



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**Departamento de Química y Física**

**Máster Universitario Oficial en Residuos de plaguicidas y  
contaminantes. Control alimentario y ambiental.**

**Trabajo Fin de Máster:**

**“Determinación de ácido clorogénico en distintas variedades de  
berenjena (*Solanum melongena* L.)”**

**Ana Martos López**

**Julio 2013**

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER:**

El presente trabajo realizado por Ana Martos López se ha presentado para la obtención del título correspondiente al Máster de “Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”.

Fdo. Ana Martos López

Tutor: Dr. Roberto Romero González

Fdo. Roberto Romero González



## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>PRESENTACIÓN</b> .....	6
<b>II.</b>	<b>MEMORIA CIENTÍFICA</b> .....	10
	<b>1. Objeto y campo de aplicación</b> .....	10
	<b>2. Introducción</b> .....	11
	<b>2.1. Berenjena y su importancia</b> .....	11
	<b>2.2. La berenjena y los compuestos fenólicos</b> .....	15
	<b>2.3. Ácidos fenólicos: Ácido clorogénico</b> .....	16
	<b>2.3.1. Ácido clorogénico</b> .....	18
	<b>2.4. Técnicas analíticas para la determinación de ácidos fenólicos en</b> <b>matrices vegetales</b> .....	20
	<b>2.4.1. Técnicas de extracción</b> .....	20
	<b>2.4.2. Técnicas de determinación</b> .....	22
	<b>3. Experimental</b> .....	25
	<b>3.1. Materiales y equipos</b> .....	25
	<b>3.1.1. Reactivos</b> .....	25
	<b>3.1.2. Equipos</b> .....	25
	<b>3.2. Método cromatográfico</b> .....	26
	<b>3.3. Método espectrométrico</b> .....	26

3.4. Procedimiento de extracción.....	27
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
4.1. Validación del método analítico.....	27
4.1.1. <i>Control de Calidad Interno.....</i>	<i>29</i>
4.2. Análisis de ácido clorogénico en muestras de berenjena.....	31
4.2.1. <i>Determinación del contenido de ácido clorogénico en</i> <i>distintas variedades de berenjena.....</i>	<i>31</i>
4.2.2. <i>Determinación de la concentración de ácido clorogénico en</i> <i>híbridos derivados de cruces de las variedades anteriores</i>	<i>33</i>
4.2.3. <i>Determinación de la variabilidad intraplanta, evolución en el</i> <i>contenido del ácido clorogénico y heredabilidad del</i> <i>contenido en siguientes generaciones.....</i>	<i>38</i>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>56</b>

## **I. PRESENTACIÓN**

El Máster denominado “*Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental*”, realizado durante el curso académico 2011-2012 y 2012-2013, consta de 60 créditos ECTS estructurado en cinco módulos, siendo los tres primeros mayoritariamente de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y el quinto engloba la elaboración, redacción y defensa del Trabajo Fin de Máster, con el que se opta al Título de Máster.

El contenido de los distintos módulos se describe brevemente a continuación:

### **MÓDULO I – PLAGUICIDAS (12 créditos ECTS)**

Consta de las siguientes materias:

1. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada)
2. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos, cursada)
3. Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada)
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada)

Este módulo comenzó con el estudio de las técnicas y equipos de aplicación de fitosanitarios, continuando con una revisión general de las estructuras y propiedades de los principales grupos de fitosanitarios.

También se ha adquirido una visión general sobre el conjunto de políticas, leyes, normas y decretos que se aplican al control de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos, a nivel internacional, nacional y autonómico.

Por otra parte, se han obtenido conocimientos sobre los objetivos y procedimientos a seguir para el registro de plaguicidas, considerando el marco normativo y administrativo de España y Europa.

Por último, se han estudiado aspectos sobre tipos, aplicaciones y formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, considerando entre otros aspectos la eficacia y su impacto en el medioambiente.

## **MÓDULO II – CONTAMINANTES (9 créditos ECTS)**

Comprende las siguientes materias:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada)
2. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, cursada)
3. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada)

En este módulo, se han adquirido conocimientos relacionados con los sistemas de gestión de la calidad y seguridad alimentaria y del marco normativo relacionado con ello, haciendo especial hincapié en aspectos tales como el fraude alimentario y las estrategias para detectarlo, así como de los sistemas de trazabilidad alimentaria.

También se han abordado aspectos relacionados con la toxicología general, alimentaria y ambiental para desarrollar habilidades de intervención en programas industriales de producción de alimentos y gestión ambiental, así como, el desarrollo de conocimientos necesarios para la evaluación de la contaminación de las distintas muestras alimentarias y biológicas.

Finalmente, se ha estudiado la composición del suelo, los contaminantes que más inciden sobre el mismo y los diferentes métodos y técnicas para la prevención de la contaminación y para la remediación de suelos contaminados.

## **MÓDULO III – GESTIÓN DE LABORATORIOS (9 créditos ECTS)**

Consta de las siguientes materias:

1. Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos, cursada)
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, cursada)
3. Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos, cursada)

En este módulo se han adquirido conocimientos relacionados con los principales procedimientos de toma de muestra y su importancia dentro del problema analítico, así como, las principales técnicas para la separación y/o preconcentración de trazas. En relación al muestreo, se han considerado los tipos de muestreo, la incertidumbre asociada, el diseño de un plan de muestreo y la legislación en que se enmarca.

También, se ha estudiado de forma general la metrología, los diferentes ensayos de significación de aplicación a datos analíticos, los parámetros de validación de métodos cuantitativos y cualitativos y los controles de calidad interno y externo.

Por último, se ha abordado el estudio de los sistemas de gestión de calidad en laboratorios incluyendo normas ISO y Buenas Prácticas en Laboratorios (BPLs). Se han estudiado los fundamentos de las mismas, y además, se han señalado aspectos relativos a gestión de personal y de equipos y los procedimientos de evaluación de la calidad basado en el sistema de auditorías.

#### **MÓDULO IV – EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS (15 créditos ECTS)**

Comprende las siguientes materias:

1. Espectrometría de masas (3 créditos, cursada)
2. Productos de transformación de plaguicidas (3 créditos, cursada)
3. Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada)

En este módulo se han adquirido conocimientos sobre los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas, los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores y detectores, modos de operación, criterios de identificación y formas de cuantificación enfocadas al desarrollo de métodos de análisis de residuos de plaguicidas y contaminantes orgánicos.

Igualmente, se abordó la aplicación de estas técnicas a la identificación de productos de transformación y de las rutas de degradación de plaguicidas en el campo agroalimentario y ambiental. Además, se estudió cómo abordar la legislación vigente en relación a la presencia de estos productos en distintas matrices.



Por último, se han estudiado las distintas técnicas cromatográficas tanto de gases como de líquidos, así como, el acoplamiento con la espectrometría de masas y detectores convencionales. Además, se evaluaron los diferentes parámetros que influyen en el proceso de separación cromatográfica y optimización del sistema de detección.

## **MÓDULO V – TRABAJO FIN DE MÁSTER (15 créditos ECTS)**

El trabajo fin de Máster titulado: **“Determinación de ácido clorogénico en distintas variedades de Berenjena (*Solanum melongena L.*)”** se ha realizado en el Grupo de Investigación “Química Analítica de Contaminantes”, perteneciente al Departamento de Química y Física de la Universidad de Almería.

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han adquirido habilidades y conocimientos para:

1. Buscar información bibliográfica y legislación relacionada a la temática del trabajo científico desarrollado.
2. Planificar y realizar estudios científicos relacionados con la presencia de productos naturales en vegetales.
3. Determinación de productos naturales presentes en vegetales mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (QqQ-MS/MS).

Los conocimientos adquiridos conceden la aptitud necesaria para poder planificar, documentar, desarrollar, validar y aplicar de forma autónoma métodos analíticos para el análisis cualitativo y cuantitativo de los fitoquímicos presentes en alimentos.

Finalmente, cabe mencionar que la realización de las materias cursadas en el Máster, así como, el desarrollo del Trabajo de Fin Máster, han permitido adquirir competencias, entre las que se pueden mencionar capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia, siendo éstas fundamentales tanto para la consolidación de la formación científica como para el desarrollo profesional.

## **II. MEMORIA CIENTÍFICA**

### **1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Debido a la creciente preocupación que se está experimentando en los últimos años acerca de los distintos productos alimentarios, es cada vez más necesario realizar estudios más exhaustivos en busca de compuestos beneficiosos para la salud.

Este trabajo tiene por objetivo la determinación del contenido de ácido clorogénico en distintas variedades de berenjena (*Solanun melongena L.*) ya que, el ácido clorogénico es bien conocido como eficaz antioxidante, posee una importante actividad antitumoral, anticolerético, antiinflamatoria, antimicrobiana y antimutagénica, además de otras acciones farmacológicas, mediante cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuádruplo (QqQ-MS/MS). Para tal fin se han llevado a cabo tres objetivos diferentes:

#### Primer Objetivo:

- ✓ Puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de ácido clorogénico en berenjena.
- ✓ Determinación del contenido de ácido clorogénico en diferentes variedades de berenjena.

#### Segundo Objetivo:

- ✓ Determinación de la concentración de ácido clorogénico en híbridos derivados de cruces de las variedades anteriores.

Tercer Objetivo:

- ✓ Evaluación de la variabilidad intraplanta.
- ✓ Evolución en el contenido del ácido clorogénico.
- ✓ La heredabilidad del contenido en ácido clorogénico a siguientes generaciones.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Berenjena y su importancia

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) recomienda el consumo diario de al menos cinco piezas de frutas u hortalizas debido a las evidencias acumuladas de que los nutrientes presentes en estos productos son beneficiosos para la salud [1].

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una hortaliza común consumida en todo el mundo. Es un miembro de la familia de la patata y es mundialmente conocida con varios sinónimos como *aubergine*, *brinjal*, *melanzana*, *huevo de jardín* y *patlican* [2], indicándose que es nativa de India, con centros secundarios de diversidad en otras partes del sudeste de Asia y China [3]. Es una especie con una importancia económica considerable en muchas partes del mundo incluyendo Asia, África y las zonas subtropicales de India y América Central, siendo, particularmente importante en India, China y sudeste asiático. De forma general se pueden cultivar distintas variedades de berenjena como *S. aethiopicum*, *S. anomalum*, *S. macrocarpon*, *S. incanum*, *S. nigrum*, *S. gilo* y *S. duplosinuatum* en África, *S. muricatum*, *S. quitoense*, *S. piliferum* y *S. topiro* en América Central y en América del Sur, mientras que en el sudeste asiático se suele cultivar *S. blumei*, *S. indicum*, *S. macrocarpon*, *S. nigrum* y *S. torvum* [3]. En Europa, los tipos varietales suelen corresponder a plantas vigorosas de frutos grandes, pertenecientes al grupo H [4], el cual corresponde a cultivos modernos distribuidos por todo el mundo [5] y que genética y morfológicamente son muy similares a las formas españolas [4]. Entre algunas de las variedades más conocidas se encuentran *S. black beauty*, *S. dourga*, *S. de barbentane* y *S. Fairy* [4].

