Ar}(\text{OH})_n \rightleftharpoons 2\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + \text{Ar}(\text{O})_n + 2\text{H}^+$  Incoloro Coloreado	Renata y otros (2016)
	FRAP	Transferencia electrones	Espectrofotometría abs UV-visible Reducción Fe ³⁺ ? Fe ²⁺ Incoloro ? coloreado	Ben Salem y otros (2017) Rouphael y otros (2016)
Mixto	ABTS	Ferrilmioglobina/ H ₂ O / K ₂ S ₂ O ₈ → ABTS*	Este método se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el catión coloreado ABTS*, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC.	Lavacchia y otros (2018)
		Descenso de ABTS*		Ben Salem y otros (2017) Samia y otros (2017) Wiolettabiel (2019)

CONCLUSIONES

La alcachofa es un alimento de alto valor nutritivo, con un potencial significativo para ser incorporado en la dieta básica de diversas poblaciones. La presencia de compuestos fenólicos en su composición química ha generado un gran interés debido a los numerosos beneficios para la salud que han sido documentados en múltiples estudios. Este interés ha llevado a numerosos grupos de investigación a desarrollar métodos analíticos para identificar y cuantificar los polifenoles presentes en la alcachofa, así como para evaluar sus propiedades nutraceuticas.

En lo que respecta a la extracción de los compuestos fenólicos, la maceración tradicional con mezclas polares continúa siendo la técnica más utilizada. Sin embargo, se han propuesto enfoques más modernos, como la extracción asistida por ultrasonidos y microondas, que han mostrado resultados prometedores. Asimismo, se han implementado estrategias para aislar las fracciones fenólicas libres y unidas de manera separada.

A pesar de los avances logrados en los procedimientos analíticos, el principal desafío sigue siendo la adopción de enfoques estandarizados para la determinación cualitativa de las diversas clases de compuestos fenólicos. Si bien se han logrado avances considerables en la elucidación de las estructuras químicas de estos compuestos bioactivos, las técnicas basadas en espectrometría de masas, aunque poderosas, aún carecen de protocolos de validación completos. Esto impide una evaluación precisa de la fiabilidad de los datos cuantitativos obtenidos.

Por otra parte, los métodos espectrofotométricos, que

son rápidos y sencillos, utilizados para la cuantificación del contenido total de polifenoles y la evaluación de la actividad antioxidante, también presentan limitaciones importantes en cuanto a la precisión y exactitud de los datos proporcionados.

Se considera que los esfuerzos de investigación realizados hasta ahora constituyen un excelente punto de partida para el desarrollo de herramientas analíticas más sofisticadas en el estudio de la fracción fenólica de la alcachofa. No obstante, los futuros estudios deben centrarse en el desarrollo de métodos integrales que permitan la determinación precisa de las diferentes clases de compuestos fenólicos, así como en la implementación de protocolos de validación rigurosos que aseguren la fiabilidad de los datos cuantitativos obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AltaVista Cesare y Prats Soledad (2020). La alcachofa, de la huerta a la mesa Capítulo: Composición química de la alcachofa y evidencias sobre sus efectos beneficiosos para la salud. <https://www.researchgate.net/publication/340871185>
- Ben Salem M, Affes H, Athmouni K, Ksouda K, Dhouibi R, Sahnoun Z, Hammami S, Zeghal KM. (2017) Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. Evid Based Complement Alternat Med. 2017; 2017: 4951937. <https://doi.org/10.1155/2017/4951937>

