



# Desarrollo y optimización de técnicas de extracción y análisis de compuestos con actividad biológica en espárragos (*Asparagus officinalis* L.)

**AUTOR:** DIEGO ALAVARSA CASCALES  
**TUTORES:** CEFERINO A. CARRERA FERNÁNDEZ  
NURIA CHINCHILLA SALCEDO

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MÁSTER EN AGROALIMENTACIÓN**  
**CURSO 2023/2024**







---

**Desarrollo y optimización de técnicas de  
extracción y análisis de compuestos con  
actividad biológica en espárragos (*Asparagus  
officinalis* L.)**

---

TRABAJO FIN DE MÁSTER  
realizado en la  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE  
CÁDIZ

Memoria del Trabajo Fin de Máster presentado por el alumno D. Diego  
Alavarsa Cascales, para optar al título de Máster Universitario en  
Agroalimentación

Puerto Real, a 05 de diciembre de 2023

Fdo.: Diego Alavarsa Cascales

*«La suerte solo favorece a la mente preparada»*

LOUIS PASTEUR

# ÍNDICE

1.- PROPUESTA DEL TFM .....	1
2.- RESUMEN .....	2
3.- ABSTRACT .....	3
4.- INTRODUCCIÓN .....	4
4.1 EL ESPÁRRAGO .....	4
4.2 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES .....	7
4.3 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	8
4.3.1 FLAVONOIDES.....	9
4.3.2 ÁCIDOS FENÓLICOS .....	10
4.4 MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	10
4.4.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (UAE) .....	11
4.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTO FENÓLICOS.....	12
5.- OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	13
6.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	14
6.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	15
6.2.1 PATRONES DE CALIBRADO .....	15
6.3 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.....	15
6.4 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE UHPLC-QDa.....	17
6.5 CUANTIFICACIÓN MEDIANTE UHPLC-DAD.....	18
6.6 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	19
6.7 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN .....	21
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
7.1 BOX-BEHNKEN .....	22
7.1.1 <i>Estudio previo univariante del intervalo óptimo del porcentaje de etanol en el disolvente de extracción .....</i>	23
7.1.2 <i>Estudio previo univariante del intervalo óptimo de la temperatura .....</i>	24
7.1.3 <i>Optimización mediante diseño de experimentos tipo Box-Behnken .....</i>	25
7.1.4 <i>Condiciones óptimas de extracción de fenoles totales y actividad antioxidante .....</i>	27
7.1.5 <i>Condiciones óptimas de extracción simultánea .....</i>	28
7.1.6 <i>Tiempo óptimo de extracción .....</i>	29
7.1.7 <i>Validación del método.....</i>	30
7.2 Muestras reales.....	31

7.2.1 <i>Concentración de rutina</i> .....	31
7.2.1 <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i> .....	32
8.- CONCLUSIONES .....	34
9.- PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	35
10. BIBLIOGRAFÍA .....	36
11. APÉNDICES.....	41

## 1.- PROPUESTA DEL TFM

Los espárragos son tallos jóvenes y tiernos de la esparraguera, planta herbácea de la familia de las Liliáceas. *Asparagus officinalis* L. es la especie que más se cultiva en España, mientras que *Asparagus acutifolius* L. es la variedad silvestre, conocida como “esparrago triguero”. España ocupa la sexta posición en producción de espárragos a nivel mundial, con una producción total de 62.000 toneladas en 2020. Es una verdura consumida globalmente debido a su alto contenido de fibra, hierro, aminoácidos, vitaminas C y E, lignanos y flavonoides. Además de su sabor y su aceptabilidad por los consumidores, los espárragos contienen una alta cantidad de metabolitos secundarios bioactivos con efectos beneficiosos para la salud, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides. En este sentido, la creciente preocupación del sistema de salud pública por promover una dieta con un mayor consumo de vegetales hace que la investigación sobre los compuestos activos presentes en este alimento sea de gran interés.

Para estos estudios se propone la combinación de técnicas analíticas y de extracción avanzadas en el contexto de la química verde, como son la extracción asistida por ultrasonidos o por microondas, entre otras.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo será el desarrollo de un método de extracción de compuestos bioactivos presentes en el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) empleando alguna de las técnicas antes mencionadas. La identificación y cuantificación de estos compuestos se llevará a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC-Q-ToF-MS). Con el método desarrollado se abordará el estudio de diferentes especies de espárragos, tanto cultivadas como silvestres, especialmente de las que se recolectan en la provincia de Cádiz.



## 2.- RESUMEN

Varios estudios han evidenciado la composición en compuestos bioactivos del espárrago, los cuales presentan numerosas propiedades beneficiosas para el correcto funcionamiento del organismo. Estos beneficios se deben, a los metabolitos secundarios sintetizados por la planta, que son capaces de actuar en numerosos procesos antiinflamatorios, antibacterianos o anticancerígenos. Además, el espárrago es una planta tolerante al frío, la sequía y a la sal, siendo económicamente viable el cultivo en zonas con poca precipitación anual y ligeramente salinas, sin perder el rendimiento.

Así pues, en este Trabajo de Fin de Máster se ha identificado y cuantificado 5 compuestos de interés presentes en el espárrago, además de diversas muestras reales de espárragos silvestres en la provincia de Cádiz.

En este sentido, en primer lugar, se identificaron los compuestos bioactivos presentes en el espárrago, empleando la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas con cuadrupolo (UHPLC-QDa). Para la cuantificación de los compuestos bioactivos identificados se utilizó la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un detector de diodos (UHPLC-DAD). Por otro lado, se evaluó la actividad antioxidante del extracto, por lo cual, se utilizaron los métodos espectrofotométricos del DPPH y del ABTS

A continuación, se llevó a cabo la optimización de un método de extracción asistida por ultrasonidos (UAE) aplicando un diseño de experimentos de superficie de respuesta tipo Box-Behnken (BBD) con cinco variables independientes (%EtOH, temperatura, amplitud, ciclo y ratio) y dos variables de respuesta (fenoles totales y capacidad antioxidantes). Se determinó un método de extracción simultánea para las dos variables de respuestas, potenciando el valor añadido del extracto obtenido. Posteriormente, se comprobó la precisión del método desarrollado mediante estudios de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo coeficientes de variación inferiores al 5%.

Por último, se analizaron 31 muestras reales de la provincia de Cádiz, donde se ha estudiado tanto las diferentes partes de la planta (yema, zona media y tallo), como la influencia del color (verde y morado).

Palabras clave: **Espárrago; Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE); Box-Behnken; Actividad Antioxidante; Flavonoides; UHPLC.**





### 3.- ABSTRACT

Several studies have shown the composition of bioactive compounds in asparagus, which have numerous beneficial properties for the proper functioning of the body. These benefits are due to the secondary metabolites synthesized by the plant, which are capable of acting in numerous anti-inflammatory, antibacterial or anticancer processes. Furthermore, asparagus is a plant tolerant of cold, drought and salt, making it economically viable to grow in areas with little annual rainfall and slightly saline, without losing yield.

Thus, in this Master's Thesis, 5 compounds of interest present in asparagus have been identified and quantified, in addition to various real samples of wild asparagus in the province of Cádiz.

In this sense, first, the bioactive compounds present in asparagus were identified, using ultra-high resolution liquid chromatography coupled with a quadrupole mass spectrometer (UHPLC-QDa). Next, ultra-high-resolution liquid chromatography coupled to a diode detector (UHPLC-DAD) was used to quantify the identified bioactive compounds. On the other hand, the antioxidant activity of the extract was evaluated, therefore, the DPPH and ABTS spectrophotometric methods were used.

Next, the optimization of an Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) method was carried out applying a Box-Behnken response surface design (BBD) with five independent variables (%EtOH, temperature, amplitude, cycle and ratio) and two response variables (total phenolics and antioxidant capacity). A simultaneous extraction method was determined for the two response variables, enhancing the added value of the extract. Subsequently, the precision of the developed method was verified through repeatability and intermediate precision studies, obtaining variation coefficients of less than 5%.

Finally, 31 real samples from the province of Cádiz were analyzed, studying different parts of the spear (top, middle zone and stem) and the influence of color (green and purple).

**Keywords: Asparagus; Ultrasound-Assisted Extraction (UAE); Box-Behnken; Antioxidant Activity; Flavonoids; UHPLC.**



## 4.- INTRODUCCIÓN

### 4.1 EL ESPÁRRAGO

Los espárragos son tallos jóvenes y tiernos de la esparraguera, planta herbácea de la familia de las Liliáceas. *Asparagus officinalis* L. es la especie que más se cultiva en España (Figura 1), mientras que *Asparagus acutifolius* L. es la variedad silvestre, conocida como “esparrago triguero”. España agrupa a diferentes especies del género *Asparagus* (*A. albus*, *A. aphyllus*, *A. acutifolius*, *A. horridus*, *A. maritimus*, etc.), que forman parte de la vegetación autóctona típicamente mediterránea [1]. Existen aproximadamente 300 especies de espárragos distribuidas en los climas áridos y semiáridos de Europa, Asia y África [2].



Figura 1. Imagen de la variedad *Asparagus officinalis* L.

España ocupa la sexta posición en producción de espárragos a nivel mundial, con una producción total de 62.000 toneladas en 2021 [3]. Esto no incluye las especies silvestres recolectadas y vendidas en los mercados locales. Según las estadísticas mundiales de hortalizas, el espárrago es una de las hortalizas menos cultivadas, pero su producción tiende a aumentar considerablemente año tras año. Entre las razones de este creciente interés se encuentran el desarrollo de nuevas variedades adaptadas a diferentes áreas ecológicas y el creciente interés de los consumidores por las plantas silvestres.

El espárrago es una planta de estación templada y fresca, de principio de la primavera, que se puede cultivar con éxito en suelos arenosos y con pocos nutrientes. La planta se encuentra entre las verduras que son relativamente tolerantes al frío, la sequía y a la sal [4]. En este sentido, es económicamente viable cultivar en zonas con poca precipitación anual y ligeramente salinas con buen rendimiento. Estas características aportan una ventaja importante con el avance del cambio climático global, lo que aumenta la importancia de investigar las plantas resistentes al calor y la sequía para países como España y muchos otros países europeos.

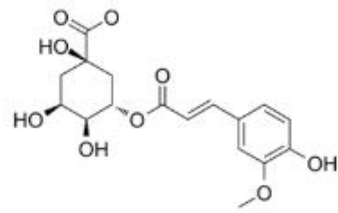
Acosta-Naranjo et al. [5], plantearon la hipótesis de que existe una relación simbiótica y biocultural entre los espárragos y los humanos a través de algunos

mecanismos atractivos, ya que la gente local los consume sin saber el valor nutricional que le atribuyen, independientemente de los estudios científicos.

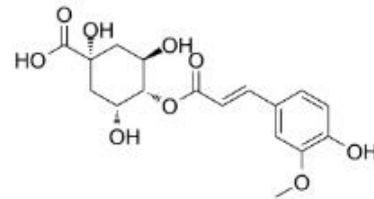
La especie *Asparagus acutifolius* L. puede ser encontrada en muchas zonas de España. Se encuentra fácilmente en la provincia de Cádiz desde la costa hasta la sierra, aunque igualmente estos cultivos están presente en otros países mediterráneos [6,7]. Conocidos por su fino sabor, son comúnmente recolectados de áreas no cultivadas, como montes, pinares y salinas, para ser comercializados en mercados locales y utilizados en diversos platos tradicionales. Esta especie silvestre se está convirtiendo en un nicho de cultivo interesante para ciertas zonas de Europa debido a su gran capacidad de adaptación a zonas no cultivables, con suelos empobrecidos, con legislaciones específicas como la de montes [8] y a la integración con ecosistemas agroforestales [5]. Destaca por presentar resistencia a la sequía, al frío, a suelos con alta salinidad y con el pH ácido.