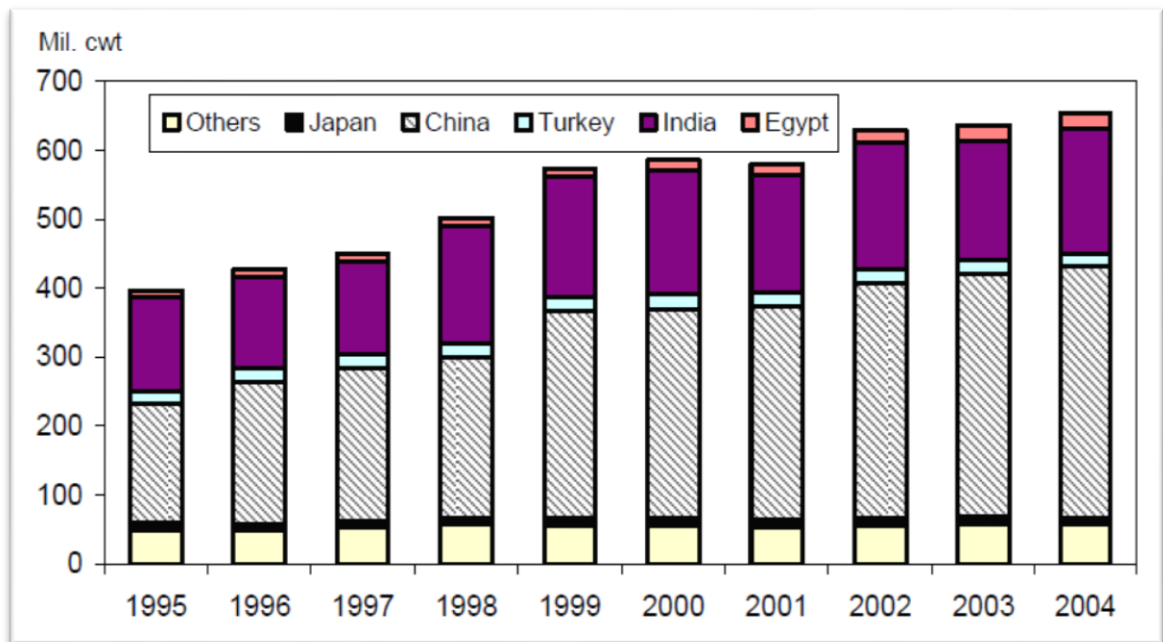
Finalmente, en España la berenjena está profundamente arraigada en la cultura culinaria y se pueden encontrar una gran diversidad de tipos locales de berenjena [4].

Algunas de las variedades tradicionales de berenjena más conocidas en España son la larga negra, listada de Gandía y de Almagro, mostrándose en la Figura 1 la forma de las mimas.



**Figura 1. Variedades de berenjena más conocidas: a) Larga negra (izquierda), b) Listada de Gandía (centro) y c) de Almagro (derecha).**

La producción mundial de berenjena es muy elevada y un 93% de dicha producción pertenece a siete países principalmente. China con un 55% de producción e India con un 28% son los mayores productores, seguida de Estados Unidos, Egipto, Turquía y Japón, mostrándose en la Figura 2 los distintos productores de berenjena. Más de cuatro millones de terreno son dedicados al cultivo de berenjena en el mundo [6].

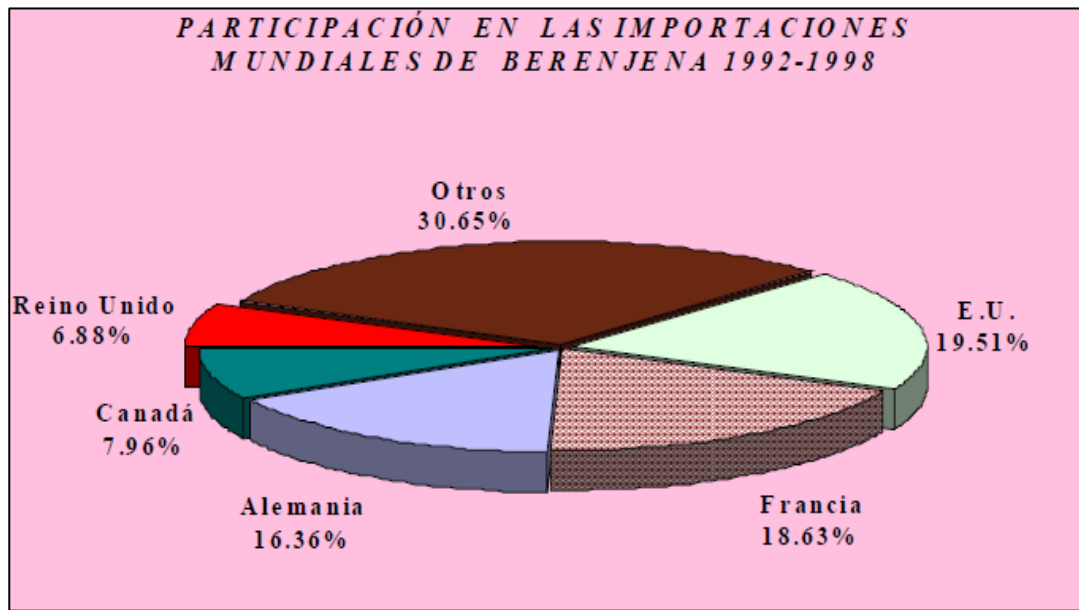


**Figura 2. Principales países productores de berenjena (*Vegetables and Melons Outlook/VGS-318/December 14, 2006*).**

En el ámbito europeo, los mayores productores de berenjena son España, Holanda, Italia (con una producción de berenjenas anual de más de 3 millones de toneladas, concentrada sobre todo en Sicilia) y Grecia [7].

Por otro lado, la berenjena es una especie ampliamente cultivada en los Estados Unidos. De acuerdo con el Censo de Agricultura del 2007, la berenjena fue cultivada en 2.900 granjas durante ese año, a diferencia de las 690 granjas donde se cultivaba en el año 2002 [8]. Unido al incremento de la producción, el consumo de berenjena en Estados Unidos ha tenido una tendencia al alza en las últimas cinco décadas [8], como consecuencia de la concienciación por parte del consumidor de un consumo más sano y responsable y de las políticas educativas relacionadas con la dieta [1]. Esto ha propiciado que la demanda del producto en el mercado estadounidense ha registrado un dinamismo importante a la cual la producción interna no ha podido hacer frente, por lo que, para cubrir las necesidades se han incrementado sus compras externas.

Entre los países que más consumen berenjena además de Estados Unidos, es la Unión Europea, donde Francia, Alemania y Reino Unido demandan un amplio porcentaje de las importaciones totales mundial [9], como se puede observar en la Figura 3.



**Figura 3. Principales países consumidores de berenjena**  
(<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/072/ca072.pdf>)

La berenjena presenta una amplia variedad de hábitat de crecimiento, características vegetativas y morfología floral y produce frutos con diferentes formas, tamaños y colores dependiendo del cultivo. La berenjena con forma alargada en color morado y negra es usada mundialmente, pero otras variedades que difieren en color, tamaño y forma también son conocidas. Además del aspecto, los recursos genéticos de la berenjena han sido evaluados por su resistencia contra graves enfermedades y parásitos que afectan a la producción del cultivo [3].

## **2.2. La berenjena y los compuestos fenólicos**

La berenjena contiene altos contenidos en compuestos fenólicos con actividad antioxidante y también proporciona cantidades relevantes de algunos minerales como fósforo, potasio, calcio o magnesio. Así, se ha observado que las condiciones medioambientales y las técnicas de crecimiento pueden influir en el contenido en compuestos fenólicos y minerales en berenjena [10]. En este sentido, las diferencias medioambientales entre distintos años influyen en la concentración de ácidos fenólicos y minerales [11]. La combinación de regímenes de riego y el tipo de fertilizante también han buscado tener un efecto en la composición mineral de los frutos. Además, Savvas y Lenz (1996) encontraron que la diferente salinidad del agua de riego afectaba a la composición mineral de los frutos de la berenjena [12].

En relación a los compuestos fenólicos, se ha visto que la berenjena está entre las diez hortalizas con mayor capacidad de absorción de radicales de oxígeno, hecho atribuido al alto contenido de antioxidantes fenólicos [1]. Así, se han identificado más de 4000 compuestos fenólicos, siendo flavonoides y ácidos fenólicos las principales clases de compuestos presentes en la berenjena. Los flavonoides, que incluyen las antocianinas, son el grupo mayoritario de fenoles en plantas y de los más estudiados. Así, se ha demostrado que la pigmentación de negro a púrpura del fruto pelado de la berenjena es atribuida al contenido de antocianinas. Por otro lado, los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluye a los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico.

Finalmente comentar que los polímeros fenólicos, comúnmente conocidos como taninos, son compuestos con alto peso molecular que son divididos en dos clases, taninos hidrolizables y condensados [3].

Así, las hortalizas constituyen importantes fuentes de antioxidantes y minerales para la dieta humana. Las dietas con una baja proporción en hortalizas están vinculadas a una alta incidencia y a enfermedades con un rango de mortalidad moderado-elevado, como cáncer o enfermedades cardiovasculares, que pueden ser prevenidas por antioxidantes, y también por dolencias y enfermedades asociadas a deficiencias minerales. Debido a los beneficios para la salud, la selección y el desarrollo de variedades con composición

mejorada es cada vez el objetivo más importante en la cría de cultivos de hortalizas [13].

Se han descrito varios efectos potenciales en la salud debido a la presencia de compuestos fenólicos en plantas. Los ácidos fenólicos y flavonoides son muy efectivos para la eliminación de radicales libres. Por lo tanto, cuando estas plantas son consumidas, los polifenoles contribuyen a reducir los radicales que están involucrados en patogénesis tales como la carcinogénesis o la arteriosclerosis. Por ejemplo, Sudheesh y col (1997) demostraron el efecto beneficioso hipolipidémico de los compuestos fenólicos de la berenjena en animales alimentados con colesterol y sin él [14]. Por otro lado, Vison y col (1998) determinaron que las hortalizas tienen capacidad antioxidante comparable con los fenoles puros y superiores de las vitaminas A, C y E [15].

