



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

ESTUDIO ANALÍTICO Y FUNCIONAL DE EXTRACTOS
DE ESPINO BLANCO (CRATAEGUS MONOGYNA JACQ.)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Grau Perales, Marta

Tutor/a: Ramón Fernández, Francisca

Cotutor/a externo: INAREJOS GARCIA, ANTONIO MANUEL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

RESUMEN

Desde hace unos siglos, el uso de las plantas como tratamientos medicinales se ha extendido en nuestra cultura y es foco de investigación de numerosos estudios.

El Espino Blanco (*Crataegus spp.*) es un arbusto ramificado de hoja caduca perteneciente a la familia Rosaceae y que posee aproximadamente 300 especies distintas.

Al Espino Blanco se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, potenciadoras del sueño, y es popular por tratar problemas cardíacos y gastrointestinales. Comercialmente se consume en forma de pastillas, extractos acuosos o en forma de té.

En este proyecto realizaré, junto con la empresa ADM®, un estudio de diferentes técnicas analíticas de hojas, extractos y productos comerciales presentes en el mercado. Se determinarán los polifenoles totales usando el método de Folin-Ciocalteu y mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se buscará un método de análisis realizando varias pruebas, para identificar y cuantificar los componentes más relevantes del *Crataegus*.

Así pues, compararemos los extractos realizados de forma manual con extractos de productos que están en venta en el mercado.

Palabras clave: *Crataegus*, HPLC, Folin-Ciocalteu, polifenoles, método.

Alumna: Dña. Marta Grau Perales

Directora Académica/tutora: Dña. Francisca Ramón Fernández

Director experimental/Cotutor: Antonio Manuel Inarejos García

Valencia, abril de 2023

RESUM

Des de fa uns segles, l'ús de les plantes com a tractaments medicinals s'ha estès en la nostra cultura i és focus d'investigació de nombrosos estudis.

L'Arç Blanc (*Crataegus spp.*) és un arbust ramificat de fulla caduca pertanyent a la família Rosaceae i que posseeix aproximadament 300 espècies diferents.

A l'Arç Blanc se li atribueixen propietats antiinflamatòries, potenciadores del somni, i és popular per tractar problemes cardíacs i gastrointestinals. Comercialment es consumeix en forma de pastilles, extractes aquosos o en forma de té.

En aquest projecte realitzaré, juntament amb l'empresa ADM[®], un estudi de diferents tècniques analítiques de fulles, extractes i productes comercials presents en el mercat. Es determinaran els polifenols totals usant el mètode de Folin-Ciocalteu i mitjançant cromatografia líquida d'alta eficiència (HPLC) es buscarà un mètode d'anàlisi realitzant diverses proves, per a identificar i quantificar els components més rellevants del *Crataegus*.

Així doncs, compararem els extractes realitzats de manera manual amb extractes de productes que estan en venda en el mercat.

Paraules clau : *Crataegus*, HPLC, Folin-Ciocalteu, polifenols, mètodes.

Alumna : Dña. Marta Grau Perales

Directora Académica/tutora : Dña. Francisca Ramón Fernández

Director experimental/Cotutor : Antonio Manuel Inarejos

García Valencia, abril de 2023

ABSTRACT

For centuries, the use of plants as medicinal treatments has been widespread in our culture and is the focus of numerous research studies.

Hawthorn (*Crataegus spp.*) is a branched deciduous shrub belonging to the Rosaceae family with approximately three hundred distinct species.

Hawthorn is attributed with anti-inflammatory, sleep-enhancing properties, and is popular for treating heart and gastrointestinal problems. It is commercially consumed in the form of pills, aqueous extracts or as a tea.

In this project I will conduct, together with the company ADM®, a study of different analytical techniques of leaves, extracts, and commercial products on the market. Total polyphenols will be determined using the Folin-Ciocalteu method and by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) we will search for a method of analysis by performing several tests to identify and quantify the most relevant components of *Crataegus*.

We will compare the extracts made manually with extracts of products that are on sale in the market.

Key words: *Crataegus*, HPLC, Folin-Ciocalteu, phenolic compounds, method.

Author: Dña. Marta Grau Perales

Academic director/tutor: Dña. Francisca Ramón Fernández

Academic director/Cotutor: Antonio Manuel Inarejos García

Valencia, April 2023

AGRADECIMIENTOS

“A mi familia por apoyarme siempre.

A mi tutor Antonio por ayudarme con la realización de este trabajo.

A mis compañeros de carrera por acompañarme durante estos años.”

ÍNDICE

DOCUMENTOS INCLUIDOS EN EL TFG

- Memoria

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EMPRESA ADM®	1
1.1.1 ADM® Valencia.....	2
1.1.2 Sostenibilidad en la empresa.	3
1.2 ESPINO BLANCO.	4
1.2.1 Moléculas principales en el Espino Blanco.	4
1.2.2 Propiedades funcionales Espino Blanco.	7
1.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	12
1.3.1 HPLC	12
II. OBJETIVOS.....	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
3.1 JUSTIFICACIÓN TÉCNICA.....	15
3.2 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA.....	15
IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	15
4.1 MUESTRAS.....	15
4.2 EXTRACCIONES.	16
4.3 HUMEDADES	18
4.4 POLIFENOLES TOTALES. FOLIN-CIOCALTEAU REAGENT.	19
4.4.1 Preparación de los reactivos.....	19
4.4.2 Preparación de las muestras y recta de calibrado	19
4.4.3 Método analítico.....	19
4.5 MÉTODO HPLC-DAD	20
4.5.1 Selección método.....	21
4.5.2 Método final.....	21
4.5.3 Selección disolvente para análisis HPLC.....	21
4.5.4 Preparación de las fases móviles (HPLC).....	22
4.5.5 Preparación de las muestras.....	22
4.5.6 Método analítico y obtención de resultados	22
4.6 CONTENIDO EN PROANTOCIANIDINAS (PAC's)	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
5.1 HUMEDADES	25

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

5.2 POLIFENOLES TOTALES.....	26
5.3 MÉTODO PROANTOCIANIDINAS	28
5.4 HPLC	30
5.4.1 Compuestos mayoritarios y su identificación en el cromatograma.	30
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. PLAN DE FUTURO.....	41
VIII. BIBLIOGRAFÍA	42

INDICE FIGURAS

Figura 1.1 Logotipo de la empresa	1
Figura 1.2 Planta ADM Valencia	2
Figura 1.3 Principales flavonoides.....	5
Figura 1.4 Estructura química de los flavan-3-oles.	6
Figura 1.5 Partes de un HPLC.	13
Figura 4.1 Muestras comerciales, extractos y hojas.	16
Figura 4.2 Thermomix	16
Figura 4.3 Filtrado a gravedad.....	17
Figura 4.4 Rotavapor laboratorio.	17
Figura 4.5 Aerosol-Dryer.	18
Figura 4.6 Espectrofotómetro SPECTROstar nano.	20
Figura 4.7 Equipo HPLC.....	23
Figura 5.1 Ejemplo de cromatograma muestra de hoja.....	31
Figura 5.2 Ejemplo de cromatograma muestra de extracto.	32
Figura 5.3 ejemplo de cromatograma de muestra comercial en tabletas.	32
Figura 5.4 ejemplo de cromatograma de muestra comercial líquida.	32
Figura 5.5 Espectro de ácido clorogénico 330 nm.	33
Figura 5.6 Espectro de Epicatequina a 280 nm.	36
Figura 5.7 Cromatograma epicatequina hojas.	36
Figura 5.8 Cromatograma epicatequina extractos.....	37

INDICE TABLAS

Tabla 1.1 Efectos beneficiosos del Espino Blanco.....	9
Tabla 4.1 Butanólisis.Métodología.	25
Tabla 5.1 Tabla resultados humedades.....	26
Tabla 5.2 Tabla resultados polifenoles.....	27
Tabla 5.3 Tabla resultados butanólisis.	29
Tabla 5.4 Tabla resultados cuantificación clorogénicos.....	33
Tabla 5.5 Tabla resultados cuantificación epicatequinas.....	37

INDICE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 Calibrado ácido gálico.....	26
Gráfico 5.2 Gráfico hojas vs extractos.....	27
Gráfico 5.3 Ratio de extracción de las hojas y los extractos.	28
Gráfico 5.4 Recta de calibrado PB2.	28
Gráfico 5.5 Gráfico de las muestras y su contenido en proantocianidinas.....	29
Gráfico 5.6 Contenido de proantocianidinas en los extractos.	30
Gráfico 5.7 Recta de calibrado ácido clorogénico.	31
Gráfico 5.8 Gráfico ácido clorogénico en las muestras.	34
Gráfico 5.9 Comparación hojas y extractos en % clorogénico.	35
Gráfico 5.10 Gráfico calibrado epicatequinas.	35
Gráfico 5.12 Gráfico radial concentración epicatequinas extractos y muestras comerciales. ...	38
Gráfico 5.13 Gráfico comparativo concentración epicatequinas y ácidos clorogénicos en hojas.	39
Gráfico 5.14 Gráfico comparativo concentración epicatequinas y ácidos clorogénicos en extractos.....	39
Gráfico 5.15 Gráfico comparativo del concentración de epicatequinas y clorogénicos en muestras comerciales.	40

I. INTRODUCCIÓN

1.1 EMPRESA ADM®

El sector alimentación es uno de los principales motores económicos de nuestro país.

La tendencia por los alimentos saludables y el interés en lo que comemos hace que nuestro sector esté invirtiendo en investigaciones acerca de nuevos productos que cumplan con las demandas de la población.

ADM® (Archer-Daniel's Midland company) es una empresa multinacional destacada en el ámbito de la nutrición animal y humana. Se encarga de la creación de ingredientes naturales para alimentos y bebidas, desde proteínas de origen vegetal hasta probióticos, trabajando con productores y apoyándolos con un servicio personalizado y la tecnología más innovadora. Se cumple la misma función con productos de nutrición animal, consiguiendo un producto limpio y saludable, comprometido con el bienestar animal y la sostenibilidad.

Se fundó en el año 1902 por George A. Archer y John W. Daniels, que iniciaron un negocio de trituración de semillas de lino. En el año 1923 se forma Archer Daniels Midland Company, y un año después ADM® fue listada en la bolsa de Nueva York.

Se indica en la figura 1.1 el logotipo actual de la empresa.



Figura 1.1 Logotipo de la empresa

Con su sede en Chicago, Illinois, ADM® está presente en todos los continentes. Actualmente cuenta con:

- 8 centros de innovación, 25 plantas procesadoras y 59 centros de adquisiciones en Asia y Australia, en donde se trabaja en el suministro de alimentos para satisfacer las necesidades de la población de manera segura y sostenible.
- 5 centros de innovación, 39 plantas procesadoras y 69 centros de adquisiciones en América del sur, con 4500 empleados y sedes en Argentina, Brasil, México, Paraguay, Perú y Uruguay.
- 20 centros de innovación, 81 plantas procesadoras y 114 centros de adquisiciones en Europa, en más de 20 países y en África, en cuatro países.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

- 29 centros de innovación, 182 plantas procesadoras y 278 centros de adquisiciones en América del Norte.

En el año 2022 ADM® ha recibido importantes premios y reconocimientos, como el premio Top Employer en Europa o el premio a las empresas más responsables de Estados Unidos de Newsweek, que la consolidan con todo el mundo como empresa innovadora, sostenible y con un equipo ejecutivo ejemplar. (ADM, n.d.)

1.1.1 ADM® Valencia

Localizada en la localidad de Carcaixent, un pueblo al sur de la ciudad de Valencia y que se caracteriza por sus plantaciones de cítricos y sus buenas conexiones con el puerto marítimo, ADM® se establece como pionero en la Comunidad Valenciana en Tecnologías de intercambio iónico, extracción a contracorriente, destilación y rectificación y secado por atomización. En la figura 1.2 se muestra la planta de producción de la Comunidad Valenciana.



Figura 1.2 Planta ADM Valencia

La empresa se dedica a la realización de mezclas especiales de concentrado de jugo de frutas, sistemas edulcorantes, aplicación de colores rojo y amarillo, y es el desarrollador y fabricante líder de extractos de plantas.

Actualmente cuenta con una plantilla de 125 trabajadores y un área de 68.000 m², además, el grupo ADM® ha realizado una gran inversión en investigación y desarrollo de nuevos productos y nuevas técnicas para cumplimentar las demandas del mercado.

HISTORIA DE LA EMPRESA

- 1974: se funda Deprovesa S.A, que trabaja en el procesado de los aceites esenciales del limón y la naranja.
- 1987: el grupo WILD, una multinacional norteamericana, adquiere Deprovesa S.A

- 1990: se apuesta por una mejora de calidad construyendo una nueva planta y nuevos equipos tecnológicos de alta gama.
- 1995: la compañía adquiere la certificación ISO 9001.
- 2000: la empresa optimiza la capacidad de procesar productos de temporada con un nuevo almacén frigorífico. Nuevas tecnologías de color que permiten una mayor intensidad y estabilidad de este.
- 2002: se construye un nuevo edificio con una nueva área logística y almacén.
- 2004: se introduce “fruit up”, un nuevo edulcorante natural de frutas.
- 2007: DEPROVESA WILD se cambia de nombre a WILD VALENCIA S.A
- 2008: Se introduce el término lean implementation, qué significa mejora continua.
- 2009: se ejecuta una planta de última generación para el procesado de edulcorantes de frutas.
- 2012: se implementa la verificación IFS.
- 2017: WILD VALENCIA S.A se transforma en ADM WILD Valencia S.A.U y se fabrican todas las especialidades de té. (ADM, n.d.)

1.1.2 Sostenibilidad en la empresa.

El programa de las naciones unidas para el desarrollo crea los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) para poner universalmente fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar a la población de un estado de paz y prosperidad. Los 17 ODS proporcionan a las empresas directrices y metas claras para alcanzar los objetivos.

ADM® destaca como empresa por sus valores y compromiso con el desarrollo sostenible y sus objetivos, ya que se emprende un ejercicio de búsqueda para determinar qué ODS se alinean con sus objetivos comerciales, actualmente cumple con muchos de ellos contribuyendo al hambre 0, aguas limpias y saneadas, trabajo decente, crecimiento económico, acción climática y vida verde. Es el medio de unión entre el productor y el consumidor. Este consumidor cada vez está más preocupado por obtener un producto sostenible, y por ello las empresas optan por seguir un modelo de fabricación con sustentabilidad.

La promoción de una agricultura sostenible, el aumento de la seguridad alimentaria y la inversión en educación son algunos de los objetivos de desarrollo sostenible por los que destaca la empresa.