Además de su sabor y su aceptabilidad por los consumidores, los espárragos contienen una alta cantidad de metabolitos secundarios bioactivos con efectos beneficiosos para la salud, principalmente compuestos fenólicos, de la familia de los flavonoides [1].

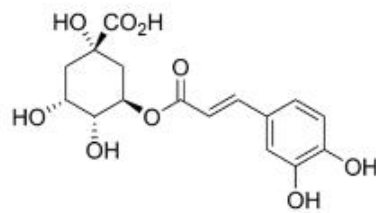
Es una verdura consumida globalmente debido a su alto contenido de fibra, hierro, aminoácidos, vitaminas C y E, lignanos, ácidos fenólicos y flavonoides [11]. Investigaciones anteriores han identificado que la rutina es el compuesto mayoritario encontrado en el espárrago, además de otros biocompuestos que poseen gran interés para la industria alimentaria, cosmética y farmacológica como el ácido 3-feruloilquínico, ácido 4-feruloilquínico, el ácido clorogénico, la rutina, y el rutinósido (Figura 2) [12–16].



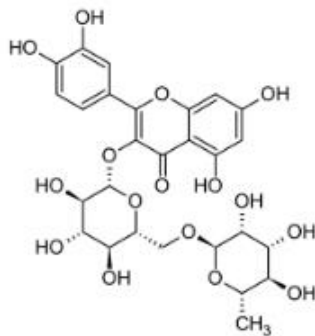
Ácido 3-feroilquinico



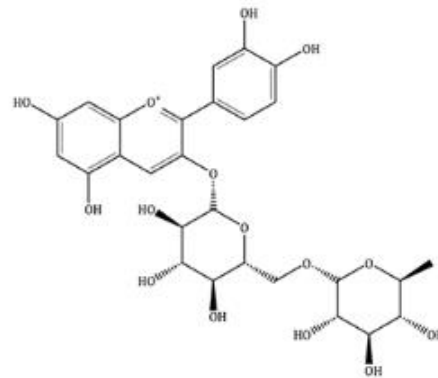
Ácido 4-feroilquinico



Ácido clorogénico



Rutina



Rutinósido

**Figura 2.** Estructuras químicas de los compuestos presentes en el espárrago.

De hecho, el espárrago ha sido comúnmente evaluado en la literatura, en términos de sus propiedades antioxidantes [10,15,17–20], antifúngica [21,22], antimicrobiana [19], antiinflamatoria [20,23], y anticancerígena [14,19,24]. Presenta potencial interés frente al cáncer de colon, lo que se ha puesto de manifiesto en ensayos *in vitro* con células humanas de carcinoma (HTC-116). El mecanismo de los efectos terapéuticos de la quimioprotección del espárrago tiene inicio con la regulación de las cascadas de señales intra y extracelulares, en específico en las diversas quinasas implicadas en la cascada de señalización [24]. Además presenta actividad pro-apoptótica en líneas celulares cancerígenas humanas: T24 (cáncer vesical); y A549 (cáncer de pulmón) [25].



Se ha observado que la especie silvestre, espárrago triguero (*Asparagus acutifolius* L.), posee un efecto beneficioso en los niveles de colesterol HDL. En ensayos *in vivo* sobre ratones alimentados con espárragos, se ha observado un efecto hepatoprotector, además de regular los niveles plasmáticos de lípidos y prevenir el daño oxidativo en estados de hipercolesterolemia, es decir, alto índice de colesterol en la sangre. Además, se están llevando a cabo estudios sobre mejoramiento genético, debido a la capacidad natural de resistencia a *Puccinia asparagi* y *Stemphylium vesicarium*, dos patógenos comunes de la especie comercial *A. officinalis* [22].

La especie africana (*Asparagus africanus*) presenta actividad anticonvulsiva, ya que provoca un aumento de los niveles de los receptores de membrana GABA, que son encargados de la liberación de neuronas del sistema nervioso, reduciendo la probabilidad de una crisis epiléptica [20]. Además, se ha observado que el extracto de la raíz de la especie asiática (*Asparagus racemosus*) sintetiza sarsasapogenina (SRS), un metabolito secundario que tiene función de frente a múltiples dianas (*multi-target directed ligand*, siglas en inglés MTDL), inhibiendo significativamente las enzimas claves involucradas en el desarrollo del Alzheimer [26], y actúa sobre las neuronas presentes en el hipocampo, con función de agente preventivo y terapéutico para los trastornos neurodegenerativos [27].

En general, el tratamiento de enfermedades utilizando biocompuestos del espárrago se debe principalmente a su alta capacidad antioxidante, que regulan las cascadas de señales intracelulares y su capacidad de neutralizar radicales libres como las especies reactivas del oxígeno (ROS: *Reactive Oxygen Species*), evitando daños al ADN y a las macromoléculas, mitigando así el daño genético acumulativo que puede desencadenar ciertas enfermedades [23].

#### 4.2 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

En los últimos años ha habido un aumento considerable en el interés por parte de la sociedad y de la ciencia en las sustancias naturales bioactivas con actividad antioxidante, debido a su acción frente a ciertas moléculas [28]. Los antioxidantes se conocen como secuestradores de los radicales libres, que son especies químicas muy reactivas generadas durante procesos de oxidación, debido a reacciones químicas de transferencia de electrones. Son compuestos muy inestables debido a que presentan uno o más electrones desapareados, lo que les impulsa a unirse a otras moléculas con electrones disponibles, dando lugar a una cascada de reacciones a nivel intracelular, que pueden llegar a producir alteraciones genéticas u ocasionar diversas enfermedades.



Debido a la exposición a la radiación o al estrés, se generan especies de oxígeno reactivo (ROS), que debido a su alta capacidad oxidante son capaces de modificar las membranas celulares. Aunque el cuerpo humano presenta mecanismos de defensa antioxidante endógenos, que son capaces de prevenir tales daños oxidativos, cualquier desequilibrio puede conllevar a una sobreproducción de ROS. Los antioxidantes exógenos consumidos en la dieta, posibilitan la prevención y el tratamiento de enfermedades producidas por dichas especies reactivas y con alto poder oxidante. Además, su aplicación va más allá de la prevención de enfermedades, pudiendo ser utilizados como conservantes alimenticios que controlan su deterioro. Los antioxidantes naturales más conocidos y utilizados en la mayoría de las industrias alimentarias son los compuestos fenólicos, los carotenoides, tocoferoles o la vitamina C.

#### 4.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

El término "compuesto fenólico" alberga todas las moléculas que tienen una o varias funciones fenólicas conectadas a una estructura aromática o alifática, es decir son compuestos que presentan uno o más grupos hidroxilo (-OH) unido a uno o más anillos de benceno [29]. En el caso de poseer más de un grupo hidroxilo, se conocen como polifenoles.

Los compuestos fenólicos son uno de los principales metabolitos secundarios, que son biosintetizados durante el desarrollo natural de las plantas con funciones muy variadas, desde funciones defensivas, debido a un hábitat hostil, hasta la atracción de polinizadores. Es decir, aunque no están implicados en funciones vitales de las plantas, sí juegan un papel fundamental en funciones de interacción entre plantas y entre plantas y animales. Su presencia en el reino animal se debe a la ingesta de estos biocompuestos en las verduras y frutas.

Los fenoles son comúnmente utilizados en la industria alimentaria por garantizar parámetros de calidad, estabilidad y aporte sensorial para los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes, proporcionan sabor y características organolépticas [30].

Además, los compuestos fenólicos llaman la atención por sus propiedades bioactivas y sus múltiples aplicaciones terapéuticas, porque donan un electrón al radical libre y lo convierten en una molécula inocua, evitando el estrés oxidativo, responsable de un gran número de enfermedades. Por un lado, se oxidan fácilmente secuestrando radicales libres y, por otro lado, funcionan como agentes quelantes, que son capaces de formar complejos con metales como el hierro y el aluminio [31], y por tanto, evitan las

reacciones de oxidación catalizadas por metales libres que ocurren naturalmente en actividades metabólicas diarias.

Algunos estudios han demostrado la relación de estos compuestos con las propiedades antioxidantes y anticancerígenas [17–19,24], debido a su capacidad de eliminar los radicales libres (ROS). Los polifenoles donan un átomo de hidrógeno a los radicales libres, por lo que se oxidan ellos mismos y así evitan la oxidación de otros compuestos, y consecuentemente, se inhiben reacciones en cadena responsables de la regulación de rutas de señalización intracelulares que pueden desencadenar enfermedades. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, el extracto de espárrago presenta actividad anticancerígena frente la célula tumoral HTC-116 (carcinoma de colon) [19,24]. La viabilidad de las células cancerígenas se ve afectada por la regulación de proteínas relacionadas con la supervivencia de tumores, genes relacionados con la apoptosis, fragmentación del ADN, quinasas involucradas en cascadas de señalización celulares, además de interferir en la expresión de ciclinas implicadas en las fases G0/G1 del ciclo celular [24].

Sin embargo, los beneficios para la salud de los alimentos ricos en esos compuestos funcionales dependen de su bioaccesibilidad (BA). En otras palabras, la eficacia de estos compuestos depende de la facilidad en el acceso y la absorción de los mismos por el tracto gastrointestinal [32].

En cuanto a su clasificación según su estructura química, se dividen en familias de flavonoides (antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavonas y chalconas) y no flavonoides (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico y estilbenos) [33,34]. Los principales compuestos fenólicos que se pueden encontrar en el espárrago son el ácido clorogénico, la rutina, ácido feruloilquínico y sus derivados [9].

#### 4.3.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos fenólicos caracterizados por presentar una estructura C6-C3-C6. En su nivel más básico (Figura 3), están constituidos por dos anillos fenólicos (anillo A y B) unidos por tres átomos de carbono, los cuales se encuentran formando generalmente un heterociclo (anillo C) [35].

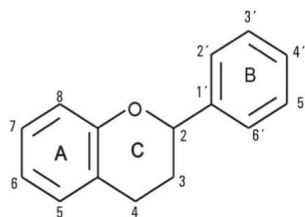


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.



Dentro de los flavonoides podemos encontrar varios tipos de compuestos en función del grado de insaturación y sustituyentes del anillo C, permitiendo esta estructura básica presentar una multitud de sustituciones y variaciones dando lugar a flavanoles, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, chalconas y antocianidinas. En este trabajo concreto nos hemos centrado en el estudio de los flavonoles (Figura 4).

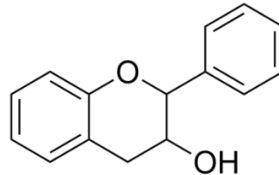


Figura 4. Estructura de los flavonoles.

#### 4.3.2 ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos, son los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en la dieta. Pueden ser de dos tipos: ácidos benzoicos (C6-C1), como se observa en la Figura 5, o ácidos cinámicos (C6-C3), como se observa en la Figura 6, en función del sustituyente presente en la estructura del anillo aromático.

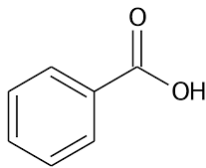


Figura 5. Estructura del ácido benzoico.

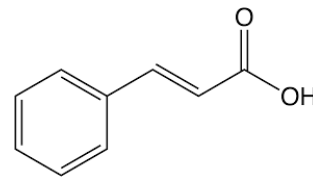


Figura 6. Estructura del ácido cinámico.

Los ácidos fenólicos derivados presentes en los espárragos, que se encuentran hidroxilados son: los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido vainílico y ácido siríngico) y los ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido caftárico y ácido clorogénico).

#### 4.4 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Como ya se ha comentado, los compuestos fenólicos son compuestos de gran interés a muchos niveles, por lo que son muchos los investigadores que han llevado a cabo su extracción de diferentes matrices. La extracción es una etapa de mucha importancia para aislar y separar los biocompuestos de interés de la matriz sólida, ya que no existe un método de extracción estándar para todas las matrices.