- Ben Salem Maryem, Hanen Affes, Raouia Dhouibi, Slim Charfi, Mouna Turki, Serria Hammami, Fatma Ayedi, Zouheir Sahnoun, Khaled Mounir Zeghal & Kamilia Ksouda (2019): Effect of Artichoke (*cynarascolymus*) on cardiac markers, lipid profile and antioxidants levels in tissue of HFD-induced obesity, *Archives of Physiology and Biochemistry*, <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1670213>
- Biel, W., Witkiewicz, R., Piątkowska, E. *et al.* Proximate Composition, Minerals and Antioxidant Activity of Artichoke Leaf Extracts. *Biol Trace Elem Res* **194**, 589–595 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01806-3>
- Ciulu M, Cádiz-Gurrea ML, Segura-Carretero A. Extraction and Analysis of Phenolic Compounds in Rice: A Review. *Molecules*. 2018 Nov. 6; 23(11): 2890. <https://doi.org/10.3390/molecules23112890>
- Dominguez-Fernandez, M.; Irigoyen, A.; Vargas, A. (2021) "Influence of culinary process on free and bound (poly)phenolic compounds and antioxidant capacity of artichoke". *International Journal of Gastronomy and Food Science*. (25), 2021, 10038. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100389>
- Djenidi, Habiba & Khennouf, Seddik & Bouaziz, Amel. (2020). Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*. 20. 224-235. 10.23751/pn.v22i1.7701. DOI: 10.23751/pn.v22i1.7701
- Echavarria, A., D'Armas Regnault, H., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., Rojas de Astudillo, L., & Benitez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales / Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *CIENCIA UNEMI*, 9(20), 29-35. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp29-35p>
- ISO/IEC 17025:2005 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. Available online: <https://www.iso.org/standard/39883.html> (accessed on 5 November 2018).
- Eleni Kollia, Panagiota Markaki, Panagiotis Zoumpoulakis & Charalampos Proestos (2016): Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques, *Natural Product Research*, DOI:10.1080/14786419.2016.1219864
- Farhan, MK, Hassawi, DS e Ibraheem, NK (2018). Investigación de compuestos de polifenoles en hojas de alcachofa callosas (*CYNARA COLYMUS* L.). *Plant Archives* Vol. 18 No. 2, 2018 pp. 2629-2635
- Guillén, S., Mir-Bel, J., Oria, R., Salvador, M.L., Influence of cooking conditions on organoleptic and health-related properties of artichokes, green beans, broccoli and carrots, *Food Chemistry* (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.067>
- Kanmaz N, Uzer A, Hizal J, Apak R. Determination of total antioxidant capacity of *Cynara Scolymus* L. (globe artichoke) by using novel nanoparticle-based ferricyanide/Prussian blue assay. *Talanta*. 2020 Aug 15;216:120960. doi: 10.1016/j.talanta.2020.120960. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32456941.
- Kayahan S and Saloglu D (2021) Comparison of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Raw and Cooked Turkish Artichoke Cultivars. *Front. Sustain. Food Syst.* 5: 761145. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.761145>
- Isabela Alves, Brenna Carvalho, Michele Terra, et al. (2020). Efecto del extracto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) sobre parámetros bioquímicos en ratas diabéticas. *Authorea*. 08 de octubre de 2020. DOI: [10.22541/au.160218249.98153058/v1](https://doi.org/10.22541/au.160218249.98153058/v1)
- Lavecchia, R.; Maffei, G.; Paaccasoni, F.; Piga, L.; Zuorro, A. (2018) Artichoke Waste as a Source of Phenolic Antioxidants and Bioenergy-2018 Waste and Biomass Valorization <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0305-y>
- Lattanzio V, Kroon P, Linsalata V, Cardinali A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*. [en línea] 2009 [consultado el 22 de abril del 2011]; 1: 131-144. doi:10.1016/j.jff.2009.01.002
- Londoño Londoño, Julian. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Corporación Universitaria Lasallista* (Biblioteca digital). <http://hdl.handle.net/10567/133> <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>
- López-Salas, L.; Borrás-Linares, I.; Quintin, D.; García-Gómez, P.; Giménez-Martínez, R.; Segura-Carretero, A.; Lozano-Sánchez, J. (2021) Artichoke By-Products as Natural Source of Phenolic Food Ingredient. *Appl. Sci.* 2021, 11, 3788. <https://doi.org/10.3390/app11093788>
- Messaoudene, Lynda & Lovillo, Miguel & Hazzit, Mohamed & Djebbar, Réda. (2018). Optimization of phenolic compounds extraction conditions from ARTICHOKE (*Cynara scolymus* L.), antioxidant activity and comparison between folin-ciocalteu and uv methods for total phenolic content quantification. *XXV*. 84-94.
- Mona Mohamed Abdel Magied, Salah EL Din Hussien, Sahar Mohamed Zaki, and Rania Mohamed EL Said. (2016) "Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Leaves and Heads Extracts as Hypoglycemic and

