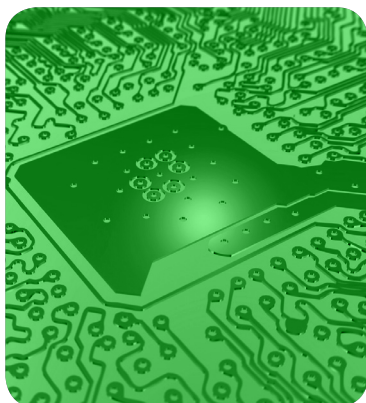
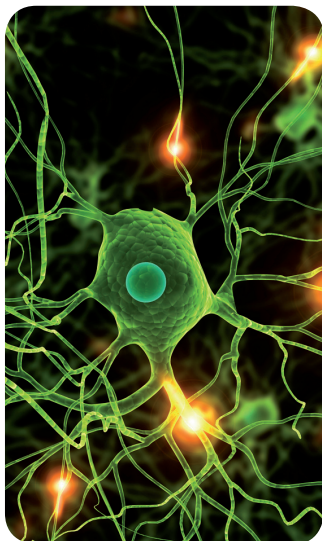




MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias
/ 15-16

Química Aplicada



**Determinación
de polifenoles en
alcachofas
mediante HPLC
con detección dual
UV-EQ**

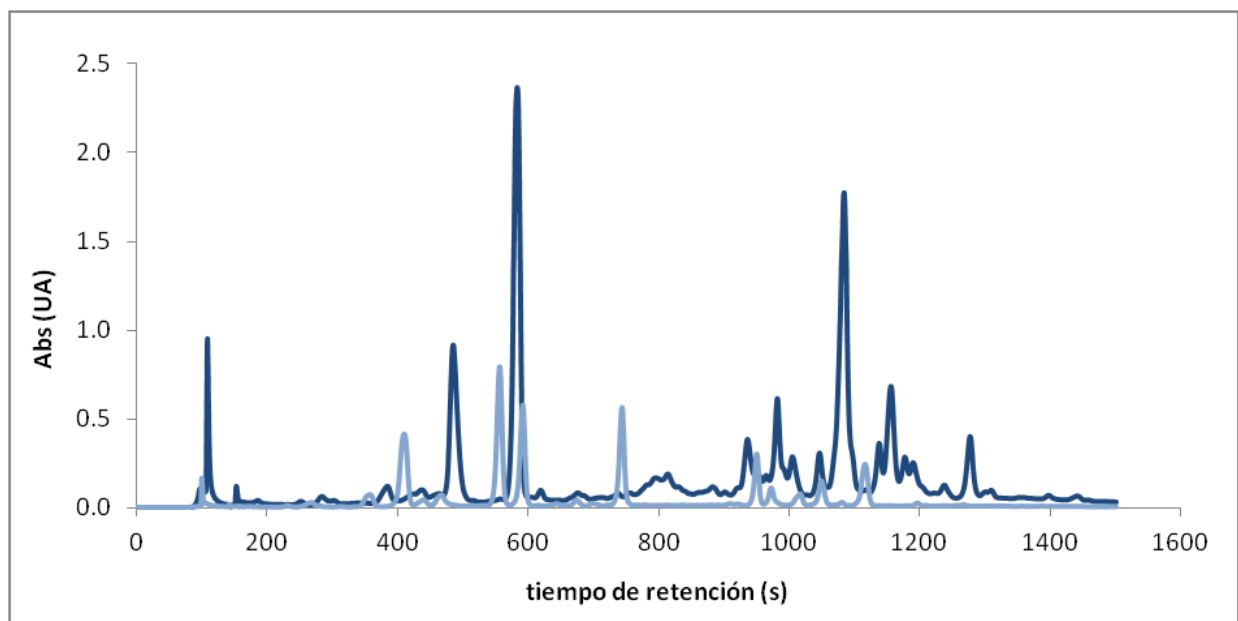
*Patricia Margallo
Jaime*



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Determinación de polifenoles en alcachofas mediante HPLC con detección dual UV-EQ



Trabajo Fin de Máster - Máster en Química Aplicada

Estudiante: Patricia Margallo Jaime

Tutor: Jesús Rodríguez Procopio

Madrid, septiembre de 2016

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL

*Determinación de polifenoles en
alcachofas mediante HPLC con
detección dual UV-EQ*

Trabajo Fin de Máster - Máster en Química Aplicada

Estudiante: Patricia Margallo Jaime

Tutor: Jesús Rodríguez Procopio

Madrid, septiembre de 2016

Este Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias al apoyo y ayuda de muchas personas a las que me gustaría expresar mi agradecimiento. De todas ellas he aprendido y me han hecho ser capaz de realizar este trabajo.

A Jesús Rodríguez Procopio, tutor de este Trabajo Fin de Máster, y a todos los integrantes del grupo de investigación: María Teresa Sevilla, Pilar da Silva y M^a Jesús Gismera, por todos sus consejos y aportaciones científicas, así como por su paciencia, dedicación y esfuerzo para sacar adelante este trabajo.

A Bea, por la ayuda ofrecida en el laboratorio, las comidas y por estar dispuesta a colaborar en lo que hiciera falta.

A mis padres y a mi hermana Elena, por su apoyo y presencia incondicional, tanto en buenos como en malos momentos, sin los que no hubiese sido posible realizar este trabajo. Especialmente a mi yayo por serlo todo para mí.

A mi segunda familia, Elena, Paula, Bea y María, que a falta de la primera en Madrid, me han apoyado, ayudado y hecho pasar muy buenos ratos.

A Aintzane, Rut, Marina y Marta, por esos buenos momentos vividos y esa recarga de pilas cuando hacía falta.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Polifenoles. Antioxidantes naturales	2
2.2. Propiedades, características químicas e importancia de los polifenoles	3
2.3. Polifenoles en alcachofas	3
2.4. Ácido clorogénico y Cinarina	4
2.5. Métodos desarrollados para el análisis de polifenoles	5
2.6. Determinación de Ácido clorogénico y Cinarina mediante HPLC	5
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	7
3.1. Objetivos	7
3.2. Plan de trabajo	7
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	9
4.1. Reactivos, patrones, disoluciones y muestras	9
4.2. Instrumentación	9
4.3. Procedimientos	11
4.3.1. Tratamiento de muestra. Extracción de polifenoles	11
4.3.2. Análisis cromatográfico	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. Estudio del comportamiento electroquímico de los polifenoles	13
5.2. Estudio de la separación cromatográfica	15
5.3. Optimización de la detección electroquímica	18
5.4. Caracterización del método	22
5.4.1. Rectas de calibrado, sensibilidad y linealidad	22
5.4.2. Límites de detección y cuantificación	23
5.4.3. Repetibilidad y reproducibilidad	24
5.5. Aplicaciones	26
5.5.1. Optimización del procedimiento de extracción sólido-líquido	26
5.5.2. Análisis de muestras reales	27
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

Los polifenoles naturales constituyen un conjunto de compuestos de gran interés para prevenir el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Entre los compuestos fenólicos de gran importancia debido a su amplia y variada actividad biológica, se encuentran el ácido clorogénico y la cinarina. Estos pueden encontrarse en distintos vegetales (alcachofas, manzanas, peras, tomates) y bebidas derivadas de los mismos (mate, café, té, o cerveza). Dichos compuestos poseen importantes propiedades antioxidantes, antibacterianas, antinflamatorias, antitumorales, antifúngicas, antihipercolesterolémicas, antimutagénicas, hepatoprotectoras, e inmunoestimulantes.

Para su estudio, es necesario disponer de metodologías analíticas adecuadas. En este trabajo se describe un método analítico cuantitativo para la determinación de ácido clorogénico (CA) y cinarina (CY) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección dual UV-EQ (espectrofotométrica-electroquímica). Se utilizó como fase estacionaria una columna de fase inversa C18 y como fase móvil una mezcla de ácido ortofosfórico al 0.2% (v/v) y acetonitrilo enriquecido con 0.2% (v/v) del mismo ácido, con programa de gradiente lineal. Se plantea una detección dual de los analitos: espectrofotométrica a una longitud de onda de 328nm y electroquímica empleando la amperometría de corriente continua (DC) a 1.0 V en tándem.

Se optimizaron numerosos parámetros para conseguir una separación y detección óptimas: naturaleza y concentración de electrolito, porcentaje de modificador orgánico, programa de gradiente, potencial de electrodo... Además, el método se validó para los siguientes parámetros: linealidad, límite de detección y cuantificación, recuperación, repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad y selectividad. Los límites de detección y cuantificación obtenidos permiten hacer una determinación de los dos polifenoles en muestras reales.

INTRODUCCIÓN

En este apartado se enmarca el tema tratado en esta memoria estableciendo la importancia del consumo de polifenoles, sus principales propiedades y cómo incorporarlos a la dieta. También se habla de los polifenoles bajo estudio, así como diferentes técnicas analíticas empleadas para la determinación de los mismos en alimentos y complementos alimenticios.

2.1. Polifenoles. Antioxidantes naturales

Estudios epidemiológicos han demostrado la importancia de los alimentos de origen vegetal para prevenir el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas; entre otras^[1]. Los antioxidantes naturales presentes en estos alimentos, entre los que destacan los compuestos fenólicos, pueden ser responsables de esta actividad.

Los compuestos fenólicos (metabolitos secundarios) son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen en su estructura un anillo aromático con un sustituyente hidroxilo. La mayoría son derivados fenilpropanoides y suelen ser ácidos, solubles en agua y capaces de formar puentes de hidrógeno. Una estructura química de un compuesto fenólico aparece representada en la *Figura 1*.

Atendiendo a la vía de síntesis, los compuestos fenólicos se clasifican en: vía shikímica (fenoles simples, fenilpropanoides lineales y fenilpropanoides cíclicos), vía poliquetídica (quinonas y antranoides) y biogénesis mixta (flavonoides, xantonas y antranoides)^[2]. Según su estructura, se clasifican en: compuestos no flavonoides [dentro de los cuales existen los ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico) y los fenoles no carboxílicos] y compuestos flavonoides [se subdividen en flaconas, flavononas y flavolonas/flavanoles, taninos y lignanos/antocianidinas y antocianos]^[2].

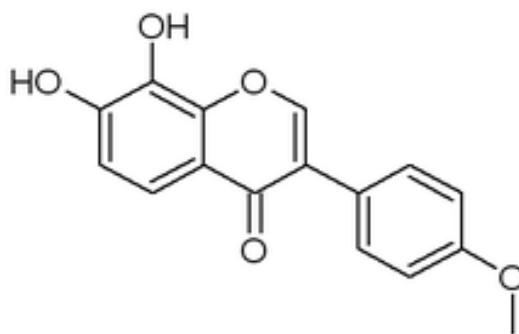


Figura 1. Estructura química típica de un compuesto fenólico.

La biodisponibilidad de los polifenoles naturales en los alimentos es muy variable^[3], dependiendo del tipo de metabolito, y la mayoría de ellos son metabolizados por los microorganismos del colon antes de ser absorbidos^[4].

2.2. Propiedades, características químicas e importancia de los polifenoles

Existen tres compuestos fenólicos de gran importancia debido a su amplia y variada actividad biológica: el ácido cafeico, la cinarina y el ácido clorogénico. Estos pueden encontrarse en distintos vegetales (alcachofas, manzanas, peras, tomates) y bebidas derivadas de los mismos (mate, café, té, o cerveza)^[5-10]. Dichos compuestos poseen importantes propiedades antioxidantes, antibacterianas, antinflamatorias, antitumorales, antifúngicas, antihipercolesterolémicas, antimutagénicas, hepatoprotectoras, e inmunoestimulantes^[11-13].

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes^[14]. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados impidiendo que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo; confiriendo unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Por otro lado, pueden actuar como quelantes y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con hierro y aluminio, teniendo potenciales implicaciones nutricionales^[15]. Al exhibir una variada gama de cualidades beneficiosas para la salud, tienen aplicaciones valiosas, por lo que se requiere disponer de métodos analíticos para su determinación.

2.3. Polifenoles en alcachofas

Mabeau Serge et al.^[16] determinaron que los principios activos más representativos en la alcachofa (*Cynara scolymus L.*) son el ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), el ácido clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico), la cinarina (derivado del ácido cinámico), el cinarósido, la isorhoifolina, y la narirutina; todos estos con propiedades antioxidantes^[17]. La estructura de algunos de estos compuestos se muestra en la **Figura 2**.