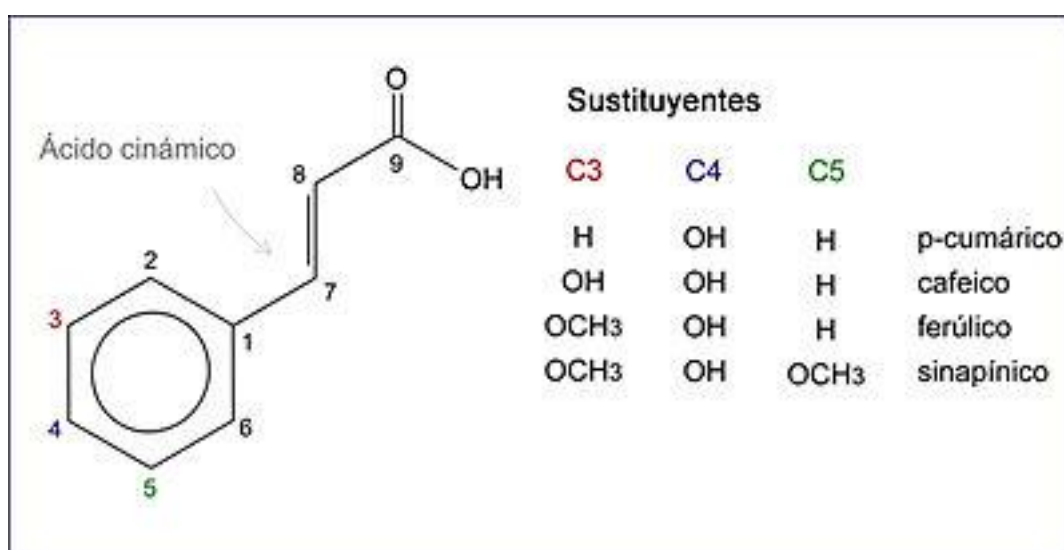
La composición de los compuestos fenólicos en frutas y hortalizas también está influenciada por el tipo de agricultura, convencional o ecológica. Defensores de la agricultura orgánica a menudo reclaman que frutas, hortalizas y granos derivados orgánicamente son más beneficiosos para la salud humana, ya que crecen sin la ayuda de plaguicidas. En algunas publicaciones, se ha declarado que el crecimiento de cultivos ecológicos contiene un alto contenido en antioxidantes, mientras otros muestran diferencias inconsistentes en el contenido de estos compuestos [16]. Un reciente resumen científico publicado por el Instituto de Tecnólogos de Alimentos [17], concluyó que es prematuro decir que cualquier comida ecológica es mejor en términos de valores de seguridad o nutricionales que la convencional. Sin embargo, el supermercado global para el certificado de comidas orgánicas está creciendo rápidamente tanto en Estados Unidos como en Europa [5].

### **2.3. Ácidos fenólicos: ácido clorogénico**

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios que son comúnmente encontrados en plantas. Los derivados sustituidos del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico son los ácidos fenólicos predominantes en plantas [18].



Los ácidos hidroxicinámicos más comunes son el cafeico, paracurámico y ácidos ferúlicos, que frecuentemente aparecen en los alimentos como simples ésteres con el ácido quínico o glucosa. Probablemente el más conocido de los ácidos hidroxicinámicos es el ácido clorogénico, que es la combinación del ácido cafeico y quínico. Los derivados de los ácidos hidroxibenzoicos están principalmente presentes en los alimentos en forma de glucosídeos, siendo parahidroxibenzoico, vanílico y los ácidos protocatéquicos las formas más comunes [17], mostrándose en las Figuras 4 y 5 las estructuras de dichos compuestos.



**Figura 4. Estructura química de los principales ácidos hidroxicinámicos.**



**Figura 5. Estructura química de los derivados del ácido hidroxibenzoico estudiado.**

### 2.3.1. Ácido Clorogénico

El término ácido clorogénico hace referencia a la familia de ésteres de ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido paracurámico) con ácido quínico [19], aunque también es usado específicamente para la unión de un éster de ácido cafeico y ácido quínico. Es un intermedio biosintético importante [20], que por ejemplo interviene en la biosíntesis de la lignina. Este compuesto, que es un antioxidante, también disminuye la liberación de glucosa en la sangre después de la comida [21].

- Propiedades químicas

Estructuralmente, el ácido clorogénico es un éster formado entre el ácido cafeico y el ácido L-quínico [22], pudiendo existir diversos isómeros como el criptoclorogénico y el ácido neoclorogénico [13].

Los compuestos que contienen dos moléculas de ácido cafeico son denominados ácido isoclorogénico, existiendo otros compuestos derivados como ácido 3,4-dicafeoilquinico y ácido 3,5-dicafeoilquinico [23].

- Procedencia

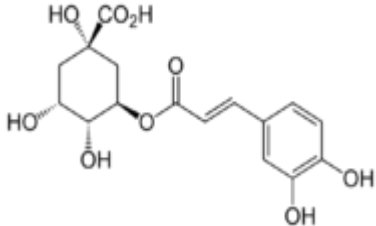
El ácido clorogénico se ha detectado en una gran cantidad de matrices además de la berenjena, como patata [24], bambú (*Phyllostachys edulis*) [25], así como, en otras muchas plantas [26], entre ellas, arándanos, semillas de girasol, tomates y manzanas [27]. Es uno de los compuestos fenólicos mayoritarios en melocotón [28] y en ciruelas [29]. También es uno de los fenoles encontrados en café [22], pudiéndose encontrar además en los brotes del brezo (*Calluna vulgaris*) [30].

- Efectos biológicos

El ácido clorogénico es estudiado por ser un sensibilizador químico responsable de alergias respiratorias por ciertos tipos de materiales de plantas [31]. Además, puede estar involucrado en los efectos laxantes observados en ciruelas [24].

De manera resumida, en la Tabla 1 se muestran algunas de las características más relevantes del ácido clorogénico.

**Tabla 1. Datos de identificación del Ácido Clorogénico**

<b>ÁCIDO CLOROGÉNICO</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{16}H_{18}O_9$
<b>Estructura química</b>	
<b>Número CAS</b>	327-97-9
<b>Sinónimos</b>	3-quinato Ácido 3-quinico 3-cafeoilquinato Ácido 3-cafeoilquinico 3-CQA Ácido 3-orto-cafeoilquinico Ácido clorogénico Ácido 3-trans-cafeoilquinico
<b>Peso molecular</b>	354.31g/mol
<b>Densidad</b>	$1.28\text{g/cm}^3$
<b>Punto de fusión</b>	207-209 °C

## **2.4. Técnicas analíticas para la determinación de ácidos fenólicos en matrices vegetales**

### 2.4.1. Técnicas de extracción

Distinta bibliografía indica que el 60% del tiempo de análisis es empleado en la preparación de la muestra y que el 30% del error analítico proviene del paso perteneciente a la preparación de la muestra [32,33]. Tres recientes estudios en los cuales el objetivo es la preparación de muestras de fenólicos en comidas, enfatizan la necesidad de desarrollar un procedimiento de preparación de muestras sistemático para que la extracción sea óptima y la cuantificación de ácidos fenólicos sea exacta en diferentes matrices [34-37].

Según la literatura consultada, para la extracción del tejido y la preparación de la muestra se utiliza entre otros el siguiente tratamiento consistente en que para cada planta, se obtiene zumo que es utilizado para la determinación de los ácidos fenólicos. Inmediatamente después de la extracción del zumo, 5 mL del homogeneizado correspondiente a cada parte de la planta se vierten en 10 mL de una solución de acetona (70% v/v) y ácido acético (0.5% v/v), durante una hora a temperatura ambiente para la extracción de fenólicos y congelados a -20°C hasta ser analizados. El resto del homogeneizado es usado para la determinación del pH. La otra mitad de la planta es pesada, y secada a 105°C hasta obtener un peso constante [7].

Por lo general, la bibliografía consultada para el análisis de ácidos fenólicos en productos de origen hortícola, realiza la extracción sobre las muestras previamente liofilizadas [2]. En la mayoría de la literatura consultada la mezcla es centrifugada y previamente a esta mezcla se le añade distintos disolventes como metanol, etanol y acetona [2].

Sin embargo, la preparación de la muestra ha recibido una atención limitada. La óptima preparación de la muestra es crítica para algunos análisis y es de gran importancia para los compuestos fenólicos debido a la débil actividad oxidativa de esta clase de compuestos [2]. Además, más de ocho mil compuestos fenólicos con

configuraciones estructurales diversas han sido aislados desde fuentes naturales [38]. Los ácidos fenólicos existen en múltiples formas como libres, esterilizados, glicosilados o polimerizados y además coexisten como complejos con proteínas, carbohidratos, lípidos u otros compuestos de plantas [34]. Así, la polaridad de los ácidos fenólicos varía significativamente, y esto dificulta el desarrollo de un método de extracción uniforme para extraer diferentes ácidos fenólicos de varias matrices. Estos múltiples factores imponen mayores desafíos en el desarrollo de un procedimiento de preparación de muestra uniforme, eficiente y exacto [2].

Los procedimientos usados por varios grupos de investigaciones para la extracción de ácidos fenólicos en berenjena variaban significativamente y son resumidos en la **Tabla 2**.

Se puede observar que se emplearon distintos tipos de disolventes como, acetona, etanol, metanol y disolución acuosa de metanol en proporciones diferentes (50% de metanol, 80% de metanol) empleando distintas técnicas de extracción como ultrasonidos [1,4], agitador rotatorio [39], agitación mecánica [40], agitador [41], reflujo [42], y extracción con líquidos presurizados [2].

**Tabla 2. Resumen de los procedimientos usados para la extracción de ácidos fenólicos en berenjena.**

Matriz de muestra	Objetivo del estudio	Cantidad de muestra	Técnica de extracción	Extracción de disolvente	Cantidad de disolvente	Tiempo de extracción	Temperatura de extracción	Ref
Tejido en polvo liofilizado	Ácido fenólico contenido y composición	200 mg	Sonicación	Metanol con 0.5% de butilhidroxitolueno	10 mL (dos veces)	15 minutos (dos veces)	T <sup>a</sup> Ambiente	4,1
Liofilizado y planta sin liofilizar	Influencia de la actividad antioxidante en el almacenamiento de ácidos fenólicos	Ns <sup>a</sup>	Agitador rotatorio	50% Metanol	Ns	30 minutos	4°C	39
Liofilizado y planta sin liofilizar	Influencia de la actividad antioxidante en el almacenamiento de ácido fenólico	50 g	Homogeneizado hirviendo etanol y mezclar	Etanol	100 mL (dos veces)	nr	78°C	40
Planta ultracongelada	Ésteres de ácido fenólico y análisis glucósidos	Ns	Agitación	80% Metanol	Ns	30 minutos (dos veces)	T <sup>a</sup> Ambiente	41
Planta	Variación en la composición química y	25 g	Reflujo	Metanol	100 mL	1h	65°C	42
Pulpa homogeneizada de la planta	Actividad antioxidante	Ns	Centrifugado y residuo extraído con acetona	Acetona	Ns	30 minutos	Ambiente	43
Liofilizado, planta sin liofilizar y tamizado (partículas tamaño < 825µm)	Procedimiento de optimización para la preparación de muestras	200 mg	Extracción de fluidos a presión	Metanol/Agua (80:20% v/v)	20 mL	30 minutos	100°C	2

<sup>a</sup> Ns: Datos no suministrados

#### 2.4.2. Técnicas de determinación

En la literatura consultada se han empleado una gran variedad de técnicas de determinación con el fin de identificar y cuantificar ácidos fenólicos en berenjena.

Hoy en día, la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de líquidos (LC) son muy usadas para el análisis de compuestos fenólicos en plantas [44-52]. Además el acoplamiento de ambas técnicas con la espectrometría de masas (MS), permiten la elucidación estructural de cada compuesto [39,41,44,45,53-55]. Una comparación de las

capacidades antioxidativas de los diferentes polifenoles presentes en los extractos de las plantas es posible llevarla a cabo usando LC, monitorizando la desaparición de los correspondientes picos después de la adición al sistema de radicales activos [52].

