Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efectos de los compuestos activos y funcionales de la alcachofa (*Cynara cardunculus*) en el control del metabolismo energético

Youssef Ahmiane

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat perJoan Ribot Riutort
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		x		x

Paraules clau del treball:
Cynara cardunculus, *Cynara Scolymus*, ácido clorogénico, metabolismo energético, adipocitos 3T3-L1

INDICE

ABSTRACT/RESUMEN 2

PARTE BIBLIOGRAFICA 2

1. INTRODUCCIÓN 3
   - 1.1. Origen, taxonomía y distribución geográfica de *Cynara Cardunculus* 3
   - 1.2. Descripción botánica o morfológica de la alcachofa 4
   - 1.3. Propagación, cultivo y producción de la alcachofa 4
   - 1.4. Usos tradicionales 5
   - 1.5. Calidad e importancia nutricional 6
   - 1.6. Relación con el metabolismo energético 6
2. OBJETIVOS 7
3. MATERIALES Y MÉTODOS 8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 8
   - 4.1. Compuestos bioactivos de la alcachofa 8
     - 4.1.1. Extracto fenólico 9
       - A. Ácidos fenólicos 10
       - B. Flavonoides 11
       - C. Composición del extracto fenólico 11
     - 4.1.2. Extracto del aceite esencial 13
       - A. Terpenos 13
       - B. Compuestos no terpenoides 15
       - C. Composición del aceite esencial 15
     - 4.1.3. Compuestos destacados 17
       - A. Ácido clorogénico 17
       - B. Cinarina 18
       - C. Luteolina 18
   - 4.2. Evidencias científicas de las propiedades de la alcachofa 19

PARTE EXPERIMENTAL 22

1. INTRODUCCIÓN 22
2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO 22
3. MATERIALES Y MÉTODOS 23
   - 3.1. Células 3T3-L1 y cultivo celular 23
   - 3.2. Diferenciación celular 23
   - 3.3. Tratamiento 23
   - 3.4. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc 23
   - 3.5. Análisis estadístico 24
4. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN 24

CONCLUSIONES GENERALES 26

AGRADECIMIENTOS 27

BIBLIOGRAFÍA 27

ABSTRACT

The artichoke is a typical Mediterranean vegetable that belongs to the species *Cynara cardunculus*, but also grown in some Middle Eastern, Asian and American countries. It is a plant that has been used since ancient times by the Egyptians, Greeks and Romans for its therapeutic properties against liver and digestive disorders, and in the last decade it has been largely studied and a variety of properties against many diseases have been also demonstrated.

The artichoke is composed of a high phytochemical content, mainly phenolic compounds and terpenoids which give various characteristic properties. Among the phenolic compounds include chlorogenic acid, and its derivatives as cynarin, and luteolin, and among terpenoids, cynaropicrin, β-cubebene and caryophyllene. The aim of this work is to know the current status of the characterization of the chemical composition and properties of the artichoke demonstrated on human health.

In addition to the bibliography, a little experiment in vitro was carried out in order to demonstrate the capacity of chlorogenic acid (GCA) in the induction of mouse´s white adipocytes browning, and therefore in the activation of thermogenic program. For the experiment, differentiated 3T3-L1 cells were used and then were treated with different concentrations of GCA (1, 5, 10, 25 and 50 µM) for 24 hours. The results have shown that GCA has a slightly inducing ability of some genes related with browning of white adipocytes at low dose (10 µM), whereas at high dose (50 µM), GCA has no effect on browning.

RESUMEN

La alcachofa es una hortaliza típica de la cuenca mediterránea y pertenece a la especie *Cynara cardunculus*, pero también se cultiva en algunos países de Oriente, Asia y América. Es una planta que se ha usado desde la antigüedad por los egipcios, griegos y romanos por sus propiedades terapéuticas contra patologías hepáticas y digestivas, y durante las últimas décadas se le han atribuido y demostrado una gran variedad de propiedades contra muchas enfermedades.

La alcachofa está compuesta por un alto contenido en fitoquímicos, principalmente por compuestos fenólicos y terpenoides que le otorgan diversas propiedades características. Entre los compuestos fenólicos destacan el ácido clorogénico, y sus derivados como la cinarina, y la luteolina, y entre los terpenoides, la cinaropicrina, β-cubebeno y cariofileno. El objetivo de este trabajo es conocer el estado actual de la caracterización de la composición química y las propiedades demostradas de la alcachofa sobre la salud humana.

Además de la recopilación bibliográfica, también se ha realizado un pequeño experimento con el objetivo de demostrar los efectos del ácido clorogénico (ACG) en la inducción de la marronización de adipocitos blancos maduros de ratón. Se ha utilizado células 3T3-L1 diferenciadas y luego han sido tratadas con el ACG a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 µM) durante 24 horas. Los resultados han reflejado que el ACG tiene una cierta capacidad inductora de algunos genes relacionados con la marronización de los adipocitos blancos a bajas dosis (10 µM), en cambio a altas dosis (50 µM), parece que el ACG no tiene efectos sobre la marronización.

1. INTRODUCIÓN

1.1. Origen, taxonomía y distribución geográfica de *Cynara Cardunculus*

Cynara cardunculus L. es una antigua planta herbácea perene que se originó por polinización cruzada entre especies nativas de la cuenca mediterránea y Macaronesia (Madeira y Canarias) [1,2]. Pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), mayoritariamente son hierbas anuales, perennes, arbustos, pubescentes o glandulares y algunas tienen uso ornamental, medicinal y alimentario [3]. Las plantas del género *Cynara* son angiospermas, dicotiledóneas y diploides con 34 cromosomas (2n=34) [4]

Gracias a los estudios basados en la variación de isoenzimas y marcadores moleculares como los RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) y AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), el género *Cynara* se separó en dos grupos principales [2,5]. El primer grupo es más heterogéneo y está formado por 7 especies que se caracterizan por poseer espinas en sus tallos y cabezas entre los cuales destacan las siguientes: *C. bética*, *C. syriaca* y *C. aurantica*. El segundo grupo comprende las especies de *C. cardunculus* L. [4,6].

C. cardunculus L. contiene tres taxones (subespecies) diferentes: el cardo perenne salvaje (*C. cardunculus subsp. Sylvestris*), el cardo cultivado frondoso (*C. cardunculus subsp. Altilis*) y la alcachofa (*C.cardunculus subsp. scolymus*, a veces denominada simplemente *Cynara scolymus*). *C. cardunculus subsp. sylvestris* ha sido reconocido como el ancestro de los dos últimos taxones gracias a estudios con marcadores AFLP y RAPD [2,6,7]. Estos taxones se diferencian por su morfología, color de las brácteas, forma y presencia de espines [4] (Figura 1).

Figura 1. Cabezas de la alcachofa, cardo silvestre y cardo cultivado respectivamente [4]

El cardo silvestre crece de forma natural en la Península Ibérica, norte de África, oeste de Turquía y en la Macaronesia [2], y también se ha naturalizado en América del Norte y del Sur, y en Australia [8]. El cardo cultivado se cultiva principalmente en Italia, España, sur de Portugal y sur de Francia, y su propagación se lleva a cabo mediante semillas [8,9]. Mientras que la alcachofa se produce en todo el mundo, especialmente en Italia, España, Francia y Turquía, debido a sus cabezas comestibles [5,6].

El nombre botánico de la especie *Cynara* se deriva en parte de la tradición de la fertilización de la planta con las cenizas (en griego "Kynara" y en latín: cinis, cineris), y la subespecie *Scolymus* viene del griego "skolymos" que significa estaca puntiaguda, debido a sus espinas [6].

La alcachofa es nativa del sur de Europa y el Norte de África. Su domesticación se remonta a alrededor de la edad imperial romana, posiblemente, en Sicilia, mientras el cardo cultivado probablemente fue domesticado en España en la Edad Media [2,6]. A menudo, el origen de la alcachofa se asocia con la cultura árabe que dominaron el sur del Mediterráneo durante la Edad Media y

probablemente tuvieron un papel importante en la difusión del cultivo de la alcachofa, entre otras plantas como las berenjenas y las espinacas [9]. Cabe señalar que la palabra “alcachofa” proviene de la palabra árabe "al Quarshuff” [6,9].

La alcachofa está representada por una multitud de variedades que se diferencien por su genotipo según el país de origen o donde se cultivan mayoritariamente y por sus características morfológicas [6].

Las alcachofas que se siembran en Italia, primer productor mundial, se agrupan en 4 variedades que se diferencian en base a la morfología del *capitulum* o cabeza (Figura 2) [4–6]:

a) el grupo “Spinoso”, incluye genotipos con espinas en brácteas y capitulum;
b) el grupo “Violetto”, con las cabezas espinosas púrpura y de tamaño mediano;
c) el grupo “Romanesco”, con las cabezas no espinosas esféricas o sub-esféricas;
d) el grupo “Catanese”, con el capitulum pequeño, alargada y no espinoso.

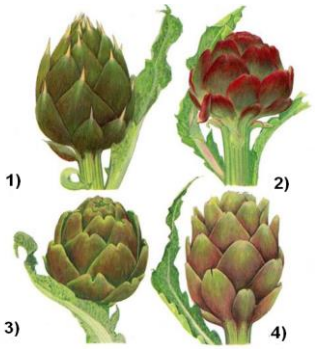

Figura 2. Alcachofas de Italia clasificadas por características morfológicas del capitulum [4]:
1) "Spinoso”, 2) “Violetto”,
3) “Romanesco”, 4) “Catanese”.

En Francia, las variedades que se cultivan allí, se dividen en dos grupos principales: “Breton”, con capítulos grandes y verdes; “Midi”, con capítulos pigmentados de color violeta y más pequeños [5,6].

En España, la variedad más común es "Blanca de Tudela” con los capítulos en forma oval, pequeños, compactos y verdes. Se propaga vegetativamente y es producida principalmente en la región de Murcia y Navarra. Otras variedades autóctonas españolas, destacan la “Morada Mallorquina” y la “Monquelina” con unas características distintivas de las otras variedades [4,5].

1.2. Descripción botánica o morfológica de la alcachofa

La alcachofa es una planta herbácea, perenne, con tallos erectos, gruesos y acanalados longitudinalmente con una altura de 1,5 a 2 metros [3,5]. Los tallos finalizan en inflorescencias, que es la parte de la alcachofa que se consume aunque la parte de la alcachofa que se suele utilizar como remedio/suplemento medicinal son las hojas [5,7]. La inflorescencia (*capitulum* o cabeza) es un receptáculo donde se insertan las flores y brácteas con un diámetro de 8-15 cm [4,6]. Las flores son de color violeta y están recubiertas por brácteas que pueden ser espinosas o no dependiendo de la variedad. Las hojas son largas de unos 30-50 cm de largo y 10-20 cm de ancho, pubescentes de color verde claro plateado por encima (haz) y de color blanquecino con pelos o fibrillas por debajo (envés)[5]. La alcachofa tiene un sistema de raíces muy potente que se puede a adaptar a una gran gama de suelos. Las raíces contienen elevadas cantidades de inulina y se ha visto que pueden alcanzar una longitud de 5m [6].

1.3. Propagación, cultivo y producción de la alcachofa

La alcachofa es una planta ampliamente distribuida por el mediterráneo y durante muchos siglos se ha propagado vegetativamente (mediante hijuelos y esquejes), pero durante los últimos años han aparecido variedades de alcachofa en el mercado que se propagan por semillas que tiene como ventaja el incremento de densidad de plantación y por tanto de producción [5,7,10].

La alcachofa es una hortaliza de temporada fría y su plantación se realiza durante los meses de julio y agosto, sus cultivos duran normalmente 2 a 3 años, sin embargo, en algunas zonas son habituales los cultivos anuales [3,10]. Para el cultivo de alcachofas se recomienda climas cálidos (la temperatura óptima de crecimiento se sitúa alrededor de los 15 ºC a 18 ºC) y libres de heladas, con primaveras suaves, sin cambios bruscos de temperatura y con alta humedad relativa (sobre el 60%) [10]. Debido a que la alcachofa posee un sistema radicular potente y profundo, se adapta a varios tipos de suelos aunque prefiere suelos profundos (más de 80 cm), arenosos y/o arcillo-arenosos, fértiles, bien drenados y con pH ligeramente alcalino (pH entre 6 y 8) [4]. Deben evitarse los suelos livianos, que tienen un excesivo drenaje y poca conservación de la humedad, ya que se obtiene una producción muy baja [5,10].