Numerosas fuentes mencionan que los principios activos de la alcachofa se encuentran exclusivamente en sus hojas y no en su corazón ni en sus brácteas^[18]. Sin embargo, existen estudios^[19] que demuestran que algunas brácteas de determinadas variedades de alcachofa contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Coinu Rita et al.^[20] las señalan

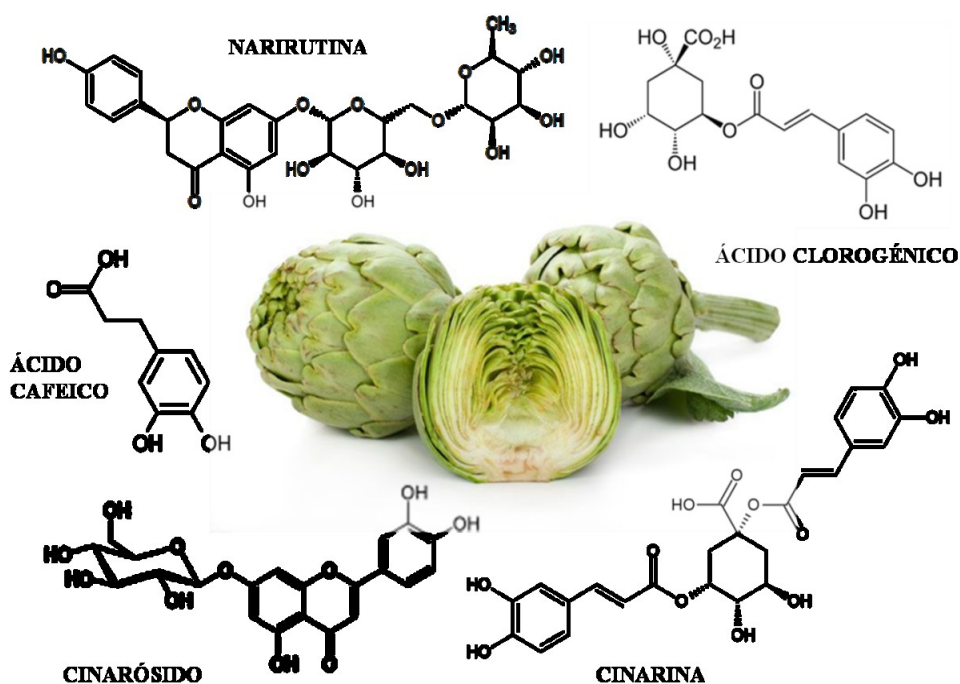


Figura 2. Principios activos más representativos en la alcachofa (*Cynara scolymus* L.).

como un relevante recurso alternativo con aplicaciones farmacéuticas por sus propiedades beneficiosas para el organismo. Todo ello resalta la importancia de emplear los subproductos para la obtención de compuestos fenólicos. Los principales que se han encontrado han sido: el ácido 1.5-Odicafeilquínico (cinarina), seguido del ácido clorogénico y la 7-O-glucuronida^[21].

2.4. Ácido clorogénico y Cinarina

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido clorogénico y la cinarina (**Figura 3**) son dos polifenoles presentes en, entre otras plantas, las alcachofas^[22]. El ácido clorogénico es, también, un ácido hidroxicinámico, un éster formado a partir de ácido quínico y una unidad de ácido cafeico. A pesar de incluir el término “cloro”, el ácido clorogénico no incluye átomos de dicho halógeno. Es un intermedio importante en la biosíntesis de lignina. Su acción antioxidante se centra en retrasar la liberación de glucosa al torrente sanguíneo tras la ingesta de alimentos^[23]. Otros efectos que tiene la administración de este polifenol son la disminución de la presión sanguínea o la acción frente a alergias, entre otros^[24].

La cinarina es un ácido hidroxicinámico, un éster formado a partir de ácido quínico y dos unidades de ácido cafeico. Es una sustancia que tiene acción colerética (aumenta la formación de bilis), colagoga (mejora la liberación de bilis), hepatoprotectora y regeneradora de la célula

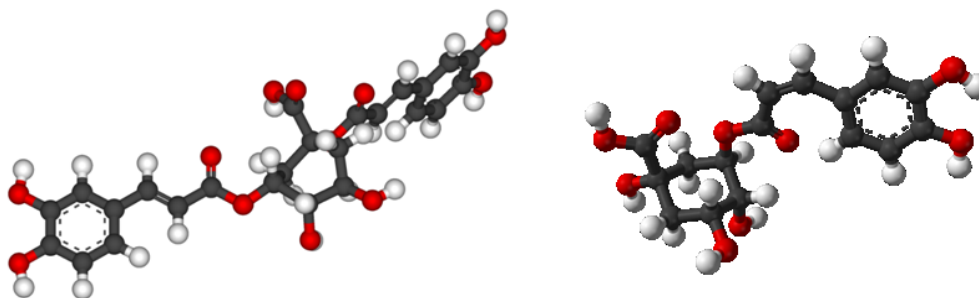


Figura 3. Representación en 3D de la estructura química de la cinarina (izquierda) y del ácido clorogénico (derecha).

hepática, hipocolesterolemia (baja los niveles de colesterol sanguíneo) e inhibitoria de los receptores del gusto^[25]. El hígado secreta normalmente unos 800 mL de bilis, pero gracias al efecto de la cinarina, tras la ingesta de 500 g de alcachofas (o complementos alimenticios derivados de las mismas) al día, la cantidad de bilis puede aumentar un 50%, llegando a alcanzar los 1200 mL. Es especialmente recomendable para aquellos pacientes que sufren afecciones hepáticas^[25].

2.5. Métodos desarrollados para el análisis de polifenoles

Existen numerosos métodos de análisis de polifenoles^[26,27] en diferentes matrices; si bien es verdad que cada uno se centra en aspectos diferentes del análisis: disminuir al máximo los LOD y LOQ, ampliar el rango de polifenoles con diferentes características con el fin de conseguir un método más versátil, acoplar diferentes técnicas de detección, minimizar al máximo el volumen de muestra empleado e introducir diferentes tratamientos previos al análisis. El método más utilizado consiste en una determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)^[28,29] con detección de masas (MS)^[30,31], siendo el acoplamiento con otros detectores igualmente posible^[32-36]. Para el caso de compuestos fenólicos electroactivos, se emplean métodos basados en la detección electroquímica^[37,38].

2.6. Determinación de Ácido clorogénico y Cinarina mediante HPLC

Existen diversos métodos en la bibliografía que emplean la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis de ácido clorogénico y cinarina en diferentes matrices^[29]. En la mayoría de los casos se emplea HPLC de fase inversa con columna C18 y como fase móvil agua acidificada (acético, fórmico, ortofosfórico) y metanol o acetonitrilo como modificador orgánico^[39]. Para la detección de los compuestos se utiliza la espectrofotometría UV, bien

fijando una longitud de onda o empleando un detector de diodos (DAD)^[40], detección por espectrometría de masas (MS)^[30,31], detección electroquímica empleando amperometría diferencial de pulsos (PAD) o distintos acoplamientos en línea^[34,42,43].

Como alternativas a los métodos analíticos ya desarrollados, se están haciendo estudios de determinación modificando la técnica electroquímica empleada para la detección EQ (por ejemplo, utilizando la coulombimetría), e incluso haciendo modificaciones al electrodo de trabajo con diferentes elementos (por ejemplo, diamante)^[44].

OBJETIVOS Y
PLAN DE TRABAJO

3.1. Objetivos

Como se ha comentado con anterioridad, el ácido clorogénico y la cinarina son dos polifenoles de gran importancia por sus aplicaciones médicas y propiedades. La vía más adecuada para la incorporación de estos compuestos al organismo es a través de la alimentación. Estos se encuentran, entre otros alimentos, en las alcachofas.

Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo (optimización y validación) de un método analítico para la determinación de dos polifenoles (ácido clorogénico y cinarina) mediante separación cromatográfica líquida de alta eficacia (HPLC) y detección dual UV-EQ (espectrofotométrica-electroquímica). Con la detección dual se pretende ya no solo cuantificar los compuestos sino también identificar la presencia de los mismos mediante la relación de señales y asegurar así la ausencia de interferencias.

3.2. Plan de trabajo

Para alcanzar el objetivo de este trabajo se diseñó y estableció un plan de trabajo que consistió en:

- **Estudio del comportamiento electroquímico de los polifenoles.** Como paso previo a la optimización del método cromatográfico, se comprobará la respuesta electroquímica de los compuestos mediante voltametría cíclica con distintos electrolitos y concentración de los mismos.
- **Estudio de la separación cromatográfica.** Una vez comprobada la respuesta electroquímica de los compuestos, se estudiarán las condiciones de separación cromatográfica. Se comenzará con estudios en isocrático observando la variación del tiempo de retención a distintas concentraciones de modificador orgánico; y se pasará, si fuera necesario, a programa de gradiente lineal. Se estudiarán distintos programas de gradiente y se seleccionará el que aporte mayor selectividad a las medidas.
- **Optimización de la detección electroquímica.** Tras estudiar el efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención y separación de los compuestos, se optimizará la detección electroquímica. En este caso, se estudiará el efecto del potencial aplicado al electrodo de trabajo sobre la respuesta del detector y el efecto de la concentración de electrolito en la fase móvil, estableciéndose las condiciones óptimas de medida.

- **Caracterización del método.** Una vez establecidas las condiciones óptimas para el análisis simultáneo de ambos polifenoles, se determinará la relación existente entre la respuesta del detector y la concentración de cada uno de los polifenoles (rectas de calibrado), así como las propiedades analíticas del método: la precisión, exactitud y robustez. Además se evaluarán los parámetros analíticos más característicos como la sensibilidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y reproducibilidad.
- **Aplicaciones.** Finalmente, se estudiará la capacidad que presenta el método a la hora de llevar a cabo el análisis de ambos compuestos en muestras reales. Se optimizará un procedimiento de extracción adecuado a las características de las muestras, se determinarán las concentraciones de los polifenoles en muestras reales de complementos alimenticios derivados de alcachofa y se validará el método por adición de patrones de concentración conocida y cálculo de las recuperaciones.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se detallan las características de los reactivos, patrones, disoluciones y muestras utilizados en el presente estudio. También se aporta información minuciosa de los instrumentos utilizados; así como todo el procedimiento experimental empleado, desde el tratamiento de muestra e inyección de la misma hasta la obtención y tratamiento de datos.

4.1. Reactivos, patrones, disoluciones y muestras

El ácido clorogénico y la cinarina objeto de este estudio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El acetonitrilo empleado como uno de los eluyentes de la fase móvil y el metanol usado para la limpieza de la columna se obtuvieron de Scharlau (calidad gradient UV-HPLC grade y supergradient HPLC grade, respectivamente) mientras que el ácido ortofosfórico (85% de riqueza) empleado fue de Panreac. El agua utilizada se purificó usando un sistema Millex (modelo Elix 10, Millipore).

La disolución patrón de ácido clorogénico de 504 mg/L se preparó por pesada directa del compuesto sólido y disolución en acetonitrilo. La disolución de cinarina de 333 mg/L se preparó por pesada directa del compuesto sólido y disolución en metanol. Ambas disoluciones de patrón se conservaron a -20°C para evitar su degradación. Para preparar patrones de menor concentración, se tomaron volúmenes adecuados de las disoluciones anteriores y se diluyeron con ácido ortofosfórico al 0.2% (v/v) en agua, hasta alcanzar la concentración deseada.

Como muestras reales se utilizaron dos complementos alimenticios comerciales identificados como M1 y M2 (**Imagen 1**); que se adquirieron en un supermercado y en una herboristería, respectivamente. La muestra M1 contiene cápsulas de 496 mg, de las cuales 400 mg corresponden a polvo de hojas de alcachofa (*Cynara Scolymus L.*) y 96 mg son gelatina (cubierta de las cápsulas). La muestra M2 contiene comprimidos de 400 mg de los cuales 60 mg son extracto seco de hojas de alcachofa (*Cynara Scolymus L.*) y 340 mg son antiaglomerantes y almidón de maíz.

4.2. Instrumentación

A lo largo de toda la memoria se muestran dos tipos de medidas: medidas electroquímicas y medidas cromatográficas (con detección espectrofotométrica y con detección electroquímica en continuo).