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, fijándose esta última a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria presentan mayores tiempos de retención; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, presentan cortos tiempos de retención. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente [56].

En el caso de LC, las distintas fases móviles propuestas en los diferentes estudios están compuestas por acetonitrilo o metanol como disoluciones orgánicas y agua. En ocasiones al agua se le adicionan diferentes modificadores como el ácido acético [57] y el ácido fosfórico [1], pero el más utilizado y versátil por su utilización en la determinación de compuestos de distintas familias tanto individual como conjunta, es sin duda el ácido fórmico [1,57,58].

En una amplia mayoría se utiliza LC en fase reversa, siendo la fase estacionaria más común la C18 [1,57,58].

Entre las técnicas más empleadas para la determinación de ácidos fenólicos caben destacar el análisis por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) [3]. Además, como tipo de detección se puede emplear la espectrometría de masas, y tipo de ionización electronebulización, normalmente empleando como analizador un triple cuadrupolo [1,3]. Para la obtención del espectro ultravioleta se emplea un detector de diodos en fila, utilizando un rango de longitudes de onda comprendido desde 210 hasta 400 nm [1,3].

Otras técnicas utilizadas son la resonancia magnética nuclear (NMR), que se utiliza principalmente para la elucidación estructural y la confirmación de estos compuestos

[59]. Además de la electroforesis capilar que se emplea con un detector de diodos en línea (DAD) [57]. Además de las técnicas cromatográficas, la electroforesis capilar se puede emplear con un detector de diodos en fila [57]. Finalmente, otra técnica de determinación de ácidos fenólicos es mediante ensayo Folin-Ciocalteu, que se utiliza para determinar polifenoles totales y se basa en medidas espectrofotométricas [3].

En la Tabla 3 se muestran las principales técnicas de determinación empleadas para la obtención de ácidos fenólicos en berenjena.

**Tabla 3. Principales técnicas empleadas para la determinación de ácidos fenólicos.**

<b>Técnicas de determinación</b>	<b>Método de detección empleado</b>	<b>Disolvente empleado</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencia</b>
HPLC-MS	Espectrometría de masas	Metanol en ácido fosfórico acuoso	ESI (-)	1
HPLC-UV	UV-visible	Metanol en ácido fosfórico /ácido fórmico	210-400 nm	1
Electroforesis capilar	Detector de diodos en línea (DAD)	Solución de hidróxido sódico	500 nm	57

En los últimos años se ha utilizado la cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC) [61] acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuádruplo (QqQ-MS/MS) para el análisis de ácido clorogénico, ya que por un lado, UHPLC mejora la resolución y sensibilidad, reduciendo el tiempo de análisis en relación a LC [62], mientras que la espectrometría de masas mejora la fiabilidad en la detección y determinación de dicho compuesto.



### **3. EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiales y equipos**

##### 3.1.1. Reactivos

El patrón de ácido clorogénico fue suministrado por Aldrich (Steinheim, Alemania). La disolución madre de este compuesto (con una concentración de 200 mg/L) fue preparada pesando exactamente el sólido y disolviéndolo en 50 mL de metanol. Esta disolución fue conservada a 4°C.

Metanol de grado HPLC fue suministrado por Sigma (Madrid, España), y el etanol absoluto fue suministrado por Panreac (Barcelona, España). El agua ultra pura fue obtenida de a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

##### 3.1.2. Equipos

Los análisis cromatográficos fueron realizados usando el sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EE.UU.), y las separaciones fueron llevadas a cabo usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm el tamaño de partícula) de Waters. El análisis de espectrometría de masas fue realizado usando un analizador de triple cuadrupolo TQD (Waters, Manchester, Reino Unido). El tipo de ionización empleada fue la electronebulización (ESI) en modo positivo. La adquisición de datos fue realizada usando el software MassLynx 4.0 (Waters).

En el proceso de extracción fue utilizado un equipo de ultrasonidos de Elma (Singen, Alemania).

### 3.2. Método cromatográfico

La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante la aplicación de los siguientes parámetros:

- Fase móvil binaria de composición metanol (eluyente A) y solución acuosa de ácido fórmico al 0.05 % (v/v) (eluyente B).
- Gradiente: El gradiente optimizado se muestra a continuación:

Tiempo (min)	0	3	4	4.5	5.5
% Eluyente A	25	100	100	25	25

- Flujo de fase móvil: 0.30 mL/min
- Temperatura de la columna: 30 °C
- Volumen de inyección: 5 µL

### 3.3. Método espectrométrico

El modo de ionización utilizado para detectar el ácido clorogénico fue ESI en modo positivo. Los valores óptimos de trabajo con la sonda ESI fueron: voltaje de capilar: 3.5 kV; temperatura de la fuente 120 °C; temperatura de desolvatación 350 °C; flujo del gas de cono 80 L/h y flujo de gas de desolvatación 550 L/h. El ion precursor  $[M-H]^+$  fue  $m/z$  355.2 obteniendo un voltaje de cono de 25 V, mientras que los dos iones productores motorizados fueron  $m/z$  163.2 y 145.2.

El primer ión fue empleando durante el proceso de cuantificación mientras que el segundo se empleó para la confirmación.

### **3.4. Procedimiento de extracción**

Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se pesaron 10 g de berenjena triturada y se le añadieron 10 mL de etanol. La mezcla se somete a un proceso de ultrasonidos durante 30 minutos. A continuación se transfieren 10  $\mu$ L del extracto a un vial y se completa a 1 mL con metanol.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tanto el método cromatográfico como de extracción de ácido clorogénico de berenjena, fue optimizado previamente en el grupo de investigación “Química Analítica de Contaminantes”, comentando a continuación los resultados más significativos durante el proceso de validación del método y aplicación del mismo.

### **4.1. Validación del método analítico**

La validación de un método de análisis es absolutamente necesaria antes de su aplicación, ya que solo utilizando métodos analíticos validados en el laboratorio donde se van a utilizar se garantiza que el método analítico empleado se ajusta al objetivo que se persigue. La validación del método analítico se realiza obteniendo y calculando algunos parámetros que evidencia dicho ajuste a objetivos. Estos son los siguientes: linealidad de la función señal analítica-concentración, límites de detección y cuantificación, veracidad y repetibilidad. Estos últimos indican la exactitud del método a falta de materiales de referencia certificados en el analito de interés y en la matriz berenjena.

La linealidad y el rango de linealidad nos dan idea del ajuste de la señal analítica con la concentración de ácido clorogénico a una función lineal, así como el intervalo de concentraciones en que es posible utilizar dicha función. Este parámetro es fundamental a la hora de cuantificar con fiabilidad las muestras. Así una señal analítica que estuviera fuera del rango lineal, por encima del límite superior, no puede ser cuantificada con la función lineal establecida en el rango de concentraciones, ya que más allá de dichos límites el comportamiento de la señal analítica instrumental no es conocido o bien dicha

función cambia. La solución en ese caso sería diluir la muestra de forma adecuada hasta que la señal analítica se encuentre en el intervalo adecuado.

Los límites inferiores, de detección y cuantificación, también son indicativos del ajuste a objetivo del método analítico. Dichos límites indican las concentraciones más pequeñas que el método analítico es capaz de detectar, en un caso, o de cuantificar, en el otro, con un error aceptable. A menudo los resultados analíticos se expresan como “ausencia”, debiéndose referir este concepto a valores por debajo de dichos límites. El no tener en cuenta los límites inferiores de un método o no utilizar métodos y técnicas analíticas suficientemente sensibles, puede llevar, por ejemplo a que se indique ausencia de un compuesto determinado cuando en realidad, dicho compuesto está presente pero en una concentración inferior al que el método analítico es capaz de detectar o cuantificar.

En relación a la veracidad y repetibilidad, esto son conceptos muy relacionados con la exactitud del método. En realidad expresan la capacidad del método analítico de determinar una concentración de ácido clorogénico, lo más cercana posible a la que la muestra tiene en realidad. Esto significa que la etapa de extracción debe ser lo más eficaz posible como para recuperar el ácido clorogénico, en un porcentaje lo más cercano posible al 100%, pero además que la etapa de cuantificación, usando una función de calibrado, realizada con patrones, para comparar la señal analítica de la muestra con la de los patrones, está correctamente establecida y le hace corresponder la concentración adecuada a la señal instrumental que proporciona el analito en la muestra. La veracidad la establecemos en términos de porcentaje de recuperación, ya que a falta de un material de referencia certificado de ácido clorogénico en berenjena, disponible en el mercado, se preparan varios materiales de referencia caseros, mediante la adición a muestras de berenjena de concentraciones crecientes de analito a partir de un patrón cuidadosamente preparado. A partir del análisis de dichos materiales de referencia caseros podemos establecer el porcentaje de recuperación del ácido clorogénico presente en la berenjena.

La repetibilidad es la dispersión que presentan los resultados cuando se aplica el método analítico. En su estimación, se tienen en cuenta distintas variables, como por

ejemplo el tiempo, el analista, las funciones de calibrado etc. Se expresa en porcentaje de desviación estándar relativa de los resultados y debe ser inferior al 30 % cuando se trata de concentraciones traza y los análisis los realizan distintos operadores, en diferentes días y con distintas funciones de calibrado o patrones. A efectos prácticos, se preparan y analizan hasta diez réplicas de los materiales de referencia caseros para constatar la dispersión de los resultados que proporciona el método de análisis.

Los resultados obtenidos para los parámetros de validación fueron los siguientes:

- Linealidad (coeficiente de determinación  $R^2$ ):  $> 0.999$
- Rango de linealidad: 0.050 - 2 mg/kg
- Límite de detección (LOD): 0.010 mg/kg
- Límite de cuantificación (LOQ): 0.050 mg/kg
- Recuperación (0.050 mg/kg y 0.50 mg/kg,  $n=5$ ): 92-98 %
- Repetibilidad, expresada como desviación estándar relativa (0.050 mg/kg y 0.50 mg/kg,  $n=5$ , RSD):  $< 18\%$

Los resultados muestran que el método analítico propuesto se ajusta al objetivo previsto, ya que presenta un amplio intervalo de concentraciones en el que la señal instrumental es lineal, con un buen coeficiente de determinación. Los límites inferiores son suficientemente bajos, ya que las concentraciones esperadas son incluso varios órdenes de magnitud superiores. El porcentaje de recuperación es muy próximo al 100 %, estimándolo a una concentración equivalente al límite de cuantificación y otra un orden de magnitud superior. La precisión puede considerarse aceptable, ya que la dispersión de los resultados es inferior al 18 % de desviación estándar relativa.

#### 4.1.1. Control de Calidad Interno

El uso de un método validado no implica que este funcione correctamente cada vez que se aplica. Es necesario establecer un control de calidad interno que constate que los resultados están bajo control estadístico cada vez que el método es aplicado. Generalmente el control de calidad interno consiste en introducir una serie de muestras

control en la misma tanda que las muestras a analizar, sometiéndolas a los mismos procedimientos analíticos.