- Hypocholesterolemic in Rats." *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 4, no. 1 (2016): 60-68. doi: 10.12691/jfnr-4-1-10.
- Montesano, V.; Negro, D.; Sonnante, G.; Laghetti, G.; Urbano, M.(2022). Polyphenolic Compound Variation in Globe Artichoke Cultivars as Affected by Fertilization and Biostimulants Application. *Plants* **2022**, *11*, 2067. <https://doi.org/10.3390/plants11152067>
- Nuria García-Martínez, Pedro Andreo-Martínez, and Luis Almela, "Characterization of Six Artichoke Cultivars and Their Suitability for Agro-industrial Processing." *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 5, no. 4 (2017): 234-242. doi: 10.12691/jfnr-5-4-5.
- Putnik, P.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Roohinejad, S.; Jambrak, A.R.; Granato, D.; Montesano, D.; Bursać Kovačević, D.(2018). Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods* **2018**, *7*, 106. [CrossRef] [PubMed] DOI: [10.3390/foods7070106](https://doi.org/10.3390/foods7070106)
- Renata S. Rabelo, Mariana T.C. Machado, Julian Martínez, Miriam D. (2016). Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes, *Journal of Food Engineering*, Volume 178, 2016, Pages 170-180, ISSN 0260-8774, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.018>.
- Rouphael, Y., Bernardi, J., Cardarelli, M., Bernardo, L., Kane, D., Colla, G. y Lucini, L. (2016). Perfil de Compuestos Fenólicos y Lactonas Sesquiterpénicas en Hojas de Diecinueve Cultivares de Alcachofa. *Revista de química agrícola y alimentaria*, 64 45, 8540-8548. DOI: [10.1021/acs.jafc.6b03856](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03856)
- Samia Dabbou, Sihem Dabbou, Guido Flamini, Pier Giorgio Peiretti, Gaetano Pandino & Ahmed Noureddine Helal (2017): Biochemical characterization and antioxidant activities of the edible part of globe artichoke cultivars grown in Tunisia, *International Journal of Food Properties*, DOI:10.1080/10942912.2017.1315131
- Seda Kayahan & Didem Saloglu (2020) Optimization and kinetic modelling of microwave-assisted extraction of phenolic contents and antioxidants from Turkish artichoke, *CyTA -Journal of Food*, 18:1, 635-643, DOI: 10.1080/19476337.2020.1800103
- Souhila, M.; Nacéra, M.; Shevchuk, O.; Afanasieva, O. (2022) Biological Activities of Phenolics in Different Parts of Local Cultivar of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus*, var. *scolymus* L.). *Biol. Life Sci. Forum* 2022, 1, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>
- Stumpf B, K"unne M, Ma L, Xu M, Yan F, Piepho H-Peter, Honermeier B. (2019) Optimization of the extraction procedure for the determination of Phenolic acids and flavonoids in the leaves of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*L.), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112879>
- Vidal-Casanella, O.; Núñez,O.; Granados, M.; Saurina, J.;Sentellas, S.(2021). Analytical Methods for Exploring Nutraceuticals Based on Phenolic Acids and Polyphenols. *Appl. Sci.*2021, 11, 8276. <https://doi.org/10.3390/app11188276>
- Zeinab M. Abd El-Ghany.(2017). Evaluation of Antibacterial Activity, Gas Chromatography Analysis and Antioxidant Efficacy of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *J. Agric.Chem.and Biotechn.*, Mansoura Univ.Vol. 8 (11): 265 - 270, 2017. DOI: [10.21608/JACB.2017.38907](https://doi.org/10.21608/JACB.2017.38907)