Concretamente, en términos de agricultura sostenible, ADM® se asocia con varias organizaciones internacionales en 2020 con el objetivo de que los productores puedan producir más, con menos coste.

Uno de los objetivos que tiene la empresa es aumentar la seguridad alimentaria y contribuir así a reducir la pobreza mundial. En 2020 se donaron más de tres millones de euros a países con escasez de alimentos. Además, colaboran con una asociación llamada *Concern Worldwide* que se dedica a la reducción del sufrimiento en los países más pobres del mundo.

Los proyectos de ADM cares han ayudado a casi siete millones de estudiantes desde la infancia hasta la universidad. Por ejemplo, mediante ADM cares, los estudiantes del condado de Macon, en Illinois, tienen acceso a educación relacionada con la agricultura. (ADM, n.d.)

1.2 ESPINO BLANCO.

Los productos naturales extraídos de plantas siempre han sido objeto de interés debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, pero en los últimos años gracias a la tendencia de lo natural y saludable, los estudios se han multiplicado y actualmente estos productos juegan un papel crucial en la prevención y mitigación de algunas patologías humanas.

El Espino Blanco, (*Crataegus spp*), también llamado Espino Albar o Majuelo es un arbusto ramificado de hoja caduca, con forma retorcida, que forma parte de la familia Rosaceae y subfamilia Maloideae. (Nazhand et al., n.d.) Su nombre científico proviene de la palabra griega “kràtaigos” que significa fuerza, ya que su madera es dura y resistente. Es una especie rústica, y no demasiado exigente con el agua, por ello sus hábitats naturales son áreas boscosas y soleadas con suelos calizos hasta 1500 metros sobre el nivel del mar. (Nazhand et al., n.d.)

El Espino Blanco consta de entre 150 y 1200 especies, dependiendo del concepto de especie y de la inserción de híbridos en la taxonomía. Muchas de las especies son poliploides, por ello es complicado establecer un número determinado de estas en términos de la botánica sistemática. (Fazel Nabavi et al., 2015; Martinelli et al., 2021)

La bayas, flores, hojas y tallos son las partes más utilizadas del *Crataegus*, son ricas en nutrientes y normalmente se realizan extracciones con metanol y etanol o con base en agua para conseguir las tabletas, extractos acuosos, tés o tintes que se compran comercialmente. En Europa y China el Espino Blanco se utiliza en la cocina y se pueden preparar mermeladas, gominolas, bebidas y vinos. Las hojas y las flores se consumen en forma de ensaladas, mientras que el fruto se consume cuando está maduro, solo en temporadas de otoño.

En Europa las especies más comunes son *C. monogyna* y *C. laevigata* (*C. oxyacantha*) mientras que en China *C. cuneata*, *C. scabrifolia* y *C. pinnatifida* son las más conocidas y utilizadas en la medicina tradicional, mayoritariamente están presentes en Europa, África, Asia del este y Norte América. (Bala Jibrin, 2016; Fazel Nabavi et al., 2015; Martinelli et al., 2021)

Desde el siglo XIX, los productos naturales que contienen Espino Blanco son populares por tratar problemas cardíacos y gastrointestinales. Además, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, anti-hiperlipidemias, potenciadoras del sueño y como tratamiento del asma. Hay evidencias científicas que demuestran que sus frutos poseen potentes propiedades antioxidantes, debido a la presencia de diferentes componentes bioactivos. Más tarde se relatan las propiedades farmacológicas más extensamente. (Edwards et al., 2012)

1.2.1 Moléculas principales en el Espino Blanco.

Dentro de la familia Rosaceae, el Espino Blanco es una de las plantas comestibles más importantes, ya que posee interesantes actividades fisiológicas y farmacológicas por la presencia de diferentes componentes activos naturales que son activamente neuroprotectores, hepatoprotectores, cardioprotectores y muchos más efectos farmacológicos, entre los cuales destacan la reducción de los efectos de riesgo cardiovasculares como la hipertensión. Debido a su importancia farmacológica, se han investigado los principales componentes del Espino Blanco.

El interés principal en estas plantas es debido a la alta cantidad de polifenoles. Las investigaciones más comunes en el Espino Blanco se centran en detectar y cuantificar los flavonoides y las antocianinas, ya que se ha comprobado que tienen propiedades antioxidantes.

En *C. monogyna* son detectados numerosos compuestos fenólicos, que varían dependiendo de la parte de la planta, del lugar de plantación y del estado de madurez del fruto. Muchos de estos compuestos como el ácido clorogénico, epicatequinas, hiperósido, quercetina, rutina, vitexina, y procianidinas poseen propiedades antioxidantes. Por ello, el extracto hidroalcohólico de la *C. monogyna* se explota como ingrediente de formulaciones farmacéuticas innovadoras como son los geles hidrosolubles. (Fazel Nabavi et al., 2015)

Los metabolitos secundarios extraídos de las diferentes partes de la planta van desde ácidos grasos simples hasta compuestos terpenoides y poli fenólicos. (Fazel Nabavi et al., 2015)

Las hojas, flores y frutos contienen ácidos hidroxicinámicos esenciales, alcoholes de azúcar, ácidos fenólicos, terpenos, aceites esenciales, fenil propanoides, lignanos y flavonoides. El azúcar principal en el Espino Blanco es la fructosa. (Martinelli et al., 2021)

Los flavonoides son los metabolitos secundarios de las plantas más estudiados. Se trata de un tipo de polifenoles que se distribuyen en el mundo vegetal. Poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes y capacidad protectora contra enfermedades crónicas, como cáncer, diabetes o inflamación. Estructuralmente están compuestos por anillos aromáticos de 6 miembros, como se indica en la figura 1.3 Los flavonoides se dividen en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanas, antocianidinas, isoflavonas, neoflavonas y chalconas.

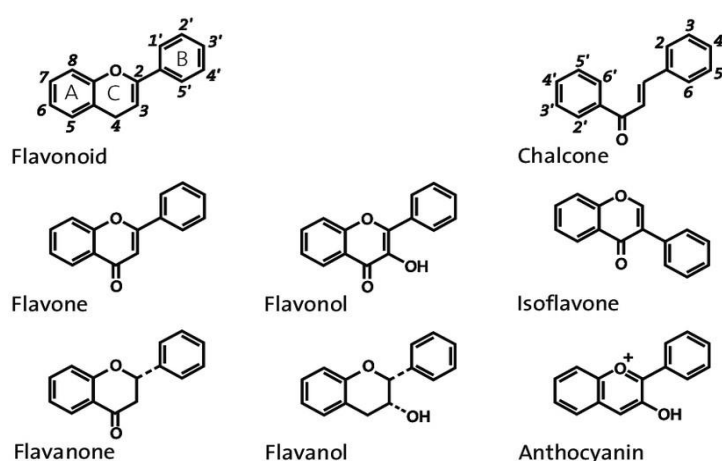


Figura 1.3 Principales flavonoides

Los flavan-3-oles o flavanoles son un tipo de flavonoides que se encuentran en la mayoría de las plantas y que son estructuralmente muy diversos. Incluyen una gran variedad de compuestos; catequinas, galato de epicatequinas, epigallocatequina, proantocianidinas,

teaflavinas y terarubinas. La catequina (monómero) y la epicatequina (isómero) son epímeros de los flavan-3-oles, por ello como se explica después, su cuantificación mediante es como equivalentes de epicatequina. (*Flavanol_ AcademiaLab*, n.d.)

En la figura 1.4 se observa la estructura química de los flavan-3-oles, sus monómeros y correspondientes isómeros.

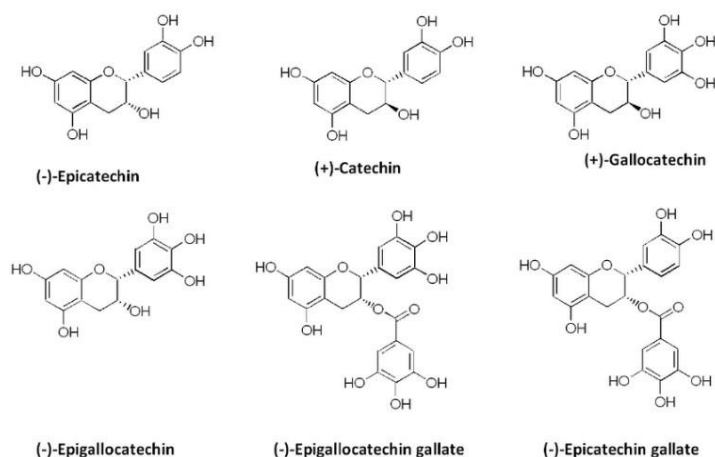


Figura 1.4 Estructura química de los flavan-3-oles.

En general, los flavonoides (rutina, vitexina e hiperósido), concretamente los flavonoles y flavonas se encuentran en los brotes de las flores y en las hojas más altas de los árboles, mientras que las proantocianidinas y glicósidos se encuentran con más frecuencia en las frutas no maduras. Además, las flores poseen altos niveles de tocoferoles, y las frutas tienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, que contribuyen a su valor nutricional y farmacológico.

Las flavonas C-glicosil más comunes en *C. monogyna* son la vitexina y derivados; su contenido puede ayudar a identificar la especie de Espino Blanco. Vitexina-2''-O-ramnósido, vitexina e isovitexina se encuentran en *C. monogyna*, *C. pentagyna*, *C. laevigata*. Por el contrario, orientina e isoorientina son los principales C-glicosil flavonas y isoorientina-2''-O-ramnósido, orientina-2''-O-ramnósido, y isovitexin-2''-O-ramnósido los minoritarios componentes de *C. pentagyna*. Estos compuestos no se encuentran en *C. monogyna*. (Martinelli et al., 2021; Yang & Liu, 2012)

Los hiperósidos, la vitexina, el ácido clorogénico y los derivados glicosilados de los compuestos son los polifenoles más identificados en el Espino. El ácido y sus isómeros son los componentes principales de las flores, sin embargo, su isómero 5-O-cafeoilquinico solo se encuentra en frutos de la especie *C. grayana*.

En *C. monogyna*, el hiperósido es también uno de los componentes principales de las flores, junto con un derivado de flavona glicosilado, ligado a glucosa y ramnosa. Los glicósidos de la antocianina son los componentes principales de las flores y les dan su color distintivo.

La quercetina, kaempferol y sexangularetina son los principales aglicones de flavanol, mientras que la isoquercitrina y la rutina son los principales glucósidos de flavanol.

Las frutas también contienen altos niveles de antocianinas, y isoquercetina como principal flavonoide junto con el hiperósido en los extractos de Espino Blanco.

Procianidinas B2, B5 y C1: Los flavan-3-oles son los compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides más conocidos. Como monómero, la epicatequina se encuentra de forma abundante en la planta, mientras que la catequina es componente minoritario. Tanto la catequina como la epicatequina sufren reacciones oxidativas y se transforman en dímeros, trímeros o estructuras oligoméricas, que conforman las procianidinas. Las procianidinas identificadas en el *Crataegus* son exclusivamente de tipo B, sus proporciones y contenido de los compuestos individuales varían considerablemente. Las procianidinas B2 y B5 se identifican como los principales dímeros de PC y la procianidina C1 como el principal trímero de PC en frutos de *C. pinnatifida*.

El contenido y el perfil de los glucósidos de procianidina también pueden usarse como un marcador químico taxonómico para distinguir diferentes especies de Espino Blanco. En las investigaciones hechas hasta ahora, hay muy pocas procianidinas que estén determinadas completamente con su estructura, debido a la falta de separación por HPLC y a la falta de compuestos de referencia, por ello, la cuantificación precisa de muchas procianidinas no es posible.

El ácido cítrico es el ácido principal presente en el Espino Blanco, seguido del ácido málico y los ácidos triterpénicos, ácido ursólico y el ácido oleanólico.

1.2.2 Propiedades funcionales Espino Blanco.

El Espino Blanco es conocido por sus propiedades beneficiosas *in vitro* e *in vivo* en la salud humana.

Debido a sus mínimos efectos adversos, sus propiedades biológicas y actividades farmacológicas registradas en animales de experimentación, se puede utilizar como agente terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades en humanos.

En la medicina popular, el Espino Blanco es usado como tratamiento de las enfermedades cardíacas, hipertensión, hiperlipidemia y como agente anti aterosclerótico.

Especialmente, es muy efectivo frente a problemas cardiovasculares, como fallos cardíacos, hipertensión con daños en el miocardio, angina de pecho, arritmia y aterosclerosis.

En Europa y en EE. UU., los extractos de Espino se utilizan como terapia adyuvante para pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva. Las partes de las plantas comúnmente utilizadas son las hojas y las flores. Recientemente las frutas frescas y secas también se han usado para estudios y se realizó un metaanálisis con datos de diez ensayos clínicos en los que participaron 855 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, de los cuales 7 utilizaron el extracto WS 1442 y 3 el extracto LI 132. La dosis diaria de los extractos varía entre 160-1800 mg. Los resultados del metaanálisis indican una mejora de la función cardíaca y un alivio de los síntomas de fallo del corazón. Un tratamiento de 8 semanas con un extracto de frutos de *C. oxyacantha* y *C. monogyna* utilizando como disolvente etanol acuoso, y una dosis diaria de 6,4 mg de procianidinas oligoméricas y 12,7 mg de polifenoles totales mejora la tolerancia al ejercicio de pacientes con fallos de corazón de tipo NYHA clase II. El extracto del fruto de *C. monogyna* (700 mL L-1 de etanol acuoso) y los principales

compuestos fenólicos del extracto causaron un desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa y la supresión de la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de corazón de rata. Esto sugiere un potencial cardioprotector reducido.

El extracto acuoso en etanol (500 ml L-1) de frutos secos de *C. laevigata* mostró actividades de eliminación de radicales y cardioprotectores del plasma *in vitro*. El extracto elimina superóxido, colesterol, hidroxilo y radicales peroxilo, mejora la recuperación de la función contráctil cardíaca, redujo la gravedad del infarto de miocardio y aumentó las actividades de la creatina quinasa y el lactato deshidrogenasa acil coa en un modelo experimental de lesión por isquemia/reperfusión. El extracto puede haber desempeñado un papel en la activación de las vías anti apoptóticas y la supresión de las vías proapoptóticas.