Actualmente, la alcachofa se cultiva sobre todo en los países mediterráneos como Italia, España, Francia y Egipto (además de Marruecos, Argelia, Túnez) contribuyendo de manera significativa a la economía agrícola mediterránea, pero en las últimas décadas su producción se ha ampliado a países de Oriente (Turquía e Irán), América del Sur (Argentina, Chile y Perú) y Estados Unidos (California). El principal productor mundial es Italia con una cosecha media de 470 millones de toneladas durante los últimos 5 años, Egipto con una cosecha de 281 millones de toneladas y España es el tercer productor mundial con 187 millones de toneladas. En América, los principales productores son Perú y Argentina con una producción 129 y 94 millones de toneladas en los últimos 5 años, respectivamente [3,11].

1.4. Usos tradicionales

Las plantas de *Cynara cardunculus* son conocidas desde el siglo 4 a.C como alimento y remedio, era apreciada por los antiguos egipcios, griegos y romanos que la utilizaban como remedio por sus propiedades beneficiosas frente a enfermedades hepatobiliares y digestivas [1,12]. A continuación se expondrá los usos que se hacían de la alcachofa a lo largo de la historia.

En el siglo IV a. C, Teofrasto, alumno de Aristóteles, fue el primero en describir en detalle toda la planta. Los antiguos egipcios consideraban la alcachofa como una fuente de fortaleza y valentía, en cambio los griegos y romanos la consideraban una valiosa remedio contra males digestivos y solo se consumía en la nobleza [12].

Entre 800 y 1500 d.C, varias fuentes informan que las alcachofas fueron traídas desde el norte de África y se cultivaron en Sicilia y España. En esta época, en España y Portugal, las flores de la alcachofa y también del cardo se usaban tradicionalmente como cuajo natural para la producción de quesos de oveja [3,4,6]. Además, en muchas zonas del mediterráneo, sobretodo en Italia, sumergían las alcachofas en vino y/o hacían un licor de alcachofas con efectos beneficiosos sobre la actividad gastrointestinal, coagulación de la sangre, resistencia capilar, y actividad del corazón, además de tener un efecto neutralizante sobre ciertas sustancias tóxicas [3].

En la primera mitad del siglo XX, científicos franceses e italianos comenzaron la investigación moderna sobre estos usos medicinales tradicionales de la planta de alcachofa y descubrieron que los extractos de esta planta estimulaba el hígado y la bilis [12], gracias concretamente a la cinarina, un compuesto característico de estas plantas. A partir de la década 1950, se descubrió que la cinarina podía bajar el colesterol [12].

1.5. Calidad e importancia nutricional

La alcachofa representa un componente importante de la dieta mediterránea. Es una verdura muy saludable y nutritiva debido a su composición nutricional y fitoquímica [13].

Tabla 1. Información nutricional de las alcachofas crudas [67].

Nutriente	por 100g	Nutriente	por 100g	Nutriente	por 100g
Proximales		**Vitaminas**		**Lípidos (en gramos)**	
Agua (g)	84,94	Vit.C (mg)	11,7	Ac. grasos, saturados totales	0,036
Energía (kcal)	47	Tiamina (mg)	0,072	Ac.g.totales monoinsaturados	0,005
Energía (kJ)	197	Riboflavina (mg)	0,066	Ac.g.totales poliinsaturados	0,064
Proteína (g)	3,27	Niacina (mg)	1,046	ácidos grasos trans total	0,000
Lípidos total (grasa) (g)	0,15	Ácido pantoténico (mg)	0,338	**Aminoácidos**	
Ceniza (g)	1,13	Vit. B-6 (mg)	0,116	Triptófano (mg)	6
Hidratos de carbono (g)	10,51	Folato Total (g)	68	**Otros: ácidos fenólicos #, en mg**	
Fibra dietética total (g)	5,4	Folato alimentario (g)	68	acido 3-O-Cafeoilquinico	57,22
Azúcares Totales (g)	0,99	Folato, DFE (g)	68	acido 4-O-Cafeoilquinico	267,02
Minerales		Colina Total (mg)	34,4	acido 5-O-Cafeoilquinico	1544,91
Calcio (mg)	44	Betaína (mg)	0,2	acido 1,3-O-Dicafeoilquinico	61,24
Hierro (mg)	1,28	Vit. A, RAE (g)	1	acido 1,4-O-Dicafeoilquinico	142,91
Magnesio (mg)	60	β-caroteno (g)	8	acido 4,5-O-Dicafeoilquinico	224,56
Fósforo (mg)	90	Vit. A (IU)	13	acido 3,5-O-Dicafeoilquinico	347,05
Potasio, K (mg)	370	Luteína + zeaxantina (g)	464	acido 1,5-O-Dicafeoilquinico	837,01
Sodio (mg)	94	Vit. E (mg)	0,19	acido 3,4-O-Dicafeoilquinico	428,71
Zinc (mg)	0,49	Vit. K (g)	14,8	**Otros: flavonoides#**	
Cobre (mg)	0,231			Naringenina (mg)	12,5
Manganeso(mg)	0,256			Apigenina (mg)	7,5
Selenio, Se (g)	0,2			Luteolina (mg)	2,3

 # extraído de [1]

Desde el punto nutricional, los capítulos de las alcachofas tienen alrededor de 10% de carbohidratos, 3% de proteínas, menos del 0,15% de lípidos y altos niveles de minerales (sobre todo potasio y calcio) [6,67]. Debido al alto contenido de fibra (5,4%) y compuestos fenólicos la alcachofa se considera también un alimento funcional con propiedades antioxidantes [14–16] (Tabla 1). Por su contenido bajo en grasas y alto contenido en fibra, la alcachofa es un ingrediente ideal en dietas para la pérdida de peso, que se pueden comer crudas en ensaladas, cocidas o guisadas con carne.

1.6. Relación con el metabolismo energético

En las últimas décadas, se ha demostrado que los alimentos que contienen fitoquímicos bioactivos modulan diferentes vías fisiológicas y moleculares implicadas en el metabolismo energético, y se ha visto que estos compuestos pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud como la prevención de diferentes enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y la obesidad, enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, y cáncer [17–19].

La prevalencia de la obesidad y sobrepeso está aumentando a un ritmo alarmante en todo en el mundo, y según datos de la OMS, más del 10% de la población mundial adulta es obesa. La obesidad presenta un estado de balance energético positivo crónico asociado con un exceso de acumulación de grasa resultante de la ingesta de energía superior al gasto energético. La obesidad aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares (como hipertensión, dislipidemias y aterosclerosis) y esteatosis hepática no alcohólica [20,21].

A causa del aumento progresivo de la obesidad [20], los países desarrollados están invirtiendo muchos recursos para desarrollar tratamientos o terapias preventivas, y se ha visto que los fitoquímicos presentan propiedades potenciales anti-obesidad ya que intervienen en diferentes mecanismos que regulan el gasto energético como: la disminución de la absorción de lípidos, disminución de la ingesta

de energía, aumento del gasto de energía (supresión de las vías anabólicas y estimulación de las vías catabólicas en el tejido adiposo, hepático y otros tejidos), inhibición de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, estimulación de la apoptosis de los adipocitos maduros, inhibición de la angiogénesis en los tejidos adiposos, y reducción de la inflamación crónica asociada con la adiposidad [18,19]. Uno de los mecanismos que más se está investigando es el aumento del gasto energético mediante la inducción de la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón, este último tiene propiedades termogénicas, disipando el exceso de energía en forma de calor. En este proceso, el tejido adiposo marrón de los mamíferos (BAT, *brown adipose tissue*) juega un papel importante en el control del balance energético. El BAT contiene altas cantidades de la proteína UCP1, la cual disipa en forma de calor la energía generada en la fosforilación oxidativa por el gradiente protónico [19,22,23].

En varios estudios se ha descrito que hay compuestos naturales que remodelan el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) en un tejido parecido al BAT llamado "beige", que contiene un alto nivel de mitocondrias, de esta manera aumenta su capacidad de oxidación de los ácidos grasos [19,23]. Esta remodelación del WAT se considera una estrategia útil para el tratamiento de la obesidad.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo general, la caracterización de la composición fitoquímica de la alcachofa y los efectos de los principales compuestos bioactivos y funcionales de la alcachofa (*Cynara cardunculus* L), concretamente de la alcachofa comercial *C. cardunculus subsp. Scolymus*, que modulan y regulan diferentes procesos celulares y metabólicos que influyen en el metabolismo energético de los mamíferos. Para realizar este Trabajo primero se hará una recopilación bibliográfica y después se realizara un experimento para ver los efectos de un compuesto bioactivo característico de la alcachofa.

2.1. Trabajo bibliográfico

En esta parte del trabajo se hace una búsqueda y recopilación de información con el fin de conocer la composición química de la alcachofa, identificando los principales compuestos bioactivos y funcionales que tienen efectos sobre el funcionamiento de las células y, además, comprender y analizar los efectos ya demostrados sobre la salud humana. Por lo tanto, los objetivos específicos de esta parte del trabajo son: conocer la composición química de la alcachofa y los efectos de los principales compuestos bioactivos con un gran potencial sobre la salud humana.

2.2. Trabajo experimental

Esta parte del trabajo consistirá principalmente en diseñar un experimento *in vitro* con el fin de comprobar los efectos del ácido clorogénico en la remodelación del tejido adiposo utilizando la línea celular 3T3-L1 para llevar a cabo el experimento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para recopilar la información de la parte bibliográfica del trabajo se utilizaron diferentes bases de datos con el fin de recopilar artículos científicos de revisión o investigación que sirvan para cumplir los objetivos marcados en este trabajo. Una de las bases de datos más consultadas ha sido *PubMed*, una base de datos gratuita, desarrollada y mantenida por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) de los Estados Unidos. Esta base de datos comprende más de 24 millones de citas de literatura biomédica de MEDLINE, revista de ciencias de la vida [24]. Además de *PudMed*, también se ha utilizado la base de datos de *Science Direct*, una página web donde se puede buscar artículos científicos de más de 2500 revistas y 30000 libros [25]. Finamente también se ha hecho uso de las herramientas de Google concretamente *Google Books* para la consulta de libros en versión online y *Google Academic* para recopilación de artículos científicos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la búsqueda de la bibliografía en las bases de datos se utilizaron diferentes palabras clave (Tabla 2). Los resultados de los artículos encontrados en PudMed según las palabras clave se pueden ver en la tabla siguiente.

Términos clave	Nº artículos
Cynara Cardunculus	448
Cynara Cardunculus review	20
Cynara Cardunculus (últimos 5 años)	164
Cynara scolymus (últimos 10 años)	195
Cynara scolymus (humanos)	57
phenolic composition *cynara*	8
volatile oil *cynara*	2
Cynara scolymus extract	85
Chlorogenic acid	3380
Cynarin	121
Luteolin	2872
Cynara scolymus effects	130
Cynara scolymus properties	48
Cynara scolymus energy metabolism	16
Cynara scolymus obesity	4
Cynara scolymus cholesterol	27
Cynara scolymus cancer	11

Tabla 2. Número de artículos obtenido en la base de datos PudMed. El número de artículos dado es el que se obtuvo de PubMed en el momento de la búsqueda y elaboración del trabajo utilizando las palabras clave mencionadas en la tabla. En la base de datos ScienceDirect se utilizaron las mismas palabras clave y en el caso de la herramienta Google Books se utilizó para buscar libros relacionados con el tema.

4.1. Compuestos bioactivos de la alcachofa

La alcachofa es una verdura muy saludable debido a su alto contenido en fitoquímicos, principalmente los ácidos fenólicos y flavonoides, juntamente con los compuestos terpenoides que le otorgan diversas propiedades [6].