Durante la aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras reales, se ha realizado un control de calidad interno del proceso y que básicamente consistía en tres actividades:

*a) Control de la veracidad del método:* se disponen tres alícuotas de una misma muestra, a una de ellas se le adiciona una cantidad conocida de ácido clorogénico, y se somete al proceso de extracción; otra alícuota se extrae y después se adiciona la misma cantidad de analito pero en esta ocasión al extracto; finalmente la tercera alícuota de la misma muestra se extrae sin adición alguna, de esta forma se comprueba que la etapa de extracción está bajo control, estableciendo como criterios aceptables porcentajes de recuperación entre el 70 y 110 %.

*b) La cuantificación de los resultados* se garantiza preparando, con cada tanda de muestras, una curva de calibrado que permite controlar que la sensibilidad y linealidad en el rango de trabajo se mantiene cada vez que se aplica el método. De esta forma es posible detectar posibles anomalías en el instrumento de medida. Por ejemplo una caída en la pendiente de la función de calibrado puede indicar que la fuente no está en las condiciones óptimas, produciéndose una caída en la sensibilidad, que a su vez se puede traducir en una modificación de los límites inferiores establecidos en la validación del método.

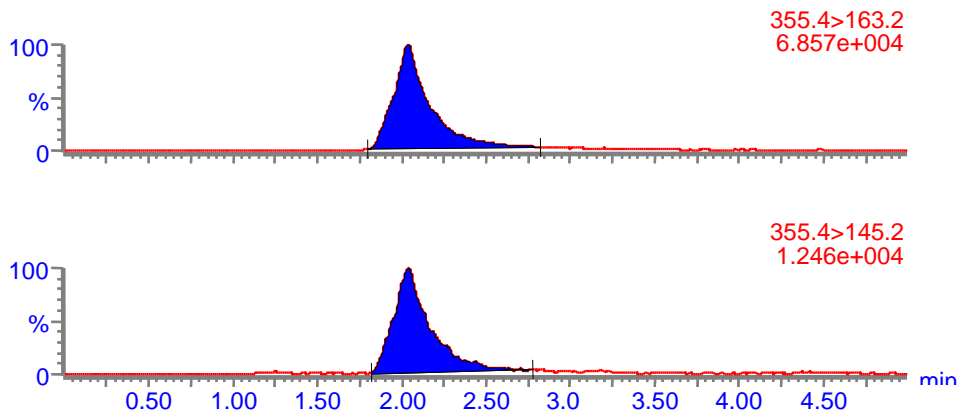
*c) La precisión del proceso* analítico se controla mediante la inclusión en intervalos de tiempo definidos de muestras duplicadas, que son dos alícuotas de la misma muestra, a las que se les asigna referencia diferente y son sometidas al mismo proceso de análisis para constatar que la dispersión de los resultados se mantiene en el rango adecuado, por debajo del 30 %. Finalmente, el trabajo de los analistas y el funcionamiento global del proceso analítico también es controlado mediante la inclusión de muestras ciegas, esto son muestras que han sido previamente analizadas, y que se introducen sin que el analista tenga previo conocimiento, los resultados de las muestras tanto duplicadas como ciegas no deben diferir significativamente entre ellas.

## 4.2. Análisis de ácido clorogénico en muestras de berenjena

### 4.2.1. Determinación del contenido en ácido clorogénico en diferentes variedades de berenjena.

En primer lugar se analizaron 17 variedades de berenjena, comentando a continuación los resultados obtenidos.

La Figura 6 muestra un cromatograma procedente de una de las muestras analizadas que presentaba un contenido de 1885.8 mg/kg de ácido clorogénico, en la que se seleccionó como ión de cuantificación  $m/z$  163.2, mientras que para la confirmación fue de  $m/z$  de 145.2, seleccionando como ión precursor el ión  $m/z$  355.4.

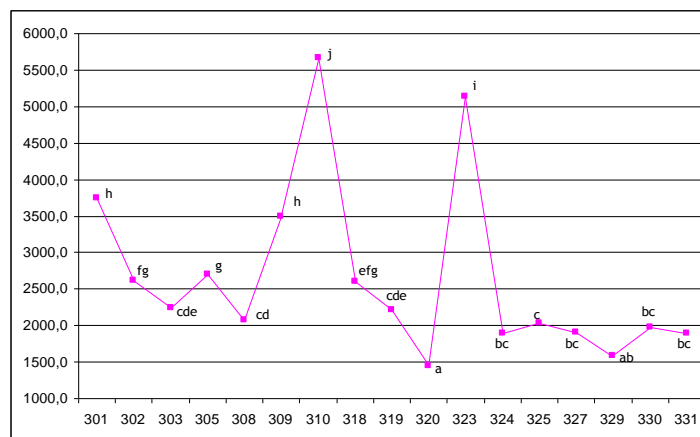


**Figura 6: Cromatograma procedente de una de las muestras analizadas.**

En la Tabla 4 y en la Figura 7 se reúnen los resultados de las determinaciones realizadas a las distintas muestras, indicándose las diferencias significativas encontradas entre la concentración de ácido clorogénico que presentan (Test de ANOVA de una sola vía ( $p < 0,05$ ) seguido de un Test de multirango) en la Figura 7.

**Tabla 4: Concentración media de ácido clorogénico (n=3) de las distintas muestras analizadas.**

Muestra	Concentración de ácido clorogénico (mg/kg)
301	3748
302	2623
303	2235
305	2700
308	2075
309	3497
310	5667
318	2597
319	2209
320	1443
323	5138
324	1894
325	2035
327	1905
329	1579
330	1981
331	1886



**Figura 7: Concentración media de ácido clorogénico (n=3) que presentan las distintas muestras analizadas junto con los resultados del test estadístico. Los puntos identificados con diferente letra denotan diferencias significativas entre ellos.**



Tal y como se observa en la Figura 7, la muestra 310 presenta una concentración de ácido clorogénico que es significativamente más elevada que las del resto, seguida por la muestra 323 que posee una concentración significativamente menor que la muestra 310 pero mayor que el resto. Los resultados obtenidos en las demás muestras, aunque presentan diferencias significativas entre la mayoría de ellos, son más homogéneos pudiendo destacar los mayores valores alcanzados por las muestras 301 y 309 o los menores valores que se han detectado en las muestras 320 y 329.

4.2.2. Determinación de la concentración de ácido clorogénico en híbridos derivados de cruces de las variedades anteriores.

En primer lugar se seleccionaron algunas de las variedades analizadas previamente, además de otra no analizada con número de referencia 40, para determinar nuevamente el contenido en ácido clorogénico. Como se puede observar en los resultados obtenidos (Tabla 5) los valores de concentración son algo menores que los que se obtuvieron en el primer análisis, diferencia quizás debida a que los muestreos se realizaron en diferente fecha, puesto que en este segundo análisis se muestreó en junio y el año anterior en marzo.

**Tabla 5: Concentración de ácido clorogénico de diferentes variedades de berenjena objeto de estudio.**

Referencia	Concentración de ácido clorogénico (mg/kg)
301	2222
327	1850
310	2894
323	1872
324	2427
40	2905
303	1941
329	1318
308	1254
331	1968

Además durante el estudio realizado en este segundo análisis, se llevó a cabo el cruce de algunas de las variedades analizadas, con la finalidad de obtener híbridos y estudiar en ellos su contenido en este tipo de ácido. Los cruces realizados con las variedades utilizadas en el primer análisis, así como, las referencias asignadas, se indican en la Tabla 6.

**Tabla 6: Referencia asignada a las muestras híbridas y parentales.**

Hibrido	Madres (Md)	Padres (Pd)
117	331	323
118	310	331
124	303	308
127	301	323
159	323	329
167	327	331

En la Tabla 7 se muestran los datos de concentración obtenidos para las muestras híbridas y parentales ya comentados anteriormente.

**Tabla 7: Concentración de ácido clorogénico (mg/kg) de las variedades analizadas.**

Concentración ácido clorogénico (mg/kg)		
hibrido_(Nºmuestra)	Md_(Nºmuestra)	Pd_(Nºmuestra)
1778 (117)	1968 (331)	1872 (327)
2535 (118)	2894 (310)	1968 (331)
1704 (124)	1941 (303)	1254 (308)
1934 (127)	2222 (301)	1872 (323)
2072 (159)	1872 (323)	1318 (329)
1632 (167)	1850 (327)	1968 (331)

Al igual que en el primer análisis, se podrían dividir las muestras en tres grupos según la concentración de ácido clorogénico que presentan, pero disminuyendo los rangos ya que las concentraciones obtenidas son menores: muestras con elevado contenido en ácido clorogénico ( $>$  de 2000 mg/kg), muestras con contenido medio (entre 2000 y 1800 mg/kg) y muestras con bajo contenido ( $<$  1800 mg/kg). Según esto los resultados de los cruces podrían ser:

- 117 (bajo): híbrido entre 2 variedades de contenido medio.
- 118 (alto): híbrido entre una variedad de alto y otra de contenido medio.
- 124 (bajo): híbrido entre una variedad de medio y otra de bajo contenido.
- 127 (medio): híbrido entre una variedad de alto y otra de medio contenido.
- 159 (alto): híbrido entre una variedad de medio y otra de bajo contenido.
- 167 (bajo): híbrido entre 2 variedades de contenido medio.

Además de los datos mostrados anteriormente, se puede evaluar si hay una diferencia significativa entre la variabilidad obtenida entre los parentales con los híbridos y entre éstos y la variabilidad intraplanta. Para el análisis de esta última se tomaron 5 muestras de una de las variedades (número de referencia 308). En la Tabla 8 se recogen los datos junto con el valor medio obtenido, valor de desviación estándar (SD) y desviación estándar relativa (RSD) de las muestras parentales, híbridos y las muestras tomadas para la variabilidad intraplanta.

**Tabla 8: Concentración de ácido clorogénico de las muestras parentales, híbridos y variabilidad intraplanta.**

Parentales:		Híbridos:		Variabilidad intraplanta:	
Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)
14	2222	117	1778	308 a	1713
23	1850	118	2535	308 b	1757
33	2894	124	1704	308 c	1759
34	1872	127	1934	308 d	1451
39	2427	159	2072	308 e	1602
40	2905	167	1632	media	1656
42	1941	media	1943	RSD	8
52	1318	RSD	17	SD	131
54	1254	SD	331		
56	1968				
media	2065				
RSD	27				
SD	565				

Las Tablas 9, 10 y 11 recogen los resultados correspondiente al test estadístico aplicado (test de comparación de varianzas) donde se puede observar que SI hay diferencia significativa entre la variabilidad de los parentales con la variabilidad intraplanta.

Sin embargo, si se compara la de los híbridos con la intraplanta, sale significativo sí se aplica el test de una cola (suponemos a priori que la de los híbridos es mayor) pero NO significativo si se aplica el test de dos colas (suponemos que las dos variabilidades son iguales).

Finalmente, si comparamos la variabilidad de los parentales con la de los híbridos, se observa que NO hay diferencia significativa, señalando por tanto que no hay diferencia significativa en la concentración de ácido clorogénico entre los parentales y los híbridos estudiados.