En el proceso de extracción influyen mucho las condiciones a las que se someta la muestra. Para llevar a cabo una extracción hay que tener en cuenta factores como son el tipo de extracción, el disolvente de extracción, la temperatura, y el tiempo, entre otros. Además, para la preparación de la muestra es conveniente aplicar un proceso de liofilización y trituración o molienda con la finalidad de conseguir una muestra





homogénea que posibilite una superficie de contacto óptima con el disolvente, con objetivo de mejorar el rendimiento y el tiempo de extracción. Al final, la muestra debe conservarse a baja temperatura, generalmente a -20 °C, para que se pueda analizar sin pérdidas en su actividad y composición.

Los métodos químicos de extracción convencionales requieren largos tiempos de extracción y procesamiento, o un alto volumen de disolventes orgánicos o un consumo de energía que pueden resultar en bajos rendimientos, degradación de compuestos o altos costes operativos [36]. Por esta razón, durante los últimos años se ha observado una creciente demanda de técnicas alternativas de extracciones avanzadas en el contexto de la química verde y la optimización de estos métodos no convencionales.

Algunas de las principales técnicas verdes empleadas para la extracción de compuestos fenólicos son la extracción sólido-líquido (SLE: *Solid-Liquid Extraction*), extracción asistida por ultrasonidos (UAE: *Ultrasound-Assisted Extraction*), extracción asistida por microondas (MAE: *Microwave-Assisted Extraction*), extracción con fluidos supercríticos (SFE: *Supercritical Fluid Extraction*), extracción con líquidos presurizados (PLE: *Pressure Liquid Extraction*), campos eléctricos pulsantes (PEFE: *Pulsed Electric Fields*), descarga eléctrica de alta voltaje (HVED: *High Voltage Electrical Discharge*), y extracción asistida por enzimas (EAE: *Enzyme Assisted Extraction*). Estas técnicas han sido aplicadas para la extracción de fenoles en multitud de matrices vegetales como la moringa [37], cebada [38] residuos de uvas [39], entre otras fuentes vegetales. En el caso del espárrago se han empleado previamente algunas técnicas como UAE (solo para las raíces) [40], PLE [9], MAE (solo para las raíces) [40] y SLE [9], para la extracción de los compuestos fenólicos.

#### 4.4.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (UAE)

En esta investigación se llevará a cabo una extracción asistida por ultrasonidos (UAE), que es una técnica que emplea ondas de ultrasonido, con una frecuencia superior a los 20 KHz, por lo que son inaudibles para el oído humano. Generan sucesivos ciclos de expansión y compresión que producen una cavitación acústica formando burbujas que destruyen las paredes celulares, liberando el contenido intracelular [36]. Este fenómeno fisicoquímico convierte a la UAE en una técnica ideal para la extracción de determinados compuestos de matrices vegetales, como los compuestos fenólicos, dado que no se requieren condiciones extremas de extracción como elevadas temperaturas y presiones.

Debido a la efectividad en romper la pared celular, puede actuar de forma sinérgica con distintos disolventes. Una combinación de disolventes químicos y UAE

cuenta con los beneficios de ambos métodos y son alternativas eficientes y más respetuosas con el medio ambiente que muchos métodos de extracción convencionales. Por lo tanto, los compuestos fenólicos pueden ser extraídos por UAE sin degradarse y, por tanto, sin alterar su capacidad antioxidante.

UAE presenta importantes ventajas en cuanto a la extracción de compuestos fenólicos, ya que es un proceso en condiciones suaves que generalmente no requiere disolventes químicos contaminantes, ni un elevado consumo de energía, tiempo o temperatura para lograr rendimientos de extracción significativos [41]. UAE se ha empleado para la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de múltiples matrices, como cebolla [42], cardo dorado [43], gengibre [44], setas [45], hojas de arándanos [46], *Abelmoschus esculentus* [47], entre otras.

#### 4.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTO FENÓLICOS

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos suele ser llevada a cabo mediante técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography) que permite la separación de estos compuestos y su posterior detección y cuantificación mediante diferentes detectores.

Con respecto a los detectores, los equipos cromatográficos de HPLC y UHPLC suelen acoplarse a sistemas de detección como el ultravioleta-visible (UV-vis: *Ultraviolet-visible*) [48], matriz de fotodiodos (DAD: *Diode Array Detector*) [49], electroquímicos (ECD: *Electrochemical Detection*) [50], y espectrometría de masas (MS: *Mass Spectrometry*)[51].

En este trabajo, la identificación de estos compuestos se ha llevado a cabo mediante la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas cuadrupolar (UHPLC-QDa: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Detector*).

La espectrometría de masa (MS: *Mass Spectrometry*) es una técnica que identifica los compuestos a partir de su peso molecular. Los analitos presentes en la muestra se ionizan al pasar por un campo eléctrico y/o magnético, de manera que al fragmentarse, las especies portadoras de carga cambian su trayectoria, luego pasan por un analizador en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y en seguida pasan por un detector que caracteriza los fragmentos iónicos según el orden de salida.

El analizador de masa más comúnmente encontrado en el mercado es el cuadrupolo (Q: *Quadrupole*). Está formado por cuatro barras (electrodos) paralelas entre

sí, y equidistantes de un eje central, para garantizar el paso de los compuestos, mantenidas con una corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF) alternas. Las magnitudes varían, lo que permite el paso de los fragmentos iónicos cargados, y su posterior detección. Presenta alta selectividad, actuando como un “filtro de masas”, permitiendo exclusivamente el paso de iones con una relación  $m/z$  determinada, lo que lo hace un analizador muy robusto y con fácil reproducibilidad [52].

## 5.- OBJETIVOS DEL PROYECTO

Tal y como se ha visto con anterioridad, los compuestos fenólicos son compuestos bioactivos de gran interés tanto para la industria alimentaria como para la propia salud de los consumidores. Por otro lado, la UAE supone una importante alternativa en el concepto de la química verde para la extracción de estos compuestos. Por todo ello, cabría esperar que el empleo de la UAE permitiese la extracción de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos y con alta actividad antioxidante del espárrago para su posterior aplicación. En base a esto, el objetivo principal de este trabajo ha sido:

**La optimización de un método fiable basado en la técnica de UAE para la obtención de un extracto de espárragos enriquecido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante, que pueda ser aplicado como control de calidad en la propia industria agroalimentaria o para la posterior aplicación de dicho extracto en campos como la cosmética, la nutrición o la medicina.**

Dicho objetivo ha sido desglosado en los siguientes sub-objetivos:

- Determinación de la capacidad de extracción para la UAE de compuestos fenólicos y con actividad antioxidante en el espárrago (*Asparagus officinalis* L.).
- Estudio del efecto del disolvente y la temperatura para la extracción.
- Estudio del efecto de las variables influyentes y optimización de las mismas para la extracción de compuestos fenólicos totales y a la vez la actividad antioxidante en el espárrago haciendo uso de técnicas de superficie-respuesta mediante un diseño estadístico de Box-Behnken.
- Estudio del tiempo óptimo de extracción del método desarrollado con el fin de intentar reducir los tiempos de extracción al mínimo, al ser un factor tan valioso en análisis de control de calidad o en procesos industriales.
- Validación del método de extracción desarrollado mediante el estudio de la repetibilidad y la precisión intermedia.



- Estudio de muestras reales de diferentes especies de espárragos silvestres, recolectadas en la provincia de Cádiz. Así como, el análisis de tres partes diferentes de la planta (yema, zona media y tallo) de las muestras recolectadas.
- Identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos en las muestras empleando UHPLC-QDa y UHPLC-DAD respectivamente.
- Evaluación la capacidad antioxidante de los extractos mediante el método de DPPH y ABTS.

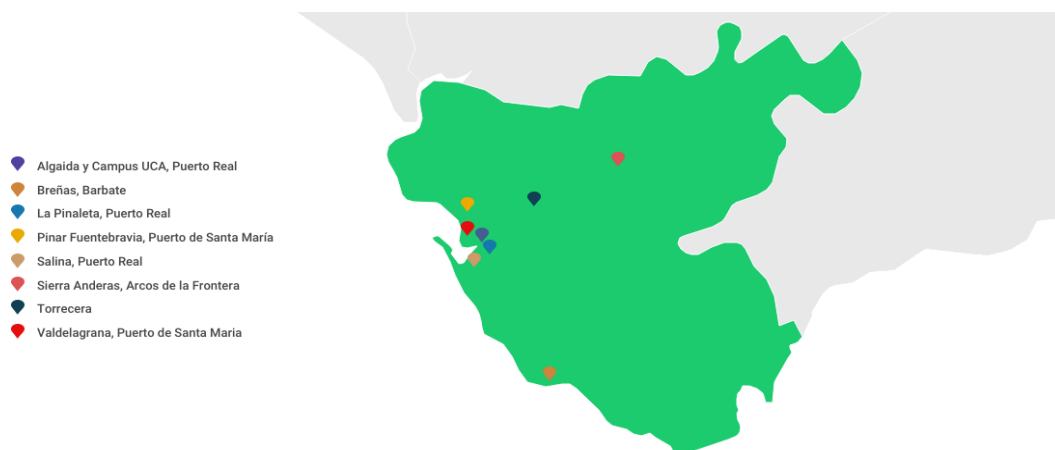
## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para esta investigación se compraron espárragos “*in natura*” en el supermercado Mercadona para realizar los estudios de optimización del método extracción. Para ello, se llevó a cabo la liofilización de las muestras, utilizando un equipo Azbil Telstar Technologies, modelo LYOALFA (Terrassa, España). A continuación, se procedió a su trituración mediante un robot de cocina (Cecotec, 1600W, Valencia, España), para aumentar la superficie de contacto entre la verdura y el disolvente, y conseguir así un mayor rendimiento en la extracción. Finalmente, las muestras se almacenaron en una cámara congeladora a -20 °C.

Las técnicas anteriormente comentadas también se aplicaron para las muestras reales, descritas en la Figura 7 y en Tabla A1 del *Apéndice I*, que fueron recolectadas en la provincia de Cádiz durante los meses de abril y mayo de 2023. Además, en el análisis de algunas de las muestras reales se ha llevado a cabo la división del espárrago en tres partes (yema, zona media y tallo).

#### Muestras reales de la provincia de Cádiz



**Figura 7.** Mapa de la provincia de Cádiz con la localización de las muestras reales.



## 6.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS

En la Tabla 1 se detallan los reactivos empleados para llevar a cabo la determinación de los compuestos bioactivos en las muestras de espárragos, así como la preparación de los patrones, metodologías de extracción y las diferentes disoluciones llevadas a cabo a lo largo de esta investigación. Se empleó agua Milli-Q (18 mΩ/cm), la cual fue obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Millipore Gradient A10 (Millipore, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

**Tabla 1.** Reactivos empleados.

Reactivo	Fórmula	Pureza	Casa comercial
<b>Etanol</b>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	96%	Scharlau*
<b>Metanol</b>	CH <sub>4</sub> O	98%	Panreac*
<b>DPPH*</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	99,9%	Sigma Aldrich*
<b>ABTS*</b>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	99%	Sigma Aldrich
<b>Persulfato de potasio</b>	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	99%	Sigma Aldrich
<b>Trolox</b>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	97%	Thermo Fischer*

\***DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; **ABTS**: 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]- sal de diamonio; **Scharlau**: Sentmenat, España; **Panreac**: Barcelona, España; **Sigma Aldrich**: St. Louis, Estados Unidos; **Thermo Fischer**: Fair Lawn, Estados Unidos.

### 6.2.1 PATRONES DE CALIBRADO

Para la preparación de las curvas de calibrado de rutina, ácido ferúlico y ácido clorogénico, se emplearon los patrones que se describe en la Tabla 2. Las correspondientes rectas de calibrado de estos compuestos se presentan en el *Apéndice II*.