Los fitoquímicos son compuestos secundarios muy abundantes en el reino de las plantas y también en el reino animal, con multitudes de funciones: defensa contra el estrés, crecimiento, reproducción, entre otras [26]. Se dividen en 3 grupos: terpenoides (terpenos), compuestos fenólicos y alcaloides y

otros compuestos nitrogenados, aunque los dos primeros son los más abundantes [27]. Los precursores para sintetizar estos compuestos son, el ácido shikimico para formar los compuestos fenólicos y el ácido mevalónico para formar los terpenoides (Figura 3) [28].

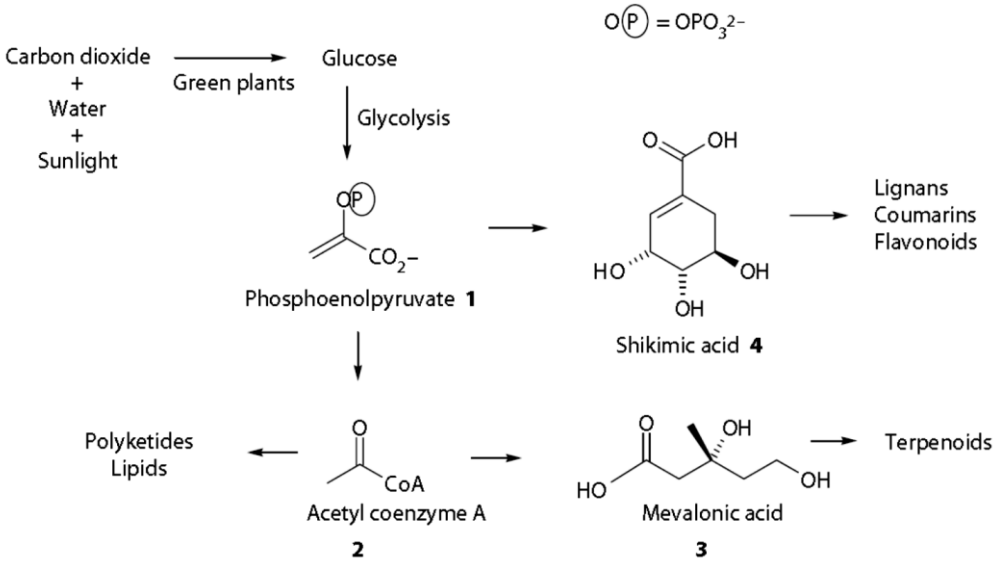

Figura 3. Ruta general para la biosíntesis de los principales metabolitos segundarios [28].

La caracterización y análisis de la composición química se realiza en extractos con agua y disolventes orgánicos polares (generalmente metanol) para extraer componentes fenólicos [29], en cambio para extraer componentes volátiles y aromáticos se utilizan disolventes apolares, como el hexano [28,30].

El contenido fitoquímico de la alcachofa depende de varios factores como por ejemplo: la variedad de la alcachofa, etapa de madurez, condiciones climáticas (geografía, temperatura, luz, etc.), condiciones de cultivo (tipo de suelo, fertilización, etc.) y cosecha (invierno o primavera), condiciones de almacenamiento, factores genéticos, etc [3,16,31]. Pero sobretodo, de cómo se ha obtenido el extracto, ya que la composición de los extractos obtenidos por extracción con disolventes polares difiere mucho de la composición de los extractos lipofilicos [8] y de la parte de la alcachofa que se analiza [3].

Antes de proseguir con la explicación de la composición de los diferentes extractos, cabe destacar que la mayoría de la bibliografía consultada caracterizan mayoritariamente la composición química de las hojas de la alcachofa, que representa la masa de desecho de las alcachofas, con un alto contenido de compuestos bioactivos por lo que presentan interesante uso para extractos con finalidad terapéutica o farmacológica.

4.1.1. Extracto fenólico (metanólico)

En este extracto se encuentran principalmente los compuestos fenólicos como los que se pueden observar en la Figura 4 [8]. Los compuestos fenólicos son uno de los grupos químicos más abundantes en las plantas y se han identificado más de 8000 compuestos [27], con diversas funciones fisiológicas en las plantas. Las clases principales de los compuestos fenólicos de la dieta son los ácidos fenólicos, flavonoides, y polifenoles (comúnmente conocidos como taninos y lignanos) [32]. Son biosintetizados a partir de la fenilalanina y tirosina mediante dos vías: la vía del ácido shikímico (O vía de fenilpropanoides) y la vía del acetato/malato [27].

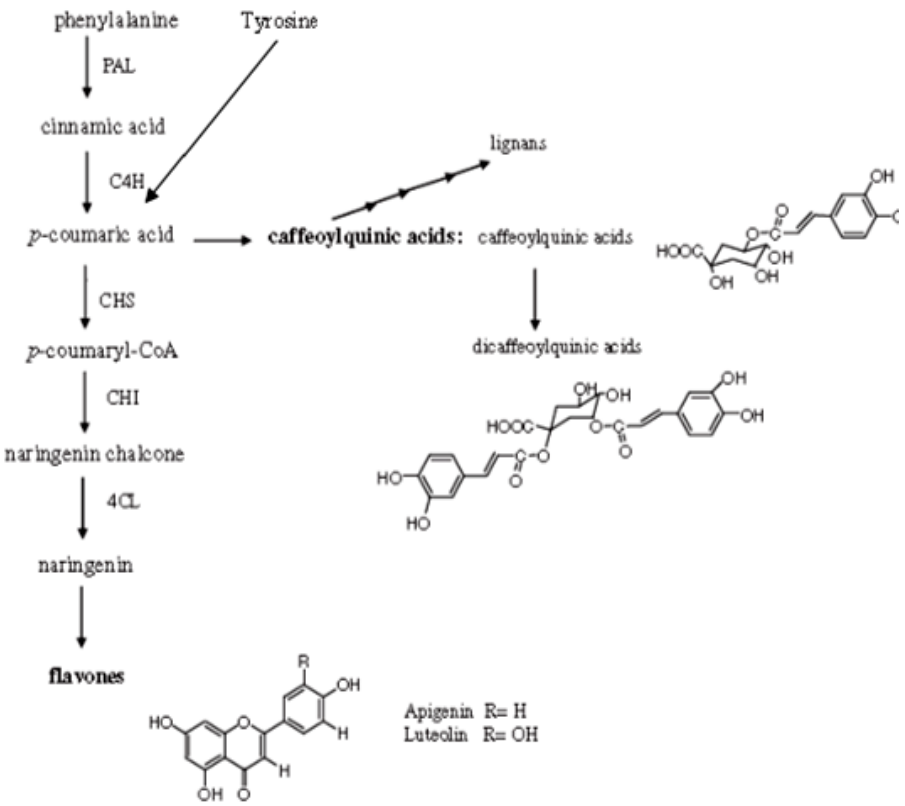

Figura 4. Ruta principal de biosíntesis de los compuestos fenólicos en las plantas del genero *Cynara cardunculus*. A partir de la fenilalanina y la tirosina se produce el ácido p-cumarico, el precursor tanto de los acidos fenolicos, flavonoides como de los lignanos, gracias a diferentes enzimas. Abreviaturas:

PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa;

4CL, 4-ligasa coumaroyl-CoA. Modificado de [8]

La biosíntesis de los compuestos fenólicos que se encuentran en la alcachofa se hace principalmente mediante la ruta de los fenilpropanoides [8] (Figura 4). La fenilalanina es el precursor a partir del cual se sintetizan los metabolitos segundarios de las plantas como los flavonoides (por ejemplo luteolina e apigenina), ácidos fenólicos (ácido clorogénico e ácido dicafeoilquínico) y lignanos [4,8], juntamente con la tirosina [27]. Los compuestos más abundantes en la alcachofa son los ácidos fenólicos y los flavonoides.

A. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos, son los compuestos mayoritarios de la alcachofa, consisten en dos subgrupos: los ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos. Estos últimos son los mayoritarios, consisten principalmente en los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico, y raramente se encuentran en forma libre. Las especies de *C. cardunculus* son una buena fuente de ésteres del ácido quínico y del ácido cafeico, que se combinan formando el ácido cafeoilquínico, y normalmente son sensibles al calor [32]. Los ácidos cafeoilquínicos tienen un papel relevante como componentes estructurales y funcionales de las paredes celulares vegetales, como componentes bioactivos de la dieta humana, y actúan como precursores para los procesos que conducen a una pérdida de calidad debido al fenómeno de pardeamiento causado por la polifenol oxidasa o mediante la formación de complejos de hierro y ácido clorogénico. Este fenómeno es especialmente importante en el procesamiento de la alcachofa y se debe evitar utilizando antioxidantes sintéticos para no perder la calidad de la verdura [26].

B. Flavonoides

Los flavonoides son componentes menores en la alcachofa, que representan menos del 10% de los compuestos fenólicos totales [1].

Los flavonoides tienen estructura común de dos anillos aromáticos, A y B, unidos a través de tres carbonos que forma otro anillo C, este esqueleto se denomina difenilpropano (C6-C3-C6) (Figura 5). El anillo A proviene de la vía del acetato/malato y tiene una hidroxilación característica en las posiciones 5 y 7, en cambio, en anillo B, proviene de la vía del ácido shikímico y suele ser hidroxilado en una o varias posiciones (3, 4 y 6) [17,32]. Además del grado de hidroxilación, los flavonoides se diferencian por otras sustituciones y conjugaciones, y en el grado de polimerización [17].

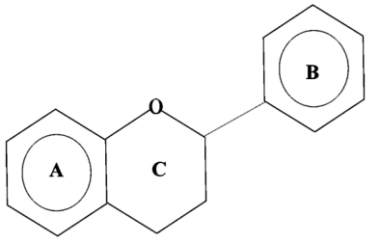

Figura 5. Estructura básica de los flavonoides. Están formados por dos anillos aromáticos A y B, más otro anillo C [17].

Se clasifican en seis subclases mayoritarios: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles [26,27], que se diferencian según las sustituciones en el anillo C, y 6 subclases minoritarios: Aurones, chalconas, cumarinas, dihidrochalconas, dihidroflavonol y flavan-3,4 dioles [17,27]. Las antocianinas dan un color violeta en las brácteas exteriores de ciertos genotipos de la alcachofa y en las flores [26,32].

C. Composición del extracto fenólico

La composición química de los extractos fenólicos de la alcachofa se ha estudiado ampliamente y se ha encontrado que contienen un alto contenido en ácidos cafeoilquínicos y sus derivados, flavonas y taninos, que se encuentran principalmente en las cabezas y hojas de las alcachofas, aunque el perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos identificados en estos extractos varía por muchos factores (variedades de la alcachofa, tiempo de cosecha…) como se había comentado anteriormente. Por ejemplo, las alcachofas “Romanesco” de primavera mostraban un contenido fenólico total más alto que las de la cosecha de invierno con un aumento de aproximadamente 16 veces de la cosecha de invierno a primavera, particularmente en el tallo floral de la alcachofa [31].

La composición también defiere mucho según la parte de la alcachofa que se caracteriza como se puede observar en la Tabla 3 [3]: Las cabezas, las brácteas y los tallos de las alcachofas contienen altos niveles del ácido 5-O-cafeoilquínico y el ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico [3,6,13]. Las hojas son ricas en luteolina y apigenina (conjugados con glucósidos o rutinósidos), mientras que los tallos florales, en el ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico, y las flores, en antocianinas [3,15,31].

Como se puede ver en la Tabla 3, los compuestos fenólicos totales son más abundantes en las hojas y tallos que en la cabeza, lo que indica que las hojas juntamente con los tallos de alcachofa representan una fuente importante de compuestos con interesantes aplicaciones farmacológicas para promover la salud.