Imagen 1. Muestra M1 (izquierda) y M2 (derecha) empleadas.

Las **medidas electroquímicas**, tanto en discontinuo como en continuo, se realizaron utilizando un sistema de medida electroquímica suministrado por Eco Chemie B.V. que consiste en un potencióstato μ Autolab con interfase USB (μ AUT970135) acoplado a un sistema de adquisición de datos (software) controlado por un ordenador. El potencióstato emplea un solo canal DAC, cuyas señales se recogen en el potencióstato y se usan para establecer el potencial o la corriente del electrodo de trabajo con respecto al de referencia. El software es GPES (General Purpose Electrochemical System) que combina la medida de los distintos datos, así como el análisis posterior de los mismos.

La celda electroquímica empleada para medidas en discontinuo está equipada con tres electrodos: el electrodo de referencia (RE) de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), el electrodo de trabajo (WE) de carbón vítreo (Glassy Carbon) y el contraelectrodo (CE) de platino (Pt). Todos ellos suministrados por Sugelabor, S.A. – CH Instruments, Inc. Con el fin de eliminar el oxígeno dentro de la celda electroquímica, se purgaron las disoluciones con nitrógeno (Carburos Metálicos, N50) durante 10 minutos. La técnica utilizada en la medida fue la voltamperometría cíclica aplicando un potencial de -0.6 V a 1.6 V y de nuevo a -0.6 V.

La célula de flujo empleada en la detección electroquímica es una célula wall-jet suministrada por Metrohm (modelo 656). Esta célula de flujo está equipada con un electrodo de carbón vítreo de 7 mm² de área (modelo 6.0727.00) un electrodo de referencia de Ag/AgCl (modelo 6.0727.000) y un contraelectrodo de oro. La célula se conectó a la salida del detector DAD empleando un capilar de Peek del menor volumen interno posible.

Para realizar las **medidas cromatográficas** se utilizó un instrumento HPLC totalmente equipado de JascoTM. El cromatógrafo HPLC cuenta con una bomba de gradiente cuaternario

(Jasco PU-2089 Plus) con una precisión de flujo del 0.1%, un sistema automático de inyección de muestra (Jasco AS-2055 Plus); así como un dispensario con las diferentes disoluciones que constituyen la fase móvil o fases de lavado (Jasco BS-2000-04). Un sistema compacto de columna y horno (Jasco CO-2067 Plus) permite controlar la temperatura de la columna en un rango de -15°C a 65°C. Para las medidas, la columna se ha mantenido a una temperatura constante de 40°C. La conexión entre el sistema cromatográfico y el ordenador se realizó a través de la interfase Jasco LC-Net II/ADC. El software, en este caso, es ChromPass Chromatography Data System (ChromPass) de Jasco que permite controlar el sistema de HPLC a través del ordenador (cargar programas, modificar las condiciones cromatográficas); así como hacer cálculos con las medidas obtenidas (representación y análisis de datos).

La columna empleada es una columna de HPLC de fase reversa de octadecilsilíce (C18), de dimensiones 150x4.6 mm, rellena con partículas de 5µm de diámetro medio (Kromasil 100 C18) de Scharlau.

Para la detección espectrofotométrica se utilizó el detector DAD acoplado al equipo de HPLC (Jasco MD-2010 Plus) el cual está equipado con un fotodiodo array de 1024 elementos. En este caso, las medidas se hicieron a una longitud de onda fija de 328 nm.

4.3. Procedimientos

A continuación se detalla el procedimiento experimental del método analítico optimizado en esta memoria. Este abarca desde el tratamiento de la muestra para la extracción de los polifenoles hasta su inyección en el cromatógrafo y análisis de datos posterior. La información referente al procedimiento de extracción de los polifenoles así como las condiciones cromatográfica empleadas se recogen en los apartados siguientes.

4.3.1. Tratamiento de muestra. Extracción de polifenoles

Se tomaron las muestras de complementos alimenticios a base de extracto de alcachofa antes descritas y se les sometió al siguiente tratamiento para extraer los polifenoles de interés (ácido clorogénico y cinarina) contenidos en las mismas. Una porción adecuada de muestra se molió en un mortero de ágata. A 1 gramo de muestra molida (pesada con exactitud de 0.1 mg) se le añaden 5.0 mL de metanol al 60%. La suspensión formada por la muestra y el disolvente se llevó a un baño de ultrasonidos y se agitó durante 15 minutos a 40°C, al 100% de potencia

y a una frecuencia de 80 kHz. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para separar el sólido del sobrenadante. El sobrenadante conteniendo los polifenoles se filtró empleando filtros de nylon de 0.45 μm obtenidos de Scharlau. Los extractos de las muestras se conservan a -20°C hasta su análisis.

4.3.2. Análisis cromatográfico

La fase móvil consistió en un gradiente binario: 0.2% (v/v) de ácido ortofosfórico en acetonitrilo (eluyente A) y ácido ortofosfórico al 0.2% (v/v) en agua (eluyente B). El volumen de muestra inyectado fue de 20 μL y el flujo de se estableció a 1.0 mL/min. El programa de elución empleado se muestra en la **Tabla 1**.

Para la detección espectrofotométrica (DAD) se seleccionó un valor de longitud de onda de medida de 328 nm. En el caso de la detección electroquímica (EQ), se empleó la amperometría de corriente continua (DC) a un potencial de 1.0 V (vs Ag/AgCl). Previo a la realización de un set de medidas, el electrodo fue pretratado aplicando un potencial de 1.6 V (vs. Ag/AgCl) al electrodo de trabajo durante 30 segundos antes a aplicar el potencial de medida. Además, se estabilizó la señal a 1.0 V durante 60 segundos antes de la inyección de los patrones y las muestras.

Tabla 1. Programa de gradiente empleado en cada medida realizada donde figuran las concentraciones de los dos eluyentes que constituyen la fase móvil en el gradiente, el tiempo de duración de cada etapa y el flujo o caudal

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
Prerun	1.0	6	94
20	1.0	30	70
25	1.0	30	70
27	1.0	6	94
37	1.0	6	94

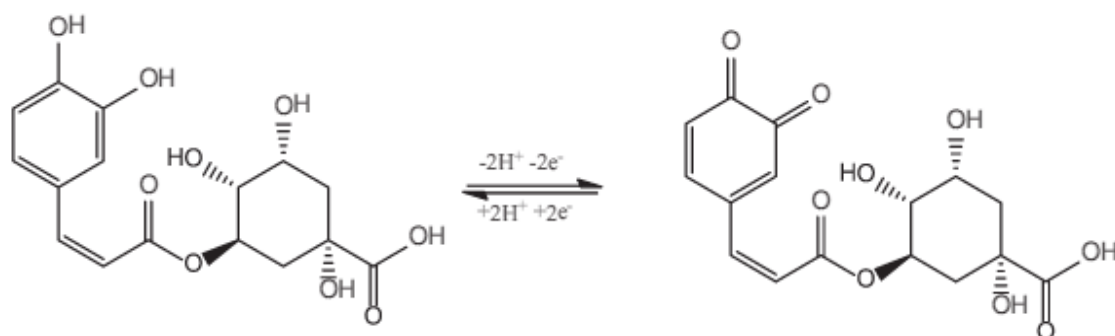
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los diferentes estudios llevados a cabo durante todo el trabajo.

5.1. Estudio del comportamiento electroquímico de los polifenoles

Previo a la optimización de las condiciones de detección electroquímica mediante HPLC, se estudió el comportamiento electroquímico de los polifenoles, ácido clorogénico (CA) y cinarina (CY), mediante voltametría cíclica. Se registraron los voltamperogramas cíclicos entre -0.6 V y 1.6 V a 100 mV/s. Las disoluciones se purgaron con nitrógeno (Carburos Metálicos, N50) durante 10 minutos para eliminar el oxígeno.

Como puede observarse en las **Figuras 4** y **5**, en ácido ortofosfórico al 0.2% y en presencia de un 5% de acetonitrilo, ambos compuestos presentan una onda de oxidación a 0.62 V (CA) y 0.56 V (CY). Barriendo en dirección negativa, se observa en ambos casos una onda de reducción a 0.5 V, que corresponde a la reducción del producto de oxidación. El mecanismo propuesto para el proceso de oxidación del ácido clorogénico se muestra en el **Esquema 1**^[44]. La oxidación de los compuestos da lugar a la o-quinona correspondiente cuya reducción daría lugar al compuesto inicial. Se espera un comportamiento similar para la cinarina.



Esquema 1. Mecanismo propuesto para la oxidación/reducción del ácido clorogénico.

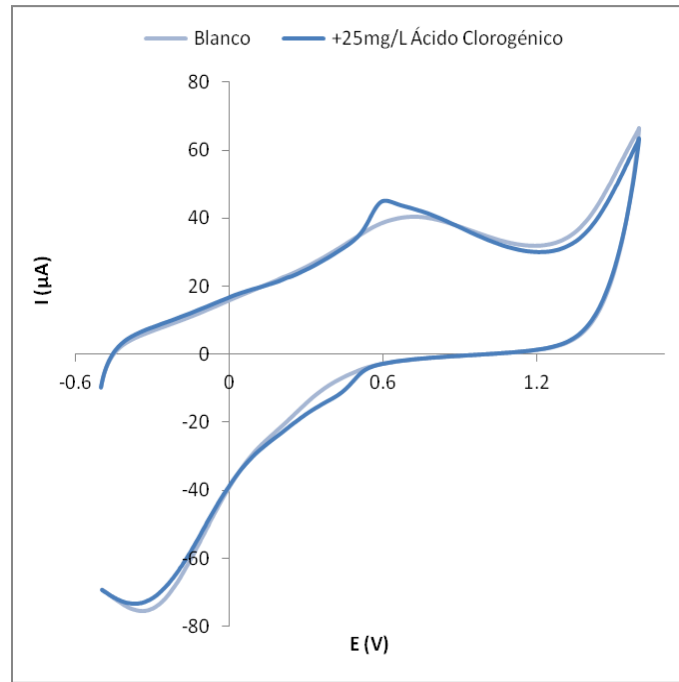


Figura 4. Voltamperograma cíclico de ácido clorogénico (25 mg/L). Ácido ortofosfórico al 0.2% en presencia de un 5% de acetonitrilo. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

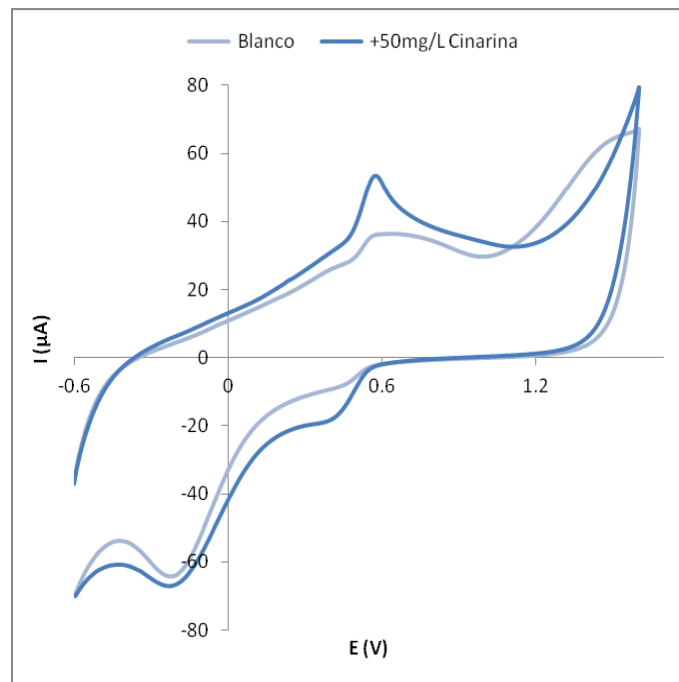


Figura 5. Voltamperograma cíclico de cinarina (50 mg/L). Ácido ortofosfórico al 0.2% en presencia de un 5% de acetonitrilo. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

5.2. Estudio de la separación cromatográfica

Una vez comprobada la respuesta electroquímica de los compuestos, se llevó a cabo un estudio de las condiciones de separación cromatográfica. Aunque la separación ya ha sido estudiada en trabajos anteriores, es necesario adaptarla a las condiciones de nuestro laboratorio. Para estos estudios se utilizó detección espectrofotométrica a 328 nm. De acuerdo a los estudios previos bibliográficos, se seleccionó acetonitrilo como modificador orgánico y ácido ortofosfórico como electrolito. Son necesarias condiciones ácidas de la fase móvil para conseguir una retención adecuada de los compuestos. Concretamente, el ácido ortofosfórico favorece la retención de estos compuestos frente a otros ácidos, como el ácido fórmico y el acético también empleados en la separación cromatográfica por otros autores^[30,36,47].