**Tabla 2.** Patrones de calibrado empleado.

Patrón	Pureza	Casa comercial
<b>Rutina</b>	94%	Sigma Aldrich*
<b>Ácido <i>trans</i>-ferúlico</b>	99%	Sigma Aldrich
<b>Ácido clorogénico</b>	95%	Sigma Aldrich

\***Sigma Aldrich**: St. Louis, MO, Estados Unidos.

## 6.3 PROCEDIMIENTO EXTRACCIÓN

DE

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) se llevó a cabo con un equipo Sonopuls HD 3200 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstrabe, Berlín, Alemania), equipado con una sonda de ultrasonidos VS 70 T (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstrabe, Berlín, Alemania) de 7 mm (Figura 8). Dicho equipo posee la sonda de ultrasonidos acoplada a un baño termostático (Frigiterm-10, Selecta, Abrera, España),



el cual posee un vaso de doble pared, donde se introducirá la muestra con el objetivo de controlar la temperatura de extracción. El equipo permite el control simultáneo de diferentes parámetros de sonicación, como la amplitud y el ciclo de los ultrasonidos, así como el tiempo de operación.



**Figura 8.** Equipo para la extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

En el desarrollo de la extracción por ultrasonidos, el modo de operar fue el siguiente:

- En un "Falcon" de 50 mL se pesa la cantidad de muestra liofilizada a extraer y se añade el volumen necesario del disolvente.
- A continuación, se introduce el "Falcon" en el vaso de doble pared con la temperatura previamente seleccionada para la extracción, colocando en su interior la sonda de ultrasonidos con la precaución de que no entre en contacto con las paredes ni el fondo del tubo "Falcon". Se programa la amplitud, el ciclo, y el tiempo de la extracción.
- Finalizada la extracción, se procede al enfriamiento dependiendo de la temperatura empleada para la extracción. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el contenido del "Falcon" se centrifuga dos veces durante 5 minutos a 1702g, trasvasando en ambos casos el sobrenadante a un único matraz aforado de 25 mL y enrasando con el mismo disolvente empleado en la extracción.
- Por último, el extracto se trasvasa a un vial, que se conserva en una cámara congeladora a -20 °C para su preservación y posterior análisis.

En primer lugar, se ha realizado el estudio del rango óptimo de etanol en el disolvente de extracción, seguido por la determinación de la estabilidad frente a la temperatura, para posteriormente realizar el diseño de Box-Behnken.



En el caso del diseño de Box-Behnken, las variables a controlar fueron la temperatura, %EtOH, ciclo, amplitud y la relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio).

#### 6.4 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE UHPLC-QDa

Para la identificación de los compuestos fenólicos en el espárrago se ha utilizado un equipo UHPLC-QDa, modelo ACQUITY QDa (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.), que se muestra en la Figura 9. La columna empleada fue de fase reversa, Acquity UPLC® BEH C18 (5cm, Waters, Milford, MA, EE.UU.). El método cromatográfico utilizado para identificar los compuestos bioactivos presentes en las muestras de espárragos empleó una mezcla de disolventes como fase móvil, formada por agua acidificada con ácido fórmico al 0.1%, como disolvente A y acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 0.1%, como disolvente B, a un flujo de 0,55 mL/min, y a 45 °C de temperatura. Los análisis fueron llevados a cabo empleando la siguiente elución en gradiente del disolvente B: 0 min, 0%; 1 min, 0%; 3 min, 5%; 4 min, 10%; 4,5 min, 10%; 5 min, 20%; 7 min, 20%; 8 min, 30%, 9 min, 100%, 12 min, 100%.



**Figura 9.** Equipo de cromatografía líquida de ultra-eficacia con detección de cuadrupolo (UHPLC-QDa) empleado para la identificación de los compuestos fenólicos.

Tras la aplicación de este método se han analizado los compuestos en modo negativo (0,8 kV), y los compuestos bioactivos identificados fueron: ácido clorogénico ( $m/z$  353), ácido 3-feruloilquínico ( $m/z$  367) y un ácido 4-feruloilquínico ( $m/z$  367); rutina ( $m/z$  609), y rutinósido ( $m/z$  771).

La identificación se ha llevado a cabo según la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada pico cromatográfico, además de la comparación con los espectros de absorción UV-Vis y los tiempos de retención de los patrones comerciales para cada uno de los picos encontrados en las muestras de espárragos. Los correspondientes espectros de masa de estos compuestos se presentan en el *Apéndice III*.



## 6.5 CUANTIFICACIÓN MEDIANTE UHPLC-DAD

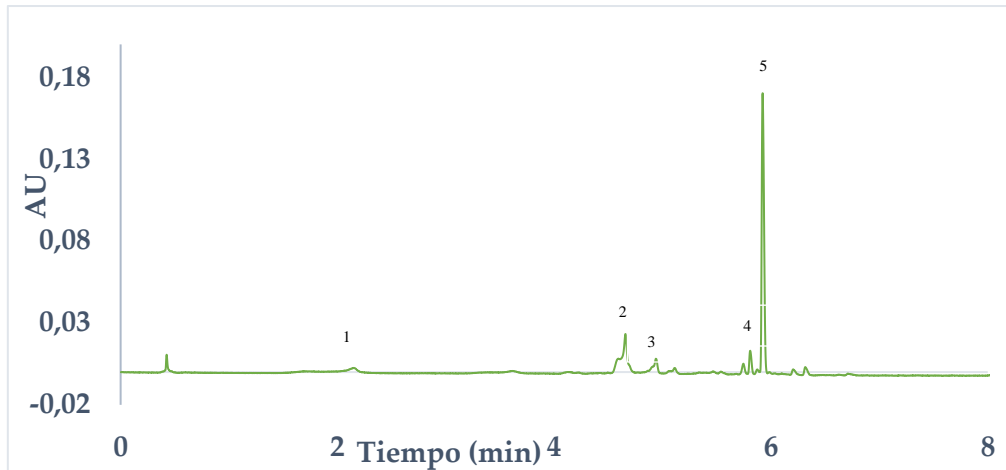
Una vez identificados los compuestos fenólicos presentes en las muestras de espárrago, la separación y la cuantificación de dichos compuestos fue llevada a cabo mediante un equipo de cromatografía líquida ACQUITY Ultra Performance LC Class (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) (Figura 11). Todo el sistema fue controlado mediante el Software Empower™ 3 (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). La columna empleada fue de fase reversa, Acquity UPLC® BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, MA, EE.UU.).



**Figura 11.** Equipo de cromatografía UHPLC-DAD empleado para la cuantificación de los compuestos fenólicos en los espárragos.

De nuevo, las condiciones empleadas para el análisis estuvieron basadas en la experiencia previa del grupo de investigación. Para ello, la temperatura se ajustó a 50 °C, se fijó un volumen de inyección de 3  $\mu\text{L}$  y el detector se configuró a una longitud de onda de 320 y 360 nm, ya que se corresponde a la máxima absorción de los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Se empleó una columna Cortecs C18 (1,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, Waters, Wexford, Irlanda). En las separaciones cromatográficas se emplearon dos disolventes: acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 0.1% (Fase B) y una disolución acuosa al 0,1% de ácido fórmico (Fase A). Para la separación cromatográfica se empleó un método de gradiente a un caudal de 0,55  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mientras que el gradiente empleado fue el siguiente: 0 min, 0% B; 1 min, 0% B; 3 min, 5% B; 4 min, 10% B; 4,50 min, 10% B; 5 min, 20% B; 7 min, 20% B; 8 min, 30% B; 9 min, 100% B; 12 min, 100% B; 13 min, 0% B. Con las condiciones previamente establecidas se separaron un total de 5 compuestos fenólicos en un corto periodo de tiempo (menos de 7 minutos). La Figura 12 muestra el cromatograma obtenido con los picos referentes a los compuestos fenólicos.





**Figura 12.** Cromatograma de los compuestos fenólicos en el extracto de espárragos ( $\lambda = 320$  nm). (1) ácido clorogénico, (2) ácido 3-feruloilquínico (3) ácido 4-feruloilquínico, (4) rutinósido, y (5) rutina.

La cuantificación de los fenoles totales presentes en las muestras se realizó mediante rectas de calibrado. Para ello, se realizaron patrones de calibrado de diferente concentración, entre 0 y  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para el ácido clorogénico, el ácido ferúlico, y la rutina, obteniendo rectas de calibrado con una bondad de ajuste, es decir, un coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0,9999, 0,9993 y 0,9984 respectivamente, como se observan en las Figuras A1, A2 y A3 de *Apéndice II*. Para el ácido 3-feruloilquínico, el ácido 4-feruloilquínico y el rutinósido se han utilizado las ecuaciones descritas anteriormente ajustando los pesos moleculares para los respectivos compuestos.

#### 6.6 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante es otro parámetro que se pretende optimizar en esta investigación, ya que es fundamental que el método de extracción produzca extractos que contengan la máxima capacidad antioxidante. En este caso, se emplearon los métodos ABTS y DPPH para medir la capacidad antioxidante de los extractos mediante espectroscopía UV-vis.

Para el análisis de la capacidad antioxidante se empleó un espectrofotómetro de microplacas modelo SpectraMax 190 (Molecular Devices, San José, CA, EE.UU.) (Figura 13). La utilización de dicho espectrofotómetro permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras, debido al empleo de placas multipocillos de 96 posiciones.





**Figura 13.** Equipo UV-vis empleado para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS.

El método DPPH se basa en el comportamiento de un radical que presenta un color violeta intenso en solución, en la banda de absorción de 515 nm, pero se vuelve incoloro cuando es neutralizado por agentes antioxidantes al reaccionar con el electrón desapareado presente en su composición. Es decir, cuanto mayor sea la pérdida de color, mayor será la actividad antioxidante del extracto [53]. Se prepararon 100 mL de una disolución 0,06 mM de DPPH en metanol. Posteriormente, 15  $\mu$ L de cada extracto se depositaron en cada posición de una placa multipocillo y se les adicionaron 165  $\mu$ L de la disolución de DPPH. Por último, se midió la absorbancia de cada muestra a 515 nm.

Cabe mencionar que, para cuantificar la capacidad antioxidante de cada una de las muestras, fue necesario realizar una recta de calibrado de trolox, bajo las mismas condiciones de operación descritas anteriormente, en un rango de concentraciones de 0 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Dicha recta de calibrado presentó una bondad de ajuste de 0,9999, la cual se muestra en el *Apéndice II*. Además, se realizó un blanco con etanol al 50%, ya que fue el disolvente empleado para realizar los diferentes extractos. La capacidad antioxidante de las muestras se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de DPPH empleando la expresión mostrada en la Ecuación 1, donde *A* representa la absorbancia.

$$\%Inhibición = \frac{\Delta A_{blanco} - \Delta A_{muestra}}{\Delta A_{blanco}} \times 100$$

**Ecuación 1.** Expresión empleada para el cálculo del porcentaje de inhibición del DPPH.

Por otro lado, el método ABTS usa un radical catiónico ABTS<sup>+</sup> que es reactivo contra la mayoría de las moléculas antioxidantes. En este caso, se obtiene una solución de color verde intenso. De igual forma que en el método del DPPH, la intensidad del color de la solución disminuye cuando el catión radical ABTS<sup>+</sup> reacciona con los agentes antioxidantes presentes en el extracto y se neutraliza perdiendo su color [54]. Para ello, se preparó una disolución acuosa de 7 mM de ABTS, y otra de 2,45 mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. De ambas disoluciones se mezclaron volúmenes iguales y dicha mezcla se dejó reaccionar 16 horas bajo condiciones de oscuridad. Posteriormente, e inmediatamente antes del análisis, se tomaron 8 mL de la mezcla anterior y se llevó a un volumen final de 100 mL, diluyendo con una disolución acuosa de etanol al 25%.

Para llevar a cabo el análisis, en cada pocillo de la multiplaca se disponen 190  $\mu$ L de ABTS y se incuba a 25 °C durante 10 minutos y se realiza una medida de la absorbancia

a 734 nm. Luego, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra a cada pocillo correspondiente, produciéndose la reacción y se realiza una medida de la absorbancia a los 30 minutos.