Tabla 3.Variación de la concentración de compuestos fenólicos en distintos partes de la alcachofa [3]

Phenolic compound	Leaves	Floral stem	Outer bracts	Inner bracts	Receptacle
1-O-Caffeoylquinic acid	0–83	0–1,111	0–54	0–648	0–131
3-O-Caffeoylquinic acid	–	0–284	0–25	0–226	0–138
4-O-Caffeoylquinic acid	0–567	0–574	0–154	0–525	17–157
5-O-Caffeoylquinic acid	0–2,135	157–4,732	0–1,049	18–14.841	20–4,717
1,3-O-Dicaffeoylquinic acid	0–72	21–90	0–58	11–73	0–45
3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	–	0–598	–	0–342	0–115
3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0–254	28–4,441	0–55	0–3,872	12–1,172
1,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0–665	136–7,999	0–608	0–7,498	12–1,102
4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0–151	0–195	0–56	–	0–57
Luteolin-7-O-rutinoside	891–2,956	0–224	0–57	0–149	0–38
Luteolin-7-O-glucoside	460–1,758	0–298	0–57	0–25	0–248
Luteolin-7-O-malonylglucoside	284–1,047	0–48	–	–	-
Apigenin-7-O-rutinoside	0–1059	0–547	0–343	15–206	0–738
Apigenin malonylglucoside	0–208	–	107–189	–	–
‡ All concentration ranges are in mg kg–1 DW.					

Además, la cocción también varía la composición de los compuestos bioactivos en la alcachofa, aumentando el contenido fenólico total de los extractos acuosos y hidroalcohólicos [16].

Uno de los más recientes estudios sobre la dilucidación de los compuestos de la alcachofa fue realizado en 2013 por M. Abu-Reidah et al [14], donde se ha hecho una profunda y amplia caracterización de los compuestos fenólicos presentes en las hojas alcachofa de la variedad "Blanca de Tudela" (*Cynara scolymus*) mediante el uso de HPLC acoplado a DAD-ESI-QTOF-MS. Se encontraron unos 61 compuestos fenólicos, entre los cuales se han caracterizado por primera vez 34 nuevos compuestos fenólicos: 3 ácidos hidroxibenzoicos, 17 ácidos hidroxicinámicos, 4 lignanos, 7 flavonas, 2 flavonoles, y 1 derivado de fenol. Así que los compuestos más destacables en la alcachofa son los que pertenecen al subgrupo de los ácidos fenólicos y flavonoides [14].

Los principales ácidos fenólicos encontrados en las alcachofas son el ácido 5-O-cafeoilquínico (o ácido clorogénico) y el ácido 1,5-O–dicafeoilquínico que están presentes sobretodo en el receptáculo y el tallo floral [26] con una concentración de 3143 y 3890 mg/kg de materia seca respectivamente [3], seguido de compuestos como los ácidos 1 y 3-O-cafeoilquínico y los ácidos 1,3- 3,5- y 4,5-O-dicafeoilquínico que están en menor concentración [26]. Generalmente, el ácido 1,3-O-dicafeoilquínico (cinarina) es considerado el principal responsable de las propiedades biológicas de alcachofa, debido a su mayor capacidad para inhibir la biosíntesis del colesterol y la oxidación de LDL [33]. En cambio, los compuestos flavonoides más representativos de la alcachofa son la luteolina, y la apigenina (ambos son flavonas), con sus conjugados, seguido de la narigenina y naritutina [1,3]. También encontramos antocianinas como la cianidina, sobre todo en las flores y brácteas externas.

Otros compuestos encontrados en la alcachofa son los lignanos, exactamente los derivados del pinoresinol como: 1-Hidroxipinoresinol 1-O-β-d glucósido, pinoresinol 4-O-β-d glucósido, pinoresinol-acetilhexosido y (+)–pinoresinol [14]. Estos compuestos se formen por condensación de monómeros de flavan-3-ol [14].

4.1.2. Extracto del aceite esencial

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de compuestos naturales, volátiles caracterizados por un fuerte olor y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios [30,34]. Por lo general, la extracción de este aceite se realiza mediante el uso de dióxido de carbono líquido o microondas, y la destilación, principalmente de baja o alta presión empleando agua hirviendo o vapor caliente. El extracto que se obtiene es un líquido volátil, límpido y rara vez coloreado, soluble en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua [30].

El perfil químico del extracto del aceite esencial se diferencia no sólo en el número de moléculas, sino también en los tipos estereoquímicas de moléculas extraídas, de acuerdo con el tipo de extracción, y el tipo de extracción que se elige en función de la finalidad de la utilización [30]. Además, la composición también varía en calidad y en cantidad de acuerdo con el clima, la composición del suelo, el órgano de planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo [3,30,31].

Los aceites esenciales están formados por compuestos complejos que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes en concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones bastantes altas (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza [30].

La composición química de los aceites esenciales se divide principalmente en dos grupos: terpenos (o terpenoides) e hidrocarburos no terpenoides [27,30].

A. Terpenos

También llamados terpenoides o isoprenoides, son uno de los grupos de fitoquimicos naturales más numerosos, con más de 30.000 compuestos aislados de plantas, microorganismos y animales. Se forman a partir reordenamientos de dos o más unidades de isopreno (5 carbonos) [30,34].

Para la biosíntesis de los terpenos hay dos precursores universales, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Hay dos vías para sintetizar estos precursores: la vía del ácido mevalónico (MVA) y la vía del metilo D-eritritol 4-fosfato (MEP) [34] (Figura 6). En la vía MVA, una molécula del ácido mevalónico es pirofosfatada por dos unidades de ATP para originar el mevalónil-pirofosfato que luego se descarboxila gracias a otra molécula de ATP para formar una molécula de IPP. Y para originar el DMAPP, se produce una simple isomerización del enlace doble del IPP [27]. El IPP y DMAPP generan el pirofosfato de geranil (GPP), un precursor inmediato de los monoterpenos y la unión de distintas unidades del GPP que pueden generar distintos compuestos con esqueletos lineales o cíclicos formando de esta manera los diferentes compuestos en las plantas como la alcachofa. La condensación de GPP y IPP conduce a la formación del farnesil pirofosfato (FPP), precursor inmediato de sesquiterpenos [27,34].

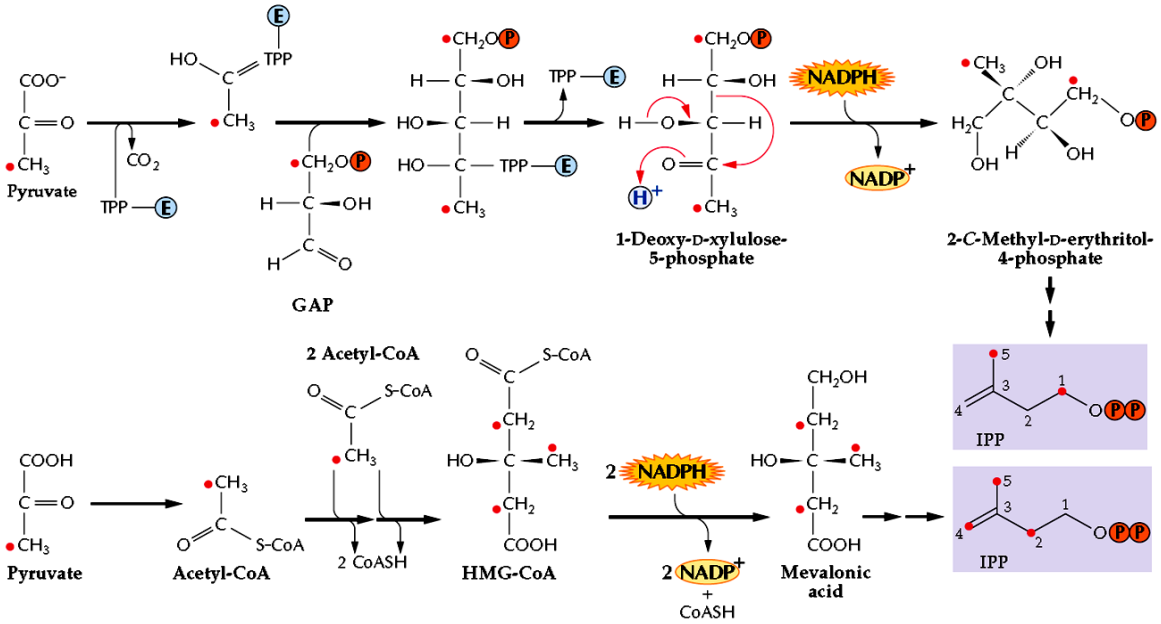

Figura 6. Biosíntesis del precursor de isoprenoides. El IPP se puede originar a partir de dos vías: la vía del ácido malvonico (MVA) que se forma a partir del acetil-CoA, y la vía del metilo D-eritritol 4-fosfato (MEP) que se forma a partir del gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Las dos vías dan lugar al pirofosfato de isopentenilo (IPP), a partir del cual se sintetizan todos los terpenoides [27].

Los principales terpenos son los monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), pero también existen los hemiterpenes (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40). Además, si un terpeno contiene un oxígeno se denomina terpenoide [27,30]. Los monoterpenos se forman por la unión de dos unidades de un isopreno y constituyen el 90% de los aceites esenciales. Los sesquiterpenos se forman a partir de la unión de tres unidades de isopreno [30]

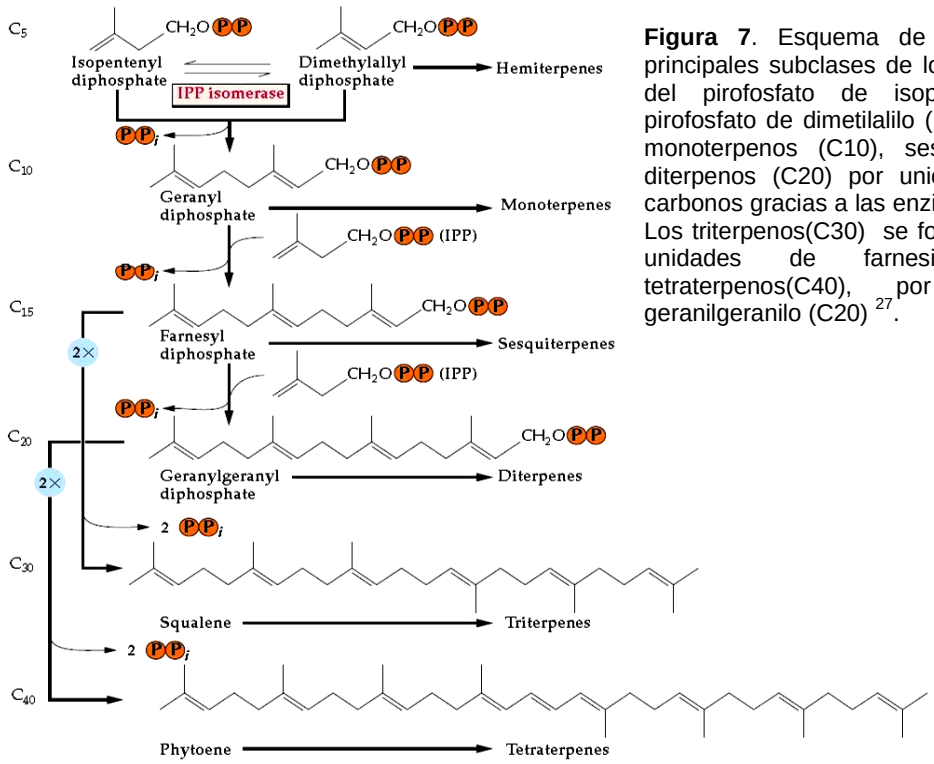

Figura 7. Esquema de la formación de las principales subclases de los terpenoides. A partir del pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) se forman los monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), y diterpenos (C20) por unión de unidades de 5 carbonos gracias a las enzimas preniltransferasas. Los triterpenos(C30) se forman por union de dos unidades de farnesil (C15) y los tetraterpenos(C40), por union de dos geranilgeranilo (C20) [27].

B. Compuestos no terpenoides

Esta parte del extracto está formado principalmente por policétidos (metabolitos segundarios derivados de lípidos), y los derivados del ácido shikimico [28]. Entre estos compuestos se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, lactónas, ésteres…[34]. Estos compuestos se encuentran en menor proporción en el extracto del aceite esencial ya que se producen en menor frecuencia en las plantas [30].

C. Composición del aceite esencial

La composición química del aceite volátil de la alcachofa esta poca caracterizada en la bibliografía porque hay poca bibliografía sobre ella.