**Tabla 9: Comparación de la variabilidad entre los parentales y la intraplanta.**

<b>F-Test de Dos Muestras para Varianzas</b>			
<i>Estadística Descriptiva</i>			
<i>VAR</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>Tamaño muestral</i>	5	10	
<i>Media</i>	1.656,38	2.065,18	
<i>Varianza</i>	17.301,452	319.243,07067	
<i>Desviación Típica</i>	131,53498	565,01599	
<i>Error Estándar (de la Media)</i>	58,82423	178,67374	
<i>Resumen</i>			
<i>F</i>	18,45181	<i>F Valor Crítico (5%)</i>	5,99878
<i>nivel p 1 cola</i>	0,00648	<i>nivel p 2 cola</i>	0,01296
<i>H0 (5%)?</i>	<i>rechazado</i>		

**Tabla 10: Comparación de la variabilidad entre los híbridos y la intraplanta.**

<b>F-Test de Dos Muestras para Varianzas</b>			
<i>Estadística Descriptiva</i>			
	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>Tamaño muestral</i>	5	6	
<i>Media</i>	1.656,38	1.942,56667	
<i>Varianza</i>	17.301,452	109.673,48267	
<i>Desviación Típica</i>	131,53498	331,16987	
<i>Error Estándar (de la Media)</i>	58,82423	135,19953	
<i>Resumen</i>			
<i>F</i>	6,33898	<i>F Valor Crítico (5%)</i>	6,25606
<i>nivel p 1 cola</i>	0,04891	<i>nivel p 2 cola</i>	0,09783
<i>H0 (5%)?</i>	<i>rechazado</i>		

**Tabla 11: Comparación de la variabilidad entre los parentales y los híbridos.**

<b>F-Test de Dos Muestras para Varianzas</b>			
<i>Estadística Descriptiva</i>			
<i>VAR</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>Tamaño muestral</i>	6	10	
<i>Media</i>	1.942,56667	2.065,18	
<i>Varianza</i>	109.673,48267	319.243,07067	
<i>Desviación Típica</i>	331,16987	565,01599	
<i>Error Estándar (de la Media)</i>	135,19953	178,67374	
<i>Resumen</i>			
<i>F</i>	2,91085	<i>F Valor Crítico (5%)</i>	4,77247
<i>nivel p 1 cola</i>	0,12598	<i>nivel p 2 cola</i>	0,25195
<i>H0 (5%)?</i>	<i>aceptado</i>		

4.2.3. Determinación de la variabilidad intraplanta, evolución en el contenido del ácido clorogénico y heredabilidad del contenido en siguientes generaciones.

a) Estudio de la variabilidad intraplanta del contenido de ácido clorogénico.

En primer lugar y como en los análisis anteriores, se ha procedido a evaluar la variabilidad intraplanta del contenido de ácido clorogénico. Para ello se tomaron 5 muestras de la misma planta de una de las variedades (número de referencia 129), mostrándose en la Tabla 12 los datos obtenidos.

**Tabla 12: Evaluación de la variabilidad intraplanta.**

	Referencia	Concentración (mg/kg)
	129a	1874
	129b	1775
	129c	1780
	129d	1716
	129e	1674
Media (mg/kg)		1768
Desviación estándar (mg/kg)		77
Desviación estándar relativa		4.4 %

Se puede indicar que la variabilidad obtenida es similar a la obtenida previamente, ya que en el año 2011, dicha variabilidad era del 7.9 %.

b) Evaluación del contenido de ácido clorogénico durante los tres años del proyecto.

En este tercer análisis, se han seleccionado algunas de las variedades analizadas previamente, determinándose de nuevo el contenido de ácido clorogénico en ellas, mostrándose los resultados obtenidos en las Tablas 13, 14 y 15.

**Tabla 13: Concentración de ácido clorogénico (mg/kg) de diferentes variedades de berenjena objeto de estudio (híbridos F1).**

Año 2011		Año 2012	
Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)
127	1934	132	1666
124	1704	134	2193
167	1632	135	1860
117	1778	136	2190
159	2072	137	2088
118	2535	*	

\* Muestra no cultivada en 2012.

**Tabla 14: Concentración de ácido clorogénico (mg/kg) de diferentes variedades de berenjena objeto de estudio (Parentales Madres, Md).**

Año 2010		Año 2011		Año 2012	
Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)
301	3747	14	2222	138*	1452
303	2235	42	1941	139	1397
327	1905	23	1850	144	1473
331	1886	56	1968	146	1771
323	5138	34	1872	142	2276
310	5667	33	2894	141	2396



**Tabla 15: Concentración de ácido clorogénico de diferentes variedades de berenjena objeto de estudio (Parentales Padres, Pd).**

Año 2010		Año 2011		Año 2012	
Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)	Referencia	Concentración (mg/kg)
323	5138	34	1872	142	2276
308	2075	54	1254	140	1664
331	1886	56	1968	146	1771
329	1579	52	1318	145	1559

En primer lugar se evaluó si había diferencia significativa entre los contenidos de ácido clorogénico de las muestras objeto de cruce (Tabla 13) en función del año muestreado. Como la muestra 118 del año 2011 no fue muestreada en 2012, se elimina del test de comparación. Al realizar un test de comparación de muestras apareadas (Tabla 16) se observa que no hay diferencia significativa entre los valores de ácido clorogénico obtenido en el año 2011 y el año 2012 ( $p = 0.272$ ).

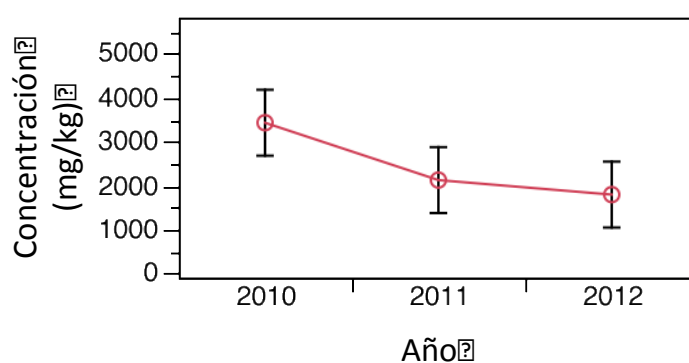
**Tabla 16. Comparación del contenido de ácido clorogénico en las muestras de cruce.**

Test de muestras apareadas			
<i>Estadística Descriptiva</i>			
	2011	2012	
<i>Tamaño muestral</i>	5	5	
<i>Media</i>	1824	1999	
<i>Varianza</i>	31.7	53.1	
<i>Resumen</i>			
<i>t calculado</i>	1.274	<i>t Valor Crítico (5%)</i>	2.776
<i>nivel p 2 colas</i>	0,272		
<i>H1 (5%)?</i>	<i>No se rechaza</i>		

De igual forma, se evalúa la variación del contenido de ácido clorogénico para las muestras Md (Madre), que se han muestreado en los tres años de duración del proyecto (datos procedentes de Tabla 14). Para ello se lleva a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, en la que se tiene en cuenta tanto la variabilidad de la variedad como del año en el que se realiza el análisis. La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos, y se puede observar que el año es un efecto significativo, obteniendo en el año 2010 mayores concentraciones de ácido clorogénico que en los años 2011 y 2012, donde se obtuvieron concentraciones similares (Figura 8). En relación a la variedad de berenjena, se puede indicar que no hay diferencia significativa.

**Tabla 17. Comparación de la variabilidad del contenido de ácido clorogénico en Md en función del año y variedad muestreada.**

ANOVA de dos vías				
Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
Variedad	9133269	5	1826654	0,086
Año	8974881	2	4487440	<b>0,015</b>
Error	6798017	10	679802	
Total	24906166	17		



**Figura 8: Variación del contenido de ácido clorogénico en Md en los tres años muestreados.**

A continuación, se evalúa la variación del contenido de ácido clorogénico para las muestras Pd (Padre), que se han muestreado en los tres años de duración del proyecto (datos procedentes de Tabla 15). Para ello, y como en el caso anterior, se lleva a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, en la que se tiene en cuenta tanto la variabilidad de la variedad como del año en el que se realiza el análisis. La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos, y se puede observar que en este caso no hay diferencia significativa en el contenido de ácido clorogénico en función del año y variedad evaluada.

**Tabla 18. Comparación de la variabilidad del contenido de ácido clorogénico en Pd en función del año y variedad muestreada.**

ANOVA de dos vías				
<i>Fuente variabilidad</i>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	Media de cuadrados	Valor p
<i>Variedad</i>	4768002	3	1589334	0,180
<i>Año</i>	2545782	2	1272891	0,241
<i>Error</i>	4193364	6	698894	
<i>Total</i>	11507148	11		

c) Determinación de ácido clorogénico en las descendencias F2 y DHLs.

Durante el análisis anterior se obtuvieron descendencias F2 de los híbridos F1 analizados por autofecundación (F2Ø) y líneas doblehaploides DHLs mediante cultivo *in vitro* de anteras, con el fin de estudiar en ellas su contenido en este tipo de ácido. Para ello se han cultivado las F2 obtenidas, además de las F1 del análisis anterior y de las cuales proceden, sus parentales y los doblehaploides en su caso. Los cruces realizados con las variedades utilizadas en el primer hito, así como las referencias asignadas, se indican en la Tabla 19 y 20.

**Tabla 19. Referencia asignada a las muestras F2 Ø, F1 y parentales.**

F2 Ø	F1	Madres (Md)	Padres (Pd)
126	132	138	142
128	134	139	140
129	135	144	146
130	136	146	142
131	137	142	145
127	*	141	146

\* Referencia 118 del año 2011.

**Tabla 20. Referencia asignada a las muestras DHLs, F1 y parentales.**

DHLs	F1	Madres (Md)	Padres (Pd)
151-158	135	144	146
160-166	136	146	142
167	137	142	145
147-150	*	141	146

\* Referencia 118 del año 2011.

Finalmente, en la Tabla 21 se muestran los datos obtenidos para las muestras comentadas anteriormente, la de los híbridos F1 de los que proceden y la de sus correspondientes parentales. Hay que destacar que para las líneas DHLs 147-150, no se proporcionó información en relación al híbrido F1 del año 2012 y que correspondía a la referencia 118 de 2011.

**Tabla 21. Concentración de ácido clorogénico de las variedades analizadas en el tercer análisis.**

	Línea		Híbrido F1		Md		Pd	
	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)
<i>F2 Ø</i>	126 <sup>a</sup>	1561	132	1667	138	1452	142	2922
	126 <sup>b</sup>	1649						
	128 <sup>c</sup>	1402	134	2194	139	1397	140	1664
	128 <sup>d</sup>	1464						
	128 <sup>e</sup>	1487						
	129	1768	135	1861	144	1473	146	1771
	130	2350	136	2190	146	1771	142	2922
	131 <sup>f</sup>	1582	137	2088	142	2276	145	1559
	131 <sup>g</sup>	1624						
		127			141	2396	146	1771
<i>DHLs</i>	151	2519	135	1860	144	1473	146	1771
	152	2141						
	153	2368						
	154	2012						
	155	1548						
	156	2448						
	157	2252						
	158	1890						
	160	1953	136	2190	146	1771	142	2275
	161	1507						
	162	1964						
	163	1929						
	164	1709						
	165	2157						
	166	1980						
	167	2456	137	2088	142	2275	145	1559
	147	2437			141	2396	146	1771
	148	2280						
149	2259							
150	2092							

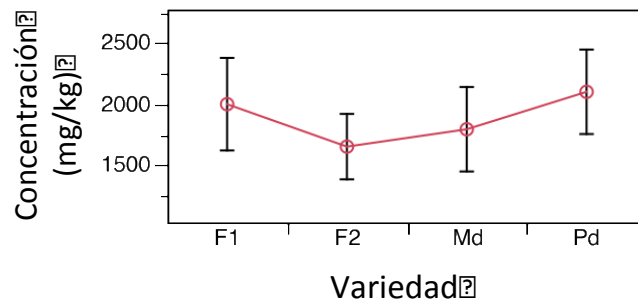
<sup>a</sup> Variedad larga; <sup>b</sup> Variedad ovalada; <sup>c</sup> Variedad morada; <sup>d</sup> Variedad rosada; <sup>e</sup> Variedad verde; <sup>f</sup> Variedad larga; <sup>g</sup> Variedad semilarga.