También, para la cuantificación de la capacidad antioxidante de cada una de las muestras analizadas fue necesario realizar una recta de calibrado de trolox, bajo las mismas condiciones de operación descritas anteriormente, en un rango de concentraciones de 0 a 100  $\text{mg L}^{-1}$ . Dicha recta de calibrado presentó una bondad de ajuste de 0,9918 (*Apéndice II*). La capacidad antioxidante de las muestras se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de ABTS empleando la expresión mostrada en la Ecuación 1, donde  $A$  representa la absorbancia.

#### 6.7 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN

Recientemente, las herramientas quimiométricas se han aplicado cada vez con más frecuencia en investigaciones que buscan la optimización de métodos. Esto se debe a la disminución del número de experimentos que se pretende ejecutar, resultando en un menor consumo de reactivos y energía, además de la simplificación del trabajo de laboratorio y la reducción en los tiempos de extracción [55]. Estos métodos quimiométricos utilizan modelos matemáticos que permiten conocer las variables más significativas en términos estadísticos, así como las interacciones que puedan ocurrir entre las variables entre sí. Si existen efectos de interacción entre los factores, la determinación de las condiciones óptimas indicadas por estudios univariantes, es decir una variable, serán diferentes a los resultados de la optimización multivariante, donde hay muchas variables estudiadas e intercorrelacionadas entre sí.

Para la optimización de la extracción se empleó el método de Box-Behnken con metodología de superficie respuesta (BBD-RSM), que es un tipo de diseño de superficie de respuesta que permite determinar las condiciones óptimas de extracción y las variables más influyentes. La optimización utilizando BBD-RSM se basa en la combinación de variables independientes a 3 niveles de factores: (-1) un nivel inferior, (0) un nivel intermedio y (1) un nivel superior, en función de si se trata de su valor mínimo, medio o máximo, respectivamente; no presenta puntos axiales por lo que tiene una disposición más esférica de los puntos de diseño que otros diseños estadísticos.

En resumen, el empleo de la quimiometría no solo repercute en la disminución del número total de experimentos realizados, sino que también permite excluir experimentos en condiciones consideradas extremas, que suponen gastos económicos más representativos y potencialidad de destrucción de los analitos de interés. Se puede



observar en la Tabla 3 la asignación de los tres rangos de valores de los experimentos de optimización a cada una de las variables que se pretende estudiar.

**Tabla 3.** Variables y rangos para el diseño de experimentos de Box-Behnken-RSM.

Variables	-1	0	1
% Etanol	25	62,5	100
Temperatura	10	40	70
Ratio	0,25	0,5	0,75
Ciclo	0,2	0,6	1
Amplitud	30	50	70

Los rangos de estudio para cada una de las variables estuvieron basados en la bibliografía, así como en la experiencia del grupo de investigación, y los resultados observados en estudios previos. Esto dio como resultado un total de 46 experimentos Tabla A2 del *Apéndice IV*, que fueron realizados de forma totalmente aleatoria. Se utilizó como variable de respuesta los resultados de la cantidad total de fenoles (mg de fenoles por gramo de muestra) determinados por UHPLC-DAD y la actividad antioxidante obtenida por el método DPPH.

La respuesta viene relacionada con los distintos factores estudiados mediante el modelo polinómico de segundo grado mostrado en la Ecuación 2, donde Y es la variable respuesta estimada,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión para los términos de intersección, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente; y por fin i e j son las variables independientes que afectan a la respuesta.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_1 * X_1 + \beta_{ii} * x_i^2 * \sum_t * \sum_{i=1}^k \beta_{ij} * x_i x_j + r$$

*Ecuación 2. Polinomio general de segundo orden del diseño de Box-Behnken.*

Por último, se utilizó el software estadístico Statgraphic Centurion (versión XVII) (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EE. UU.) para generar y analizar los diseños de BBD-RSM. Se realizó una prueba *t* al 95% de nivel de confianza para calcular los *p*-valores correspondientes a cada una de las variables estudiadas. De esta forma las variables que presentaron *p*-valores inferiores a 0,05 fueron consideradas significativamente influyentes.

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 BOX-BEHNKEN

En lo que se refiere al diseño de Box-Behnken, se han establecido tres niveles para cada variable independiente: uno inferior, uno medio y otro superior. No obstante, para establecer dichos niveles es necesario llevar a cabo un estudio previo e independiente de

los factores que se pretenden estudiar, de manera que se pueda determinar un intervalo en el que la extracción tenga una máxima eficiencia. Es por esto que se ha decidido estudiar en primer lugar el rango de porcentaje del disolvente, en cuyo caso se ha utilizado el etanol. En cuanto a la temperatura, se busca identificar el intervalo en el los compuestos bioactivos de interés no sufren degradación.

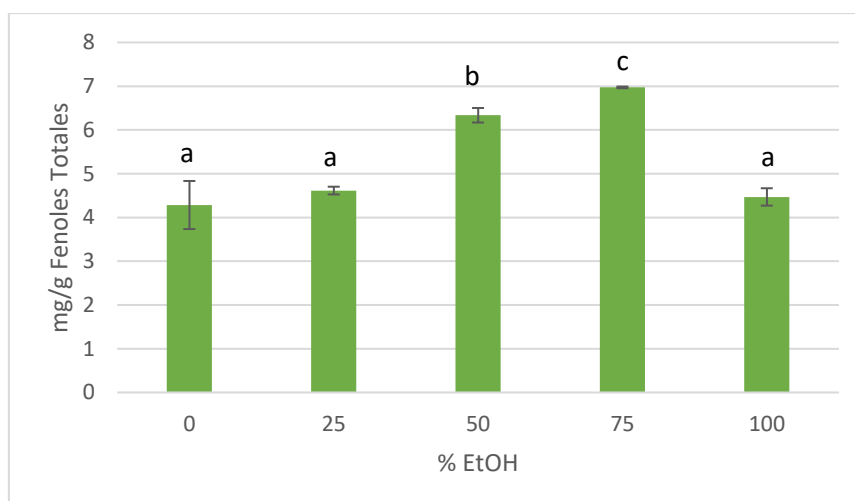
#### 7.1.1 Estudio previo univariante del intervalo óptimo del porcentaje de etanol en el disolvente de extracción

Con el objetivo de establecer el rango óptimo del porcentaje de etanol en el disolvente de extracción, se llevaron a cabo 5 ensayos por duplicado, en los que se extraían los biocompuestos en diferentes porcentajes de etanol (0, 25, 50, 75, y 100%), mientras las demás variables se quedaron fijas, según los valores descritos en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de operación para las variables en el estudio del intervalo óptimo del porcentaje de etanol.

Variables	Valor
Temperatura (°C)	30
Tiempo (min.)	10
Amplitud (%)	50
Ciclo ( $s^{-1}$ )	0,7
Cantidad de muestra (g)	0,5
Volumen de disolvente (mL)	25

Tras la realización de los experimentos, los extractos fueron centrifugados durante 10 minutos a 4.000 rpm (1702g) y el sobrenadante se llevó a un volumen de 25 mL con el mismo disolvente de la extracción. Los resultados obtenidos para concentración de los fenoles totales en el extracto se muestran en la Figura 14.



**Figura 14.** Concentración de los fenoles totales obtenido con diferentes porcentajes de EtOH ( $n = 2$ ).

\*Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.



A la vista a los resultados obtenidos se observa que, en el caso del ácido clorogénico, el rango de porcentaje de etanol con el que se obtiene más cantidad del compuesto oscila desde el 25% hasta el 50%. Para el ácido feruloilquínico, los porcentajes de etanol que extraen con más eficiencia van desde el 0% hasta el 75%. Por último, analizando los datos de la rutina, se observa que los porcentajes de etanol más eficientes para llevar a cabo la extracción se corresponden con el 50% y el 75%.

Se realizó un análisis estadístico para estudiar si había diferencia significativa entre las concentraciones obtenidas para cada compuesto en función del porcentaje de etanol. Debido a los resultados obtenidos, se ha seleccionado el intervalo óptimo para llevar a cabo el diseño de Box-Behnken entre el 25% y 100%.

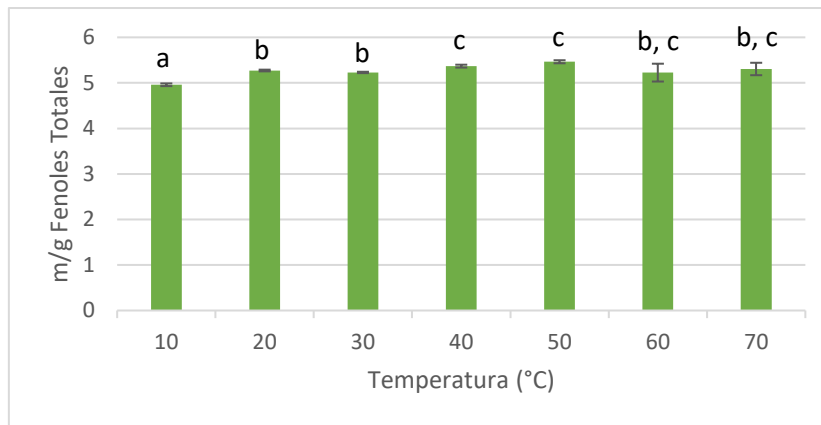
#### 7.1.2 Estudio previo univariante del intervalo óptimo de la temperatura

A continuación, tras la selección del rango del porcentaje de etanol a usar en el diseño, se analizó la temperatura por separado en 7 ensayos, en los que el rango de temperatura seleccionado variaba entre los 10 °C y los 70 °C, y las demás variables, como anteriormente se quedaron fijas, como se observa en la Tabla 6.

**Tabla 1.** Condiciones de operación para las variables en el estudio del intervalo óptimo de la temperatura.

Variables	Valor
<b>EtOH (%)</b>	50
<b>Tiempo (min.)</b>	10
<b>Amplitud (%)</b>	50
<b>Ciclo (<math>s^{-1}</math>)</b>	0,7
<b>Cantidad de muestra (g)</b>	0,5
<b>Volumen de disolvente (mL)</b>	25

De la misma forma que en el estudio anterior, tras realizar la extracción los extractos obtenidos fueron centrifugados durante 10 minutos a 4.000 rpm (1702g), y el sobrenadante se llevó a un volumen de 25 mL con el mismo disolvente de la extracción. Los resultados obtenidos para la concentración de los fenoles totales se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Concentración de fenoles totales obtenido con diferentes temperaturas de extracción ( $n = 2$ ).

\*Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Tras la obtención de los resultados, se han realizado análisis estadísticos para conocer las diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas de los compuestos en función de las diferentes temperaturas empleadas en la extracción.

En vista a los resultados obtenidos, se ha decidido mantener los experimentos de diseño en el mismo rango de temperatura desde 10 °C hasta 70 °C.

### 7.1.3 Optimización mediante diseño de experimentos tipo Box-Behnken

Tras establecer los intervalos de la concentración de disolvente y de la temperatura para realizar los ensayos de extracción, se han establecido los niveles inferiores, medios y superiores característicos de los diseños de Box-Behnken para cada una de las 5 variables que se pretenden estudiar.

Para esto, se combinaron los diferentes niveles de las variables establecidas para dar lugar a los 46 experimentos propuestos para el diseño de Box-Behnken. Posteriormente, se llevaron a cabo estos ensayos y se determinaron tanto las concentraciones de los compuestos fenólicos totales, como la actividad antioxidante presentes en los distintos extractos, los cuales se muestran en la Tabla A2 del *Apéndice IV*. Los resultados fueron tratados con el software estadístico Statgraphics Centurion (Versión XVIII, StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, Estados Unidos).