En cuanto a la capacidad antiinflamatoria del Espino Blanco, se realiza un estudio con una fracción de triterpenos, aislada del extracto de hexano y que contiene cicloartenol como componente principal, y se experimenta en animales, la carragenina reduce la inflamación. Los resultados muestran una actividad antiinflamatoria *in vivo* por parte de *C. monogyna*. Los efectos de los principales flavonoides que se encuentran en el Espino se probaron en corazones de cobaya, se llega a la conclusión de que hay un beneficio potencial para la salud en las funciones cardíacas; Los extractos fenólicos de Espino pueden proteger las células endoteliales al regular la expresión de los genes asociados a la apoptosis. La Reestenosis puede resultar de la respuesta biológica de la pared arterial a la lesión local causada por la angioplastia. La formación de neo íntima es un proceso crucial en la Reestenosis. La administración oral de extracto fenólico de Espino redujo la formación de neo íntima después de la extracción del catéter con balón dilatador en la arteria carótida de las ratas.

Attard et Al concluyen una actividad anti-ACE del ácido oleanólico extraído de *C. monogyna*, realizando un estudio de la composición química del extracto, la cual demuestra que tiene ácidos triterpenos, flavonoides y cumarinas.

Se investiga el efecto antitrombótico del extracto etanólico obtenido con las hojas de Espino Blanco en un sistema modelo animal en el que la carragenina induce a la trombosis de la cola. Los autores concluyen que el extracto etanólico de *C. monogyna* podría utilizarse como agente terapéutico o tratamiento complementario contra la trombosis. También mejora la circulación y se usa como agente antiespasmódico y diurético y comúnmente también es usado para tratar enfermedades gastrointestinales ya que estimula la digestión y promueve las funciones estomacales.(Fazel Nabavi et al., 2015; Yang & Liu, 2012). En la tabla 1.1 se citan los tipos de efectos beneficiosos del Espino Blanco.

Tabla 1.1 Efectos beneficiosos del Espino Blanco.

TIPO DE ACCIÓN	COMPUESTOS	PARTE DE LA PLANTA	TIPO DE ESTUDIO
Actividad cardiovascular	proantocianidinas	hojas, frutas y flores	in vitro in vivo medicina tradicional
Inhibición apoptosis	proantocianidinas	hojas, frutas y flores	in vitro
Efectos antiinflamatorios	extractos de plantas	frutas, hojas	in vivo
	ácido ursólico y oleanólico	hojas, frutos y flores	in vitro
Actividad mitocondrial miocardio	extractos de plantas	flores y hojas	in vitro in vivo
Actividad antioxidante	ácido ursólico y oleanólico	flores y hojas	in vitro
Protección contra fallos cardíacos tipo II y III	extractos de plantas	extractos de flores y hojas	in vitro in vivo
Protección contra la hipertensión, desórdenes digestivos y cardíacos	extractos de plantas	frutas, flores y hojas	in vitro in vivo
Dilatación de los vasos sanguíneos y las arterias coronarias	extractos de plantas	hojas y bayas	in vivo
Antiinflamatorio, hipolipidémico y ansiolítico	extractos de plantas	hojas y bayas	in vivo

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

Antihiper lesterol y efecto hipoglicémico	frutos y extractos de frutos	fruto	in vivo
Acción antimicrobiana	flavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos	hojas y bayas	in vivo in vitro
	apigenin-7-glucoside luteolin 3,7diglucoside	hojas, frutos y flores	in vitro
	frutos catequina epicatequina galato epigalocatequina	fruto	in vivo
Efecto hepatoprotector	extractos de hojas	hojas	in vivo
Protección contra la fibrosis hepática	ácido clorogénico, rutin, epicatequinas, vixetina y quercetina	hojas	in vivo
Protección contra enfermedades renales	extractos de frutos	frutos	in vivo
Efectos citotóxicos y genotóxicos	extractos de frutos	frutos	in vitro
Efecto antidiabético	diferentes extractos	hojas	in vivo
Efectos gastro protectores	diferentes extractos	hojas, frutos	in vivo
Anticáncer	diferentes extractos crataequinona A, quercetina, kaempferol, pinnatífida in BVI	hojas, frutos	in vitro
Dermatitis	diferentes extractos	hojas, frutos	in vivo
Anti-ansiedad	diferentes extractos	hojas, frutos	in vivo

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

Efectos protectores contra los daños cerebrales por	betulin, ácido betulínico, ácido	hojas y partes de la planta	ex vivo in vitro
Pesticidas	oleanólico y crissin, sitosterol, glucopiranosido y lupeol	-----	-----
Potencial anti-cataratas	extracto hojas	hojas	in vivo
Efectos protectores contra los desórdenes neurológicos	betulin, ácido betulínico, ácido oleanólico y crissin, sitosterol, glucopiranosido y lupeol	hojas y partes de la planta	in vivo
Efecto anti aterosclerótico	proantocianidinas oligoméricas	hojas	in vivo
Efecto radio protector	compuestos fenólicos	hojas y partes de la planta	in vivo

EFFECTOS ADVERSOS *C. monogyna*:

Teniendo en cuenta sus usos culinarios, se puede plantear la hipótesis de que el Espino causa un efecto adverso insignificante. En dosis muy elevadas causa efectos adversos limitados, como sudoración, dolor de cabeza, erupción leve, palpitaciones, somnolencia, agitación y efectos gastrointestinales.

La dosis letal media (DL50) para la administración oral de extracto hidroalcohólico de hoja y frutos de Espino es de 18,5 mL/kg en ratones y 33,8 mL/kg en ratas. Además, se ha informado que la media letal (DL50) para fracciones ricas en flavonoides de Espino administradas por vía intravenosa es de 1,56 g/kg en ratones y, la media de la dosis letal (DL50) para la fracción de proantocianidinas es de 130 mg/kg (intraperitoneal) y 300 mg/kg (inyección subcutánea) en ratones. (Paez, 2022; Saz, 2012)

El Espino Blanco puede interactuar con fármacos vasodilatadores, puede potenciar o inhibir las acciones de los medicamentos utilizados para la hipertensión, la angina de pecho, la

insuficiencia cardíaca y las arritmias. Además, el consumo puede tener algunas interacciones con medicamentos, como los betabloqueantes, digitálicos, y algunos agentes hipotensores, debido a sus efectos cardiotónicos e hipotensores. Está contraindicado en mujeres embarazadas o en estado lactante. (Saz, 2012)

1.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía se define como la separación de dos materiales. Keulemans (1959), la definió como “*Método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil)*”. (Araceli et al., 2010)

1.3.1 HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento (High-performance liquid Chromatography) es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas, ya que tiene la capacidad de separar analitos de diferente naturaleza que están presentes en la mezcla. Sus aplicaciones industriales incluyen desde productos farmacéuticos, alimentarios, químicos y bioquímicos hasta un uso en la medicina clínica y la química forense.

Como se ha visto en la definición, este método involucra una fase móvil, de fase polar y apolar, que varían en su concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar y una fase estacionaria, que son inmiscibles entre sí.

La fase móvil es un líquido cuya función es la de llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida. La retención y la separación de cada componente de la mezcla se determina mediante varias fuerzas químicas y analíticas que actúan en las dos fases.

Los componentes que tienen mayor afinidad con la fase estacionaria migran más lentamente que los componentes que tienen menos afinidad, así pues, los componentes se separan mediante las fuerzas que actúan en las moléculas como son las fuerzas de dispersión de London, las interacciones dipolo- dipolo, interacciones por puentes de hidrógeno, dieléctricas y electroestáticas.

Su equipo consta de 5 partes, como se muestra en la figura 1.5 : el reservorio, que está situado en la fase móvil, suele estar hecho de vidrio, y dependiendo de si se hace gradiente de concentración se necesitan uno o varios, la bomba , que succiona la fase móvil del reservorio para que fluya por el sistema a velocidad constante y se inyecta con un volumen de entre 1 μ L y 5 mL, el inyector , que puede ser manual o automático, y permite que la muestra sea introducida a la fase móvil de una manera precisa, el horno, que regula y mantiene la temperatura en la columna, la columna, fabricada de acero inoxidable, con una longitud de entre 50 a 300 nm y está rellena de la fase estacionaria, el detector, cambia los cambios en los efluentes de la columna, y por último el registrador, que procesa las señales y las plasma en el cromatograma. (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018)

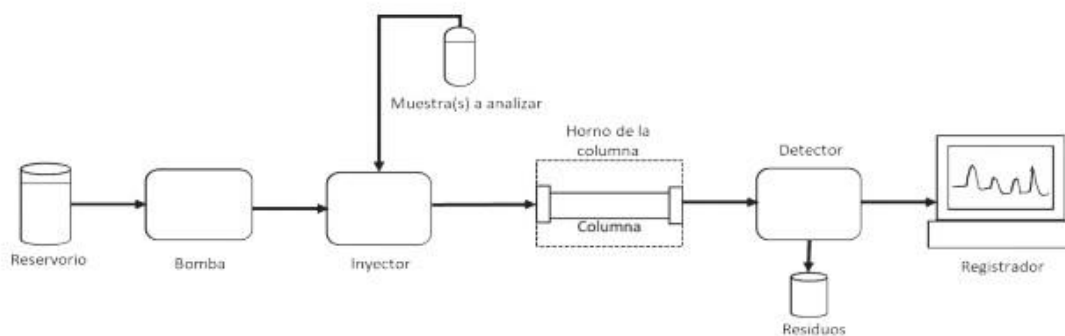


Figura 1.5 Partes de un HPLC.

Existe la cromatografía HPLC en fase normal y en fase reversa. La cromatografía HPLC en fase normal es el modo de funcionamiento original, la fase estacionaria es la más polar y, aunque actualmente no se usa tanto, es útil para cuando el compuesto tiene una polaridad muy elevada.

En el HPLC en fase reversa o invertida, la fase móvil es más polar que la estacionaria, los resultados en la separación de analitos y la reproducibilidad de ensayos son mucho mejores que en la fase normal, y la columna es más robusta y resistente, por ello es el tipo de HPLC más utilizado.

El HPLC tiene diversas ventajas frente a otros métodos ya que es una operación flexible, automatizada y personalizable, tiene alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos, no es un método destructivo y tiene un amplio rango de aplicabilidad. (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018)

Los métodos colorimétricos y HPLC combinado con detección UV o espectroscopia de masas son utilizados para determinar el contenido de polifenoles en el Espino Blanco. Primero, se realiza un análisis colorimétrico, que da una idea de la cantidad de polifenoles totales presentes en la muestra, el problema es que muchas veces los resultados están afectados por otros componentes en los extractos que tienen una reacción colorimétrica similar, además, estos métodos no proporcionan información del perfil composicional de los compuestos fenólicos individuales. Por ello, el HPLC y la espectroscopia de masas son las técnicas más fiables para cuantificar estos polifenoles.

Aun así, estas técnicas están limitadas debido a la separación insuficiente de los compuestos y la falta de referentes comerciales (Yang & Liu, 2012)

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de final de grado es el estudio de los principales componentes bioactivos de Espino Blanco. Se realizan extractos de muestras de raíces y hojas y se comparan con extractos y productos comerciales disponibles en el mercado. Para ello se realizan diferentes técnicas analíticas mediante las cuales se cuantificarán el ácido clorogénico, flavan-3-oles, polifenoles totales y proantocianidinas.

Otros objetivos específicos serían los siguientes:

1. Puesta a punto extracción de los analitos (método analítico)
2. Selección de un método de análisis adecuado realizando una búsqueda bibliográfica.
3. Análisis de muestras mediante espectrofotometría y cromatografía.
4. Realización de los ensayos experimentales, mediante técnicas analíticas y HPLC.
5. Identificación y cuantificación de los principales compuestos del Espino Blanco.
6. Desarrollo extractos funcionales (prototipos).
7. Análisis de muestras mediante espectrofotometría de absorción.
8. Selección de materias primas en base a su calidad, y también muestras comerciales

III. JUSTIFICACIÓN

3.1 JUSTIFICACIÓN TÉCNICA

El proyecto se lleva a cabo mediante unas prácticas extracurriculares en una empresa de ámbito alimentario, ADM® Valencia, que se encarga de la obtención de ingredientes naturales y su estudio para encontrar la mayor cantidad de beneficios.

El interés por los productos naturales y saludables ha crecido potencialmente durante los últimos años. El producto del que se va a obtener el estudio, el Espino Blanco, es una planta medicinal procedente de Europa muy conocida por su uso para tratar problemas de corazón y de la tensión arterial, además de muchos otros beneficios. Por todo ello, se realiza el proyecto para determinar sus componentes esenciales y que aportan ventajas en la salud de la población.

3.2 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

En cuanto a términos académicos, este trabajo se realiza para finalizar los estudios de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en la Universidad Politécnica de Valencia.

Para la realización del proyecto, se han utilizado muchos conceptos y aprendizajes de la carrera. Entre las asignaturas más relevantes para poder realizar el estudio destacaría Química, ya que en el laboratorio se han aplicado fórmulas y métodos para realizar diluciones, Análisis Químico, ya que se imparte toda la información sobre el equipo de HPLC y Botánica, porque se daba una vista general acerca de las plantas y cómo tratarlas en un laboratorio. En general, haber concluido mis estudios y realizar todas estas asignaturas me ha sido de gran ayuda para trabajar en el laboratorio y poder estudiar en profundidad el Espino Blanco.

IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 MUESTRAS

Como se ha resaltado anteriormente, trataremos con varios tipos de muestras:

-Tres muestras de una mezcla de hojas y raíces que se muelen en el laboratorio para realizar las pruebas.

-Tres extractos de hojas y raíces realizados manualmente en el laboratorio como se explica en el punto 4.2. Las actividades biológicas y los efectos fisiológicos de los compuestos fenólicos se investigan a partir de extractos de las frutas, hojas y flores de *C. monogyna*. Las extracciones se pueden realizar con etanol, metanol, agua, metanol o etanol acuosos. Los comerciales tienen una composición estandarizada y nosotros preparamos otros a escala de laboratorio.

-Dos muestras comerciales, una se trata de una caja de tabletas de Espino Blanco que se toman de 2 a 3 comprimidos al día con un vaso de agua y la otra muestra comercial es un

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

complemento alimenticio líquido que se toma junto con agua y que ayuda al reposo nocturno.

Como las muestras son de proveedores ajenos al proyecto, se van a codificar para obtener los resultados y poder hablar de ellos respetando la confidencialidad. Las muestras y sus formatos están representados en la figura 4.1.

Muestras de hojas y raíces: H1, H2 y H3.

Muestras de extractos de hojas y raíces: E1, E2 y E3.

Muestras comerciales: T1 y T2 para las tabletas y L1 y L2 para la muestra líquida.