En primer lugar, mediante un ANOVA de una vía se compara los contenidos de ácido clorogénico de las líneas F2Ø con sus híbridos F1 y sus respectivos Md y Pd, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 22.

**Tabla 22. Comparación del contenido de ácido clorogénico en líneas F2 Ø en relación a F1, Md y Pd.**

ANOVA una vía				
<i>Estadística Descriptiva</i>				
VAR	F2	F1	Md	Pd
<i>Tamaño muestral</i>	10	5	6	6
<i>Media</i>	1651	2000	1794	2101
<i>Desviación Típica</i>	129,8	183,6	167,6	167,6
<i>Resumen</i>				
<i>Fuente variabilidad</i>	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
<i>Tipo de muestra</i>	904602	3	301534	0,177
<i>Error</i>	3875451	23	168498	
<i>Total</i>	4780053	26		

Se puede observar que no hay diferencia significativa en la concentración de ácido clorogénico entre líneas F2Ø, híbridos y parentales (Md y Pd). A pesar de ello, si se representan los valores medios (Figura 9), se puede observar que F2Ø suele presentar menores valores que F1, Md y Pd, aunque como se ha observado previamente, dicha diferencia no es significativa. Se puede observar que F2Ø presenta una menor variabilidad en la concentración de ácido clorogénico, siendo ésta más homogénea.



**Figura 9. Variación del contenido de ácido clorogénico en función de los cruces realizados.**

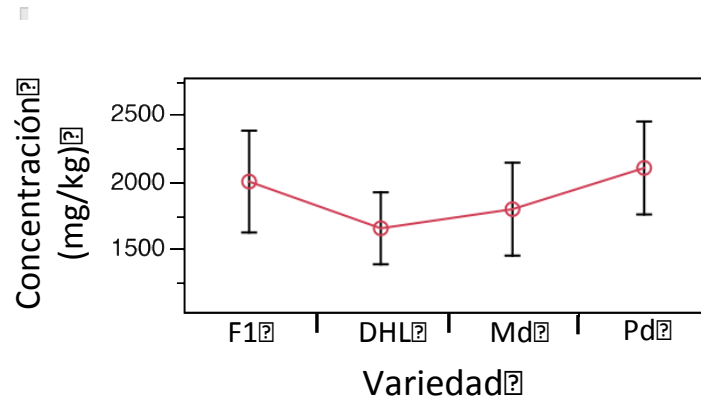
De igual forma se realizó un ANOVA de una vía para comparar los contenidos de ácido clorogénico de las líneas *DHLs* con sus híbridos F1 y sus respectivos parentales (Md y Pd), mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 23.

**Tabla 23. Comparación del contenido de ácido clorogénico en líneas *DHLs* en relación a F1, Md y Pd.**

ANOVA una vía				
<i>Estadística Descriptiva</i>				
VAR	DHLs	F1	Md	Pd
<i>Tamaño muestral</i>	20	3	4	4
<i>Media</i>	2095	2046	1979	1844
<i>Desviación Típica</i>	68,5	176,9	153,2	153,2
<i>Resumen</i>				
<i>Fuente variabilidad</i>	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
<i>Tipo de muestra</i>	229127	3	76375	0,497
<i>Error</i>	2534452	27	93869	
<i>Total</i>	2763579	30		

Se puede observar que no hay diferencia significativa en la concentración de ácido clorogénico entre líneas *DHLs*, híbridos y parentales (Md y Pd). A pesar de ello, si se representan los valores medios (Figura 10), se puede observar que, al igual que en el

caso anterior, los valores de DHLs presentan una menor variabilidad en la concentración de ácido clorogénico, siendo esta diferencia más notable para las líneas DHLs que para las F2Ø.



**Figura 10. Variación del contenido de ácido clorogénico en función de los cruces realizados.**

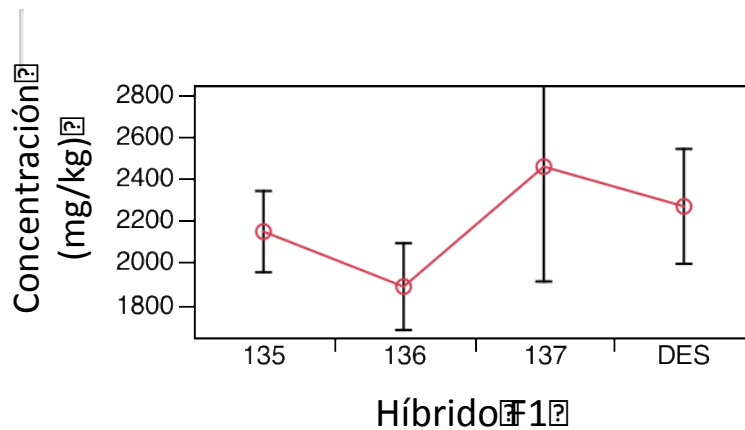
Además, y puesto que se muestrearon distintas plantas provenientes del mismo cruce, se ha realizado una ANOVA evaluando si el contenido de ácido clorogénico en las distintas líneas depende del cruce realizado. En este sentido, se ha decidido mantener la línea DHL 167, procedente del Híbrido F1 137. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24. Comparación del contenido de ácido clorogénico en líneas DHLs respecto al cruce.**

ANOVA una vía				
Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
DHL-Híbrido	577520	3	192507	0,067
Error	1061387	16	66337	
Total	1638907	19		



Se puede indicar que el contenido de ácido clorogénico en la DHL no depende de manera significativa del cruce original. Se puede observar que de forma general, las líneas DHLs provenientes del Híbrido F1 136 presentan menor contenido de ácido clorogénico, tal y como se muestra en la Figura 11.

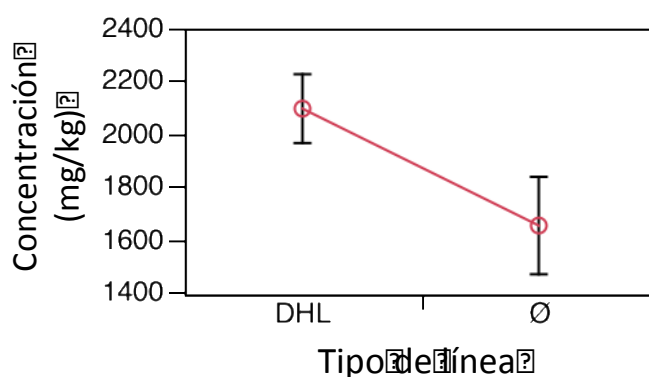


**Figura 11. Variación del contenido de ácido clorogénico para las líneas DHLs.**  
**Abreviatura: DES corresponde al híbrido F1 correspondiente a la referencia 118 del año 2011.**

A continuación, se compararon los resultados obtenidos de ácido clorogénico para los dos tipos de líneas evaluadas (F2 Ø y DHLs), mediante un ANOVA de una vía, mostrándose los resultados en la Tabla 25 y Figura 12.

**Tabla 25. Comparación del contenido de ácido clorogénico en los dos tipos de líneas obtenidas.**

ANOVA una vía				
Estadística Descriptiva				
VAR	F2 Ø	DHLs		
Tamaño muestral	10	20		
Media	1651	2095		
Desviación Típica	90,2	63,8		
Resumen				
Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
Tipo línea	1311577	1	1311577	<b>0,0004</b>
Error	2279183	28	81399	
Total	3590761	29		



**Figura 12. Variación del contenido de ácido clorogénico para las líneas.**

Se puede observar que hay una diferencia significativa en el contenido de ácido clorogénico en función del tipo de línea obtenida, proporcionando mejores resultados de ácido clorogénico las líneas DHLs.

Finalmente, se comparan los resultados obtenidos para las líneas DHLs, a partir de los datos mostrados en la Tabla 26.

**Tabla 26. Concentración de ácido clorogénico de las líneas DHLs.**

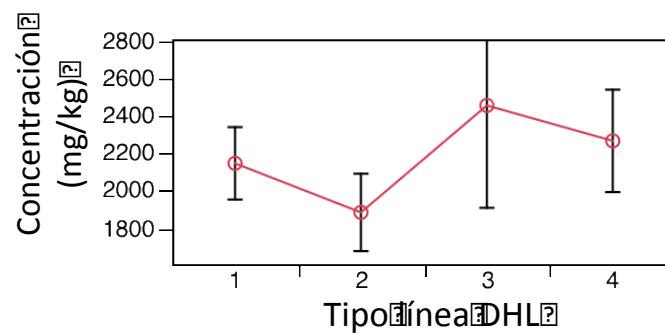
Variedad	Línea		Híbrido F1		Md		Pd	
	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)	Ref	Con (mg/kg)
<b>1</b>	151	2519	135	1860	144	1473	146	1771
	152	2141						
	153	2368						
	154	2012						
	155	1548						
	156	2448						
	157	2252						
	158	1890						
<b>2</b>	160	1953	136	2190	146	1771	142	2275
	161	1507						
	162	1964						
	163	1929						
	164	1709						
	165	2157						
	166	1980						
<b>3</b>	167	2456	137	2088	142	2275	145	1559
<b>4</b>	147	2437			141	2396	146	1771
	148	2280						
	149	2259						
	150	2092						

Al realizar el ANOVA de una vía se puede observar (Tabla 27) que no hay diferencia significativa entre las 4 variedades evaluadas ( $p > 5$ ).

**Tabla 27. Comparación del contenido de ácido clorogénico en las líneas DHLs obtenidas.**

ANOVA una vía				
Estadística Descriptiva				
VAR	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4
Tamaño muestral	8	7	1	4
Media	2147	1886	2456	2267
Desviación Típica	91,1	97,3	257,6	128,8
Resumen				
Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor p
Tipo de muestra	577520	3	192507	0,067
Error	1061387	16	66337	
Total	1638907	19		

Sin embargo, observando la Figura 13 se puede indicar que de forma general se obtienen resultados ligeramente más altos de ácido clorogénico en las variedades 3 y 4.