Los primeros ensayos se realizaron de forma isocrática. Se ensayaron porcentajes de modificador orgánico del 10, 15 y 20%, en presencia de un 0.2% de ácido ortofosfórico. La variación del tiempo de retención de los compuestos se refleja en la **Figura 6**. Se observa que la separación es buena a todos los porcentajes de acetonitrilo ensayados. Sin embargo, a porcentajes bajos de modificador orgánico el tiempo de análisis es alto; mientras que a un porcentaje del 20%, la elución del ácido clorogénico se realiza a un tiempo de retención muy cercano al frente del disolvente, lo que puede dar lugar a interferencias en las muestras (**Figura 7**). Aun así, los tiempos de retención del ácido clorogénico son bajos.

Para mejorar la selectividad de la medida en muestras reales, se ensayó un método en gradiente lineal de 20 minutos. La fase móvil estaba formada por dos eluyentes: eluyente A

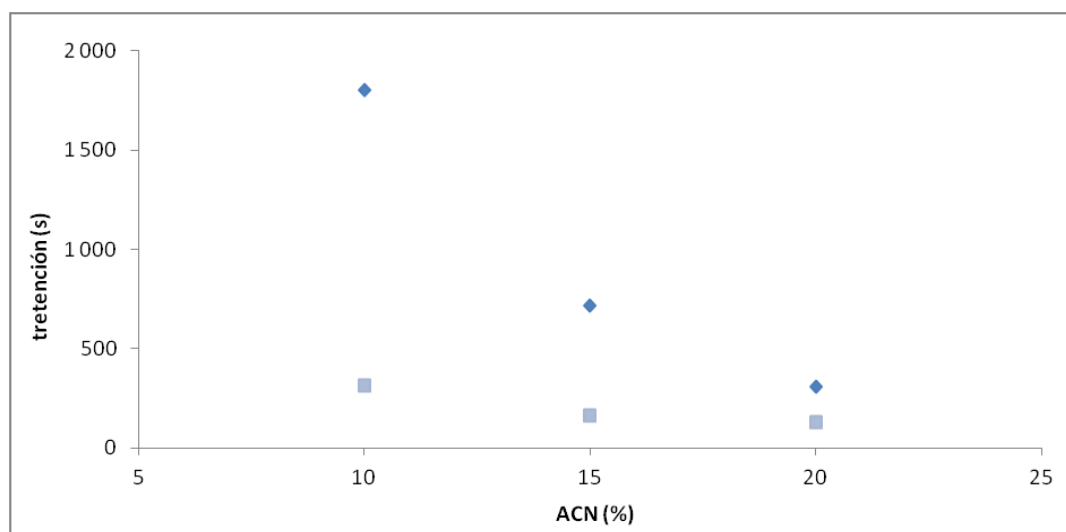


Figura 6. Variación del tiempo de retención de CA (■) y CY (♦) en función del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil. Elución isocrática acetonitrilo:0.2%ácido ortofosfórico 5/10/15%:95/90/85%. Detección UV a 328 nm.

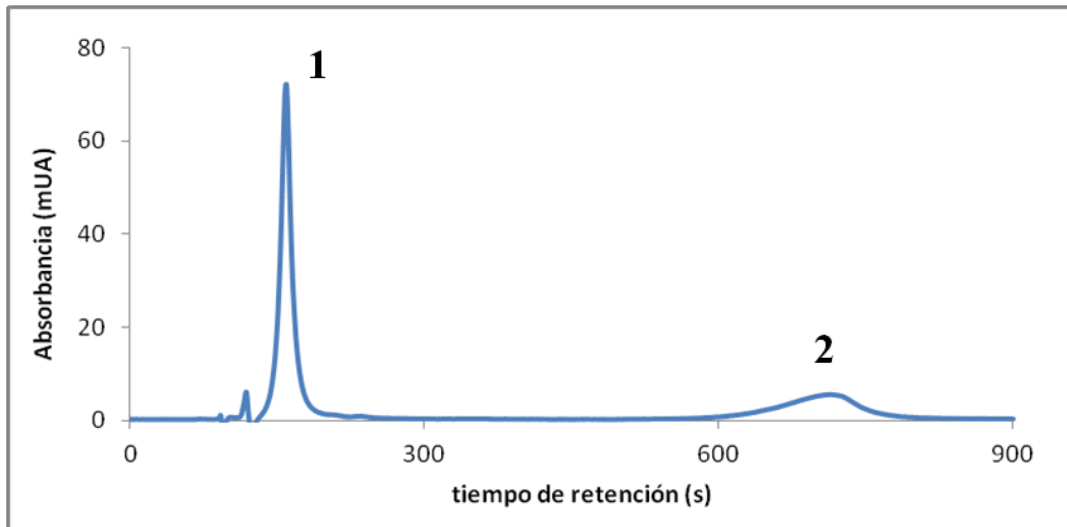


Figura 7. Cromatograma de una disolución con 25 mg/L de CA (1) y 16 mg/L de CY (2). Elución isocrática acetonitrilo:0.2% ácido ortofosfórico 15:85. Detección UV a 328 nm.

[ACN con 0.2% de ácido o-fosfórico] y B [ácido o-fosfórico al 0.2% en agua]. Para optimizar las condiciones de elución, se estudiaron distintos gradientes modificando el porcentaje inicial de eluyente A, entre el 3 y 7% y manteniendo fijo el porcentaje final del 30%. La modificación del tiempo de retención de los compuestos con el porcentaje inicial del eluyente A, se muestra en la **Figura 8**. Se observa que a medida que aumenta el gradiente en eluyente A, menor es el tiempo de retención de los compuestos. La mejor condición de separación, teniendo en cuenta la posible presencia de interferentes en las muestras, fue un porcentaje inicial de eluyente A del 6%. En la **Figura 9** se observa el cromatograma obtenido.

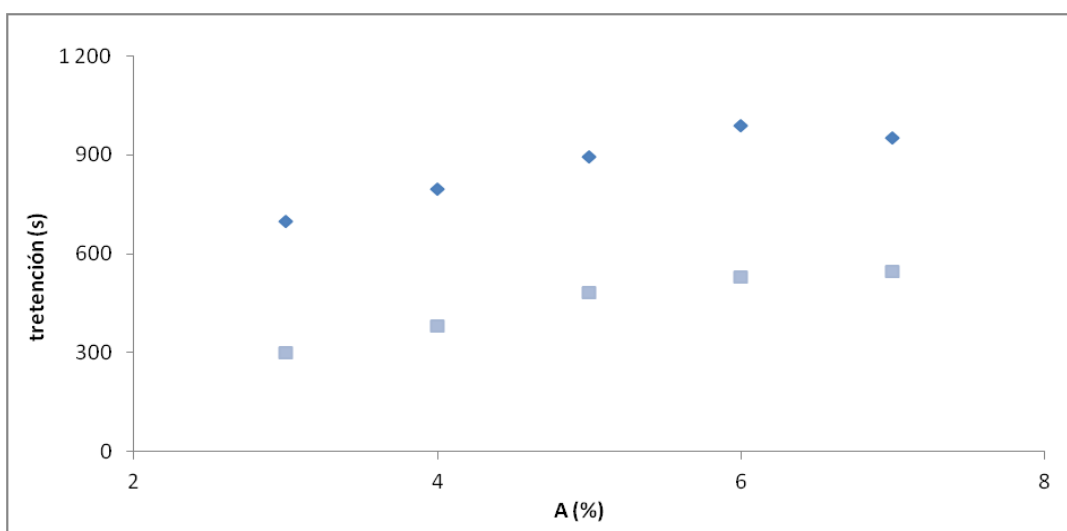


Figura 8. Variación del tiempo de retención de CA (■) y CY (◆) en función del porcentaje de eluyente A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) en fase móvil. Gradiente lineal hasta el 30% de A en 20min. Detección UV a 328 nm.

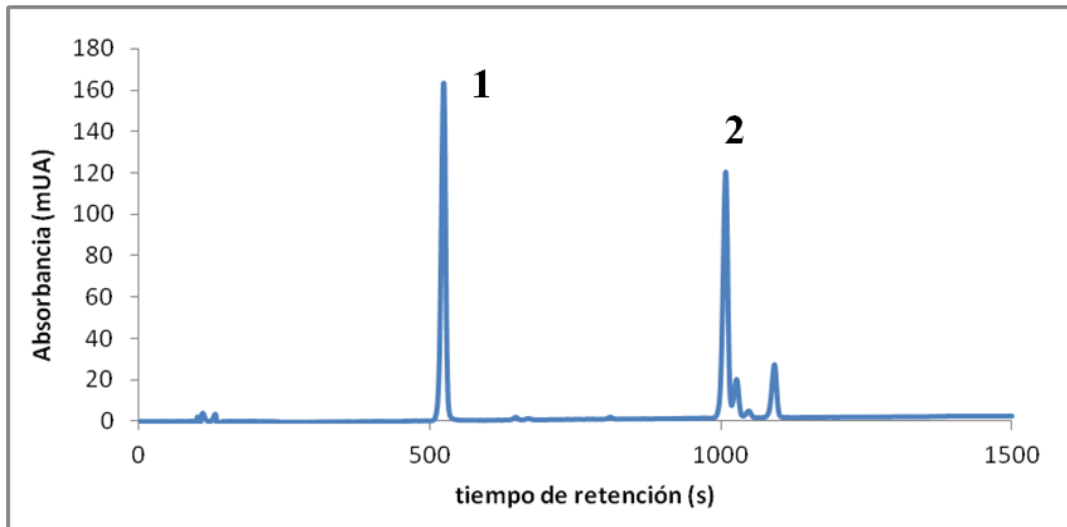


Figura 9. Cromatograma de una disolución con 25 mg/L de CA (1) y 35 mg/L de CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección UV a 328 nm.

5.3. Optimización de la detección electroquímica

Una vez estudiado el efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención de los compuestos, se llevó a cabo la optimización de la detección electroquímica (previa separación cromatográfica mediante HPLC). Para ello, se eligió como técnica de detección la amperometría de corriente continua que consiste en medir la corriente a un valor de potencial constante aplicado entre el electrodo de trabajo y el de referencia.

Se realizaron inyecciones sucesivas de mezclas de CA y CY en el cromatógrafo, detectando a un potencial de 0.6 V. Se observó una disminución de la señal electroquímica de ambos compuestos con el número de inyecciones. Esto puede ser debido a una pasivación del electrodo por adsorción del compuesto de oxidación. Para evitarlo, se aplicó un potencial de acondicionamiento de 1.6 V durante 30s y el de medida durante 60s antes de la inyección para estabilizar la medida. El potencial de medida se varió entre 0.6 V y 1.2 V con el fin de estudiar la respuesta del detector a diferentes valores de potencial. Se representó la señal obtenida para ambos compuestos en función del potencial aplicado, obteniendo el voltamperograma hidrodinámico, que permite seleccionar el potencial que aporta señales de mayor intensidad.

En la **Figura 10** podemos observar que un incremento en el potencial aplicado al electrodo de trabajo, produce un aumento en la señal electroquímica de ambos compuestos (referida en área, $\mu\text{A}\cdot\text{s}$) hasta un potencial de 1.0 V. Es un valor distinto al obtenido en el estudio del comportamiento electroquímico (apartado 5.1.) que fue de 0.6 V. Pero ya indicamos que el primer estudio era para tener una idea previa de qué potencial aplicar para la detección EQ de los polifenoles tras la separación cromatográfica de los mismos; pudiendo este coincidir o no, con el seleccionado tras estudiar la curva hidrodinámica.

En la **Figura 11** se comparan los cromatogramas con detección electroquímica obtenidos a 0.6 V y 1.0 V. El valor de potencial de 0.6 V se obtuvo del estudio previo del comportamiento electroquímico de ambos polifenoles; mientras que el de 1.0 V es el que se ha determinado estudiando el voltamperograma hidrodinámico. Se ve que el correspondiente a 1.0 V da unos picos más sensibles (mayor intensidad) sin un incremento apreciable del ruido de fondo, por lo que fue el valor elegido para el resto de estudios de optimización y validación del método analítico propuesto.