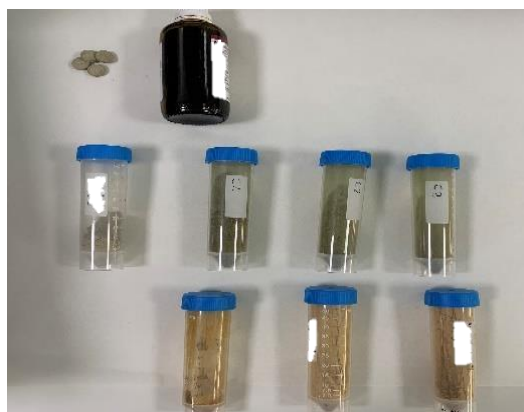


Figura 4.1 Muestras comerciales, extractos y hojas.

4.2 EXTRACCIONES.

En una extracción se obtiene el extracto concentrado de una materia prima. Para realizar las extracciones a partir de las muestras de hojas y raíces se realizan los siguientes pasos.

Primero se pesan aproximadamente 100 g de la mezcla de hojas y raíces y se mezclan con 1 L de agua, se introduce en la Thermomix (modelo Vorwerk Thermomix TM31, figura 4.2) y se establecen las condiciones de trabajo: 35 minutos a 80°C y en velocidad 3.



Figura 4.2 Thermomix.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

Después se realiza la separación sólido-líquido. Se filtra la solución que hemos sacado de la Thermomix mediante papel de filtro en probetas y con embudos de plástico, quedando el residuo sólido en los papeles. Este residuo se recoge y se vuelve a verter en la Thermomix junto con otro litro de agua para una segunda extracción. Esto se realiza para aumentar el rendimiento.

Una vez filtrado con papel, como en la figura 4.3 y cuando nos queda en la probeta el líquido de las dos extracciones se pasa a filtrar mediante vacío, se vierte el líquido en pequeñas dosis para que no se sature el filtro y se va cambiando una vez pasa esto, la bomba se deja reposar de vez en cuando para que no se sature tampoco. Es importante anotar los volúmenes y las masas que quedan tras filtrar tanto de la primera como de la segunda extracción para calcular el rendimiento.



Figura 4.3 Filtrado a gravedad.

A continuación, se pasa a la etapa de concentración. El líquido que queda se introduce en un rotavapor, que se muestra en la figura 4.4, este aparato se encarga de separar el agua y el disolvente que hay en la mezcla debido al diferente punto de ebullición. El baño se calienta a una temperatura de 55°C, se aplica vacío y se produce esta separación.



Figura 4.4 Rotavapor laboratorio.

El resultado de utilizar el rotavapor es un extracto puro muy concentrado. Una vez el extracto está ya concentrado se tiene que secar, para ello se utiliza el espray Dryer, concretamente el mini aerosol dryer Buchi B-290 (figura 4.5). Este aparato atomiza el

líquido en finas gotas y evapora el agua mediante gas de aspersión caliente. Las condiciones de medida son: temperatura de 180°C, 70% de aspiración, la bomba al 20% y un caudal de 45.



Figura 4.5 Aerosol-Dryer.

El resultado es un extracto en polvo que va a ser el que se utilice para los estudios.

La cantidad de gramos de hojas y raíces con la que se obtiene 1 g de extracto activo se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio extracto nativo} = \frac{\text{Peso de hojas y raíces inicial (g)}}{\text{Peso del extracto nativo (g)}} \quad (1)$$

4.3 HUMEDADES

Los resultados de polifenoles, proantocianidinas y HPLC se expresarán en base seca, por tanto, es necesario obtener las humedades de las muestras.

Para las muestras que no son líquidas: H1, H2, H3, E1, E2, E3 y T1 y T2 se realiza de la siguiente manera: primero se dejan los vasos de precipitados que se van a usar unos 30 minutos en el horno para eliminar la posible humedad. Después se pesa aproximadamente 1 g de muestra con una balanza de precisión y una espátula. Se ha de pesar el peso de cada vaso de precipitados vacío, y después el de la muestra con el vaso tarado. Una vez estén los vasos con la muestra, se introducen otra vez en el horno durante 24 horas a unos 100°C.

Con estos cálculos se obtiene el porcentaje de humedad, y, por tanto, la materia seca.

$$\text{Humedad}(\%) = \frac{\text{muestra inicial (g)} - \text{muestra seca (g)}}{\text{muestra inicial (g)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Materia seca}(\%) = 100 - \text{Humedad}(\%) \quad (3)$$

En la muestra que es líquida, se obtiene de otra forma distinta, pesando un gramo de muestra en un plato con arena y mediante el analizador de humedad líquida, se calcula automáticamente el porcentaje de humedad que posee.

4.4 POLIFENOLES TOTALES. FOLIN-CIOCALTEAU REAGENT.

El método para calcular los polifenoles totales es el método de Folin Ciocalteu (ISO 14502-1). Es un método colorimétrico que se caracteriza por ser simple, rápido y fiable.

Está basado en la oxidación selectiva de los compuestos fenólicos cuando son sometidos a diferentes reactivos. Los polifenoles presentes en la muestra pueden reducir el reactivo de Folin. La muestra se lee a 765 nm y los resultados se expresarán en equivalentes de ácido gálico. Se utiliza como solvente el agua y como patrón ácido gálico 300 ppm.

4.4.1 Preparación de los reactivos

Se realizan dos reactivos diferentes; Reactivo de Folin al 10% en volumen y Na_2CO_3 al 7,5%.

Para Folin se preparan 5 mL de la disolución; por lo que se mide 0,5 mL del reactivo y se enrasa con agua de análisis hasta los 5 mL.

Del carbonato sódico al 7,5% se preparan 500 mL, por lo que se pesan 37,5 g del reactivo y se introducen en un matraz aforado de 500 mL, que se enrasa con agua de análisis.

4.4.2 Preparación de las muestras y recta de calibrado

Como he especificado antes, para la realización de la recta de calibrado se parte de patrón de ácido gálico 300 ppm, y preparamos seis puntos para la recta.

Se pesa cada muestra por duplicado pesando una cantidad de aproximadamente 0,10 y 0,15 g y añadiendo 10 mL de agua. A continuación, se realizan disoluciones de los extractos, del E1; 1:10,1:20 y 1:25 y del E2 y E3; 1:20,1:25 y 1:40. En cuanto a la muestra comercial líquida se realizan 3 diluciones 1:10,1:25 y 1:40. Se introduce en el agitador 30 minutos y una vez agitado se filtran todas las muestras con filtros de jeringa del MCE.

4.4.3 Método analítico

Para este método se utiliza espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible y se usa el espectrofotómetro SPECTROstar nano, la figura 4.6 es el espectrofotómetro que se utiliza en el laboratorio.



Figura 4.6 Espectrofotómetro SPECTROstar nano.

Se utilizan celdillas de 200 μ L en una placa de pocillos. Por lo que en cada celdilla se añade en orden Muestra, Carbonato, Folin:

-Muestra y curva de gálico: en 200 μ L se dispensan 20 μ L.

-Folin Ciocalteu: en 200 μ L se dispensan 100 μ L.

- Na₂CO₃: en 200 μ L se dispensan 80 μ L.

Cuando están preparadas las celdillas se tapa con papel de aluminio y se hace reaccionar durante aproximadamente 1 hora para que los polifenoles interactúen con el reactivo de Folin. A continuación, se introduce la placa de pocillos en el espectrofotómetro y se lee la absorbancia a 765 nm. Por tanto, para cada pocillo se obtiene una absorbancia y con ello se calcula la cuantificación de polifenoles, teniendo en cuenta que es proporcional a la concentración.

Primero se realizará la recta de calibrado con las concentraciones y absorbancias de las muestras de ácido gálico. Y a continuación se sacará el porcentaje de ácido gálico.

$$\text{Absorbancia} = m \times \text{ácido gálico (ppm)} + n \quad (4)$$

$$\text{Ácido gálico(\%)} = \frac{\text{ácido gálico (ppm)}}{\text{Concentración inicial de muestra (ppm)} \times 100} \quad (5)$$

4.5 MÉTODO HPLC-DAD

En un principio la cromatografía HPLC se utilizó para analizar ácido clorogénico y proantocianidinas como equivalentes de PB2, tras realizar los análisis, se observó que el PB2 no daba buenos resultados en la cuantificación, y que lo podíamos medir mediante Folin, así que cuantificamos flavan-3-oles mediante un patrón de epicatequinas, y así se obtiene el análisis de los principales componentes del Espino Blanco.

4.5.1 Selección método

La técnica de HPLC tiene diversos métodos y condiciones de operación dependiendo de la muestra que se quiere analizar. Por tanto, el primer paso será hacer una búsqueda bibliográfica para saber el método más adecuado para identificar y cuantificar los compuestos que interesan.

Tras la búsqueda se seleccionaron dos alternativas posibles, de las cuales se realizaron una prueba pinchando dos muestras para ver si se veían bien los compuestos en el cromatograma.

Método 1: Este método es característico del Espino Blanco procedente de China. Se utiliza como columna Hypersil C18 del BDS (élite Analytical Instruments Co., Dalian, China), las fases que se usan son; ácido fórmico del 0,05% como fase móvil A, y metanol: se empleó acetonitrilo (23:77 v/v) como fase móvil B. El gradiente es de 0-8 min con 14% B, 8-15 min con 14-18% B, 15-25 min con 18% B, 25-28 min con 18-50% B, 28-33 min con 50% B, 33-35 min con 50-14% B, y 35-50 min con 14% B a una temperatura de 25°C con flujo de 0,8 mL/min y a una longitud de onda de 330 nm y volumen de inyección de 2 µL. Este procedimiento se ha utilizado para realizar la prueba con disolvente que se detalla más adelante. (Tong Cui, n.d.)

Método 2: En este método se utiliza como columna LiChroCart, 250-4, Hypersil ODS (5 m) Merck, como fases se toma de fase A 2,5% de ácido acético en agua y como fase B acetonitrilo / 2,5% de ácido acético en agua (80:20). De gradiente en este método especifica tres, pero en este caso se ha utilizado el siguiente: 5-50% en 35 minutos de fase B, 50-100% en 40 minutos fase B, con flujo de 1 ml/min y una longitud de onda de 330 nm, como patrón tomamos los mismos que en el método anterior, ya que se va a cuantificar lo mismo, y como disolvente metanol 100%. (Svedström et al., 2006)

4.5.2 Método final

Tras realizar las pruebas pertinentes en el HPLC se determina que el método que se va a utilizar para identificar y cuantificar ácido clorogénico y flavan-3-oles como equivalentes de epicatequinas es el método número 2, ya que es más completo y en los cromatogramas se distinguen bien los picos y los compuestos, además la columna es más accesible en el laboratorio.

4.5.3 Selección disolvente para análisis HPLC

Pese a que el método seleccionado admite como disolvente metanol puro al 100%, se va a realizar una prueba con distintos disolventes, para ver en que se disuelve mejor el Espino Blanco, y así realizar las pertinentes diluciones con el más favorable. Probamos con metanol puro 100%, metanol al 20% y dimetilsulfóxido. Por tanto, se pesan unos 10 mg de las muestras (las tres muestras de hojas y raíces, los tres extractos y los comerciales) y lo disolvemos con los tres tipos de diluciones, se ponen en el agitador 30 minutos, se filtran y se introduce la secuencia en el HPLC.

Como es una prueba no se llegaron a integrar los picos y a sacar la concentración en los cromatogramas, pero se observó que en los tres disolventes hay claridad respecto a los

picos, al ser todos los disolventes tan similares, se optó por ceñirnos al disolvente que especificaba el método (metanol al 100%).

Por tanto, esta prueba se realizó para ver si el disolvente se ajustaba a lo que necesitábamos o si había otro disolvente del que disponíamos en el laboratorio con el que se observarían mejores resultados, pero no hubo ningún disolvente que sobresaliera por sus resultados por lo que nos ajustamos a la inicial.

4.5.4 Preparación de las fases móviles (HPLC)

Como ya se ha explicado antes (4.5.1), la fase A está formada por 2,5% de ácido acético en agua y la B es acetonitrilo, 2,5% ácido acético (80:20).

En este caso se prepararon 2 L de fase A, lo que significa medir 50 mL de Ácido acético (en campana y con las medidas de seguridad adecuadas) y 1950 mL de agua en una probeta, mezclarlos en la botella que se usará en el HPLC. Se agita y se introduce unos segundos en ultrasonidos y con esto estaría realizada la fase A.

Para la fase B se añade en una probeta 1600 mL de acetonitrilo y 400 mL de la fase A, se mezcla, se agita bien y se introduce en ultrasonidos.

El mismo HPLC especifica cuánta cantidad de fases necesita para pasar toda la secuencia, es mejor siempre preparar fase de más, ya que es importante realizar una auto purga de las fases, y este proceso gasta más cantidad.

4.5.5 Preparación de las muestras

El primer paso será la preparación de los patrones, en este caso se preparan dos patrones; ácido clorogénico 1030 ppm y epicatequina 1000 ppm, ambos disueltos en metanol. Se realizan 7 puntos de entre 1030 y 20,6 ppm para el clorogénico y 6 puntos de entre 1000 y 40 ppm de la epicatequina. Se realizan en viales aptos para HPLC y se agitan en un vortex antes de insertarlas en el equipo.

La preparación de las muestras se realiza de una manera muy similar al método para extraer polifenoles. Se pesan dos repeticiones de cada muestra. Para las hojas y raíces y para la muestra comercial en tabletas se pesa alrededor de 0,5 y 1 g, para extractos se pesarán aproximadamente 0,2 y 0,3 g. Para la muestra comercial en líquido se realizarán dos diluciones 1:5 y 1:10. Las muestras de hojas y raíces han sido previamente molidas para facilitar la extracción.

Se añaden 10 mL de metanol y se introduce en el agitador orbital durante media hora a 480 rpm, y una vez agitadas se filtran las muestras con una jeringa de plástico y filtros de membrana MCA (de Nylon) de 0.45 μm de tamaño del poro.

Estas muestras se ponen directamente en viales para HPLC y se introducen para el análisis.

4.5.6 Método analítico y obtención de resultados

En la siguiente foto está representado el equipo HPLC del que disponemos en el laboratorio, *Agilent 1260 Infinity II* y mediante el cual se han realizado los análisis (figura 4.7).



Figura 4.7 Equipo HPLC

Para que el HPLC disponga de un método con las características que se requieren para el Espino Blanco hay que crearlo en el software LABsolutions. El primer paso es introducir las características del método:

-Columna: LiChroCart, 250-4, Hypersil ODS (5 m) Merck Agilent.

-Fases: fase A 2,5% de ácido acético en agua y como fase B acetonitrilo / 2,5% de ácido acético en agua (80:20).

-Gradiente: 5-50% en 35 minutos de fase B, 50-100% en 40 minutos fase B.