**Figura 13. Variación del contenido de ácido clorogénico para las líneas DHLs.**

## 5. CONCLUSIONES

Tras la elaboración de este Trabajo Fin de Máster, las principales conclusiones que se pueden extraer son:

- ✓ La combinación de UHPLC y MS/MS ha permitido la determinación de ácido clorogénico en berenjena, mediante un método rápido, con un tiempo de análisis inferior a cinco minutos, y fiable, basado en la monitorización de dos transiciones. Los parámetros característicos obtenidos en la validación del método nos indican que éste es apropiado y el control de calidad interno ha garantizado que en todo momento, los resultados están bajo control estadístico, con buenas recuperaciones y sin que se observe degradación del analito o de la muestra ni contaminación accidental.
- ✓ Los valores de concentración obtenidos tras analizar las muestras indican que existen diferencias significativas entre ellas. Sin tener en cuenta los valores de concentración más elevados y después de aplicar el análisis estadístico, podríamos concluir que las muestras pueden agruparse según su concentración en tres grupos con diferencias estadísticamente significativas: muestras con elevado contenido en ácido clorogénico (> de 2500 mg/kg), muestras con contenido medio (entre 2500 y 2000 mg/kg) y muestras con bajo contenido (< 2000 mg/kg).
- ✓ En general, la hibridación ha producido un descenso en el contenido de ácido clorogénico con respecto a los parentales que tenían un mayor contenido. Sin embargo, se ha producido un ascenso con respecto a los parentales que tenían un bajo contenido. Sin embargo, en las hibridaciones entre variedades de contenido medio, se obtienen híbridos de contenido bajo, excepto los caso de la 118 y 159 que producen un híbrido con contenido alto cruzando un parental alto con otro medio en el primer caso y medio y bajo en el segundo caso.
- ✓ La dispersión de los resultados es menor en los híbridos que en los parentales.

- ✓ La dispersión de los resultados (o variabilidad) intraplanta es menor que cuando se consideran distintos frutos de la misma variedad procedentes de distintas plantas. Esto se observa en una mayor proporción en los parentales, mientras que para los híbridos, se observa que la variabilidad de los resultados es igual en el caso de que se traten frutos de distintas plantas o frutos de la misma planta, con lo que se deduce que la concentración de ácido clorogénico de los híbridos es mucho más constante y homogénea en los frutos de los híbridos, independientemente de cual sea la variedad del híbrido que se esté estudiando.
- ✓ En los estudios de variabilidad intraplanta en 2012 se obtienen resultados similares a los realizados en 2011.
- ✓ No se observa variación significativa en el contenido de ácido clorogénico en las variedades muestreadas durante los años 2010, 2011 y 2012, excepto en el caso de los parentales Md que muestran en 2010 valores mayores que en 2011 y 2012.
- ✓ En relación al contenido de ácido clorogénico en las líneas F2, se puede observar que aunque no haya diferencia significativa entre dichas líneas, el híbrido F1 del que proceden y los correspondientes parentales (Md y Pd), para las líneas F2 el contenido es ligeramente inferior. Por otro lado, se observa una menor variabilidad en los resultados obtenidos para las líneas F2 que para los híbridos F1, Md y Pd, siendo más acusada esta disminución de variabilidad en las líneas DHLs.
- ✓ A la hora de comparar las distintas líneas DHLs, no se observa diferencia significativa en el contenido de ácido clorogénico para las muestras evaluadas, por lo que el contenido en dicho ácido no depende del cruce realizado.
- ✓ Al comparar las líneas F2Ø y DHLs, sí se observa una diferencia significativa en el contenido de ácido clorogénico, encontrándose una mayor concentración de dicho compuesto en las líneas DHLs.

- ✓ Dentro de las distintas líneas DHLs, aunque no hay diferencia significativa entre ellas, se obtienen mayores resultados de ácido clorogénico para las procedentes del híbrido 137 o de los padres 141 y 146.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Whitaker, B. D.; Stommel, J. R. Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruits of commercial eggplants (*Solanum melongena* L.) Cultivars. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, *51*, 3448-3454.
- [2] Luthria, D. L.; Mukhopadhyay, S. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, 41-47.
- [3] Stommel, J. R.; Whitaker, B. D. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **2003**, *128*, 704-710.
- [4] Prohens, J.; Blanca, J.; Nuez, F. Morphological and molecular variation in a collection of eggplant from a secondary center of diversity: implications for conservation and breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **2005**, *130*, 54-63.
- [5] Lester, R. N.; Hasan, S. M. Z. Origin and domestication of the brijal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. *The Linnean Society of London*. **1991**, 369-387.
- [6] Lucier, G.; Jerardo, A. Vegetables and Melons Outlook. *Economic Research Service, USDA*. **2006**, VGS-318.
- [7] <http://www.zipmec.com/es/berenjenas-historia-produccion-comercio.html>
- [8] [http://www.agmrc.org/commodities\\_products/vegetables/eggplant-profile/](http://www.agmrc.org/commodities_products/vegetables/eggplant-profile/)
- [9] <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/072/ca072.pdf>
- [10] Hanson, P.M., Yang, R.Y., Tsou, S.C.S., Ledesma, D., Engle, L., Lee, T.C. Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, *19*, 594-600.
- [11] Russo, V. M.; Cultural methods and mineral content of eggplant (*Solanum melongena*) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1996**, *71*, 119-123.
- [12] Savvas, D., Lenz, F. Influence of NaCl concentration in the nutrient solution on mineral composition of eggplants grown in sand culture. *Angewandte Botanik*. **1996**, *70*, 124-127.
- [13] Raigón, M. D.; Prohens, J.; Muñoz-Falcón, J. E.; Nuez, F. Comparison of eggplant landraces and comercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein. *Journal and Food Composition and Analysis*. **2008**, *21*, 370-376.
- [14] Sudheesh, S., Presannakumar, G., Vijayakumar, S., & Vijayalakshmi, N. R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. *Plant Foods for Human Nutrition*. **1997**, *51*, 321-330.
- [15] Vinson, J.A., Y. Hao, X. Su, and L. Zubik. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, *46*:3630-3634.
- [16] Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N. C., Horn, M. V., & Mitchell, A. Three-year comparison of the content of antioxidant, microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2006**, *54*, 8244-8252.



- [17] Winter, C.k., & Davis, S. F. (2006). Organic foods. *Journal of Food Science*, 71, R117-R124.
- [18] Mattila, P.; Hellström, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2007**, 20, 152-160.
- [19] Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knigh, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**2003**, 51, 2900–2911.
- [20] Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. **2003**, 54, 519–46.
- [21] Johnston, K. L.; Clifford, M. N.; Morgan, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **2003**, 78, 728–733.
- [22] Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.**1999**, 79, 362–372.
- [23] Corse, J.; Lundin, R. E.; Waiss, A. C. Identification of several components of isochlorogenic acid. *Phytochemical*.**1965**, 4, 527–529.
- [24] Mendel, F. Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**1997**, 45, 1523–1540.
- [25] Kweon, M.; Hwang, H.; Sung, H. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49, 4646–4655.
- [26] Clifford, M. N. The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates". In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.). *Methods in Polyphenol Analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. **2003**, 314–337.
- [27] [http://mpkb.org/home/food/chlorogenic\\_acid](http://mpkb.org/home/food/chlorogenic_acid).
- [28] Cheng, G. W.; Crisosto, C. H. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *Journal of the American Society Horticultural Science*.**1995**, 120, 835–838.
- [29] Stacewicz-Sapuntzakis, M.; Bowen, P.E.; Hussain, E.A.; Damayanti-Wood, B.I.; Farnsworth, N.R. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2001**, 41, 251–286.
- [30] Mahbulbul A.F.; Read, D. J.; Haslam, E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*. **1982**, 21, 1397–1401.
- [31] Freedman, S. O.; Shulman, R.; Krupey, J.; Sehon, A.H. Antigenic properties of chlorogenic acid. *Journal Allergy*. **1964**, 35, 97–107.
- [32] Major, R. E. Trends in sample preparation and automation what the experts are saying. *LC-GC*. **1995**, 13, 742-749.
- [33] Major, R. E. An overview of sample preparation methods for solids. *LC-GC*. **1999**, 17, S8-S13.
- [34] Naczek, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food: a review. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1054, 95-111.

- [35] Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Rayn, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*. **2000**, 125, 989-1009.
- [36] Escarpa, A.; González, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2001**, 31, 57-139.
- [37] Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Pohl, C. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 1033-1039.
- [38] Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 2886-2887.
- [39] Huang, H. Y.; Chang, C. K.; Tso, T. K.; Huang, J. J.; Chang, W. W.; Tsai, W. C. Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **2004**, 55 (5), 423-429.
- [40] Kozukue, N.; Kozukue, E.; Kishiguchi, M. Changes in the contents of phenolic substances, phenylalanine ammonia-lyase (Tal) accompanying chilling-injury of eggplant fruit. *Science Horticultural*. **1979**, 11, 51-59.
- [41] Winter, M.; Herrmann, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **1986**, 34, 616-620.
- [42] Esteban, R. M.; Molla, E. M.; Robredo, L. M.; López-Andreu, F. J. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during development and ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**, 40, 998-1000.
- [43] Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, 3426-3431.
- [44] Robards, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 1000, 657-691.
- [45] Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 571-581.
- [46] Tsao, R.; Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Cromatography B*. **2004**, 85, 812.
- [47] Rösch, D.; Bergmann, M.; Knorr, D.; Kroh, L. W. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 4233.
- [48] Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 2866.
- [49] Herrero, M.; Ibáñez, E. Cifuentes, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*. **2005**, 28, 883-897.
- [50] De Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. **2006**. 31, 1112, 31-63.
- [51] Li, P.; Li, S. P.; Wang, Y. T. Optimization of capillary zone electrophoresis for analysis of phytochemical bioactive compounds. *Electrophoresis*. **2006**, 27, 4808-4819.

- [52] Scherz, H.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. CEC and EKC of natural compounds. *Electrophoresis*. **2007**, 28, 1645-1657.
- [53] Carrasco-Pancorbo, A.; Neusü, C.; Pelzing, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*. **2007**, 28, 806-821.
- [54] Cheng, F.-C.; Jen, J.-F.; Tsai, T.-H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *Journal of Chromatography B*. **2002**, 781, 481-496.
- [55] Simó, C.; Barbas, C.; Cifuentes, A. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in food analysis. *Electrophoresis*, **2005**, 26, 1306-1318.
- [56] Skoog, Holler, Nieman. *Principios de análisis instrumental*, Quinta edición, McGrawHill, HarcourtBrace&Company. **2003**. Capítulo: 20, Páginas: 537-576 y Capítulo: 28, Páginas: 785-830.
- [57] Helmja, K.; Vaher, M.; Püssa, T.; Kaljurand, M. Analysis of the free radical scavenging capability of artificial polyphenol mixtures and plant extracts by capillary electrophoresis and liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2009**, 2417-2423.
- [58] Luthria, D.; Singh, A. P.; Wilson, T.; Vorsa, N.; Banuelos, G. S.; Vinyard, B. T. Influence of conventional and organic agricultural practices on the phenolic content in eggplant pulp: Plant-to-plant variation. *Food Chemistry*. **2010**, 121, 406-411.
- [59] Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brovillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 923-933.
- [60] Mukhopadhyay, S.; Luthria, D. L. & Robbins, R. J. Optimization of extraction process for phenolic compounds from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2006**, 86, 156-162.
- [61] Spácil, Z.; Nováková, L.; Solich, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, **2008**, 76, 189-199.
- [62] Gruz, J.; Novák, O.; Sornad, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, **2008**, 111, 789-794.
-