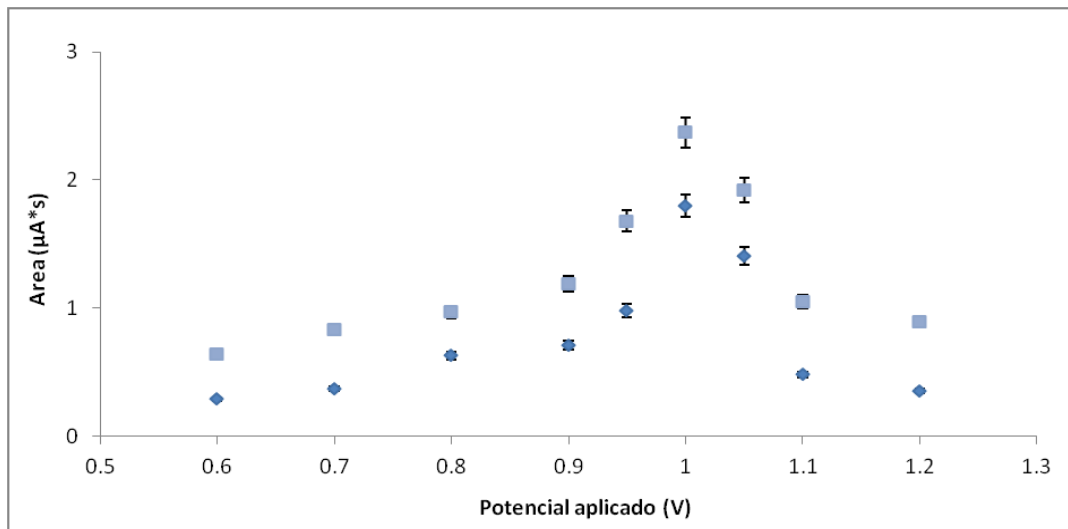


Figura 10. Voltamperograma hidrodinámico de una disolución con 25 mg/L de CA (■) y 35 mg/L de CY (◆). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC de 0.6 V a 1.2 V.

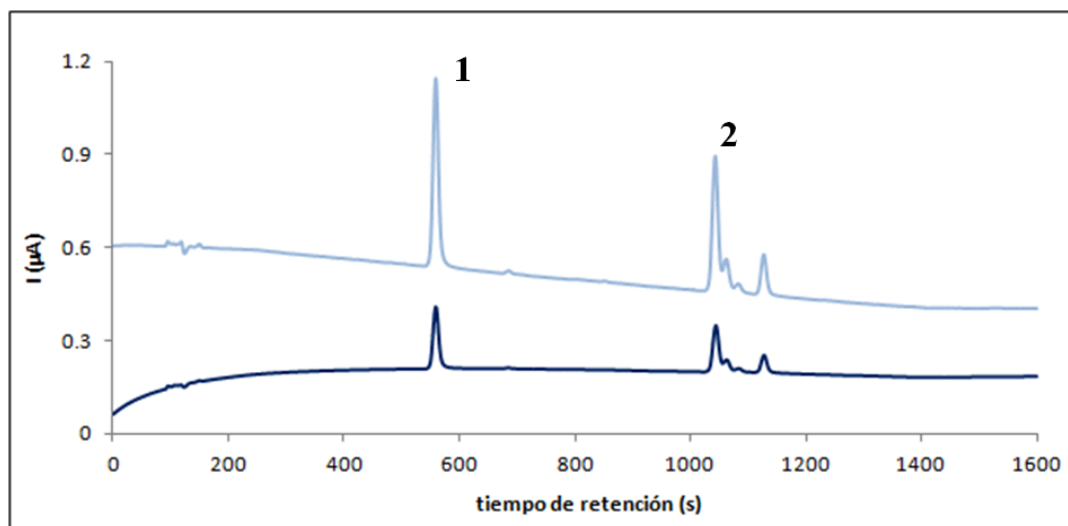


Figura 11. Cromatogramas de una disolución con 25 mg/L CA (1) y 35 mg/L CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 0.6 V (→) y a 1.0 V (←).

Una vez seleccionado el potencial de trabajo, se estudió el efecto que sobre la señal ejerce la concentración de ácido. En la **Figura 12** se muestran los cromatogramas obtenidos para unos porcentajes de ácido ortofosfórico en la fase móvil del 0.05 y del 0.2%. Puede observarse que al disminuir el porcentaje de ácido, se produce una disminución de la señal y del tiempo de elución. Como consecuencia, se mantuvo la concentración de electrolito en 0.2% ya que con ella se obtiene una mejor línea base y unas medidas de mayor sensibilidad.

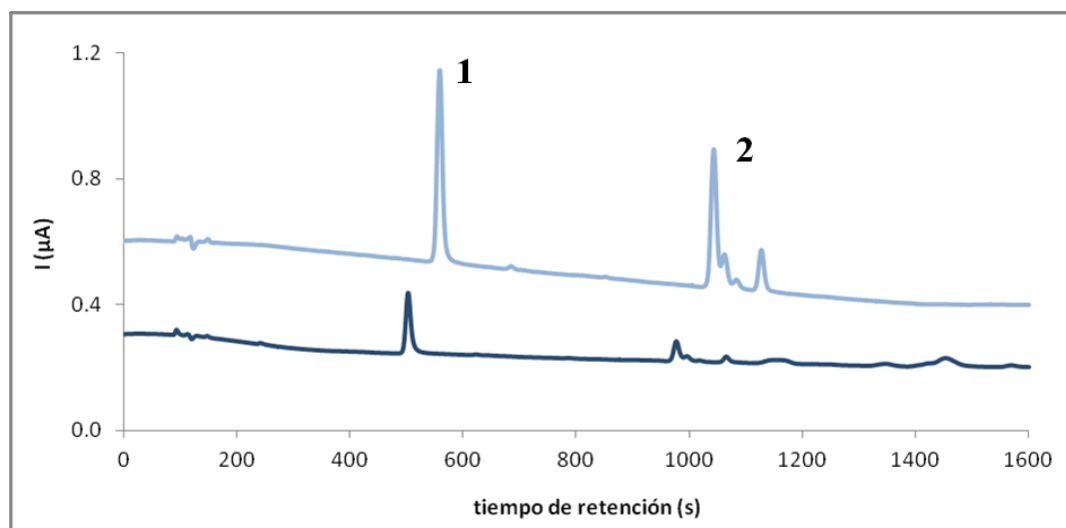


Figura 12. Cromatogramas de una disolución de 25 mg/L CA (1) y 35 mg/L CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.05% (⇒) o 0.2% (⇐) de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

El método analítico presentado en esta memoria plantea una separación cromatográfica (mediante HPLC) de los polifenoles y una posterior detección dual UV-EQ de los mismos. Las dos técnicas de detección son distintas y aportan información complementaria (intensidades de picos a tiempos de retención determinados) siendo sus fundamentos analíticos completamente diferentes. La comparación de las respuestas obtenidas en ambos detectores permite confirmar fehacientemente la presencia de los compuestos en las muestras. Las medidas se hicieron bajo las condiciones que se exponen a continuación. Una separación cromatográfica mediante HPLC con detección UV-EQ. La fase móvil compuesta por acetonitrilo enriquecido con un 0.2% de ácido ortofosfórico (A) y ácido ortofosfórico al 0.2% (B). El programa de gradiente lineal empleado se refleja en la **Tabla 1**. El resto de las condiciones de la medida fueron: 1 mL/min de caudal de la fase móvil; volumen de inyección de 20 μ L; detección UV a 328 nm y detección EQ por amperometría de corriente continua DC a 1.0 V. La **Figura 13** muestra los cromatogramas típicos obtenidos con ambas detecciones.

Tabla 1. Programa de gradiente empleado en cada medida realizada donde figuran las concentraciones de los dos eluyentes que constituyen la fase móvil en el gradiente, el tiempo de duración de cada etapa y el flujo o caudal

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
Prerun	1.0	6	94
20	1.0	30	70
25	1.0	30	70
27	1.0	6	94
37	1.0	6	94

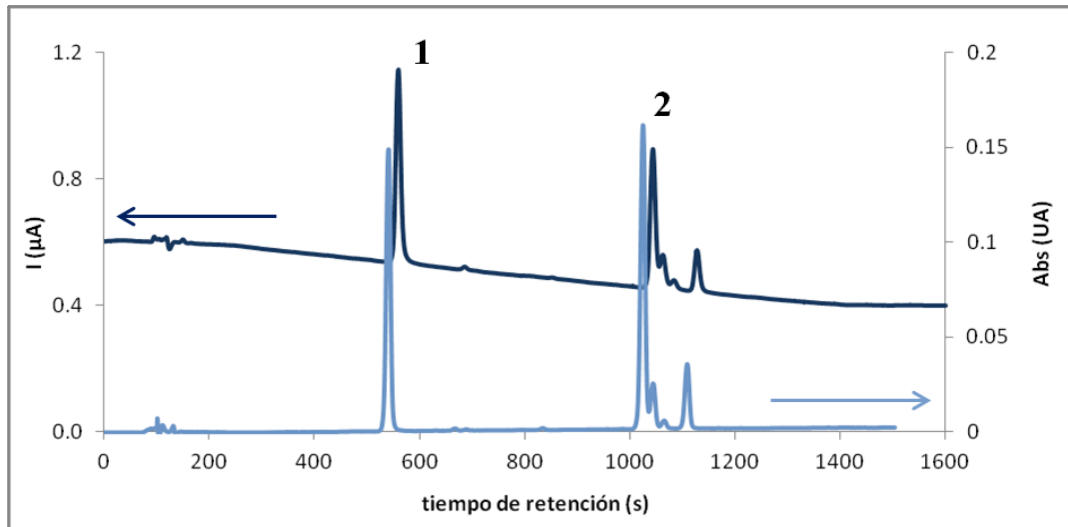


Figura 13. Cromatogramas de una disolución con 25 mg/L CA (1) y 35 mg/L CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min.

Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V (←) y UV a 328 nm (→).

5.4. Caracterización del método

Una vez optimizadas y establecidas las condiciones de separación cromatográfica y de detección espectrofotométrica y electroquímica, se caracterizó el método. Caracterizar el método consiste en construir las correspondientes rectas de calibrado y establecer la linealidad de las respuestas para los dos compuestos, así como los límites de detección y cuantificación, la robustez del método, la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas para el ácido clorogénico (CA) y la cinarina (CY).

5.4.1. Rectas de calibrado, sensibilidad y linealidad

Tras haber optimizado las condiciones de análisis, se hizo un estudio de la respuesta, tanto espectrofotométrica como electroquímica, con la concentración de los dos polifenoles (CA y CY) para concentraciones de los mismos comprendidas entre 2.5 mg/L y 100 mg/L (rango de trabajo seleccionado). Se observó que la respuesta de ambos compuestos es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas y en ambos sistemas de detección empleados (espectrofotométrico y electroquímico). Los resultados se muestran numéricamente en la **Tabla 2** y gráficamente en las **Figura 14** y **15**. Ambas técnicas de detección resultaron ser más sensibles para el CA (pendientes mayores) que para la CY. Este hecho se nota, especialmente, en el caso de las medidas con detección electroquímica con una sensibilidad de 0.103 mg/L para el ácido clorogénico frente a 0.056 mg/L para la cinarina. Las linealidades obtenidas con ambas detecciones son buenas, obteniéndose valores de R^2 superiores a 0.995.

Tabla 2. Valores de pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación para las rectas de calibrado del CA y la CY, y detección UV a 328 nm, y EQ mediante amperometría DC a 1.0 V. Recta de calibrado de la forma $y=ax+b$.