-Detección a 330 nm.

-Flujo: 1mL/min.

-Volumen de trabajo: 2 μ L.

Una vez introducida toda la información en el software se procede a realizar una limpieza del equipo para evitar la suciedad residual de otros análisis. Hay que purgar cada canal por el que pasan las dos fases. A continuación, se realiza una auto purga con las condiciones del método, tarda aproximadamente 20 minutos.

Una vez el equipo está purgado y listo se introducen las muestras que se quieren analizar (hojas y raíces, extractos, muestras comerciales y rectas de calibrado) y se crea la secuencia del análisis.

El equipo una vez ha analizado las muestras obtiene un cromatograma de cada una y el espectro UV que se obtiene de cada molécula para la longitud de onda determinada. A través de los patrones se podrán cuantificar estos compuestos.

El primer paso será la identificación de los compuestos. Lo que se obtiene del HPLC es un cromatograma, que está compuesto por una serie de picos de longitud y área distinta. Estos picos han de ser identificados a las longitudes de onda a las cuales se analizan los

compuestos que son de interés, en nuestro caso ácido clorogénico a 330 nm y epicatequinas a 280nm. El parámetro de identificación que se utiliza es el tiempo de retención, ya que cada compuesto tiene uno característico. Además, también hay que guiarse por los patrones, ya que el tiempo de retención puede variar dependiendo de las condiciones de trabajo.

Una vez se identifican los compuestos, el siguiente paso es su cuantificación, que se basa en la integración de los picos para obtener el área, se integran los picos de los patrones para realizar las dos rectas de calibrado. El área que se obtiene es proporcional a la concentración del compuesto en la muestra. Por ello, se obtiene una ecuación con la que se podrán cuantificar los compuestos de interés en todas las muestras.

$$\text{Área pico} = m \times \text{Concentración (ppm)} + n \quad (6)$$

4.6 CONTENIDO EN PROANTOCIANIDINAS (PAC's)

Como hemos observado que el Espino Blanco contiene niveles relevantes de proantocianidinas, y que estas son difíciles de observar en HPLC debido al estado de los picos, realizaremos un método de butanólisis (análisis de PAC's) y mediante espectrofotometría cuantificamos también los resultados. (Porter et al., 1985)

Realizaremos esta prueba con los extractos comerciales y con nuestros extractos hechos en el laboratorio, puesto que las diluciones de las hojas están menos concentradas. Nuestro patrón va a ser Procianidina B2, y la disolución madre inicial de 200 ppm. Tras realizar varias pruebas nos dimos cuenta de que a 200 ppm la recta de calibrado perdía la linealidad, por lo que bajamos la concentración a 100 ppm.

PROCEDIMIENTO:

Preparación de los reactivos

Se necesitan preparar dos reactivos. El sulfato de amonio férrico y el But-HCL (5%).

Para el sulfato de amonio férrico se pesaron 0,2 g de sulfato de amonio férrico y se enrasa con 10 mL de ácido clorhídrico 2 M, este reactivo necesita estar en condiciones de oscuridad por lo que se tapa con papel de aluminio.

Para el But-HCL (5%) se necesitarán 25 mL de ácido clorhídrico y 475 mL de butanol, esta disolución se realiza en campana y con las condiciones de seguridad adecuadas (gafas, guantes de laboratorio).

Preparación muestras:

Pesamos las muestras, tanto de nuestros extractos como del producto comercial en pastillas, que como se ha explicado previamente lo secamos y lo tenemos en polvo. Hay que pesar aproximadamente 0 '02 g. El extracto comercial líquido lo realizaremos haciendo dos diluciones 1:40. Enrasamos con metanol en un matraz de 25 mL, agitamos en el agitador orbital durante 30 minutos y se filtra. Añadimos las cantidades expresadas en la tabla 4.1:

Tabla 4.1 Butanólisis.Métodología.

	But-HCL (5%)	sulfato de amonio férrico	Muestra	Metanol
Blanco	6 mL	0,2 mL	-	1 mL
Patrones	6 mL	0,2 mL	-	-
Diluciones muestra extractos	6 mL	0,2 mL	1 mL	-
Diluciones muestra Líquida	6 mL	0,2 mL	1 mL	--
Meter al baño a 90 °C durante 1 hora (tapar con papel de aluminio)				
Atemperar unos 20 minutos				
Medir absorbancia a 546 nm				

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 HUMEDADES

En la tabla 5.1 se muestran las medias de los resultados de humedades. Cabe destacar que por facilidad a la hora de realizar los cálculos se estableció un contenido medio de 95%.

Tabla 5.1 Tabla resultados humedades

% de humedad en las muestras y extractos	
Muestra 1	95,44±0,01
Muestra 2	93,24±0,23
Muestra 3	95,43±0,10
Extracto 1	94,96±0,33
Extracto 2	91,03±0,44
Extracto 3	97,45±1,27

5.2 POLIFENOLES TOTALES

Lo primero que se obtiene es la recta de calibrado de ácido gálico, gráfica 5.1, a partir de estos resultados se interpola para sacar los polifenoles totales en el Espino Blanco.

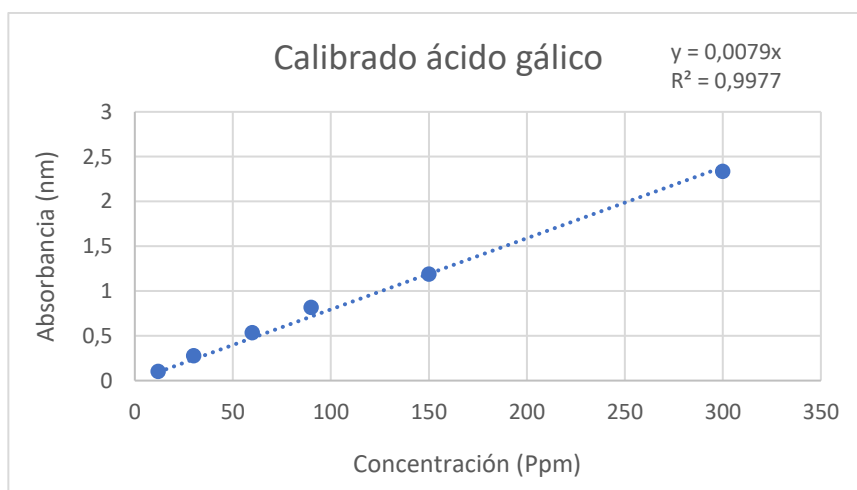


Gráfico 5.1 Calibrado ácido gálico.

Los resultados obtenidos de polifenoles cuantificando como equivalentes de ácido gálico para hojas, extractos y muestras comerciales vienen recogidos en la tabla 5.2:

Tabla 5.2 Tabla resultados polifenoles

		hojas	extractos	comercial
media g ácido gálico/100 g (BS)	1	1,35 ± 0,17	12,76 ± 0,92	1,24 ± 0,03
	2	1,14 ± 0,23	15,34 ± 0,81	17,36 ± 1,63
	3	1,76 ± 0,53	16,74 ± 1,12	-

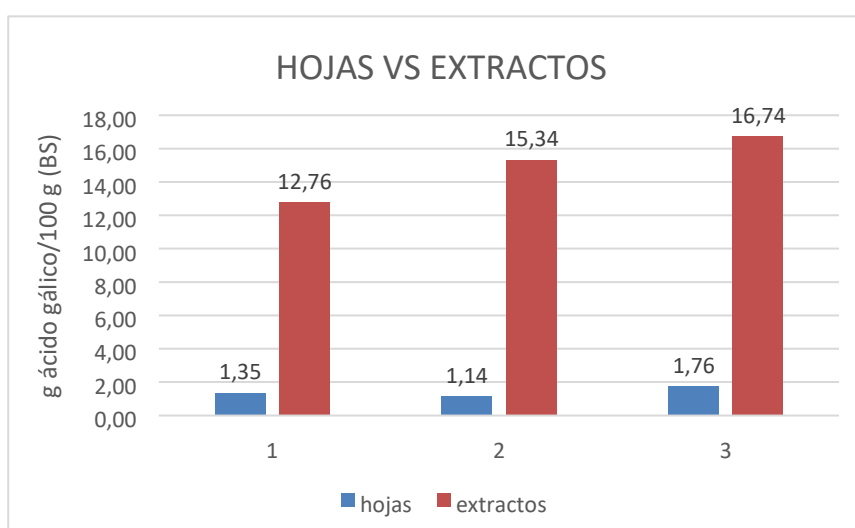


Gráfico 5.2 Gráfico hojas vs extractos.

En la gráfica 5.2 se representa la comparativa de los polifenoles obtenidos en las hojas y los obtenidos en sus respectivos extractos, siendo 1 la muestra 1 (extractos y hojas), 2 la muestra 2 y 3 la muestra 3. La cantidad de polifenoles obtenida en las muestras de hojas es bastante similar entre sí, alrededor del 1-2%, siendo la más concentrada en polifenoles la muestra 3 con un 1,76%, lo que coincide con los extractos, ya que la muestra 3 también es la que más polifenoles contiene (16,74%).

Los extractos tienen mucha más cantidad de polifenoles, lo que cabría esperar ya que son concentrados de las hojas y por ello tienen mayores cantidades en sus componentes.

En cuanto a las muestras comerciales, la muestra 1, que corresponde a las tabletas, tiene una cantidad muy baja de polifenoles (1,24%), similar a la de las hojas, mientras que la 2, que es el líquido, tiene una cantidad elevada y más similar a la de los extractos (17,36%). Si estas muestras comerciales se vendieran con el objetivo de ser beneficiosas por su cantidad de polifenoles, la muestra líquida sería mucho más efectiva.

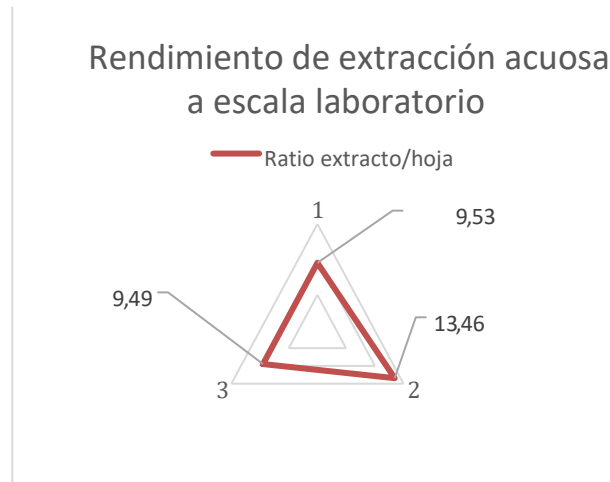


Gráfico 5.3 Ratio de extracción de las hojas y los extractos.

En cuanto al ratio de extracción, como se puede observar en el gráfico 5.3, la mayor ratio extracto/hoja se obtiene de la muestra 2, un 13,46, lo que quiere decir que se extraerá más cantidad de polifenoles con la misma cantidad de muestra de hojas, las otras dos muestras tienen una ratio mucho menor, los dos entornos al 9,5, por lo que si interesara una muestra que tuviera un buen rendimiento en las extracciones, consideraríamos la muestra 2 como referencia.

5.3 MÉTODO PROANTOCIANIDINAS

Se realiza una recta de calibrado del PB2 (procianidina B2), que corresponde con el gráfico 5.4. En este método y con estos datos en concreto se usa la recta sin dos puntos que se realizaron, ya que es la que da la R más ajustada (más cerca de 1), hacemos pasar nuestra recta por 0 y obtenemos el valor de X, que es el que usaremos para sacar la concentración mediante interpolación con el valor de la absorbancia. (Porter et al., 1985)

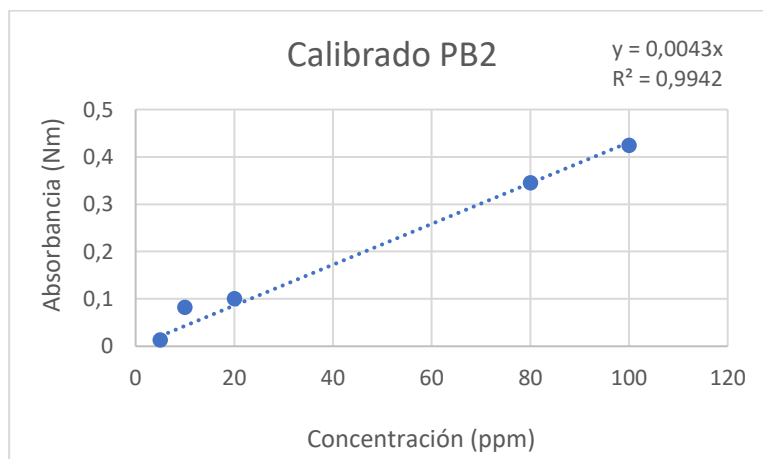


Gráfico 5.4 Recta de calibrado PB2.

La tabla 5.3 expresa el resultado tras la interpolación del porcentaje de proantocianidinas en las muestras de extractos y extractos comerciales.

Tabla 5.3 Tabla resultados butanolisis.

Muestra	g PACs /100 g (BS)
Extracto 1	3,56 ± 0,18
Extracto 2	3,60 ± 0,22
Extracto 3	4,87 ± 0,16
Tableta 1	0,97 ± 0,02
Líquido 1	1,78 ± 0,37
Líquido 2	2,43 ± 0,35

Como se puede observar en la tabla y en los gráficos 5.5 y 5.6 (donde E son los extractos, T la muestra comercial en tabletas y L la muestra comercial líquida), el porcentaje de proantocianidinas de los extractos es de alrededor del 3-4 % siendo el que mayor porcentaje tiene el extracto 3, superando el 4,5 %.

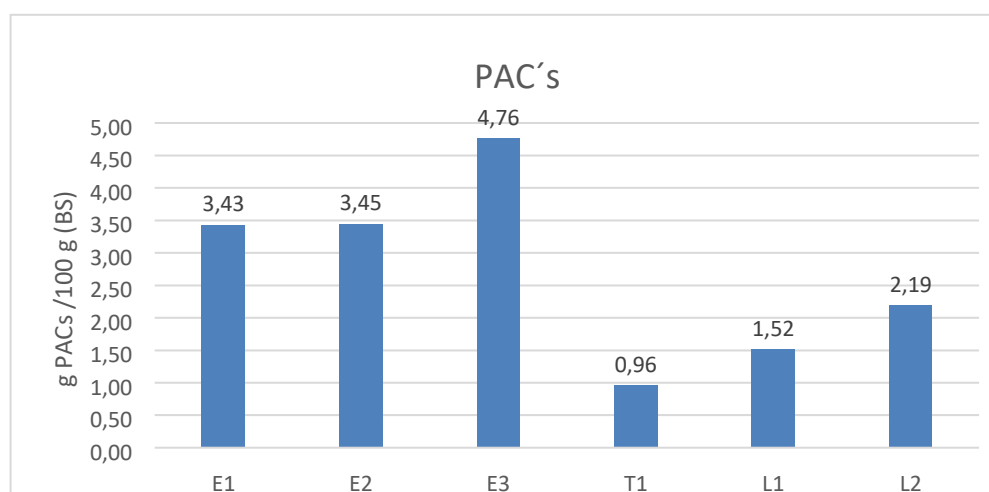


Gráfico 5.5 Gráfico de las muestras y su contenido en proantocianidinas.