En primer lugar, se analizó el efecto aislado de cada una de las 5 variables, tanto individualmente como también las posibles interacciones entre cada una de ellas, teniendo en cuenta las variables de respuestas, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante. En este sentido, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), en el cual aquellos parámetros que presenten un  $p$ -valor inferior a 0,05 para un nivel de confianza del 95%, se considera influyente de manera significativa sobre las dos variables respuesta.

A continuación, se presentan los diagramas de Pareto (Figuras 16 y 17), tanto para los fenoles totales, como para la actividad antioxidante. De esta manera, se pueden observar las variables independientes y las interacciones entre ellas de forma visual, que son significativas para la extracción sobre las variables de respuesta. En este sentido, los parámetros que presenten un error estandarizado, con un valor superior a 2,17, se determina que tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta.

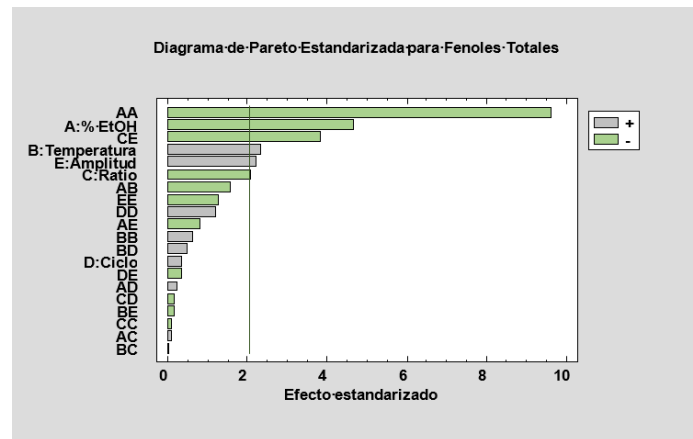


Figura 16. Diagrama de Pareto para la extracción de los fenoles totales mediante UAE.

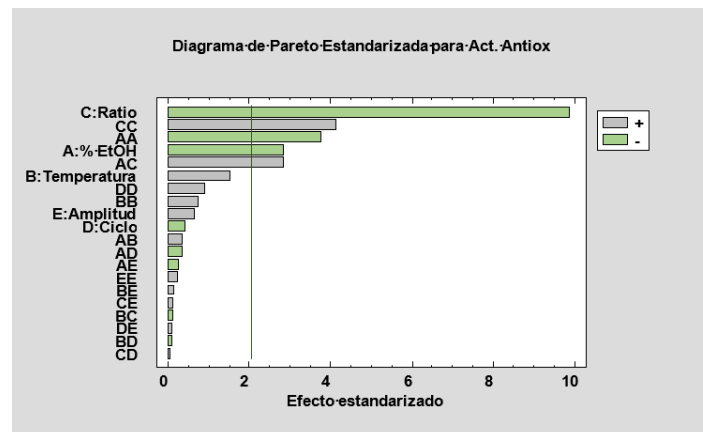


Figura 17. Diagrama de Pareto para la actividad antioxidantes mediante UAE.

El diagrama de Pareto, por un lado, identifica las variables que tienen un efecto significativo sobre las variables respuesta, y por el otro, también determina el signo para cada efecto. De esta forma, para las variables significativas que presenten un efecto positivo, es decir, cuanto mayor sea su valor, extraerá una mayor cantidad de compuestos bioactivos, mientras que, al revés, para aquellas variables cuyo efecto sea negativo, a mayor valor, extraerá una menor cantidad de compuestos bioactivos.

Los parámetros identificados como influyentes tanto para la concentración de fenoles totales, como para la actividad antioxidante están presentes en la Tabla A3 y A4 del Apéndice V y VI. De igual manera, se presenta el coeficiente estimado que se



determina por la ecuación polinómica de segundo orden de cada uno de ellos. De esta forma, con el objetivo de reducir e identificar los términos en los que los parámetros son influyentes de manera significativa, la ecuación de segundo orden determina la respuesta proporcionada por el sistema en función de las variables tanto de forma independiente, como las interacciones existentes entre ellas. Así pues, se obtienen las expresiones matemáticas que se muestran en la Ecuación 2 y 3, a continuación. En ellas se observa que, para el caso de fenoles totales, los parámetros más influyentes son el porcentaje de etanol y su interacción cuadrática, la interacción cuadrática entre ratio y amplitud, la temperatura, la amplitud y el ratio. Para la actividad antioxidantes, los parámetros más influyentes son el ratio y su interacción cuadrática, el porcentaje de etanol y su interacción cuadrática, y la interacción cuadrática entre el porcentaje de etanol y el ratio.

$$\begin{aligned} \text{Fenoles totales} = & -17,812 - 0,000762222 \text{ EtOH}^2 + 0,337354 \% \text{EtOH} \\ & -0,4195 \text{ Ratio Amplitud} + 0,0419375 \text{ Temperatura} + 0,412958 \text{ Amplitud} \\ & +19,4042 \text{ Ratio} \end{aligned}$$

**Ecuación 2.** Ecuación polinómica reducida de segundo orden para los fenoles totales.

$$\begin{aligned} \text{Actividad Antioxidante} = & 19,4498 + 0,0298926 \text{ EtOH} - 46,135 \text{ Ratio} \\ & -0,000990963 \text{ Amplitud}^2 + 0,165067 \text{ Amplitud Ratio} + 24,5833 \text{ Ratio}^2 \end{aligned}$$

**Ecuación 3.** Ecuación polinómica reducida de segundo orden para la actividad antioxidante.

#### 7.1.4 Condiciones óptimas de extracción de fenoles totales y actividad antioxidante

Con el diseño de experimentos de Box-Behnken se obtienen las condiciones óptimas de extracción, en las cuales las cantidades de compuestos fenólicos y actividades antioxidantes están maximizadas. Tras llevar a cabo los 46 experimentos del diseño, se determinan los valores óptimos para la obtención de los compuestos bioactivos identificados, tal y como se recogen en la Tabla 7, a continuación.

**Tabla 2.** Condiciones óptimas para la extracción de los compuestos fenólicos totales y de la actividad antioxidante.

Variables	Valor óptimo fenoles	Valor óptimo antioxidantes
<b>% EtOH</b>	50	30
<b>Temperatura (°C)</b>	70	70
<b>Amplitud (%)</b>	70	70
<b>Ciclo (s<sup>-1</sup>)</b>	0,2	0,2
<b>Ratio (g muestra)</b>	0,25	0,25

En la Tabla 7, se puede observar, que tanto para los fenoles totales, como para la actividad antioxidante, los valores óptimos para las dos variables respuesta coinciden salvo en el caso del % de etanol en el disolvente de extracción, siendo 50% y 30%, respectivamente



### 7.1.5 Condiciones óptimas de extracción simultánea

Asimismo, se llevó a cabo una optimización multivarieante para obtener unas condiciones de compromiso que maximicen ambas variables de interés. En definitiva, que mediante una única extracción se pueda obtener un extracto con la mayor concentración de compuestos fenolicos posibles, así como la máxima capacidad bioquímica de actuación.

En este sentido, el coeficiente de deseabilidad es una herramienta estadística de ajuste entre unas condiciones de compromiso y las condiciones óptimas para extraer cada una de las variables de interés por separado. Cuanto más se acerque el coeficiente de deseabilidad a 1, más adecuadas serán las condiciones de compromiso para obtener un extracto de ambas variables de interés. Las condiciones óptimas para la extracción simultanea, utilizando un diseño multivariante, se detallan en la Tabla 8, a continuación.

**Tabla 3.** Condiciones óptimas de compromiso para la extracción sinultánea de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Variables	Valor óptimo de compromiso
% Etanol	50
Temperatura (°C)	50
Ratio (g muestra en 25 mL disolvente)	0,25
Ciclo ( $s^{-1}$ )	1
Amplitud (%)	50

Tras realizar el tratamiento estadístico, el ensayo presentó un coeficiente de deseabilidad de 0,86, por lo que las condiciones de compromiso son apropiadas para realizar una extracción simultánea de las variables de interés. No obstante, se ha realizado un análisis comparativo para conocer la posibilidad de que haya diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Para esto, se han realizado nuevos ensayos con ambas condiciones óptimas de extracción individuales (Tabla 7), así como una extracción de compromiso, resultado del diseño multivariante para la extraccion simultanea (condiciones en la Tabla 8).

En este sentido, se han realizado 3 nuevas extracciones por triplicado, aplicando las condiciones previamente detalladas, cuyos resultados se exponen en la Tabla 9, a continuación.

**Tabla 4.** Concentración de los compuestos bioactivos de interés y los tres métodos de extracción ( $n = 3$ ).

Método de Extracción	Fenoles Totales (mg/g)	Actividad Antioxidantes, DPPH (mg/g)
<b>Fenoles Totales</b>	8,76 ± 0,21 <sup>a</sup>	7,85 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>Actividad Antioxidante</b>	8,53 ± 0,15 <sup>a</sup>	8,58 ± 0,72 <sup>a</sup>
<b>Compromiso</b>	8,89 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,54 ± 0,66 <sup>a</sup>

\*Letras iguales en la misma columna indica que no hay diferencias significativas a un nivel de significación del 95%.

En conclusión, se ha decidido trabajar con las condiciones de compromiso (Tabla 8), ya que esta condición de extracción no presenta diferencias significativas, por lo cual, se fijan como las condiciones óptimas para la extracción simultanea, tanto de los compuestos fenólicos como de la actividad antioxidante.

7.1.6 Tiempo óptimo de extracción

Una vez identificadas las condiciones óptimas para la extracción, se procedió a un estudio con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de extracción, en el cual se pretenden potencializar los valores obtenidos de las dos variables de respuesta. En este sentido, se llevaron a cabo un total de seis ensayos, que se realizaron por duplicado, donde se mantuvieron constantes los valores óptimos previamente determinados, y se cambió la variable tiempo. Tras la realización de los seis ensayos durante 2, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, se estableció la concentración de los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante para cada uno de los extractos obtenidos frente al tiempo, que vienen representados en las Figuras 18 y 19.

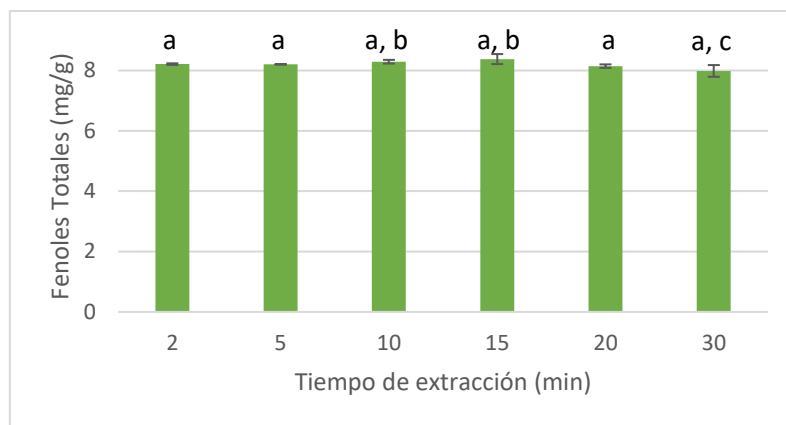


Figura 18. Concentración de fenoles totales frente al tiempo de extracción (n = 2).

\*Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

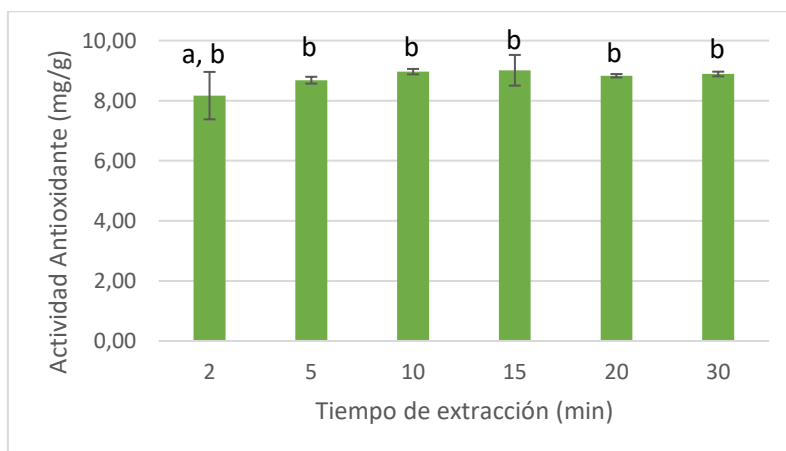


Figura 19. Concentración de la actividad antioxidantes frente al tiempo de extracción (n = 2).