	DETECCIÓN UV		DETECCIÓN EQ	
	CA	CY	CA	CY
a	0.069±0.005 (UA*s*L/mg)	0.053±0.009 (UA*s*L/mg)	0.103±0.011 (μA*s*L/mg)	0.056±0.008 (μA*s*L/mg)
b	-0.17±0.06	-0.22±0.07	-0.16±0.07	-0.12±0.06
R²	0.999	0.997	0.998	0.995

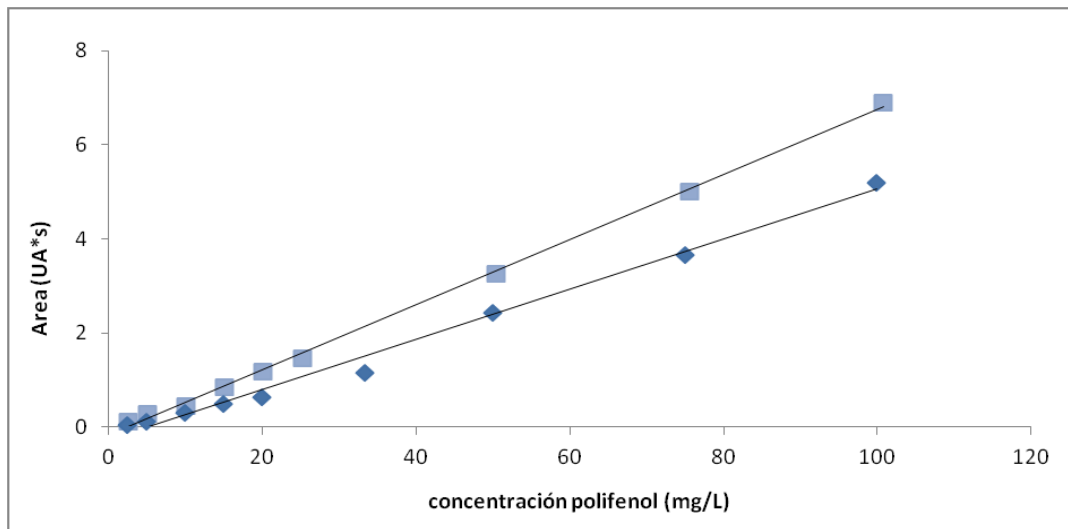


Figura 14. Recta de calibrado para el CA (■) y la CY (◆). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección UV a 328 nm.

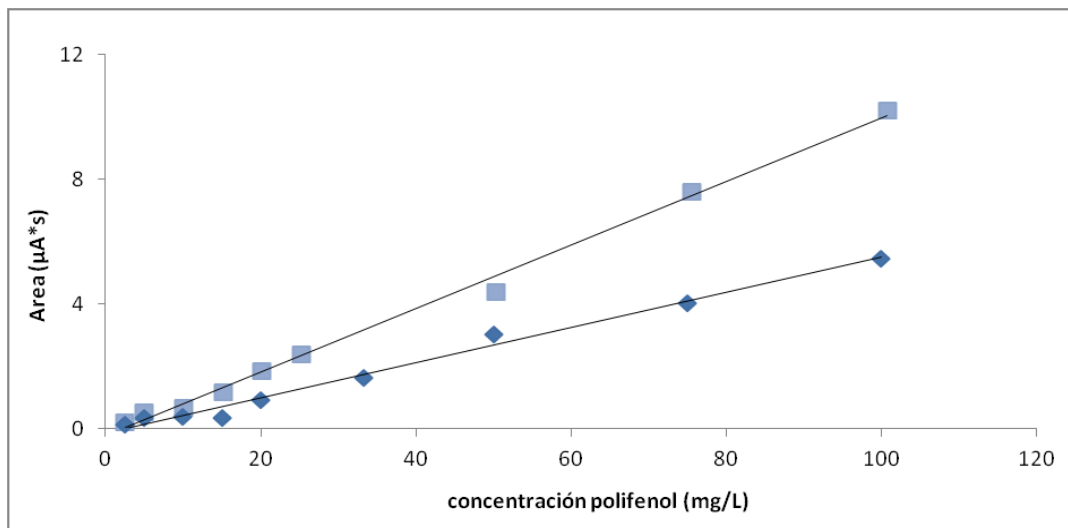


Figura 15. Recta de calibrado para el CA (■) y la CY (◆). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ por amperometría DC a 1.0 V.

5.4.2. Límites de detección y de cuantificación

Una vez obtenidas las rectas de calibrado y los rangos lineales de las medidas para los dos compuestos, se calcularon y estudiaron los límites de detección y cuantificación para los dos métodos de detección empleados (UV y EQ) como parte de la caracterización del método analítico planteado^[47-50]. El límite de detección (LOD) es la menor concentración de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico concreto, mientras que el de

cuantificación (LOQ) es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas por ese procedimiento analítico. LOD y LOQ se definen como la concentración que da una señal que es tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de las áreas obtenidas con siete réplicas de una disolución de 2.5 ± 0.1 mg/L de CA y CY.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**. Podemos observar que los mejores límites de detección y cuantificación se obtienen de la detección espectrofotométrica. Para la detección electroquímica los valores de LOD y LOQ son más altos debidos a, entre otras cosas, el ruido de la línea base. Además, la técnica de detección electroquímica por amperometría de corriente continua, presenta una mayor incertidumbre en las medidas. No obstante, los LOD y LOQ son suficientes para hacer una buena determinación de los dos polifenoles en las concentraciones que se esperan en muestras reales.

5.4.3. Repetibilidad y reproducibilidad

Con las rectas de calibrado, el rango lineal, la sensibilidad, los límites de detección y cuantificación establecidos, se estudiaron y calcularon los valores de repetibilidad y reproducibilidad de las medidas obtenidas empleando este método analito como parte de la caracterización del mismo^[47-50]. La repetibilidad es la medida de la precisión de un método analítico efectuado sobre el mismo analito bajo las mismas condiciones (mismo día, misma persona, mismo equipo); mientras que la reproducibilidad es eso mismo pero en condiciones diferentes (distinto día, distinta persona, distinto equipo).

Para los estudios de repetibilidad y reproducibilidad, se tomaron muestras a un nivel de concentración bajo (2.5 mg/L de CA y CY) y a un nivel de concentración medio (25 mg/L de CA y 35 mg/L de CY). Para el cálculo de la repetibilidad se hicieron 7 réplicas el mismo día

Tabla 3. Valores de límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para el ácido clorogénico (CA) y la cinarina (CY), para detección UV a 328 nm, y EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

	DETECCIÓN UV		DETECCIÓN EQ	
	CA	CY	CA	CY
LOD (mg/L)	0.05	0.08	0.63	0.84
LOQ (mg/L)	0.16	0.23	1.9	2.5

por la misma persona, mismo equipo y mismo analito; mientras que para la reproducibilidad se hicieron 5 réplicas en distintos días por la misma persona y equipo y mismo analito. Los resultados, expresados como la desviación estándar relativa (% RSD), se muestran en la **Tabla 4**. Podemos observar que ambos métodos, tanto el de detección espectrofotométrica como el de detección electroquímica, presentan buenos valores de repetibilidad y reproducibilidad. Bien es verdad, que dichos valores son mejores utilizando la detección UV (especialmente para el nivel de concentración medio). En este caso concreto, las medidas obtenidas con la detección electroquímica (amperometría DC) tienen mayor ruido de fondo (hecho que se observa en la línea base) y de ahí que los valores calculados de repetibilidad y reproducibilidad sean mayores.

Tabla 4. Valores de repetibilidad y reproducibilidad (en %RSD) para las detecciones estudiadas a nivel bajo y nivel medio de concentración de CA y CY. Detección UV a 328 nm, y EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

		DETECCIÓN UV		DETECCIÓN EQ	
		CA	CY	CA	CY
Nivel bajo	Repetib. (n=7), %RSD	1.9	2.1	4.6	5.2
	Reprod. (n=5), %RSD	3.5	3.8	6.1	7.3
Nivel medio	Repetib. (n=7), %RSD	1.1	1.4	4.3	4.6
	Reprod. (n=5), %RSD	2.7	3.0	5.7	6.5

5.5. Aplicaciones

Una vez estudiados el comportamiento electroquímico de los polifenoles y la separación cromatográfica, y tras haber optimizado la detección electroquímica y caracterizado el método, se estudió la viabilidad del este para el análisis de muestras reales, es decir, la aplicabilidad del mismo.

5.5.1. Optimización del procedimiento de extracción sólido-líquido

Como paso previo a la determinación de los polifenoles en las muestras mediante HPLC, es necesario realizar la extracción de los polifenoles de las mismas. Se llevó a cabo un estudio para optimizar el procedimiento de extracción de los dos polifenoles objeto de estudio de este trabajo (CA y CY) de complementos alimenticios a base de extracto de alcachofa. Para la optimización del procedimiento, se eligió una muestra (M1) de la que se extrajeron los polifenoles. El método de separación se basa en una extracción sólido-líquido en la que una masa determinada de muestra (de 1 gramo de muestra) se pone en contacto con 5.0 mL de extractante que consiste en mezclas metanol/agua. Las variables que se estudiaron fueron el porcentaje de metanol y el tiempo de extracción. Se ensayaron tres concentraciones de metanol (60, 80 y 100% (v/v) de metanol en agua) y tres tiempos de extracción, agitación en baño de ultrasonidos, (15, 30 y 45 min).

Una vez se tuvieron los extractos, se inyectaron en el cromatógrafo y se detectaron los compuestos empleando ambas técnicas de detección: UV a 328 nm y electroquímica por amperometría de corriente continua a 1.0 V. La selección de las mejores condiciones de extracción se hizo en base a aquella que permitiera una mejor y mayor extracción (referida en términos de mayor señal para ambos compuestos). La variación de la intensidad de las señales de los compuestos, utilizando detección electroquímica, se muestra en la **Figura 16**. Empleando detección espectrofotométrica, se ve un comportamiento similar. Observamos que para un mismo porcentaje de metanol, un aumento en el tiempo de extracción no se traduce en un aumento de la intensidad de las señales para CA y CY; lo que significa que la extracción de los polifenoles tiene lugar dentro de los primeros 15 minutos de agitación. Este efecto es más evidente cuando se utiliza un 60% de metanol como extractante. Un mayor tiempo de extracción puede dar lugar a transformaciones de los compuestos y a una pérdida de señal, cuando el porcentaje de metanol es más bajo. Por otra parte se observa que al aumentar el

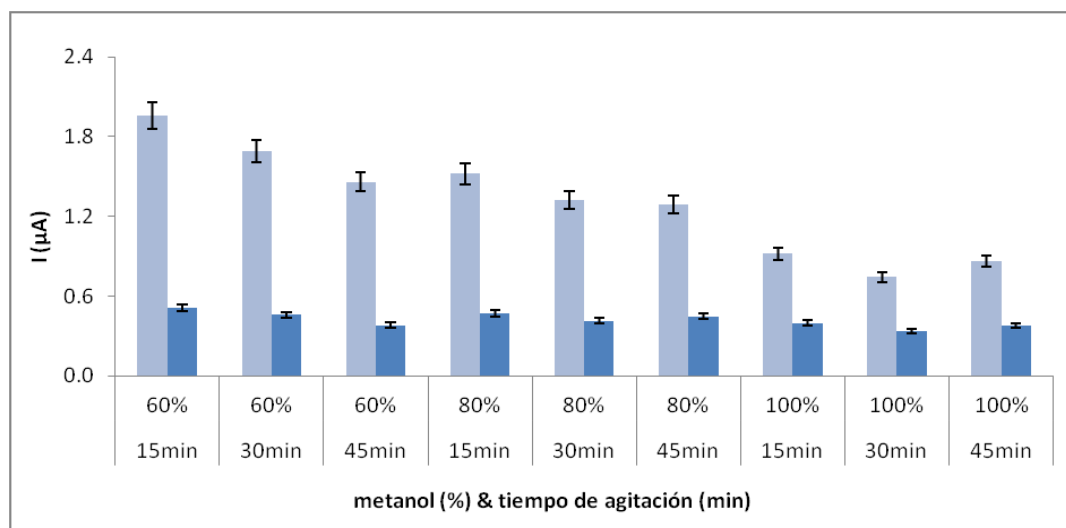


Figura 16. Variación de la intensidad de las señales de CA (■) y CY (■) en muestra real M1 en función del porcentaje de extractante (metanol) y tiempo extracción (agitación en baño de ultrasonidos) durante la extracción. Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ por amperometría DC 1.0 V.

porcentaje de metanol se extrae una menor cantidad de compuesto. Otros autores han comprobado este hecho cuando extraen otro tipo de muestras^[51]. Parece necesaria la presencia de una cierta cantidad de agua en el extractante para poder extraer todos los polifenoles presentes en la muestra^[52]. Por todo ello, las condiciones para el procedimiento de extracción sólido-líquido de CA y CY de muestras reales son: extracción de la muestra con metanol al 60% (v/v) en agua agitando en baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

5.5.2. Análisis de muestras reales

Una vez optimizada, la metodología analítica se utilizó para determinar las concentraciones de CA y CY en dos muestras comerciales de complementos alimenticios que contenían extractos de alcachofa adquiridas en centros comerciales, denominadas muestras M1 y M2. Las muestras se extrajeron con metanol al 60% y los extractos se inyectaron en el cromatógrafo, empleando el método analítico propuesto (separación cromatográfica mediante HPLC y detección dual UV-EQ (UV a 328 nm y EQ con amperometría de corriente continua a 1.0 V). En las *Figuras 17* y *18* se muestran los cromatogramas obtenidos de las dos muestras analizadas. Podemos observar que las dos muestras contienen otros compuestos a parte de los estudiados, hecho evidente al aparecer nuevas señales a distintos tiempos de retención con diferentes áreas e intensidades.