Generalmente el aceite esencial que corresponde a la fracción lipídica, se obtiene a partir de las hojas y cabeza (*capitulum*) de las alcachofas. Para separar los compuestos químicos en este extracto se utiliza la cromatografía de gas integral bidimensional (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) o detector de ionización de llama (FID) para identificar los compuestos [29,35]. El aceite esencial de las hojas y cabezas de la alcachofa contiene más de 30 compuestos entre los cuales se encuentran: monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos y cetonas que son los principales componentes volátiles [29]. Los sesquiterpenos están principalmente concentrados en las hojas y presentes en pequeñas cantidades en los tallos y capítulos, en contraste con los triterpenos que están presentes en menor cantidad en las hojas. El sesquiterpeno más predomínate en las hojas es la cinaropicrina que proporciona un sabor amargo a las alcachofas conjuntamente con los ácidos clorogénicos [6].

Uno de los primeros estudios realizados sobre la caracterización de los compuestos volátiles del aceite fue realizado por Ron G. Buttery et al. en 1978 [36] en alcachofas cocidas y se detectaron 32 compuestos. Los componentes mayoritarios en este extracto fueron los sesquiterpenos: β-selineno y cariofileno, y los componentes que proporcionaban aroma y olor a este extracto eran: oct-l-en-3-ona, hex-l-en-3-ona, decanal, no-trans-2-enal, fenilacetaldehído y eugenol [36].

En otro estudio realizado en 2013 por Nassar et al. [35], se pretendía identificar los compuestos presentes en las brácteas de las alcachofas de Egipto. Se identificaron 37 compuestos (Tabla 4). Los principales componentes activos identificados fueron: ciclozativeno (45,4%), mirtenal (11,6%), 2-metil undecanal (3,1%), n-dodecano (2,6%), xantorrizol (2,6%), bencilo tiglato (2,5%), isocomeno (2,4%), isosilvestreno (2,4%), ciclamen aldehído (1,6%) y fencona (1,1%). Estos compuestos principalmente son terpenos (75,99% de la cantidad total de los compuestos identificados) incluyendo los mono y sesquiterpenos. Otros compuestos corresponden a hidrocarburos oxigenados (18%) [35].

Finalmente un estudio realizado por Caroline Saucier et al. en 2014 29, se encontraron un total de 130 compuestos en el aceite esencial de las hojas de la alcachofa, 109 de los cuales son reportados por primera vez en C. scolymus utilizando cromatografía de gases bidimensional integral acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar de barrido rápido (GC×GC/ qMS) para dilucidar exhaustivamente la composición las hojas, en cambio con el GC/qMS solo se dilucidaron 32 compuestos, entre los cuales se incluyen 7 aldehídos, 7 norisoprenoides, 6 fenilpropanoides, 6 cetonas, 4 monoterpenos oxigenados, 1 lactona y 1 alcohol (Tabla 4). Los principales compuestos dilucidados mediante el GC×GC/ qMS fueron: 1-octen-3-ona (11,30%), acetaldehído benceno

(8,86%), β-ionona (6,05%), diciclohexil-metanona (5,18%), (E) -β-damescenona (5,02%), dihidroactinidiolide (3,43%) y acetona de geranilo (2,23%).

Además, también se estudia la composición de las flores y tallos de las alcachofas, aprovechando de esta manera todas las partes de la alcachofa para obtener compuestos bioactivos interesantes farmacológicamente. En un análisis multivariado (PCA) de los biocompuestos de las plantas de la familia *Compositae*, se ha dilucidado la composición de las diferentes partes de la alcachofa mediante el GC-MS y se encontró que los principales compuestos en las flores, las hojas, las raíces y tallos, son el β-cubeneno, cariofeleno y elixeno [37].

	Composición en las brácteas [35]		Composición en las hojas [29]	
Nº	**Compound**	**C (%)**	**Compound**	***C* (%)**
1	*cis*-Piperitol	0,3	Furfural	1,84
2	Geranyl formate	0,4	(*E*)-2-Hexenal	1,42
3	Limonene aldehyde	0,8	Benzaldehyde	1,44
4	(*Z*)-Damascone	0,1	1-Octen-3-one	11,30
5	Cyclosativene	45,4	6-Methyl-5-hepten-2-one	0,37
6	4-(*E*)-Octene	0,3	Octanal	0,40
7	Myrtenol	0,6	Benzene acetaldehyde	8,86
8	Isocitronellene	0,6	(*E*)-2-Octenal	0,62
9	*n*-Hexanol	0,2	Acetophenone	0,11
10	Myrtenal	11,6	(*E,E*)-3,5-Octadien-2-one	0,25
11	Dihydro-linalool	0,4	Nonanal	1,68
12	Fenchone	1,1	(*E*)-6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	0,62
13	3-*p*-Menthane	0,8	Phenethyl alcohol	0,46
14	Xanthorrhizol	2,6	Isophorone	1,18
15	Helifolenol B	0,9	3-Nonen-2-one	0,26
16	Thuj-3-en-10-al	0,8	(*E,Z*)-2,6-Nonadienal	0,30
17	Mayurone	0,6	4-Methyl-acetophenone	0,36
18	*α*-Isocomene	2.4	Safranal	1,15
19	Cyclamen aldehyde	1,7	Decanal	0,28
20	*β*-Atlantol	0,3	β-Cyclocitral	1,35
21	Isosylvestrene	2,4	Neral	0,22
22	1-Phenyl heptan-3-one	0,3	β-Homocyclocitral	0,24
23	Prenopsan-8-ol	0,8	Geranial	0,80
24	Methyl tiglate	0,3	*p*-Vinylguaiacol	0,68
25	Benzyl tiglate	2.5	Eugenol	0,69
26	Nerol oxide	0,4	γ-Nonalactone	0,85
27	2-Methyl undecanal	3,1	(*E*)-β-Damascenone	5,02
28	*n*-Pentadecane	1,2	Geranyl acetone	2,23
29	Methyl dodcanoate	1	β-Ionone	6,05
30	*trans*-Dehydro-*β*-terpineol	0,3	Dicyclohexyl-methanone	5,18
31	Cryptomeridiol	0,3	Dihydroactinidiolide	3,43
32	Geranyl acetate	0,3	Phytone	0,19
33	*trans*-Pinane	0,3		
34	3-Dodecanone	0,4		
35	*n*-Dodecane	2,6		
36	3-Decanone	0,2		
37	Cedranediol (85, 13-)	0,8		

Tabla 4. Composición del aceite volátil de Cynara scolymus L de las brácteas utilizando un GC-MS, de las hojas utilizando un GC-qMS y de las flores utilizando GC-MS. (*) Las concentraciones relativas expresadas como porcentaje de área de la superficie total picos detectados por el MS o qMS de los principales biocompuestos

Los resultados de estos estudios implican que se puedes utilizar las hojas, tallos, brácteas y raíces de las alcachofas, que normalmente presentan la biomasa de desecho, por lo que se pueden aprovechar para obtener estos compuestos bioactivos volátiles con potenciales propiedades farmacológicas.

4.1.3. Compuestos destacados

Los compuestos más destacados en cuanto a composición e importancia funcional presentes en la alcachofa son: el ácido clorogénico y sus derivados, que son los ácidos hidroxicinámicos más predominante en la alcachofa; la cinarina, compuesto especifico de las plantas del género Cynara; y por último la luteolina, una flavona se encuentra principalmente en las hojas y tallo. Estos compuestos tienen diferentes propiedades sobre todo antioxidantes.

A. Ácido clorogénico

El ácido chlorogénico (ACG) es un compuesto fenólico que se forma por la esterificación del ácido cafeico y ácido quínico. El ACG se encuentra en altas cantidades en el café y frutas como arándanos y ciruelas, además de la alcachofa [38,39]. Según la nomenclatura de la IUPAC es conocido como el ácido 5-O-cafeoilquínico [26].

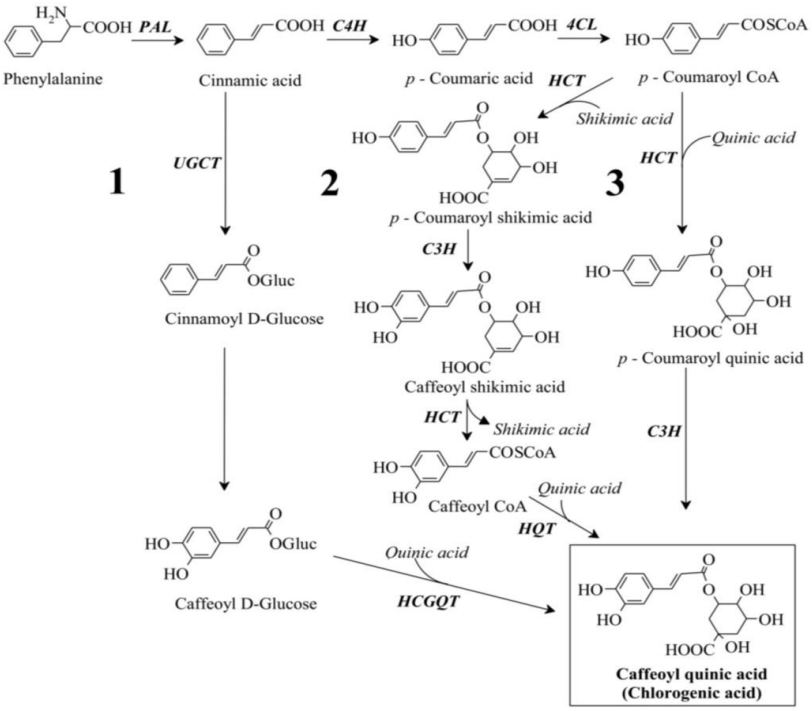

Figura 8. Figura Rutas simplificadas para la biosíntesis del ácido clorogénico en plantas. Las enzimas implicados en esta ruta son: PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato ligasa CoA; HCT, hidroxicinamoil CoA Shikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa; C3H, p-cumarato 3'-hidroxilasa; HQT, hidroxicinamoil CoA transferasa quinato hidroxicinamoil; UGCT, glucosa UDP cinamato glucosil transferasa; HCGQT, hidroxicinamoil D-glucosa quinato hidroxicinamoil transferasa [38]

Para sintetizar el ACG se han propuesto tres rutas distintas en las plantas con diferentes precursores: (ruta 1) trans-esterificación del cafeoil-D-Glucosa con el ácido quinico mediante hidroxicinamoil D-glucosa quinato hidroxicinamoil transferasa (HCGQT); (ruta 2) trans-esterificación del cafeoil-CoA y ácido quínico a través de la hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferasa (HQT); y (ruta 3) hidroxilacion del p- coumaroyl quinato a ACG mediante la p-cumarato 3'-hidroxilasa (C3H) [38]. Las biosíntesis del ACG en la alcachofa se hace principalmente a través de las rutas 2 y 3, utilizando el p- coumaroyl-CoA como precursor principal para dar lugar al ACG [39].

En los últimos años, el ácido clorogénico ha tenido un creciente interés por sus diversas funciones biológicas y farmacológicas. El ACG regula el metabolismo glucídico y lipídico mediante la activación de la AMPK y la activación de la glucosa-6-fosfatasa hepática, inhibiendo así la gluconeogénesis y lipogénesis hepática y por otro lado aumenta la captación de la glucosa en el musculo hepático [40,41]. También inhibe la carcinogénesis en el colon e hígado, reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares al disminuir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LPL) y la biosíntesis del colesterol. Además, también inhibe el crecimiento de preadipocitos con efectos anti-obesidad [40].

B. Cinarina

La cinarina es un derivado del ácido hidroxicinámico, químicamente conocido como el ácido 1,3-di-O-cafeoilquinico que se forma por esterificación de dos unidades del ácido cafeico y una unidad del ácido quinico [42,43](Figura 9). Este compuesto es considerado el principio activo de las alcachofas, ha sido aislado por primera vez en las plantas de *Cynara cardunculus* y se encuentra en concentraciones más altas en las hojas.

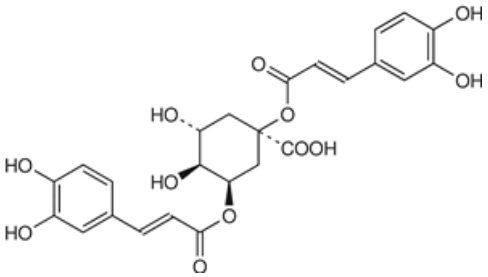

Figura 9. Estructura química de la cinarina [42].