\*Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.



En ambas figuras, se observa un incremento en la concentración de las variables de respuestas extraídas con el tiempo hasta los 10 y los 15 minutos. Por un lado, a los 10 minutos se alcanza una concentración promedio de 8,29 mg/g de fenoles totales y 8,97 mg/g de actividad antioxidantes, con una desviación estándar de 0,06 y 0,09, respectivamente. Por otro lado, a los 15 minutos, la concentración promedio extrae 8,37 mg/g de fenoles totales y 9,01 mg/g de actividades antioxidantes, no obstante, la desviación estándar es de 0,17 y 0,51, respectivamente.

En base a estos resultados, se llevó a cabo un análisis estadístico para estudiar si había diferencias significativas entre la cantidad obtenida de fenoles totales y la actividad antioxidante en función del tiempo de extracción. En dicho análisis se obtuvo que, solamente existían diferencias estadísticamente significativas para las extracciones realizadas durante 2 minutos y 5 minutos en actividad antioxidante y 5 y 10 minutos en compuestos fenólicos totales. Por tanto, se concluyó que el tiempo óptimo de extracción simultánea fuese de 10 minutos tanto para compuestos fenólicos totales y para la capacidad antioxidante.

#### 7.1.7 Validación del método

Para concluir la optimización del método de extracción asistida utilizando ultrasonido de los compuestos bioactivos en espárragos, el último paso fue la validación del método desarrollado mediante la realización de un estudio de repetibilidad y precisión intermedia.

En primer lugar, para evaluar la repetibilidad, se realizaron 9 extracciones bajo las condiciones óptimas obtenidas previamente en un mismo día. En segundo lugar, para el estudio de la precisión intermedia, las extracciones se realizaron durante tres días consecutivos, con un total de 9 extracciones cada día.

En la Tabla 10, se detallan los resultados obtenidos en la realización de ambos ensayos para cada una de las variables de respuestas, así como para la desviación estándar y el coeficiente de variación.

**Tabla 5.** Resultados obtenido en el ensayo de repetibilidad y precisión intermedia.

	Repetibilidad		Precisión Intermedia	
	Fenoles Totales	Act. Antioxidantes	Fenoles Totales	Act. Antioxidantes
<b>Media (mg/g)</b>	8,52	9,43	8,50	9,41
<b>Desviación Estándar (mg/g)</b>	0,145	0,176	0,134	0,121



<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	1,7	1,9	1,6	1,3
--------------------------------------	-----	-----	-----	-----

En los resultados de los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, el error máximo aceptado es un coeficiente de variación del 10% [56]. Basado en los resultados obtenidos, se observa que, tanto para los fenoles totales, como para la actividad antioxidantes, los coeficientes de variación están por debajo al 5%. Por lo que se puede concluir que el método desarrollado presenta una buena repetibilidad y precisión intermedia.

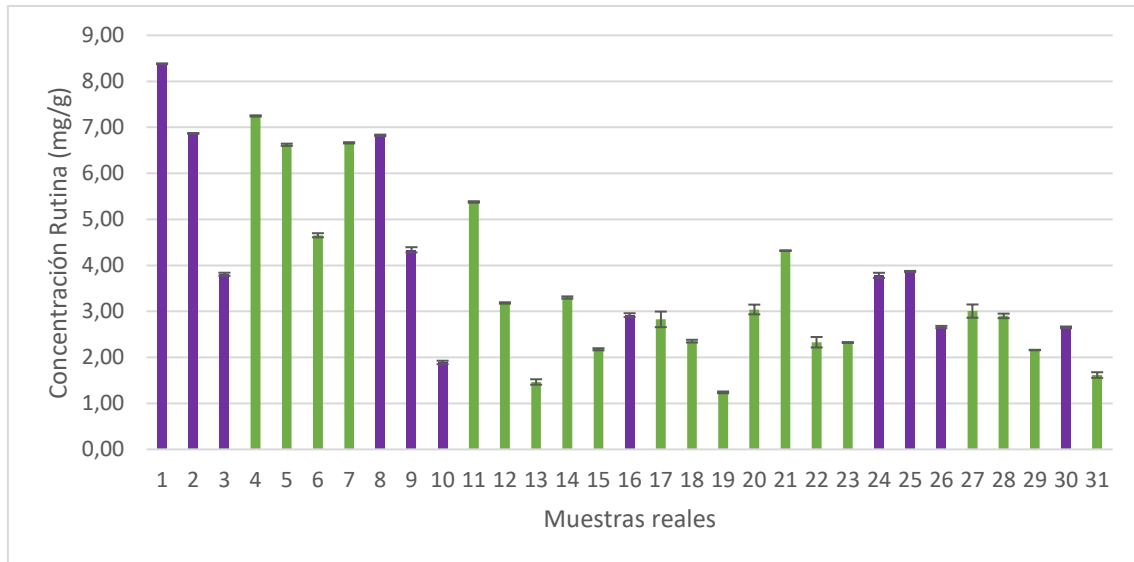
## 7.2 Muestras reales

Se ha empleado el método desarrollado en diferentes muestras reales de la provincia de Cádiz, de diferente origen geográfico y de diferentes colores. Aunque todas las muestras sean de la misma especie (*A. acutifolius* L.), las condiciones ambientales determinan el color del espárrago. En este sentido, para la preparación de las muestras reales recolectadas, se ha decidido, cuando la cantidad de muestra lo permitía, por un lado, separar las muestras por zonas, cortando el espárrago en 3 partes: yema, zona media y tallo. Por otro lado, se ha separado por color, morado o verde.

De esta manera, se han determinado la cantidad de rutina y la actividad antioxidante presentes en 31 muestras reales recolectadas en diversos municipios de la provincia de Cádiz, utilizando el método de extracción optimizado desarrollado en esta investigación. Los valores de dichos compuestos bioactivos se recogen en la Tabla A5, A6 y A7 del *Apéndice VII* y *VIII*.

### 7.2.1 Concentración de rutina

Tras llevar a cabo la extracción optimizada en las muestras reales, se observa que la concentración de rutina presente en estas se encuentra en el rango entre 1,24 mg/g y 8,38 mg/g (peso seco), y presenta un valor medio de 3,73 mg/g, según Tabla A5 en el *Apéndice VII*. En la Figura 20 se observa el diagrama de barras donde se representa la concentración de rutina para cada una de las muestras recolectadas en la provincia de Cádiz. La tendencia observada es que la zona de la yema presenta una concentración de rutina más elevada que en el tallo,. Este descenso puede ser observado, por ejemplo, en las muestras #1, #2 y #3, así como en las muestras #4, #5 y #6, y, #8, #9, y #10, entre otras, que representan, yema, zona media y tallo, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de Lee et al., que determina que la yema del espárrago verde es la zona donde la rutina presenta mayor concentración. Adicionalmente, en el mismo estudio, se determina que el rango de concentración esperado para la rutina está comprendido entre 1,51 y 7,29 mg/g del peso seco [57].



**Figura 20.** Diagrama de barras de la concentración de rutina en las muestras reales ( $n = 2$ ). Las muestras # 7, 14, 15, 16, 20, 30, y 31 son muestras enteras, las demás fueron divididas (yema, zona media, y tallo, en este orden).

En lo que se refiere al color, las muestras clasificadas como moradas (color morado en la gráfica) presentan más concentración de rutina que las muestras de color verde, como se puede observar, por ejemplo, en las muestras #1 (8,33 mg/g) y #4 (7,31 mg/g), y #7 (6,60 mg/g) y #11 (5,31 mg/g), yema morada y yema verde, respectivamente. Las muestras comentadas se han recolectado en la misma ubicación, pero se han separado en función de su color.

### 7.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras reales de espárrago, se han llevado a cabo dos métodos espectrofotométricos. Específicamente, el método del DPPH y del ABTS. La capacidad antioxidante se relaciona directamente con la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra. En este sentido, a mayor concentración de compuestos fenólicos, mayor actividad antioxidantes frente a las especies ROS, hecho que contribuye para evitar la aparición de diferentes enfermedades. Los resultados de los ensayos se encuentran en las Tablas A6 y A7 en el *Apéndice VIII*.

Se observa que, según el método DPPH, la muestra que presenta una mayor cantidad de mg equivalentes de trolox por gramo de muestra, y, por consiguiente, mayor capacidad antioxidante, es la muestra #24: *A. acutifolius* (Morado, Yema, Algaida), con un porcentaje de inhibición del 83,52%. Por otro lado, la muestra real de espárrago que presenta una menor capacidad antioxidante es la #29: *A. acutifolius* (Verde, Tallo, Puerto Real), con un porcentaje de inhibición del 55,28%. En líneas generales, los valores obtenidos del porcentaje de inhibición con el método de DPPH oscilan en un intervalo del 55,28-83,52%, con un valor medio del 76,60% según se observa en la Tabla A7 en el



*Apéndice VIII.* En cuanto a los resultados representados en mg de equivalentes de trolox por gramo de muestra real, la capacidad antioxidante obtenida contempla el rango entre 5,33-9,22 mg/g, con un valor medio de 8,25 mg/g, según los datos en la Tabla A6 del *Apéndice VIII.*

Por otro lado, según los resultados obtenidos (Tabla A7 del *Apéndice VIII*) con el método de ABTS, la muestra real de espárrago con mayor capacidad antioxidante fue la #27: *A. acutifolius* (Verde, Yema, Algaida), alcanzando el porcentaje de inhibición de 88,02%. No obstante, las muestras reales #19: *A. acutifolius* (Verde, Tallo, Arcos) y a la muestra #23: *A. acutifolius* (Verde, Tallo, Puerto Real), son las dos muestras que presentaban los valores más bajos de porcentaje de inhibición, concretamente representan el 73,25% y 73,42%, respectivamente. En este sentido, el porcentaje de inhibición determinado para las muestras de espárragos de la provincia de Cádiz, están comprendidos en un rango entre el 73,25-88,02%, siendo el valor medio de 80,38%. En cuanto a los resultados representados en mg de equivalentes de trolox por gramo de muestra real, la capacidad antioxidante obtenida contempla el rango entre 22,72-27,80 mg/g, con un valor medio de 25,07 mg/g, según los datos en la Tabla A6 del *Apéndice VIII.*

En ambos métodos de determinación de la actividad antioxidante, la yema es la zona con más actividad antioxidante, en comparación con las otras partes. Así como la zona del tallo es la que presenta menos actividad antioxidante.

Autores como Park y Lee [58], determinaron el porcentaje de inhibición de extractos de espárragos utilizando el método de DPPH en 44,52%, y por otro lado, utilizando el ABTS 15,58%, valores inferiores a los mostrados por los extractos obtenidos usando el método de extracción desarrollado.



## 8.- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster se establecen las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado de manera exitosa un método de extracción asistida por ultrasonidos (UAE), para la extracción simultánea, tanto de compuestos fenólicos, como para la actividad antioxidante en espárragos.
2. El método extracción optimizada presenta una alta repetibilidad y precisión intermedia con coeficientes de variación inferiores al 5%.
3. Mediante la aplicación del método desarrollado se han podido analizar muestras silvestres de la provincia de Cádiz cuantificando el compuesto fenólico mayoritario, la rutina, un biocompuesto de interés para la industria cosmética, farmacéutica y agroalimentaria.
4. Se han podido analizar las tres partes del espárrago silvestre (yema, zona media y tallo), identificando una mayor concentración de rutina en la yema de las muestras reales, así como analizar espárragos (*A. acutifolius* L.) verdes y morados, identificando una mayor concentración de rutina en las muestras moradas, dentro de la misma especie y localización geográfica.
5. Se ha determinado la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las muestras reales mediante los métodos espectrofotométricos del DPPH y ABTS, donde se han obtenido porcentajes de inhibición superiores a los encontrados en bibliografía.