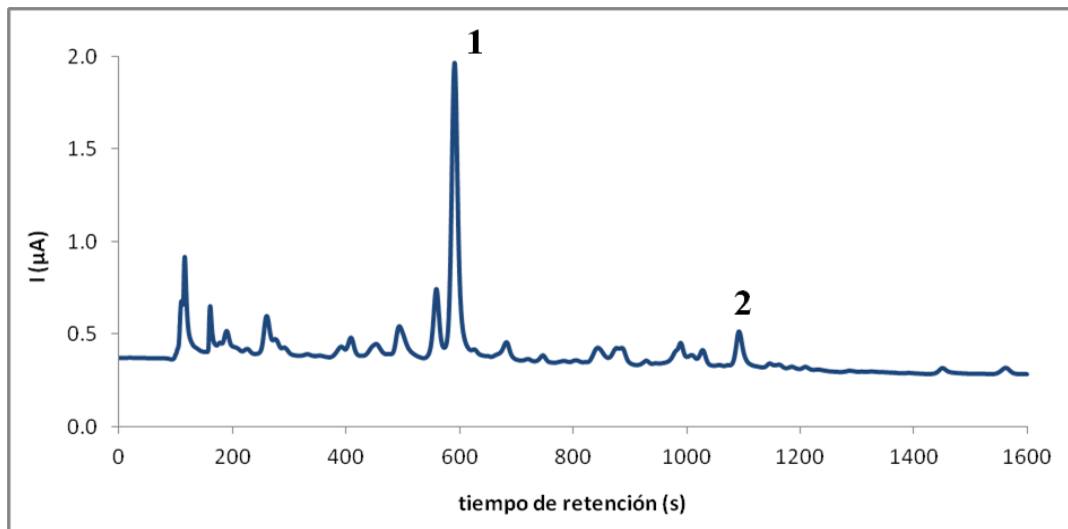


Figura 17. Cromatograma de la muestra M1 (–) donde se señalan el CA (1) y la CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

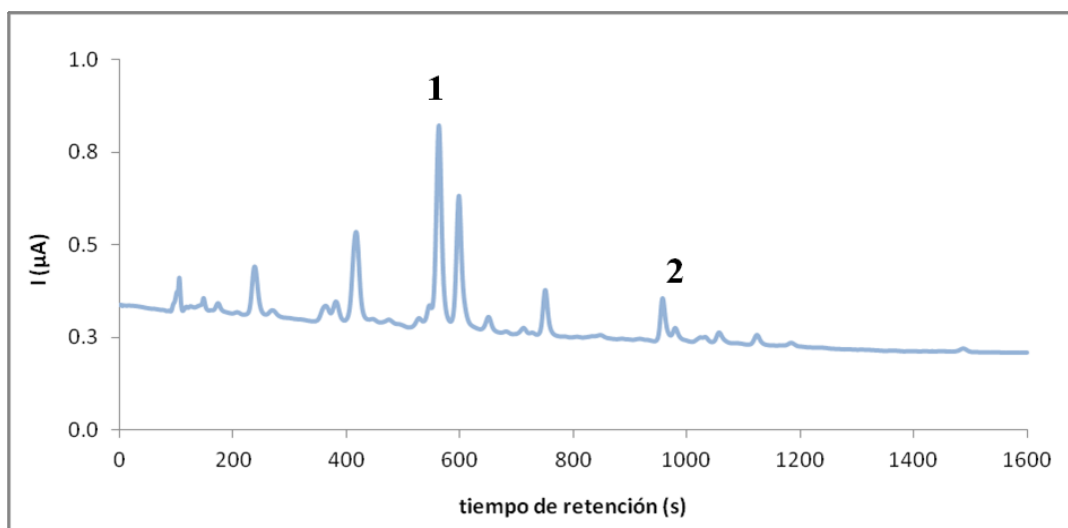


Figura 18. Cromatograma de la muestra M2 (–) donde se señalan el CA (1) y la CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

Los resultados correspondientes a la cuantificación se expresaron como mg de polifenol/g de comprimido y como mg de polifenol/100g de polvo de alcachofa. Todos ellos se muestran en las *Tablas 5 y 6*. Si comparamos las concentraciones de CA y CY de las dos muestras en cuanto a su contenido por gramo de comprimido, observamos que es la muestra M1 la que tiene mayor concentración de ambos polifenoles (en torno a 5 veces más). Dicho resultado se corresponde con lo ya expuesto al detallar las características de las dos muestras (*apartado 4.1*), la relación de contenido de polvo de alcachofa de la M1 y la M2 es M1:M2,

Tabla 5. Valores de concentración (expresada como mg de CA o CY/g de comprimido) en las muestras M1 y M2, para las detecciones estudiadas. Detección UV a 328 nm, y EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

	DETECCIÓN UV		DETECCIÓN EQ	
	CA	CY	CA	CY
Muestra M1 (mg/g)	1.71±0.03	1.55±0.04	1.36±0.05	1.22±0.07
Muestra M2 (mg/g)	0.32±0.06	0.29±0.07	0.27±0.08	0.24±0.09

Tabla 6. Valores de concentración (expresada como mg de CA o CY/100g de polvo de alcachofa) en las muestras M1 y M2, para las detecciones estudiadas. Detección UV a 328 nm, y EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

	DETECCIÓN UV		DETECCIÓN EQ	
	CA	CY	CA	CY
Muestra M1 (mg/100 g)	212±4	193±5	169±7	151±6
Muestra M2 (mg/100 g)	213±3	195±4	180±5	160±3

5.4:1 (los comprimidos de la muestra M1 tienen 806 mg de polvo de alcachofa por gramo de comprimido, mientras que los de la muestra M2 tienen 150 mg de polvo de alcachofa por gramo de comprimido), como se observa en la **Tabla 5**. Sin embargo, si comparamos las concentraciones de CA y CY de las dos muestras en cuanto a su contenido por 100 gramos de polvo de alcachofa, observamos que estas son prácticamente iguales (**Tabla 6**). Dicho resultado parece indicar que el polvo de alcachofa de ambas muestras procede de la misma variedad de alcachofa por lo que su contenido en ácido clorogénico (CA) y cinarina (CY) es el mismo en ambas. Otros autores han determinado una relación similar de concentraciones^[41].

Como se ha mencionado con anterioridad, fue necesario confirmar que la identificación de las señales y posterior cuantificación que se había hecho del CA y CY en las muestras reales se había realizado correctamente. Por ello, además de recurrir a la relación de señales de ambos detectores, se hicieron adiciones de CA y CY de concentración conocida a los extractos de las muestras para confirmar que las señales que aumentaban en intensidad y área eran las asignadas a los compuestos identificados (CA y CY). Además, se calcularon las recuperaciones de dichas adiciones. Para ello, se tomaron extractos diluidos de las dos muestras M1 (dilución 1:4 en 0.2% de ácido ortofosfórico, eluyente B de la fase móvil) y M2 (dilución 1:2 en 0.2% de ácido ortofosfórico, eluyente B de la fase móvil) y se doparon con

25 mg/L de CA y 40 mg/L de CY. Los extractos dopados se inyectaron en el cromatógrafo y se analizaron según las condiciones cromatográficas optimizadas en apartados anteriores. Haciendo uso de la recta de calibrado, previamente estudiada, se determinaron las concentraciones correspondientes a las adiciones y se calcularon las recuperaciones^[47-50].

En las **Figuras 19** y **20** se muestran los cromatogramas obtenidos de las muestras analizadas y las adiciones hechas sobre las mismas. Podemos observar que las señales que crecen en intensidad y área tras la adición, corresponden con las identificadas para el CA y la CY. Es por ello, que se confirma que ha sido correcta la asignación de las señales hechas para la cuantificación de CA y CY en las muestras reales M1 y M2. Los valores correspondientes a los porcentajes de recuperación calculados para las adiciones de las muestras, se muestran en la **Tabla 7**. Si comparamos los dos métodos de detección empleados (UV y EQ), observamos que se obtiene una menor incertidumbre cuando se hace la detección espectrofotométrica que cuando se hace la detección electroquímica debido, entre otras cosas, al ruido existente en la línea base de las medidas de esta última, EQ. Sin embargo, los valores de porcentajes de recuperación se encuentran en todos los casos estudiados muy próximos al 100%, hecho que demuestra que el método analítico propuesto es válido para la separación, detección y cuantificación de ácido clorogénico y cinarina (CA y CY) en muestras reales.

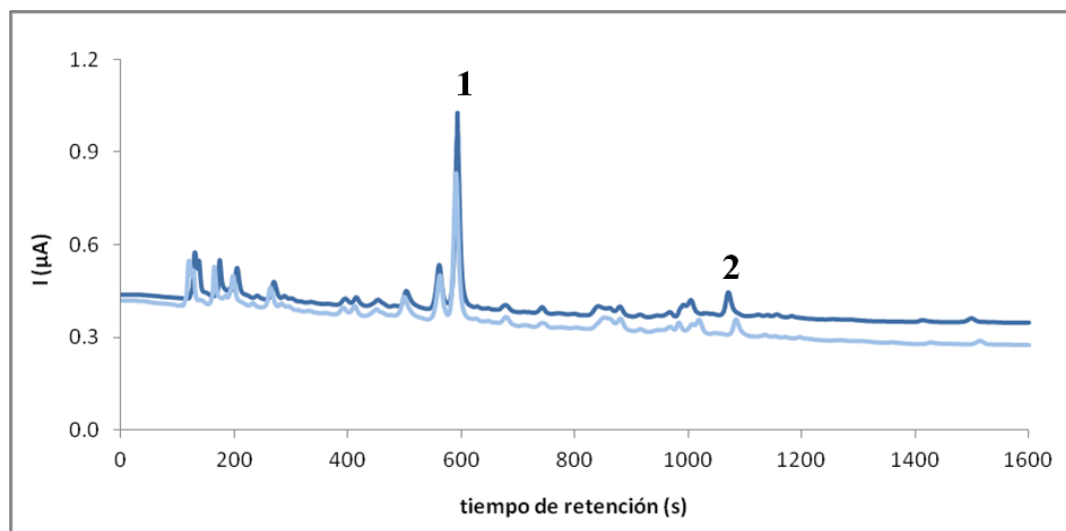


Figura 19. Cromatograma de la muestra M1 diluida 1:4 (–) y la adición (–) de 25 mg/L de CA (1) y 40 mg/L de CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

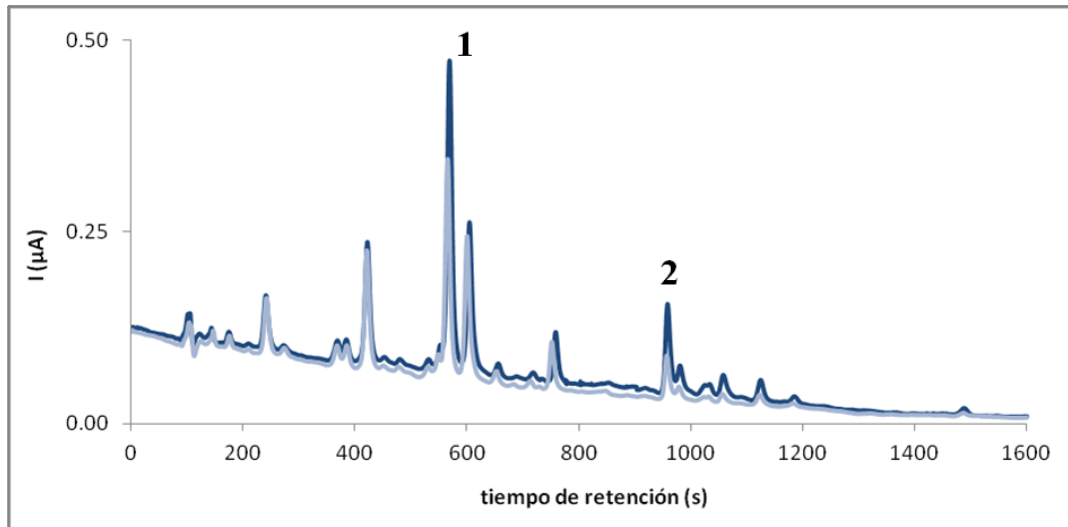


Figura 20. Cromatograma de la muestra M2 diluida 1:2 (—) y la adición (—) de 25 mg/L de CA (1) y 40 mg/L de CY (2). Fase móvil: A (acetonitrilo con 0.2% de ácido ortofosfórico) y B (0.2% de ácido ortofosfórico). Gradiente lineal de 6% hasta el 30% de A en 20min. Detección EQ mediante amperometría DC a 1.0 V.