La primera referencia de la extracción y aislamiento de este compuesto en las alcachofas data del 1954. Se ha aislado este compuesto en las hojas que han sido cocidas y tratadas con acetato de plomo [43]. La obtención de cinarina puro se hace a partir de una mezcla de ácidos mono- y dicafeoilquínicos de un extracto vegetal crudo [42], aunque su biosíntesis se hace a partir del ácido clorogénico.

La cinarina es la responsable de las propiedades colagogas y coloréticas de la alcachofa. Otras propiedades que tiene la cinarina son: hepaprotectoras hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas y antihistamínicas [33,42]

C. Luteolina

La luteolina (3 ', 4', 5,7-tetrahidroxi-flavona) es uno de los flavonoides más comunes en el reino vegetal, pertenece a la subclase conocida como flavonas. Está presente en verduras y frutas, como el apio, brócoli, alcachofa y manzana [44,45]. Normalmente, se encuentra en forma de glucósidos que son metabolizados por las bacterias intestinales. Cabe destacar que la luteolina es estable al calor, y las pérdidas por cocción son relativamente bajas [44].

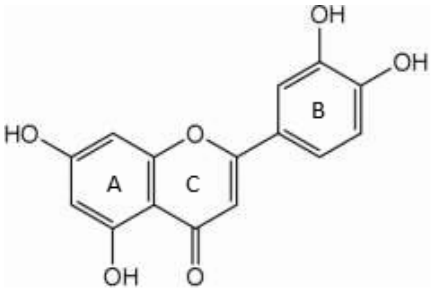

Figura 10. Estructura química de la luteolina

Molecularmente, la luteolina está formada por 3 anillos, el anillo A es un grupo resorcinol, el anillo B es un grupo catecol y el anillo C que contiene un doble enlace en el carbono 2-3 y un grupo 4-oxo. La luteolina se forma por hidroxilación en el C5' de la apigenina. Los grupos hidroxilo y el doble enlace están asociados a las actividades bioquímicas y biológicas de la luteolina como por ejemplo su buena capacidad anti-oxidante [17,44].

La luteolina posee varios efectos biológicos que se han demostrado científicamente. Entre estos efectos, se incluyen efectos antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, neuro y cardioprotectores, entre otros [44].

4.2. Evidencias científicas de las propiedades de la alcachofa

Como se ha comentado en el apartado 1.4, a lo largo de la historia se le han atribuido varias propiedades a los extractos de la alcachofa. A continuación veremos algunos estudios que aportan evidencias científicas sobre las propiedades de la alcachofa en los seres humanos, en modelos animales o in vitro (Tabla 5). Las propiedades que exhiben los extractos de alcachofa se le atribuyen al alto contenido en el ácido clorogénico y cinarina y flavonoides como la luteolina.

Como el objetivo de este trabajo es averiguar los afectos de la alcachofa sobre el metabolismo energético, en un estudio realizado Cho et al. en ratas, se vio que dietas altas en grasas suplementadas con el ácido clorogénico reducían significativamente el peso corporal, mejoraban el metabolismo lipídico y los niveles hormonales relacionados con la obesidad (leptina, adiponectina e insulina)[40]. Este estudio nos sugiere que la alcachofa puede utilizarse para combatir la obesidad en humanos, que posteriormente ha sido demostrado en estudios realizados por Rondanelli et al. [46,47]. Cabe señalar que por sus efectos hipoglucemiantes, que se le relacionen por el contenido del ácido clorogénico en los extractos de la alcachofa, también se puede utilizar como terapia para la diabetes tipo 2 [12,52].

Otras investigaciones indican que los extractos de la alcachofa poseen propiedades hipocolesterolémiantes, ya que inhiben la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la biosíntesis de colesterol. Este efecto inhibidor se relaciona con la luteolina, ácido clorogénico y cinarina [5,12,40]. Además, también se ha visto que estos extractos reducen la oxidación de LDL, gracias a alto contenido en compuestos fenólicos con actividad antioxidante, y también aumentan la secreción biliar para eliminar el colesterol (efecto colerético) [48]. La disminución del colesterol por parte del extracto de alcachofa puede también tener una repercusión en la disminución de enfermedades cardiacas y aterosclerosis, por ejemplo en el caso de la aterosclerosis, el extracto de la alcachofa tiene efecto sobre la regulación de la óxido nítrico sintasa endotelial, aumentando la producción del óxido nítrico con funciones vasodilatadoras y también inhibe la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, ICAM-1 y VCAM-1, reduciendo la adhesión de los monocitos al endotelio [12].

Por otra parte, les propiedades antioxidantes de la alcachofa se ha visto que tienen efectos hepatoprotectoras [49],protección contra el estrés oxidativo que mejora las ulceras gástricas inducidas por químicos como el etanol [35].

Por último, investigaciones recientes sugieren que el extracto de la alcachofa, especialmente algunos de sus compuestos, tienen efectos quimiopreventivos en el cáncer, propiedades neuroprotectoras y anti-VIH…[5,45,50] (Tabla 5).

Enfermedad	Ensayo Clínico o Línea Celular	Tratamiento/ Compuesto bioactivo	Dosis y Duración	Efectos del tratatamiento	Ref
Obesidad	55 sujetos obesos con el IMC 25-35 y DM2	Extracto alcohólico de cabezas de alcachofa	600 mg /día, 8 semanas	Reduce parámetros glucémicos, lipídicos y peso corporal	47
	40 sujetos con sobrepeso con IMC 25 y 35	Extracto de judías(EJ) y alcachofas	100 mg de EJ y 200 mg de alcachofa, 8 meses	Aumento de la sensación de saciedad, reducción de peso corporal y del IMC	46

Hipercoles-terolemia	47 sujetos con el IMC 19 – 30 con hiper-colesterolemia leve	Extracto de hoja de alcachofa (ALE)	2x250 mg ALE/ día, 8 semanas	Aumento de la [HDL] y disminución de [LDL] y colesterol total	51
	75 sujetos con IMC 20-25 con hiper-colesterolemia leve	Extracto de hoja de alcachofa (ALE)	280 mg ALE/ día, 12 semanas	Disminución de colesterol total (4,2%)	48
Diabetes mellitus	40 ratas machos adultos Wistar	Extracto hidroalcohólico de alcachofa	100 o 300 mg/peso/día, 6 días	Reducción de la glucemia y aumento de secreción de insulina. Además hay una reducción de las ALP, ALT y AST	52
Aterosclerosis	38 sujetos hiperlipidémicos (LDL 130-200 mg/dl y/o triglicéridos 150-250 mg/dl)	Jugo de hojas de alcachofa	20 ml de jugo/día, 6 semanas	Reducción de las VCAM-1 e ICAM-1 y la mejora de la vasodilatación mediada por el flujo de la arteria braquial	53
Hipertensión	98 varones con PAS:140-159 mmHg y/o PAD:90-99 mmHg	Concentrado de jugo de las hojas de alcachofa	2x 50 o 100 mg de jugo/día, 12 semanas	Se reduce la presión arterial dependiente de dosis	54
Daño hepático inducido por CCl_4	Ratas hembras Wistar	Extracto de hoja de alcachofa	1,5g/kg/día, 2 semanas	Disminución significativa de las actividades de las transaminasas plasmáticas (AST y ALT) y mejoras histopatológicos en el hígado después de la inyección de CCl_4 mediante la inducción de glutatión peroxidasa (GSH-Px), en ratas pretratadas con el extracto.	49
Ulcera gástrica inducida por etanol	Ratas Sprague-Dawley	Extracto de alcachofa	200 y 400 mg de extracto/kg	Aumento en la producción de moco gástrico, y una reducción del área de la úlcera dependiente de la dosis con 55,33% y 72,14%, y de los niveles de glutatión y la actividad de la catalasa.	35
Dispepsia	244 sujetos con diagnóstico de dispepsia funcional	Extracto de hoja de alcachofa	2x 320 mg de extracto/día, 6 semanas	Mejora significativa de los síntomas dispépticos parecida a los fármacos químicos	55
	454 sujetos con síntomas de dispepsia	Extracto acuoso de hojas de alcachofa	320 o 640 mg/ día, 2 meses	Mejora de los síntomas gastrointestinales y de la calidad de vida. Dosis altas reducen mejor los síntomas.	56
infecciones fúngicas	In vitro, con diferentes microorganismos	Extracto de cloroformo, etanol, acetato de etilo, de hojas, cabezas y tallos de alcachofa	12,5, 25, 50 mg/ml (hojas); 25, 50, 75 mg/ml (cabezas); 50, 100, 150 mg / ml (tallos)	Todos los extractos (hojas, cabezas y tallos) mostraron actividad anti fúngica. Los extractos de etanol mostraron el mayor grado de inhibición	57
Cáncer de mama	In vitro, línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB231	Extracto hidroalcohólico de cabezas y brácteas de la alcachofa(AEs) e ácido clorogénico	-Proliferación: 100-400µM AEs, 6 días -Citotoxicidad: 200-800 µM AEs, 24 horas; 200-1,200 Mm ACG, 24 y 48 horas	-El extracto induce apoptosis en la células mda-mb231, por activación de las caspasas-8 y 9. En cambio, en células normales no se ha visto estos efectos. -El ACG no tuvo efectos importantes sobre la tasa de muerte celular de las células MDA-MB231	50

Alzheimer inducido por STZ	60 ratas machos Wistar	Luteolina	10 o 20 mg /kg/día, 5 días	Luteolina mejoró significativamente la perdida de la memoria espacial y aprendizaje en ratas con Alzheimer	45
Isquemia cerebral focal	Ratas Sprague-Dawley	Ácido clorogénico	3, 10 y 30 mg ACG/kg, 1 semana	ACG reduce el daño en la barrera hematoencefálica y el riesgo de edemas cerebrales (efecto neuroprotector contra la isquemia)	58
anti-VIH	In vitro, línea celular MT-2	Cinarina	25- 250 µM	inhibición de la replicación del VIH-1 25µM (EC_{50})	59

Tabla 5. Propiedades demostradas del extracto o compuestos de la alcachofa. En la tabla se detallan algunos estudios, relacionados con la salud, llevados a cabo sobre la alcachofa o sus compuestos durante los últimos años. Se puede observar que el extracto de la alcachofa tiene diversas propiedades para combatir o prevenir diferentes enfermedades. IMC: índice de masa corporal, DM2: Diabetes mellitus2, ALP: fosfatasa alcalina, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, VCAM-1 e ICAM-1: moléculas de adhesión endoteliales EC_{50}: concentración efectiva media

En conclusión, gracias a las investigaciones que se han llevado a cabo se ha podido comprobar las propiedades beneficiosas para la salud debido a su alta composición en fitoquímicos como se ha visto anteriormente (apartado 4.1). Por estas evidencias científicas, la alcachofa tiene características de un alimento funcional, y su consumo es muy interesante a nivel de salud.

El ácido clorogénico induce la marronización en adipocitos blancos 3T3-L1 a bajas dosis.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha observado que el tejido adiposo blanco tiene una cierta plasticidad o capacidad de remodelación para cambiar de fenotipo. Esta remodelación consiste en un proceso llamado "marronización" o browning, que es el oscurecimiento del adipocitos blancos adquiriendo características de adipocitos marrones y se denominan adipocitos "beige" o "brite". Los adipocitos beige expresan UCP1, proteína clave de la termogénesis, tienen un contenido mayor de mitocondrias y mayor gasto energético [22,23]. El proceso de marronización se puede inducir por varios factores como la exposición prolongada al frío, agonistas beta adrenérgicos, ácido retinoico, dietas hiperlipídicas, entre otros. Representa un mecanismo con potenciales propiedades terapéuticas en diversas enfermedades, especialmente en el caso de la obesidad, como se ha comentado anteriormente [23].

Últimamente hay muchas investigaciones relacionadas con la remodelación de los adipocitos blancos mediante compuestos bioactivos [18]. De ahí que nuestro objetivo de esta parte del trabajo sea estudiar los efectos del ácido clorogénico (ACG) en la marronización de adipocitos maduros blancos ya que se ha visto que el ACG modula el metabolismo glucídico y lipídico [60], y tiene efectos anti-obesidad [40].