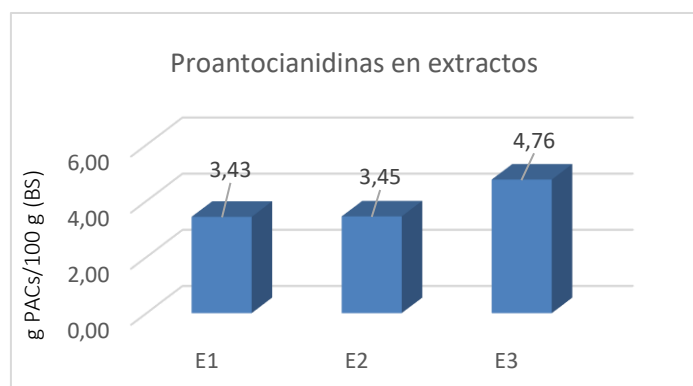


Gráfico 5.6 Contenido de proantocianidinas en los extractos.

Este es un resultado que cabe esperar, ya que como se ha especificado antes, el extracto 3 también es el que tiene más polifenoles, y está más concentrado en cuanto a sus componentes.

En cuanto a los extractos comerciales, los resultados son similares a los de polifenoles, las tabletas contienen un porcentaje de PAC's muy bajos, sobre el 1,5%, mientras que los del líquido sí que se asemejan más a nuestros extractos realizados en el laboratorio, aunque son también bastante bajos, ya que ninguna de las dos pruebas de líquido comercial supera el 2% en proantocianidinas. Cabe destacar que el método de la butanólisis se realizó dos veces, una de ellas sin filtrar y otra filtrando, y los resultados fueron mucho más ajustados una vez filtramos todas las muestras.

5.4 HPLC

5.4.1 Compuestos mayoritarios y su identificación en el cromatograma.

La prueba con el HPLC se realizó varias veces, primero, se intentaron cuantificar proantocianidinas y ácidos clorogénicos, pero en las proantocianidinas no se distinguían bien los picos y se decidió cuantificarlas mediante la butanólisis y con el HPLC hacer una prueba a ver si se podía identificar y cuantificar flavan-3-oles y derivados con epicatequina como patrón. Así que los patrones son ácido clorogénico y epicatequinas.

ÁCIDO CLOROGÉNICO:

Lo primero que se realiza es la recta de calibrado del componente que vamos a cuantificar para luego a partir de la ecuación cuantificar el compuesto, la recta viene expresada en el gráfico 5.7.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

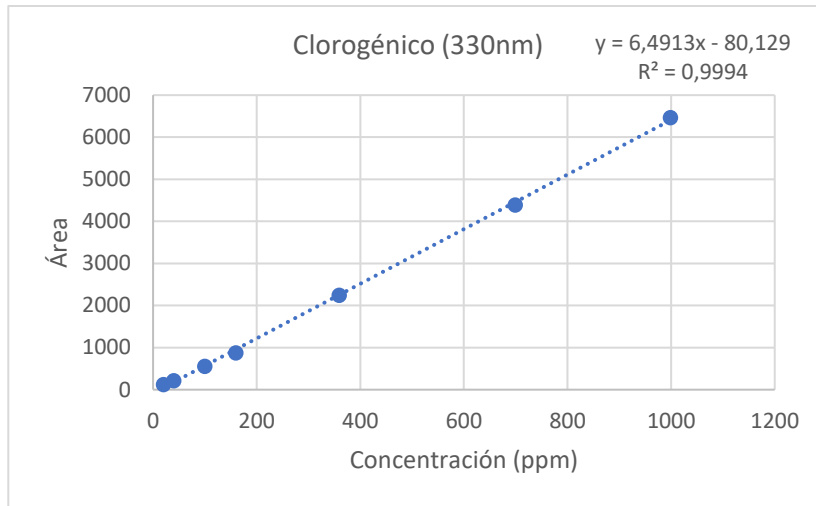


Gráfico 5.7 Recta de calibrado ácido clorogénico.

Cuando las muestras se han pinchado en el HPLC, se procede a realizar el análisis de lo que se ha obtenido. A partir del cromatograma que nos facilita el HPLC se tendrán que integrar los picos de los compuestos a analizar. Cada pico corresponde a un compuesto. Este procedimiento es necesario realizarlo en todas las muestras.

En las figuras 5.1,5.2,5.3 y 5.4 se muestran ejemplos de los cromatogramas de las hojas, de los extractos, y de las muestras comerciales.

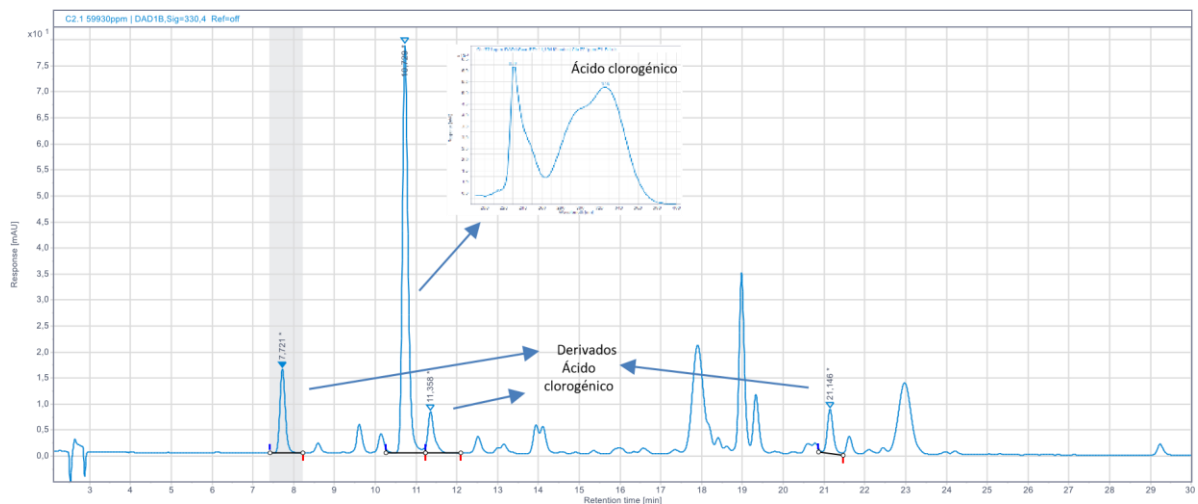


Figura 5.1 Ejemplo de cromatograma muestra de hoja.

Como se puede observar, mediante los tiempos de retención y los espectros es fácil identificar los distintos picos. El pico con tiempo de retención sobre 10,5 minutos corresponde al pico principal de ácido clorogénico, el resto de los picos se cuantifican como derivados.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

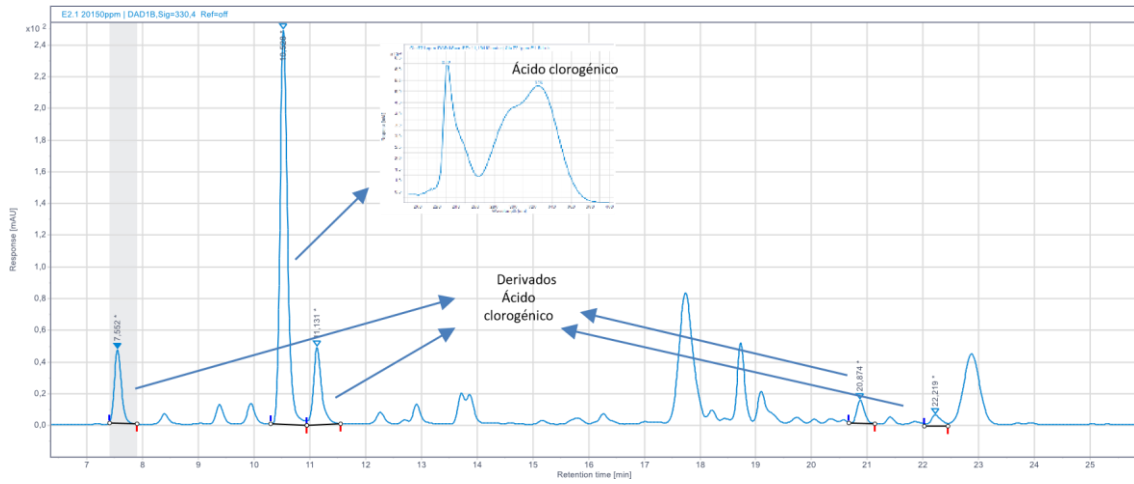


Figura 5.2 Ejemplo de cromatograma muestra de extracto.

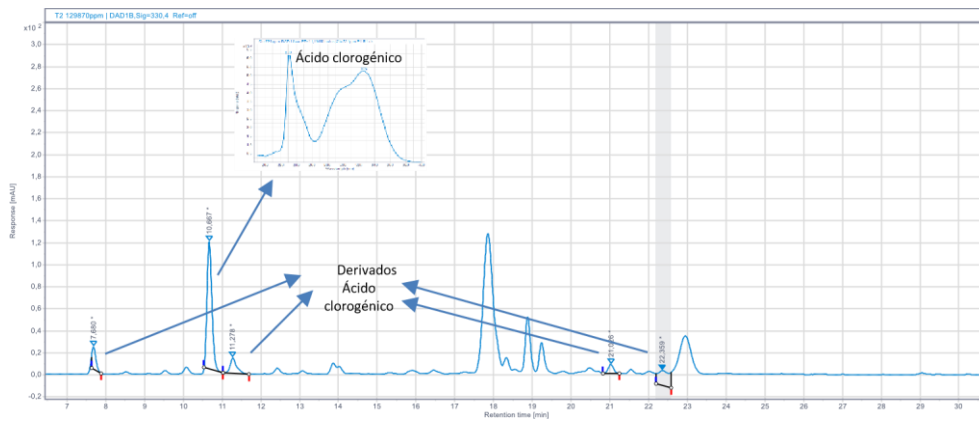


Figura 5.3 ejemplo de cromatograma de muestra comercial en tabletas.

Se observa que en el cromatograma de la muestra comercial en tabletas los picos están mucho más bajos, por lo que la muestra está menos concentrada, y tendrá menos % de clorogénicos.

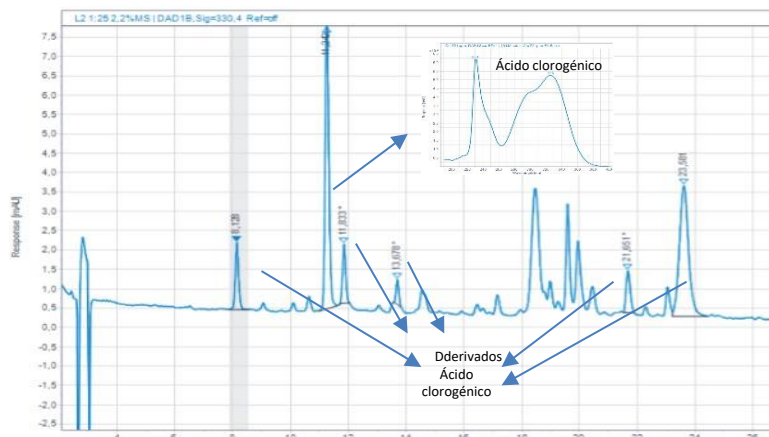


Figura 5.4 ejemplo de cromatograma de muestra comercial líquida.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

En la muestra comercial líquida se puede apreciar como los tiempos de retención están ligeramente por encima del resto de cromatogramas, pese a ello, se puede identificar claramente el pico de clorogénico y sus derivados.

A continuación, se muestra cómo sería el espectro de la sustancia que vamos a analizar (figura 5.5); el ácido clorogénico. Cada pico que tenga estas características se va a identificar como clorogénico y derivados. Tener el espectro nos ayuda a la identificación de aquellos picos que son más difíciles de observar.

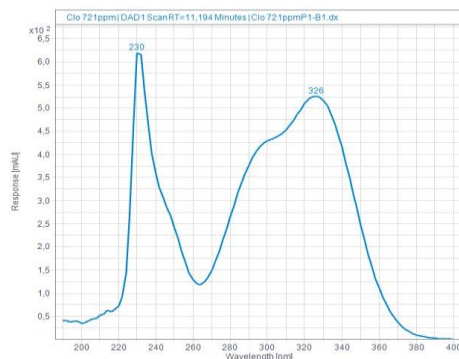


Figura 5.5 Espectro de ácido clorogénico 330 nm.

Una vez obtenido el cromatograma, se saca el tiempo de retención, un área y un porcentaje de área. Con estos datos más la ecuación de la recta obtenida se puede sacar la concentración, como se ha descrito previamente.

A continuación, en la tabla 5.4 se representan los resultados tanto de hojas como de extractos como de las muestras comerciales.

Tabla 5.4 Tabla resultados cuantificación clorogénicos.

	Hojas	Extractos
Muestra	g clorogénico/100 g (BS)	g clorogénico /100 g (BS)
Muestra 1	0,36 ± 0,07	2,47 ± 0,14
Muestra 2	0,42 ± 0,01	2,99 ± 0,15
Muestra 3	0,34 ± 0,02	2,51 ± 0,18
Muestra comercial pastillas	-	0,25 ± 0,03

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

Muestra comercial líquida	-	2,38 ± 0,42
---------------------------	---	-------------

Se puede observar en la gráfica 5.8 que la muestra 2 es la que más porcentaje de ácido clorogénico contiene, tanto de extracto como de hojas, ya que de extracto contiene un 2,99% y de hojas un 0,42%, en cuanto a las comerciales, se observa que en las pastillas es casi inapreciable (0,25 %) y en el líquido los valores se asemejan al extracto 1 realizado en laboratorio (2,38%).