Tabla 7. Valores de porcentajes de recuperación de las correspondientes adiciones hechas a las muestras M1 y M2, para las detecciones estudiadas de CA y CY. Detección UV a 328 nm, y EQ amperometría DC a 1.0 V.

	<i>DETECCIÓN UV</i>		<i>DETECCIÓN EQ</i>	
	CA	CY	CA	CY
Muestra M1 (% Recuperación)	99.9±0.6	98.6±0.9	100.2±1.8	100.8±2.7
Muestra M2 (% Recuperación)	99.7±0.8	98.9±1.2	99.4±2.1	101.6±3.4

CONCLUSIONES

A continuación se detallan las **conclusiones** extraídas de los resultados obtenidos y discutidos a lo largo de esta memoria.

De todo lo expuesto en los apartados anteriores podemos concluir lo siguiente:

1. Se ha logrado desarrollar un método analítico válido, selectivo y sensible para el análisis cuantitativo de dos principales polifenoles presentes en alcachofas y complementos alimenticios derivados de las mismas (ácido clorogénico y cinarina). Dicho método se basa en la inyección de la muestra, previamente extraída, y en un análisis cuantitativo posterior por HPLC-UV-EQ.
2. El uso de una detección dual, espectrofotométrica y electroquímica, permite identificar con certeza las señales correspondientes a los polifenoles objeto de estudio presentes en las muestras por la relación de señales obtenidas de ambas detecciones.
3. Se han conseguido buenos valores de repetibilidad y reproducibilidad, porcentajes de recuperación muy próximos al 100%, así como unos límites de detección y cuantificación que permiten determinar ácido clorogénico y cinarina en la concentración que se espera en muestras reales.
4. La detección de nuevos picos en el cromatograma, con características espectrales y electroquímicas similares a las observadas para ácido clorogénico y cinarina permite suponer que el método puede ser utilizado para la detección y cuantificación de otros polifenoles presentes en las muestras.

Como **líneas de trabajo futuro** para continuar con este trabajo estarían la modificación de la técnica de detección electroquímica, pudiendo hacerse con amperometría diferencial de pulsos e incluso coulombimetría, permitiendo disminuir los límites de detección y cuantificación del método entre 2 y 3 unidades de magnitud. Además, durante todo el desarrollo de este método se ha empleado el mismo electrodo de trabajo (de carbón vítreo), por lo que otra línea de investigación sería hacer modificaciones al mismo que incluirían doparlo con diferentes elementos (por ejemplo, diamante, como ya se ha señalado en la bibliografía) o incluso someterlo a pretratamientos para pulirlo o activarlo.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Doll, R. 1990. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. Proc Natl Acad Sci USA; 49: 119-31
- [2] Gimeno Creus, E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farmacéutico. Nutrición. Offarm*; 23 N°6: 80-84
- [3] Wittemer, S.M; Ploch M; Windeck T; Muller S.C; Drewelow, B; Derendorf, H; Veit, M. (2005). Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans, *Phytomedicine* 12: 28-38
- [4] Tomás-Barberán, F.A. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud. Instituto Danone*; 10, N°2: 41-53. 1136-4815/03
- [5] Duke James, A. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Chemicals in *Cynara cardunculus* subsp. *Cardunculus* (Asteraceae) – Artichoke. United States Department of Agriculture <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl?344>
- [6] Clifford, M.N; Ramirez-Martinez, J.R. 1990. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, 35(1): 13–21
- [7] Farah, A; Donangelo, C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 23–36
- [8] Nishitani, E; Sagesaka, Y.M. 2004. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5): 675–685
- [9] Gerhäuser, C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer (Oxford, England)*, 41 (13): 1941–1954
- [10] Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; Remesy, C; Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 724–747
- [11] Zhu, X; Zhang, H; Lo, R. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities, *J. Agric. Food Chem*, 52: 7272-7278
- [12] Miadokova, E; Nadova, S; Vlckova, V; Duhova, V; Kopaskova, M; Cipak, L; et al. 2008. Antigenotoxic effect of extract from *Cynara cardunculus* L. *Phytotherapy Research*, 22, 77–81.
- [13] Zhu, X.F; Zhang, H.X; Lo, R. 2005. Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. *Fitoterapia*, 76, 108–111
- [14] Kukić, J; Popović, V; Petrović, S; Mucaji, P; Ćirić, A; Stojković, D; et al. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107: 861–868

- [15] Scalbert, A; Manach, C; Morand, C; Remesy, C. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 45: 287–306. [[PubMed](#)]
- [16] 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. www.lareal.com/mediastore/7/202-2.pdf
- [17] Gouveia, S.C; Castilho, P.C. 2012. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*; 48: 712-724
- [18] Negro, D; Montesano, V; Grieco, S; Crupi, P; Sarli, G; De Lisi, A; Sonnante, G. 2012. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties, *J. Food Sci.* 77: C244–C252
- [19] Fratianni, F; Tucci, M; De Palma, M; Pepe, R; Nazzaro, F. 2007. Polyphenolic compounds in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori), *Food Chem.* 104: 1282–1286
- [20] Coinu, R; Carta, S; Urgeghe, P.P; Mulinacci, N; Pinelli, P; Franconi, F; Romani, A. 2007. Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke [en línea], *Food Chemistry*; 101: 524- 531. www.sciencedirect.com
- [21] Dueñas, J; Naranjo, B; Araujo, P. 2009. Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas, Tesis de grado, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador
- [22] Lattanzio, V; Kroon, P.A; Linsalata, V; Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*; 1: 131-144
- [23] Bariana, D.S; Krupey, J; Scarpati, L.M; Freedman, S.O. 1965. Chlorogenic Acid: Further Evidence for its Antigenic and Allergenic Activity. *Nature*; 207 (1155-7): 10. [doi:10.1038/2071155a0](https://doi.org/10.1038/2071155a0)
- [24] Onakpoya, I.J; Spencer, E.A; Thompson, M.J; Heneghan, C.J. 2014. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Human Hypertension*; 29: 77-81 [doi:10.1038/jhh.2014.46](https://doi.org/10.1038/jhh.2014.46)
- [25] Panizzi, L; Scarpati, M.L. 1954. Constitution of Cynarine, the Active Principle of the Artichoke. *Nature*; 174 (4440): 1062. [doi:10.1038/1741062a0](https://doi.org/10.1038/1741062a0).

- [26] Ignat, I; Volf, I; Popa, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.* 126: 1821–1835
- [27] Clifford, M. N. 2003. 14. The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. In C.Santos-Buelga & G.Williamson (Eds.). *Methods in Polyphenol Analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry: 314–337. [ISBN 0-85404-580-5](#)
- [28] Martí, R; Valcárcel, M; Herrero-Martínez, J.M; Cebolla-Cornejo, J; Roselló, S. 2015. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column, *FoodChem.* 169: 169–179
- [29] Schutz, K; Muse, E; Carle, R; Schieber, A. 2006. Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8812–8817
- [30] Tena, M.T; Martínez-Moral, M.P; Cardozo, P.W. 2015. Determination of caffeoylquinic acids in feed and related products by focused ultrasound solid–liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*; 1400: 1-9
- [31] Alarcón-Flores, M.I; Romero-González, R; Martínez Vidal, J.L; Garrido Frenich, A. 2014. Determination of phenolic compounds in artichoke, garlic and spinach by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods* 7: 2095–2106
- [32] Abad-García, B; Berrueta, L.A; Garmón-Lobato, S; Gallo, B; Vicente, F. 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216: 5398–5415
- [33] Regalado, E.L; Tolle, S; Pino, J.A; Winterhalter, P; Menendez, R; Morales, A.R; Rodríguez, J.L. 2011. Isolation and identification of phenolic compounds from rum aged in oak barrels by high-speed countercurrent chromatography/HPLC-DAD-ESI-MS and screening for antioxidant activity, *J. Chromatogr. A* 1218: 7358–7364
- [34] Schütz, K; Kammerer, D; Carle, R; Schieber, A. 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52: 4090–4096

- [35] Chen, H; Zhang, Q; Wang, X; Yang, J; Wang, Q. 2011. Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC–DAD and ESI/MSn. *Phytochemical Analysis*, 22: 247–257
- [36] Abu-Reidah, I. M; Arraez-Roman, D; Quirantes-Pine, R; Fernandez-Arroyo, S; Segura-Carretero, A; Fernandez-Gutierrez, A. 2012. HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*, 46: 108–117
- [37] Nardiello, D; Palermo, C; Natale, A; Quinto, M; Centonze, D. 2015. Pulsed amperometric detection at glassy carbon electrodes: a new approach for sensitive and reproducible determination of electroactive compounds, *Anal. Chim. Acta* 894: 1–6
- [38] Bebeselea, A; Manea, F; Burtica, G; Nagy, L; Nagy, G. 2010. The electrochemical determination of phenolic derivatives using multiple pulsed amperometry with graphite based electrodes. *Talanta* 80: 1068–1072
- [39] Hausler, M; Ganzera, M; Abel, G; Popp, M; Stuppner, H. 2002. Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 56: 407–411
- [40] Alonso, M.R; Spagnuolo, M.A; Rubio, M; Ferraro, G. 2007. Comprimidos Comerciales con Extracto de Alcachofa en el Mercado Farmacéutico Argentino: Comparación de los Perfiles de Disolución y Valoración de Cinarina y Ácido Clorogénico por HPLC. *Latin American Journal of Pharmacy*; 26(3): 399-403
- [41] Natale, A; Nardiello, D; Palermo, C; Muscarella, M; Quinto, M; Centonze, D. 2015. Development of an analytical method for the determination of polyphenolic compounds in vegetable origin samples by liquid chromatography and pulsed amperometric detection at a glassy carbon electrode. *Journal of Chromatography A*; 1420: 66-73
- [42] Wu, J; Qian, Y; Mao, P; Chen, L; Lu, Y; Wang, H. 2013. Separation and identification of phenolic compounds in canned artichoke by LC/DAD/ESI-MS using core-shell C18 column: a comparative study. *J. Chromatogr. B* 927: 173–180
- [43] Abu-Reidah, I.M; Arraez-Roman, D; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS. *Food Chemistry*; 141: 2269-2277
- [44] Yardim, Y. 2012. Electrochemical Behavior of Chlorogenic Acid at a Boron-Doped Diamond Electrode and Estimation of the Antioxidant Capacity in the Coffee Samples Based on Its Oxidation Peak. *Journal of Food Science*: 77 (4): C408-C413

- [45] Kamau, G.N. 1988. Surface preparation of glassy carbon electrodes, *Anal. Chim. Acta* 207: 1–16
- [46] Ignat, I; Volf, V; Popa, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.* 126: 1821–1835
- [47] Gouveia, S.C; Castilho, P.C. 2012. Validation of a HPLC-DAD-ESI/MSⁿ method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia. *Food Research International*, 45: 362–368
- [48] ICH, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services; Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, Rockville, 1996
- [49] Calpena, A.C; Escribano, E; Fernández, C. 1991. Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin*; 7(9): 749-58
- [50] Rampazoo, P. 1990. Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry. *II Farmaco*; 45: 807-15
- [51] Turkmen, N; Sari, F; Velioglu, Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. Volume 9, Issue 4: 835-841
- [52] Bucić-Kojić, A; Planinić, M; Srećko, T; Bilić, M; Velić, D. 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape sedes. *Journal of Food Engineering*. Volume 81, Issue 1: 236-242