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Para llevar a cabo nuestro objetivo se va a analizar la expresión de algunos genes que están relacionados con la remodelación de tejido adiposo en adipocitos blancos maduros de la línea celular 3T3-L1 tratados durante 24 horas con concentraciones crecientes de ácido clorogénico (ACG) mediante RT-PCR a tiempo real. Estos genes son los siguientes:

- Pparγ2 (*peroxisome proliferator activated receptor gamma 2*): Pparγ2, un regulador maestro de la diferenciación de adipocitos, que se expresa tanto en el WAT como BAT, se requiere para la formación de grasa marrón [61].
- Ucp2 (*Uncoupling protein 2*): es un gen que codifica para una proteína mitocondrial clave en la regulación central del metabolismo de la energía mediante la modulación de la producción de ROS. La expresión de UCP2 se aumenta mediante los receptores nucleares pparγ, pgc1α y productos ROS. En el tejido adiposo tiene un papel importante contra el estrés oxidativo [62].
- Pgc1α (*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1α*), prdm16 (*PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain containing protein-16*) y cidea (*Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A*) son genes implicados en la regulación de la marronización del tejido blanco. El pgc1α induce y coordina genes que están relacionados en la biogénesis mitocondrial y termogénesis (UCP1), y coactiva el pparγ y otros receptores nucleares [61]. Prdm16 estimula la marronización mediante la unión a PGC-1α, PGC-1β, C / EBP-β y la activación de PPARγ. CIDEA es coactivador transcripcional que se expresa abundantemente en el tejido adiposo marrón y se induce mediante la expresión de PPARγ[61,63].

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y diferenciación celular de 3T3-L1

Las células de preadipocitos 3T3-L1 de ratón se adquirieron de la casa comercial ZenBio, se cultivaron en dos placas de 12 pocillos en un medio de preadipocitos (PM-1-L1) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 hasta la confluencia (7 días). EL medio PM-1-L1 se cambió cada dos días [64].

Cuando las células 3T3-L1 alcanzaron la confluencia después de 48 h de incubación (día 0), se cambió el medio PM-1-L1 por el medio de diferenciación (Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2% de solución de penicilina-estreptomicina, 0.5mM 3-isobutil-1-metilxantina(IBMX), 50nM de dexametasona, 1% piruvato de sodio y 5 µg/ml de insulina) y las células se incubaron a 37 °C con un 8% de CO_2 durante 2 días. Después de 48h (día 2), el medio de diferenciación se cambió a un medio de mantenimiento sin dexametasona ni IBMX y se incubó durante 5 días más, cambiando el medio cada dos días [64].

Tratamiento

Los adipocitos 3T3-L1 se recogieron 8 días después de la iniciación de la diferenciación y fueron tratadas con 1 a 50 µM del ácido clorogénico (≥98.0%, Sigma-Aldrich) diluido en DMSO y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera humidificada 5% de CO_2 incubadora. Se realizaron 6 grupos: Grupo control o vehículo (DMSO), grupo tratamiento de 1, 5, 10, 25 y 50 µM del ácido clorogénico. Después de 24h se observaron las células con microscopio para ver los efectos de tratamiento y finalmente se congelaron las muestras a -80 °C para la posterior extracción de ARN.

Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

La extracción de ARN de las células tratadas se realizó en columnas mediante el kit E.Z.N.A. Total RNA y se siguió los pasos indicados en el protocolo del kit. El ARN extraído se resuspendió en agua libre de ARNasas y se medió la concentración del ARN con el espectrofotómetro *NanoDrop* ND-1000. Después se realizaron diluciones del ARN de las muestras a 50 ng/µL. Con las diluciones de ARN a 50 ng/µL, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% con *Syber Safe* para determinar la integridad del ARN total de las muestras.

La síntesis de ADNc se realizó mediante la transcripción reversa-PCR, utilizando el Termociclador 2720 de *Applied biosystems*, a partir de 0,25µg de ARN diluido de cada muestra que ha sido desnaturalizado a 65 ˚C durante 10 minutos y después se le añade una mix (master mix) que contiene: 1.25µL de M-MuLV *Reverse Transcriptase Reaction Buffer* 10X, 1.25µL de MgCl2 25mM, 2µL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2.5mN, 0.5µL de *random hexamers* 50µM, 0.5µL de inhibidor de RNasas 20 U/µL, 0.5µL de transcriptasa reversa 50 U/µL y 1.5µL de agua libre de ARNasas para cada muestra.

Una vez obtenido el ADNc de las muestra, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando el *StepOnePlusTM Real-Time PCR System* de *Applied Biosystems* para analizar la expresión génica de los genes: β-actina (gen constitutivo), pparγ2 , ucp2, pgc1α, prdm16 y cidea, estos tres últimos genes se consideran genes clave en el browning del WAT; utilizando 2µL del producto de la transcripción reversa diluido a 1/5 y una mix (master mix), para cada muestra, que

contiene: 5µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X, 0.45 µL del primer forward (10µM) y otros 0.45 µL del reverse (10µM) y 3.1 µL de agua libre de ARNAsas. En la tabla 6 se detallan la pareja de los primers usados en este estudio.

Tabla 6. Secuencias de los primers usados en PCR en tiempo real

Gen	Primer forward	Primer reverse
β-actina (Bac)	ACGGGCATTGTGATGGACTC	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC
Pparγ2	AGAGCCTTCAAACTCCCTCA	GAGACATCCCCACAGCAAG
Ucp2	GGTCGGAGATACCAGAGCAC	ATGAGGTTGGCTTTCAGGAG
Pgc1α	CCTGCCATTGTTAAGACCGAGAA	CTGTGGGTTTGGTGTGAGGAG
Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
Cidea	GTCGGGTCAAGTCGTCGCGG	CCACGCCGGCTACTTCGGTC

Todos los grupos, tanto control como los tratamientos (10, 25, 50 µM), se realizaron por cuadriplicado (n=4), y se utilizó el valor medio de la Ct (*cycle threshold* o ciclo umbral) para evaluar la expresión génica. La expresión relativa de los genes se calculó según el método descrito por M. W. Pfaffl [65], siendo el gen de la β-actina el gen de normalización.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media de la expresión relativa ± error estándar (SEM). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias se determinaron mediante la prueba de *t* Student de una cola. Los niveles de expresión de los diferentes ARNm para el grupo control o vehículo fue establecido como 100%, y los niveles de expresión de ARNm de las diferentes muestras tratadas fueron comparados con el grupo vehículo.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Después de 24 horas de tratamiento con el ácido clorogénico (ACG), se ve una disminución de la expresión del ARNm de pparγ2 como estaba descrito en la bibliografía para concentraciones altas [66] (Figura 11. B), pero esta disminución no se acompaña de la disminución de lípidos en las células 3T3-L1 como se puede observar en las fotos de microscopia (Figura 11. A).

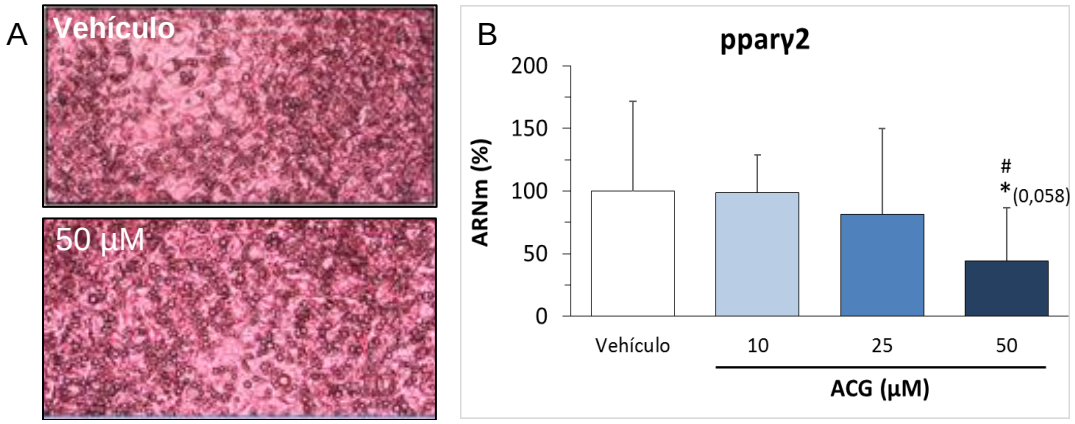

Figura 11. Microfotografías y niveles de expresión del ARNm del PPARγ2 en adipocitos 3T3-L1. (A) Microfotografías de adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con vehículo (DMSO) y ACG de 50µM respectivamente. Magnificación (x100). (B) Niveles de ARNm de PPARγ2 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con diferentes dosis del ácido clorogénico (ACG) o vehículo (DMSO). Se representa la media ± SEM (n=4) de los valores relativos respecto a las células tratadas con vehículo (100%). Las diferencias significativas se estudiaron con el test *t*-Student: * Control vs Tratamiento: # Tratamiento 10µM ACG vs 50µM ACG. ACG, ácido clorogénico.

El tratamiento con el ACG a 10µM durante 24 horas en adipocitos maduros incrementa en un 50% los niveles de ARNm del pgc1α, proteína con funciones inductoras de la marronización, y tiende a subir los niveles de ARNm de la ucp2, proteína clave en la respuesta al estrés oxidativo. En contraste con el tratamiento a 50µM ACG, bajan los niveles de expresión de ARNm de la ucp2 (30%) y cidea (40%) respecto a los niveles de las células tratadas con el vehículo (DMSO) (Figura 12). Además, en la Figura 12 se puede observar que no hay diferencias muy significativas en los niveles de ARNm de prdm16 a las distintas dosis de ACG estudiadas y cabe destacar que el nivel de expresión de prdm16 es muy bajo (Ct>29).

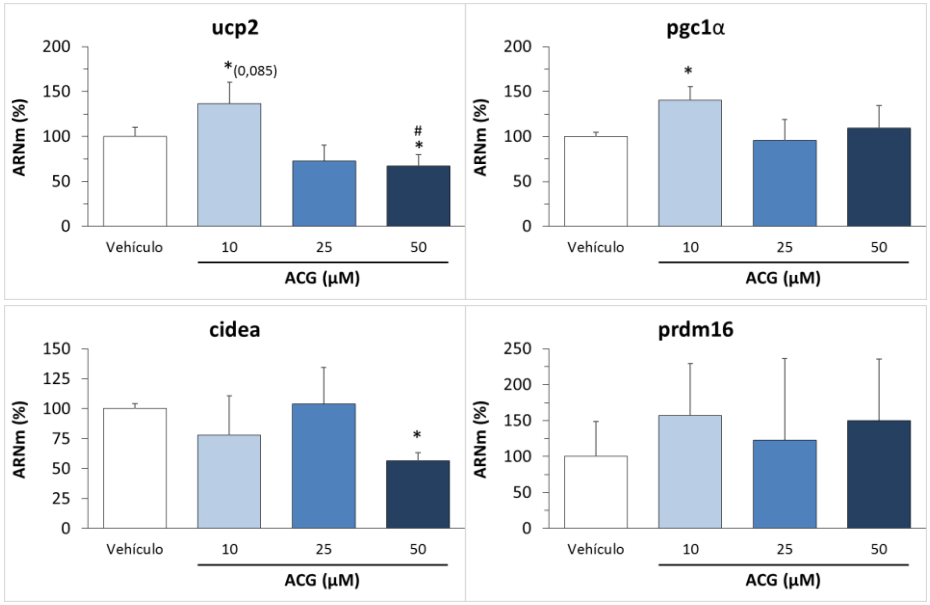

Figura 12. Niveles de ARNm de distintos genes adipogénicos en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con diferentes dosis del ácido clorogenico (ACG) o vehículo (DMSO). Se representa la media ± SEM (n=4) de los valores relativos respecto a las células tratadas con vehículo (100%). Las diferencias significativas se estudiaron con el test t-Student: * Control vs Tratamiento; # Tratamiento 10µM ACG vs 50µM ACG 10. ACG, ácido clorogénico.