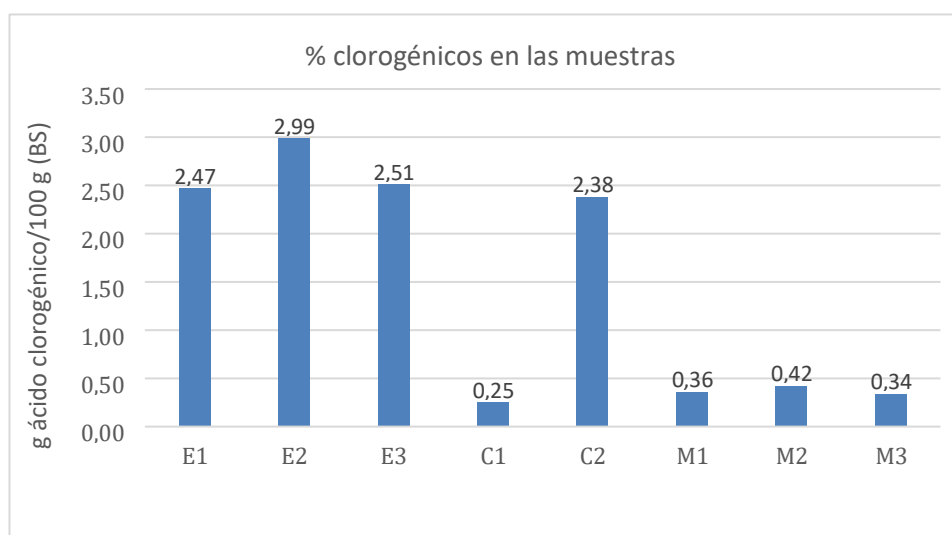


Gráfico 5.8 Gráfico ácido clorogénico en las muestras.

En el gráfico 5.9 se realiza una comparativa de las hojas vs los extractos y como se ha explicado antes los extractos al estar mucho más concentrados contienen más % de clorogénico, así pues, se observa también que la mejor ratio de extracción lo tiene la muestra 2, puesto que la muestra 1 es la 2ª en % en las hojas, pero se extraen más clorogénicos de la muestra 2 en los extractos (2,51%).

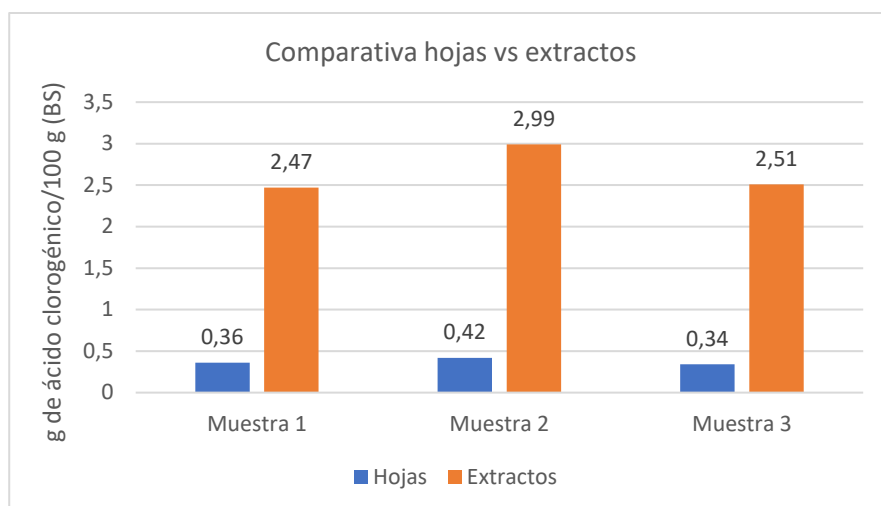


Gráfico 5.9 Comparación hojas y extractos en % clorogénico.

FLAVAN-3-OLES CUANTIFICADOS COMO EQUIVALENTES DE EPICATEQUINA:

Se van a identificar los flavan-3-oles como equivalentes de epicatequinas, como se ha explicado previamente en el apartado 1.2. El primer paso, como en los clorogénicos, es sacar la curva patrón de epicatequinas para, una vez tengamos los picos identificados e integrados, se pueda hallar la concentración, la recta está representada en el gráfico 5.10.

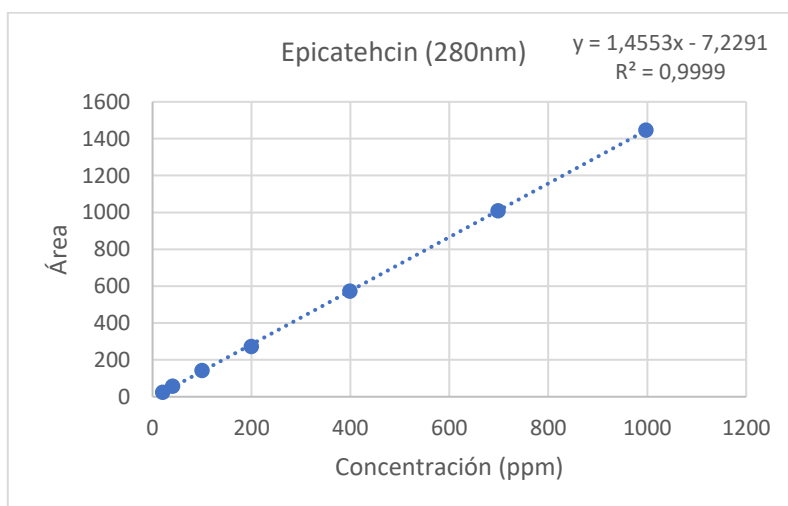


Gráfico 5.10 Gráfico calibrado epicatequinas.

Una vez sacada la recta de calibrado y hallada la ecuación con la que se interpola se han de identificar los picos de epicatequinas y equivalentes, nos podemos guiar a través de los espectros, figura 5.6, que tendrán una determinada forma a la longitud de onda correspondiente.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

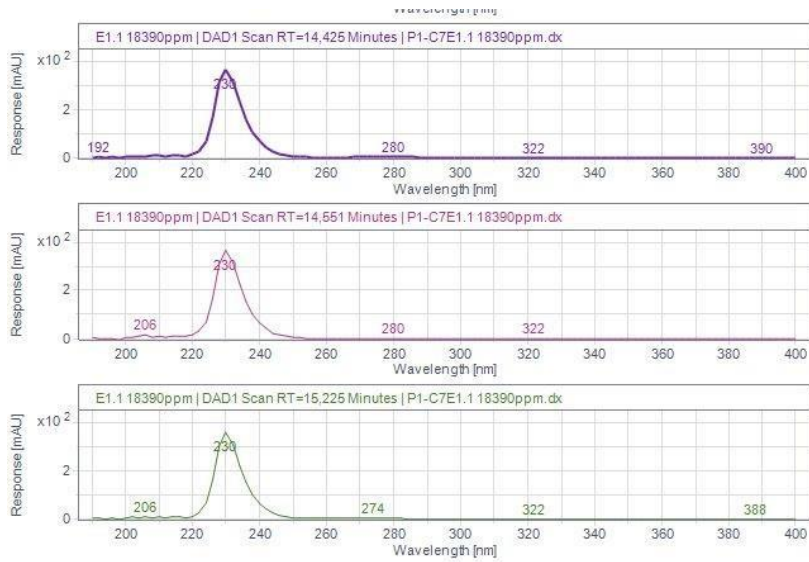


Figura 5.6 Espectro de Epicatequina a 280 nm.

A continuación, en las figuras 5.7 y 5.8 se muestran los ejemplos de cómo se vería el cromatograma de hojas y extractos en la identificación de epicatequinas, que como se puede observar, hay una ligera variación en los cromatogramas.

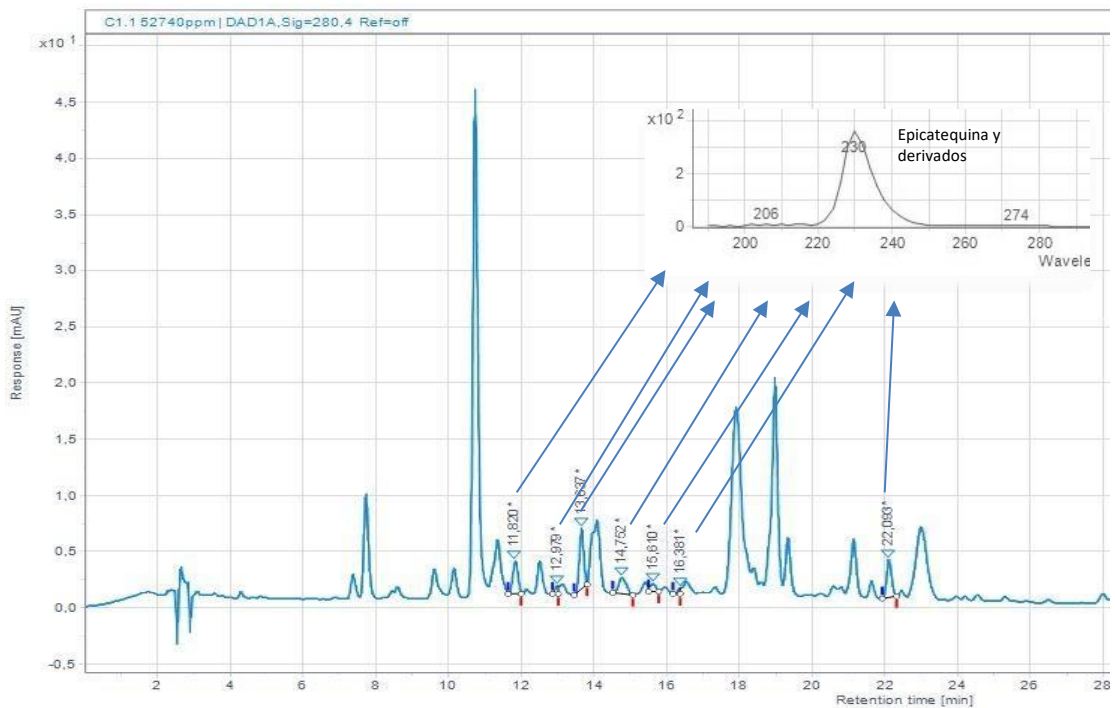


Figura 5.7 Cromatograma epicatequina hojas.

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

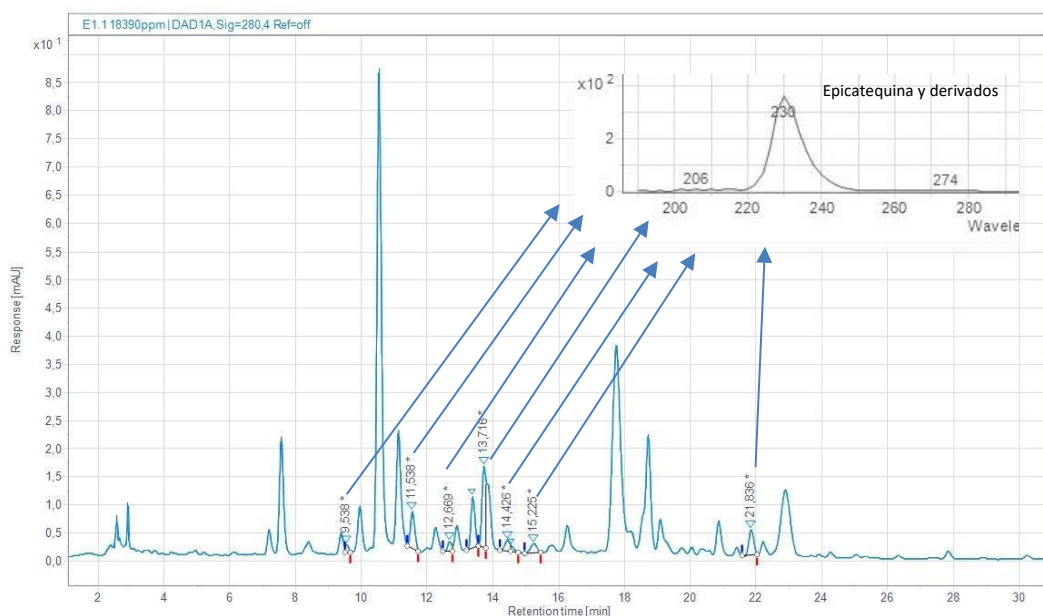


Figura 5.8 Cromatograma epicatequina extractos.

En ambos cromatogramas se identifican las epicatequinas como flavan-3-oles y derivados, como se puede observar, la identificación de los picos es sencilla ya que los tiempos de retención coinciden.

Así que, una vez identificados los picos, se integran como esta explicado previamente y se saca la concentración. A continuación, se muestran los resultados en la tabla 5.5.

Como se puede observar en el gráfico 5.11, el porcentaje de epicatequinas en las hojas es muy inferior a los extractos, ya que están menos concentrado.

Tabla 5.5 Tabla resultados cuantificación epicatequinas.

	Hojas	Extractos
Muestras	g epicatequina/100 g (BS)	g epicatequina/100 g (BS)
Muestra 1	0,24 ± 0,04	1,69 ± 0,06
Muestra 2	0,28 ± 0,01	2,79 ± 0,08
Muestra 3	0,29 ± 0,02	2,45 ± 0,10
Muestra comercial pastillas	-	0,34 ± 0,03
Muestra comercial líquida	-	1,81 ± 0,30

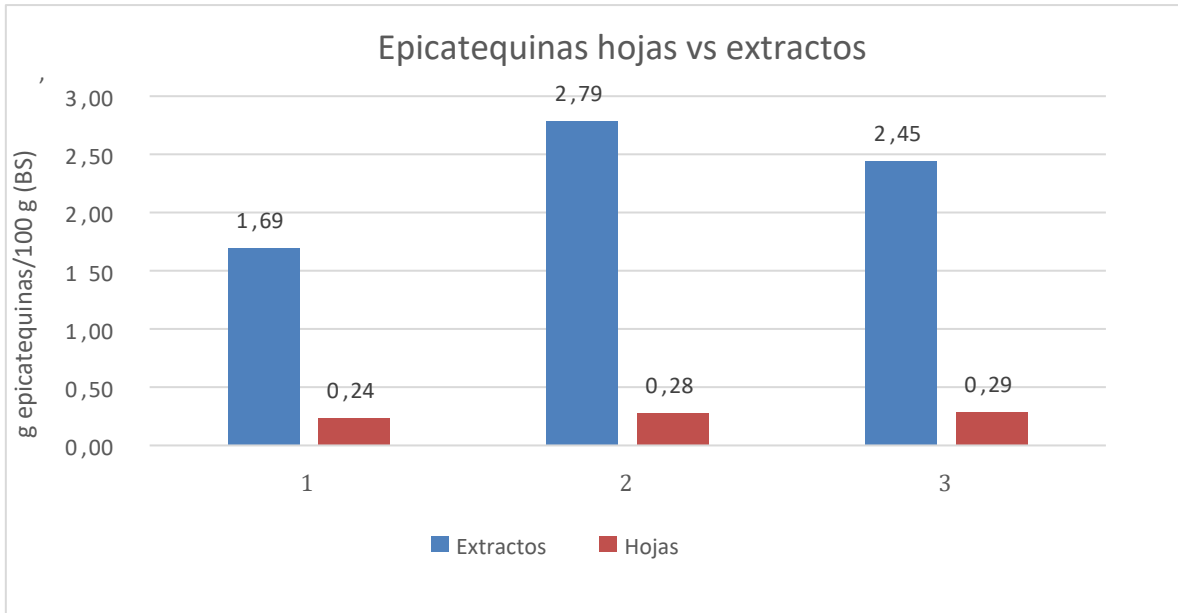


Gráfico 5.11 Gráfico concentración epicatequinas hojas vs extracto

Se observa que la muestra 3 (3) es la que más porcentaje de epicatequinas tiene en las hojas (0,29%), seguido de la muestra 2 (2) muy de cerca (0,28%), mientras que en los extractos es la muestra 2 la que más porcentaje tiene (2,79%), por ello se puede llegar a la conclusión de que el extracto 2 tiene más rendimiento a la hora de realizar la extracción. En las muestras comerciales se observan resultados similares a los de % de clorogénico, la muestra en pastillas contiene muy poco porcentaje mientras que en el líquido se asemeja a los extractos, esta comparativa se muestra en el gráfico 5.12.