En conjunto, sugiere que el ACG tiene un efecto dual, a dosis bajas se induce la capacidad oxidativa/marronización, por el incremento de los niveles de ucp2 y pgc1α, mientras que a dosis más altas del ACG se inhibe la capacidad adipogénica de los adipocitos (lipogénesis) y esta capacidad de marronización, por la inhibición de la expresión del ARNm de pparγ2, ucp2 y cidea,

CONCLUSIÓNES GENERALES

La alcachofa es una hortaliza típica del Mediterráneo, que se puede considerar un alimento funcional debido a su contenido alto en compuestos bioactivos que le otorgan diversas propiedades farmacológicas y terapéuticas interesantes para la salud.

Su composición bioquímica varía en función de su origen, parte de la alcachofa y también de la cocción, siendo los compuestos con más concentración, los ácidos clorogénicos, abundantes tanto en la hoja como en las cabezas de la alcachofa. Se ha demostrado en varios estudios que el ácido clorogénico modula el metabolismo energético y puede ser un interesante suplemento para el tratamiento de la obesidad.

Los extractos de la alcachofa, generalmente de las hojas que se comercialicen en forma de suplemento, tienen propiedades potenciales e interesantes sobre diferentes enfermedades, como la obesidad, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, cáncer, entre otras. Algunas de estas propiedades se han demostrado ya en humanos como por ejemplo es el caso de hipercolesterolemia y obesidad, mientras que otras propiedades están en fase de investigación.

En cuanto al trabajo experimental, los resultados que hemos obtenido sugieren que el ácido clorogénico tiene un efecto dual, a dosis bajas (10µM) se induce la marronización tendiendo a aumentar los niveles de ARNm de pgc1α, ucp2, sin embargo, a dosis altas (50µM) se inhibe esta capacidad de marronización y la adipogénesis.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutor, el Dr. Joan Ribot Riutort, por confiar en mí para elaborar el Trabajo de Fin de Grado propuesto por él, además del tiempo dedicado para poder guiarme en la realización de este proyecto, tanto a nivel teórico como práctico. También quiero agradecerle la oportunidad que me dio al concederme la plaza como alumno colaborador y de esta manera poder aprender más y aumentar mi experiencia en los laboratorios. No solo me gustaría agradecerle a nivel académico, sino también por los consejos que he recibido por su parte a nivel personal y profesional, consejos que serán útiles a lo largo de mi carrera como bioquímico.

Por otro lado, me gustaría agradecer también a los que hayan participado y colaborado en la elaboración del trabajo experimental, la estudiante de doctorado en nutrigenómica Andrea Arreguin Martín, quien me ayudó en el cultivo celular, y a quien le agradezco su apoyo en todo momento durante el trabajo de laboratorio. De la misma manera, me gustaría agradecer a mi compañero y amigo, Jorge R. Soliz Rueda, que durante sus prácticas del Máster, haya colaborado conmigo en el Trabajo experimental, por sus consejos para la elaboración y redacción del presente trabajo.

También quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos que me han ayudado en algún momento de la carrera, y de forma especial a mis dos amigas y compañeras de carrera, Claudia Almaraz Lopez y Paola Quishpe Riera, por su apoyo, por sus consejos y, sin duda alguna, por su compañía a lo largo de mi carrera.

Por último, y no menos importante, me gustaría agradecer a toda mi familia por apoyar y animar la decisión de estudiar Bioquímica, especialmente por el gran esfuerzo realizado durante estos años por parte de mis padres, Ali Ahmiane y Fadma Akodad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V. & Cardinali, A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods* **1,** 131–144 (2009).

2. Sonnante, G. & Carluccio, A. On the origin of artichoke and cardoon from the Cynara gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genet. Resour. …* (2007).

3. Sekara, A., Kalisz, A., Gruszecki, R., Grabowska, A. & Kunicki, E. Globe artichoke – a vegetable, herb and ornamental of value in central Europe: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* (2015).

4. Ciancolini, A. Characterization and selection of globe artichoke and cardoon germplasm for biomass, food and biocompound production. (2012).

5. *Vegetables I*. **1,** (Springer New York, 2008).

6. De Falco, B., Incerti, G., Amato, M. & Lanzotti, V. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochem. Rev.* **14,** (2015).

7. Gatto, A., De Paola, D., Bagnoli, F., Vendramin, G. G. & Sonnante, G. Population structure of Cynara cardunculus complex and the origin of the conspecific crops artichoke and cardoon. *Ann. Bot.* **112,** 855–65 (2013).

8. Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G. & Williamson, G. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild Cynara cardunculus L. genotypes. *Food Chem.* **126,** 417–422 (2011).

9. Sonnante, G., Pignone, D. & Hammer, K. The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Ann. Bot.* **100,** 1095–100 (2007).

10. Giaconi, V. & Escaff, M. *Cultivo de Hortalizas*. (Editorial Universitaria).

11. FAOSTAT. FAOSTAT. (2016). Available at: http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E. (Accessed: 10th March 2016)

12. Ben Salem, M. *et al.* Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **70,** 441–53 (2015).

13. Negro, D. *et al.* Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J. Food Sci.* **77,** C244–52 (2012).

14. Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (Cynara scolymus L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem.* **141,** 2269–77 (2013).

15. Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G. & Williamson, G. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus) germplasm. *J. Food Compos. Anal.* **24,** 148–153 (2011).

16. Lutz, M., Henríquez, C. & Escobar, M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (Cynara scolymus L.), raw and cooked. *J. Food Compos. Anal.* **24,** 49–54 (2011).

17. Yao, L. H. *et al.* Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **59,** 113–122 (2004).

18. Tucakovic, L., Colson, N. & Singh, I. Relationship between Common Dietary Polyphenols and Obesity-Induced Inflammation. *Food and Public Health* **5,** 84–91 (2015).

19. Yun, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. *Phytochemistry* **71,** 1625–41 (2010).

20. Yatsuya, H. *et al.* Global trend in overweight and obesity and its association with cardiovascular disease incidence. *Circ. J.* **78,** 2807–18 (2014).

21. Meydani, M. & Hasan, S. T. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients* **2,** 737–51 (2010).

22. Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10,** 24–36 (2014).

23. Poekes, L., Lanthier, N. & Leclercq, I. A. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin. Sci.* **129,** 933–949 (2015).

24. HOME - PUBMED - NCBPubMed - NCBI. (2016). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed. (Accessed: 15th March 2016)

25. ScienceDirect. (2016). Available at: http://www.sciencedirect.com/. (Accessed: 15th March 2016)

26. Pandino, G., Lombardo, S., Williamson, G. & Mauromicale, G. Polyphenol profile and content in wild and cultivated Cynara cardunculus L. *Italian Journal of Agronomy* **7,** 35 (2012).

27. Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants* **7,** 1250–1318 (2000).

28. Adlard, E. R. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. *Chromatographia* **72,** 1021–1021 (2010).

29. Saucier, C. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry applied to the analysis of volatiles in artichoke (Cynara scolymus L.) leaves. *Ind. Crops Prod.* **62,** 507–514 (2014).

30. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* **46,** 446–75 (2008).

31. Lombardo, S. *et al.* Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [Cynara cardunculus L. var. scolymus (L.) Fiori]. *Food Chem.* **119,** 1175–1181 (2010).

32. King, A. & Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* **99,** 213–8 (1999).

33. Aksu, Ö. & Altinterim, B. Hepatoprotective effects of artichoke (Cynara scolymus). *tunceli.edu.tr* **1,** (2013).

34. *Flavours and Fragrances*. (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-49339-6

35. Nassar, M. I. *et al.* Chemical constituents and anti-ulcerogenic potential of the scales of Cynara scolymus (artichoke) heads. *J. Sci. Food Agric.* **93,** 2494–501 (2013).

36. Buttery, R. G., Guadagni, D. G. & Ling, L. C. Volatile aroma components of cooked artichoke. *J. Agric. Food Chem.* **26,** 791–793 (1978).

37. Hadaruga, N. *et al.* Multivariate analysis (PCA) in Compositae biocompounds class. *J. Agroaliment. Process Technol.* **15,** 201–210 (2009).

38. Tuan, P. A. *et al.* Enhancement of chlorogenic acid production in hairy roots of Platycodon grandiflorum by over-expression of an Arabidopsis thaliana transcription factor AtPAP1. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 14743–52 (2014).

39. Comino, C. *et al.* The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biol.* **9,** 30 (2009).

40. Cho, A.-S. *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* **48,** 937–43 (2010).

41. Ong, K. W., Hsu, A. & Tan, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem. Pharmacol.* **85,** 1341–51 (2013).

42. Topal, M. *et al.* Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (Onopordum illyricum L.). *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31,** 266–75 (2016).

43. Panizzi, L. & Scarpati, M. L. Constitution of Cynarine, the Active Principle of the Artichoke. *Nature* **174,** 1062–1062 (1954).

44. Dwight, A. J. *Luteolin: Natural Occurrences, Therapeutic Applications and Health Effects*. (Nova Science Publishers Inc, 2015).

45. Wang, H., Wang, H., Cheng, H. & Che, Z. Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. *Mol. Med. Rep.* **13,** 4215–4220 (2016).

46. Rondanelli, M., Giacosa, A., Orsini, F., Opizzi, A. & Villani, S. Appetite control and glycaemia reduction in overweight subjects treated with a combination of two highly standardized extracts from Phaseolus vulgaris and Cynara scolymus. *Phytother. Res.* **25,** 1275–82 (2011).

47. Rondanelli, M. *et al.* Metabolic management in overweight subjects with naive impaired fasting glycaemia by means of a highly standardized extract from Cynara scolymus: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Phytother. Res.* **28,** 33–41 (2014).

48. Bundy, R., Walker, A. F., Middleton, R. W., Wallis, C. & Simpson, H. C. R. Artichoke leaf extract (Cynara scolymus) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* **15,** 668–75 (2008).

49. Mehmetçik, G., Ozdemirler, G., Koçak-Toker, N., Cevikbaş, U. & Uysal, M. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Gesellschaft für Toxikologische Pathol.* **60,** 475–80 (2008).

50. Mileo, A. M., Di Venere, D., Linsalata, V., Fraioli, R. & Miccadei, S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *J. Cell. Physiol.* **227,** 3301–9 (2012).

51. Rondanelli, M. *et al.* Beneficial effects of artichoke leaf extract supplementation on increasing HDL-cholesterol in subjects with primary mild hypercholesterolaemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **64,** 7–15 (2013).

52. Hosseini, S. E., Mousaei, S. & Tavakoli, F. Effect of hydro alcoholic extract of artichoke on diabetes treatment and liver enzymes in diabetic adult male rats. *Adv. Herb. Med.* **1,** 17–21 (2015).

53. Lupattelli, G. *et al.* Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sci.* **76,** 775–82 (2004).

54. Roghani-Dehkordi, F. & Kamkhah, A.-F. Artichoke leaf juice contains antihypertensive effect in patients with mild hypertension. *J. Diet. Suppl.* **6,** 328–41 (2009).

55. Holtmann, G. *et al.* Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18,** 1099–1105 (2003).

56. Marakis, G. *et al.* Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. *Phytomedicine* **9,** 694–9 (2002).

57. Zhu, X. F., Zhang, H. X. & Lo, R. Antifungal activity of Cynara scolymus L. extracts. *Fitoterapia* **76,** 108–11 (2005).

58. Lee, K. *et al.* Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **689,** 89–95 (2012).

59. Slanina, J. *et al.* New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Lett.* **42,** 3383–3385 (2001).

60. Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. & Hu, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013,** (2013).

61. Spiegelman, B. M., Puigserver, P. & Wu, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24 Suppl 4,** S8–10 (2000).

62. Toda, C. & Diano, S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **28,** 757–64 (2014).

63. Chi, J. & Cohen, P. The Multifaceted Roles of PRDM16: Adipose Biology and Beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* **27,** 11–23 (2016).

64. Zen-Bio. 3T3-L1 Cell Care Manual Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes. *Differentiation* **0692,** 1–9 (2010).

65. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29,** e45 (2001).

66. Prabhakar, P. K. & Doble, M. Interaction of cinnamic acid derivatives with commercial hypoglycemic drugs on 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **59,** 9835–44 (2011).

67. USDA. USDA Nutrient Database. (2016).