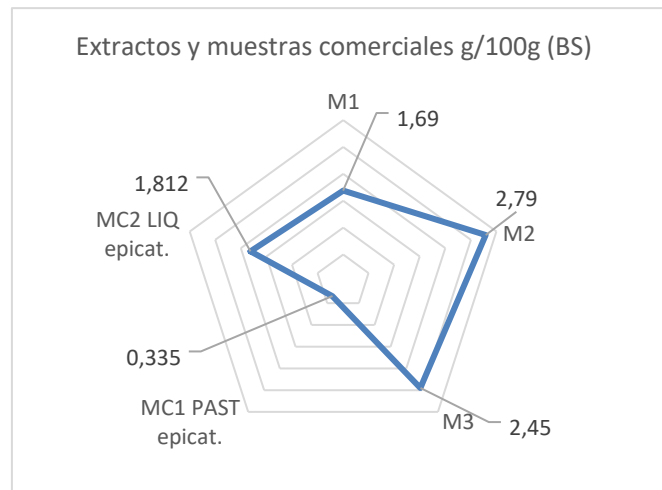


Gráfico 5.12 Gráfico radial concentración epicatequinas extractos y muestras comerciales.

En el gráfico 5.13 se comparan en las hojas las concentraciones de los dos compuestos principales. Se puede observar que no existe una relación aparente, ya que mientras que

la muestra 3 es la que mayor porcentaje de epicatequinas tiene en las hojas (0,29%), en cuanto a ácido clorogénico, es la muestra 2 la que más contiene (0,42%).

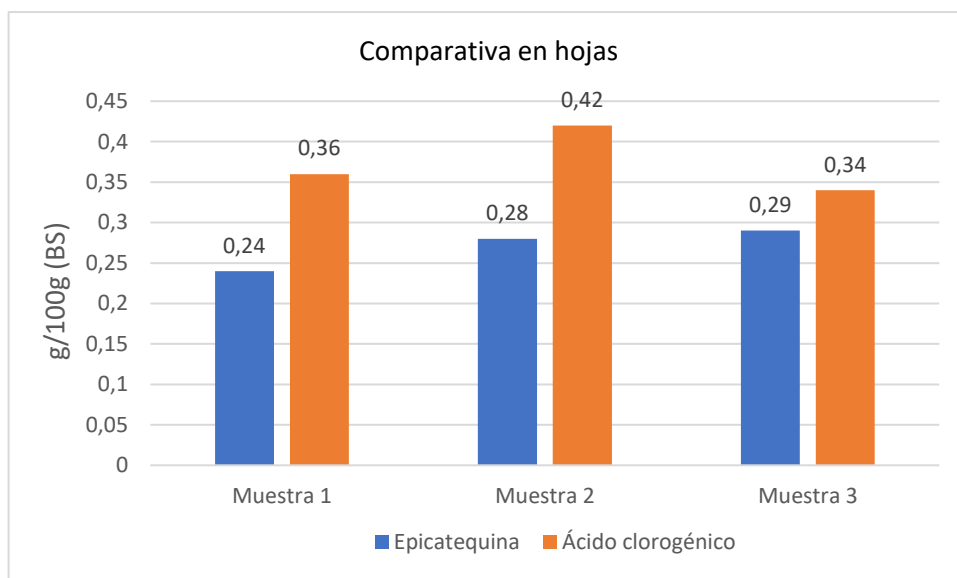


Gráfico 5.13 Gráfico comparativo concentración epicatequinas y ácidos clorogénicos en hojas.

A continuación, se procede a realizar el mismo gráfico 5.14, pero en los extractos. Se observa que la muestra 2 es la que más % en ase seca posee tanto de epicatequinas como de clorogénico contiene, 2,79% y 2,99%.

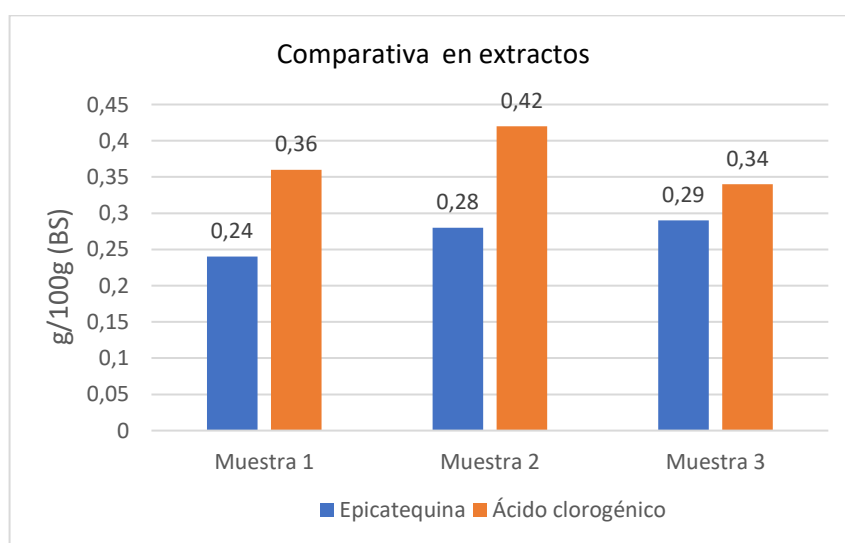


Gráfico 5.14 Gráfico comparativo concentración epicatequinas y ácidos clorogénicos en extractos.

El ácido clorogénico, sí que es la muestra 2 la que tiene más porcentaje, igual que en las hojas, mientras que en % de epicatequinas es la muestra 2 la que presenta más cantidad,

al contrario que en las hojas, que era la muestra 3. Pero como se ha concluido antes, al ser la diferencia de tan poco, y teniendo muestra 2 mejores resultados en sus extracciones, se podría considerar la muestra y el extracto de referencia.

En cuanto a las muestras comerciales, se observa en el gráfico 5.15 que los porcentajes en las muestras en pastilla son muy bajos 0,335 y 0,3 % y por tanto es difícil cuantificarlos, en la muestra líquida sin embargo son muy similares a los extractos, con valores de epicatequina de 1,81% y ácido clorogénico 2,7%.

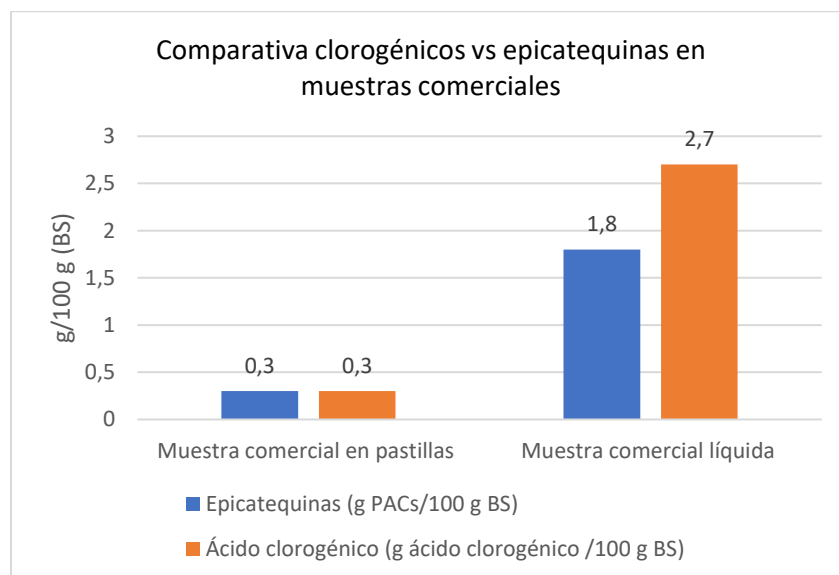


Gráfico 5.15 Gráfico comparativo de la concentración de epicatequinas y clorogénicos en muestras comerciales.

VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se han identificado y cuantificado los principales compuestos bioactivos del Espino Blanco en distintas muestras comerciales, junto a hojas de distintos proveedores y los correspondientes extractos. Entre los análisis realizados, destacan los polifenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, las proantocianidinas totales mediante butanólisis, y por último hemos hecho un estudio en HPLC para analizar ácidos clorogénicos y flavan-3-oles.

Entre las conclusiones, destacan:

- Los compuestos bioactivos se concentran unas 9-10 veces más en los extractos acuosos correspondientes, provenientes de hojas y/o raíces.
- Los extractos contienen principalmente proantocianidinas, junto a ácidos clorogénicos y flavan-3-oles monoméricos (derivados de epicatequina).

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyne* Jacq.)

- Será necesario completar el estudio con más muestras para poder añadir más datos para estudios de correlación.
- Tras realizar el análisis de proantocianidinas, se llega a la conclusión de que el extracto 3 es el que más cantidad de proantocianidinas tiene (g PACs/100 g en base seca), seguido del extracto 2 y por último el 1. En cuanto a las muestras comerciales, son mucho menos concentradas que los extractos obtenidos en laboratorio. por lo tanto, la preselección de materia prima es fundamental para obtener el producto deseado.
- Con respecto al contenido en polifenoles totales, la muestra 3 de hojas mostró un contenido mayor, al igual que el extracto correspondiente. En cuanto a los comerciales, siguen la misma tendencia que las PACs, la muestra líquida es la más concentrada en polifenoles.

En cuanto a los resultados obtenidos por HPLC, se destacarían las siguientes conclusiones:

- Para la identificación y cuantificación de ácido clorogénico y sus derivados se observa que la muestra con más concentración (g ácido clorogénico/100 g en base seca) es la muestra 1 de hojas. El contenido en las muestras comerciales, al igual que en las pruebas anteriores, resultó en un contenido muy bajo de este grupo de compuestos bioactivos comparando con las muestras obtenidas a escala laboratorio.
- Con respecto al contenido en flavan-3-oles monoméricos, la muestra 2 es la más concentrada, al igual que el extracto correspondiente.

Por tanto, haciendo un análisis general de todas las muestras y cogiendo los extractos de cada una de ellas, viendo los porcentajes de los componentes, y las propiedades de cada una de las muestras, si se tuviese que seleccionar una muestra para su uso como materia prima, se podrían elegir las muestras 2 o 3. Probablemente, los extractos correspondientes serán más concentrados en este tipo de compuestos y, por tanto, probablemente una mayor actividad biológica.

VII. PLAN DE FUTURO

Este trabajo de final de grado ha servido como base para la realización de un póster que se presentara en un congreso científico en los próximos meses. A partir de este análisis se realizará un estudio in vivo y se analizan todos los componentes del Espino Blanco. Sería interesante hacer un estudio más global y con extractos obtenidos a nivel industrial, y con más muestras para poder completar posibles correlaciones.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ADM. (n.d.).

Araceli, M., Roldolfo Soberón, J., Alejandro Sampietro, D., & Amelia Vattuone, M. (2010). CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Revista Arakuku*, 1(2), 1–6. www.csnat.unt.edu.ar/academica/publicaciones/revista-arakuku

Bala Jibrin, M. A. (2016). *Pharmacological activities of Crataegus species: A review*.

Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., & Shipley, P. R. (2012). *A review of the chemistry of the genus Crataegus*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>

Fazel Nabavi, S., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., & Nabavi, S. M. (2015). Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients*, 7, 7708–7728. <https://doi.org/10.3390/nu7095361>

Flavanol _ *AcademiaLab*. (n.d.). Retrieved April 27, 2023, from <https://academia-lab.com/enciclopedia/flavanol/>

Martinelli, F., Perrone, A., Yousefi, S., Papini, A., Castiglione, S., Guarino, F., Cicatelli, A., Aelaei, M., Arad, N., Gholami, M., Salami, S. A., Petroni, K., Zyna Budryn, G. , & Zaktos-Szyda, M. (2021). *molecules Botanical, Phytochemical, Anti-Microbial and Pharmaceutical Characteristics of Hawthorn (Crataegus monogyna Jacq.), Rosaceae*. <https://doi.org/10.3390/molecules26237266>

Nazhand, A., Lucarini, M., Durazzo, A., Zaccardelli, M., Cristarella, S., Souto, S. B., Silva, A. M., Severino, P., Souto, E. B., & Santini, A. (n.d.). *Hawthorn (Crataegus spp.): An Updated Overview on Its Beneficial Properties*. 11, 564. <https://doi.org/10.3390/f11050564>

Paez. (2022). *ESPINO BLANCO NOMBRE CIENTÍFICO: CRATAEGUS OXYCANTHA*.

Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)

Saz, P. y T. M. C. (2012). *ESPINO ALBAR Majuelo Crataegus monogynaoxyacantha. Medicina naturista*. 20–24.

Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4.

Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2006). Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.12.080>

Estudio analítico y funcional de extractos de Espino Blanco (*C. monogyna* Jacq.)

Tong Cui, J.-Z. L. H. K. L. M. L.-X. W., and K. N. (n.d.). *Quantification of the Polyphenols and Triterpene Acids in Chinese Hawthorn Fruit by High-Performance Liquid Chromatography*.

Yang, B., & Liu, P. (2012). Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1578–1590. <https://doi.org/10.1002/JSFA.5671>