## 9.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

Este Trabajo de Fin de Máster se enmarca dentro del proyecto “Estudio y comparativa de compuestos bioactivos en espárragos (*Asparagus officinalis* L. y *Asparagus acutifolius* L.) del sur de Andalucía y norte de Marruecos en el marco de una economía verde.” financiado por el Aula Universitaria del Estrecho. Debido a la amplia variedad de especies de espárrago silvestres, y de compuestos de interés biológico, se abre un amplio abanico de posibilidades para futuras líneas de investigación, para la producción de extractos con alto valor añadido con la posibilidad de escalamiento a la industria agroalimentaria, cosmética, y farmacológica, entre otras.

En este sentido, todas estas variables aportarán información relevante acerca del perfil nutricional y propiedades naturales, y añaden valor a un alimento altamente valorado y consumido, a nivel regional, como es el caso del espárrago.

Se pretende presentar este trabajo en congresos científicos tanto de ámbito nacional o internacional, como el Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos o el congreso Euroanalysis.

Finalmente, el trabajo pretende ser publicado como artículo científico en una revista de alto índice de impacto, como Food Chemistry (JCR-Q1, 7/143 en Food Science & Technology) y exponer el fruto de este trabajo en distintas redes sociales (Researchgate, Facebook, Twitter e Instagram).



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. MAPA *Espárrago de Huérto-Tájar*. Disponible en: [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Pliego\\_esparrago\\_modificado.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Pliego_esparrago_modificado.pdf).
2. Kubota, S.; Konno, I.; Kanno, A. Molecular Phylogeny of the Genus *Asparagus* (Asparagaceae) Explains Interspecific Crossability between the Garden *Asparagus* (*A. Officinalis*) and Other *Asparagus* Species. *Theoretical and Applied Genetics* **2012**, *124*, 345–354, doi:10.1007/s00122-011-1709-2.
3. FAO Cultivos y Productos de Ganadería. Producción/Rendimiento de Espárragos En España 2023.
4. Wilcox-Lee, D. Soil Matric Potential, Plant Water Relations, and Growth in *Asparagus*. *HortScience* **1987**, *22*, 22–24, doi:10.21273/HORTSCI.22.1.22.
5. Acosta-Naranjo, R.; Guzmán-Troncoso, A.J.; Gómez-Melara, J. The Persistence of Wild Edible Plants in Agroforestry Systems: The Case of Wild *Asparagus* in Southern Extremadura (Spain). *Agroforest Systems* **2020**, *94*, 2391–2400, doi:10.1007/s10457-020-00560-z.
6. Palfi, M.; Jurković, Z.; Ćosić, J.; Tomić-Obrdalj, H.; Jurković, V.; Knežević, N.; Vrandečić, K. Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Wild and Cultivated *Asparagus* in Croatia. *Poljoprivreda* **2017**, *23*, 56–62, doi:10.18047/poljo.23.1.9.
7. Mohammed, F.S.; Pehlivan, M.; Sevindik, E.; Akgul, H.; Sevindik, M.; Bozgeyik, I.; Yumrutas, O. Pharmacological Properties of Edible *Asparagus Acutifolius* and *Asparagus Officinalis* Collected from North Iraq and Turkey (Hatay). *Acta Alimentaria* **2021**, *50*, 136–143, doi:10.1556/066.2020.00204.
8. Real Decreto 159/2022. Conservación de Los Recursos Genéticos Forestales y de La Flora Silvestre. **2022**.
9. López-Salas, L.; Borrás-Linares, I.; Quirantes-Piné, R.; Emanuelli, T.; Segura-Carretero, A.; Lozano-Sánchez, J. Enhancing the Production of the Phenolic Extracts of *Asparagus* Using an Advanced Green Process. *Metabolites* **2022**, *12*, 951, doi:10.3390/metabo12100951.
10. Fan, R.; Yuan, F.; Wang, N.; Gao, Y.; Huang, Y. Extraction and Analysis of Antioxidant Compounds from the Residues of *Asparagus Officinalis* L. *Journal of Food Science and Technology* **2015**, *52*, 2690–2700, doi:10.1007/s13197-014-1360-4.
11. Yu, Q.; Li, J.; Fan, L. Effect of Drying Methods on the Microstructure, Bioactivity Substances, and Antityrosinase Activity of *Asparagus* Stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67*, 1537–1545, doi:10.1021/acs.jafc.8b05993.
12. Cai, C.; Cheng, W.; Shi, T.; Liao, Y.; Zhou, M.; Liao, Z. Rutin Alleviates Colon Lesions and Regulates Gut Microbiota in Diabetic Mice. *Scientific Reports* **2023**, *13*, 4897, doi:10.1038/s41598-023-31647-z.
13. Hamad, R.S. Rutin, a Flavonoid Compound Derived from Garlic, as a Potential Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Agent against Murine *Schistosomiasis Mansoni*. *Nutrients* **2023**, *15*, 1206, doi:10.3390/nu15051206.
14. Ismail, A.; El-Biyally, E.; Sakran, W. An Innovative Approach for Formulation of Rutin Tablets Targeted for Colon Cancer Treatment. *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24*, 68, doi:10.1208/s12249-023-02518-7.
15. Kubavat, K.; Trivedi, P.; Ansari, H.; Kongor, A.; Panchal, M.; Jain, V.; Sindhav, G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Dietary Antioxidant Rutin and Its



- Biological Contour. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **2022**, *11*, 115, doi:10.1186/s43088-022-00297-x.
16. Wu, H.; Wang, Y.; Huang, J.; Li, Y.; Lin, Z.; Zhang, B. Rutin Ameliorates Gout via Reducing XOD Activity, Inhibiting ROS Production and NLRP3 Inflammasome Activation in Quail. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, *158*, 114175, doi:10.1016/j.biopha.2022.114175.
  17. Vázquez-Castilla, S.; De la Puerta, R.; García Giménez, M.D.; Fernández-Arche, M.A.; Guillén-Bejarano, R. Bioactive Constituents from “Triguero” Asparagus Improve the Plasma Lipid Profile and Liver Antioxidant Status in Hypercholesterolemic Rats. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 21227–21239, doi:10.3390/ijms141121227.
  18. Rodríguez, R.; Jaramillo, S.; Rodríguez, G.; Espejo, J.A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A.; Jiménez, A. Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts from Several Asparagus Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5212–5217, doi:10.1021/jf050338i.
  19. Hamdi, A.; Jaramillo-Carmona, S.; Srairi Beji, R.; Tej, R.; Zaoui, S.; Rodríguez-Arcos, R.; Jiménez-Araujo, A.; Kasri, M.; Lachaal, M.; Karray Bouraoui, N.; et al. The Phytochemical and Bioactivity Profiles of Wild *Asparagus Albus* L. Plant. *Food Research International* **2017**, *99*, 720–729, doi:10.1016/j.foodres.2017.06.027.
  20. Birhan, Y.S. Medicinal Plants Utilized in the Management of Epilepsy in Ethiopia: Ethnobotany, Pharmacology and Phytochemistry. *Chinese Medicine* **2022**, *17*, 129, doi:10.1186/s13020-022-00686-5.
  21. Rosado-Álvarez, C.; Molinero-Ruiz, L.; Rodríguez-Arcos, R.; Basallote-Ureba, M.J. Antifungal Activity of Asparagus Extracts against Phytopathogenic *Fusarium Oxysporum*. *Scientia Horticulturae* **2014**, *171*, 51–57, doi:10.1016/j.scienta.2014.03.037.
  22. Castro, P.; Gil, J.; Cabrera, A.; Moreno, R. Assessment of Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in Asparagus Species Related to *Asparagus Officinalis*. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2013**, *60*, 1275–1288, doi:10.1007/s10722-012-9918-3.
  23. Alyami, N.M.; Almeer, R.; Alyami, H.M. Protective Effects of *Asparagus Officinalis* (Asparagus) against Lead Toxicity in Mice. *Environmental Science and Pollution Research* **2023**, *30*, 18718–18730, doi:10.1007/s11356-022-23540-5.
  24. Jaramillo, S.; Muriana, F.J.G.; Guillen, R.; Jimenez-Araujo, A.; Rodriguez-Arcos, R.; Lopez, S. Saponins from Edible Spears of Wild Asparagus Inhibit AKT, p70S6K, and ERK Signalling, and Induce Apoptosis through G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer HCT-116 Cells. *Journal of Functional Foods* **2016**, *26*, 1–10, doi:10.1016/j.jff.2016.07.007.
  25. Bilušić, T.; Šola, I.; Rusak, G.; Poljuha, D.; Čikeš Čulić, V. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activities of Wild Asparagus (*Asparagus Acutifolius* L.), Black Bryony (*Tamus Communis* L.) and Butcher’s Broom (*Ruscus Aculeatus* L.) Aqueous Extracts against T24 and A549 Cancer Cell Lines. *Journal of Food Biochemistry* **2019**, *43*, e12781, doi:10.1111/jfbc.12781.
  26. Kashyap, P.; Muthusamy, K.; Niranjana, M.; Tripathi, S.; Kumar, S. Sarsasapogenin: A Steroidal Saponin from *Asparagus Racemosus* as Multi Target Directed Ligand in Alzheimer’s Disease. *Steroids* **2020**, *153*, 108529, doi:10.1016/j.steroids.2019.108529.
  27. Jagdish, P.; Maheep, B. Neuroprotective Efficacy of *Asparagus Racemosus* Root Extract on Hippocampal Neurons in Scopolamine Mouse Model of Alzheimer’s



- Disease. *Asian Journal of Biological and Life Sciences* **2021**, *10*, doi:10.5530/ajbls.2021.10.52.
28. Junsathian, P.; Nakamura, S.; Katayama, S.; Rawdkuen, S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Thai Edible Plant Extracts Prepared Using Different Extraction Techniques. *Molecules* **2022**, *27*, 6489, doi:10.3390/molecules27196489.
  29. Peñarrieta, J.M.; Tejada, L.; Mollinedo, P.; Vila, J.L.; Bravo, J.A. Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química* **2014**, *31*, 15.
  30. Gimeno Creus, E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm* **2004**, *23*, 80–84.
  31. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352, doi:10.3390/molecules15107313.
  32. Ariza, M.T.; Reboredo-Rodríguez, P.; Cervantes, L.; Soria, C.; Martínez-Ferri, E.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Battino, M.; Simal-Gándara, J. Bioaccessibility and Potential Bioavailability of Phenolic Compounds from Achenes as a New Target for Strawberry Breeding Programs. *Food Chemistry* **2018**, *248*, 155–165, doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.105.
  33. Pinto, P.; Santos, C.N. Worldwide (Poly)Phenol Intake: Assessment Methods and Identified Gaps. *Eur J Nutr* **2017**, *56*, 1393–1408, doi:10.1007/s00394-016-1354-2.
  34. De la Rosa, L.; Alvarez-Parrilla, E.; Aguilar, G. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*; 2009; p. 367;.
  35. Brown, J.P. A Review of the Genetic Effects of Naturally Occurring Flavonoids, Anthraquinones and Related Compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **1980**, *75*, 243–277, doi:10.1016/0165-1110(80)90029-9.
  36. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, *34*, 540–560, doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
  37. Polo-Castellano, C.; Mateos, R.M.; Visiedo, F.; Palma, M.; Barbero, G.F.; Ferreiro-González, M. Optimizing an Enzymatic Extraction Method for the Flavonoids in Moringa (*Moringa Oleifera* Lam.) Leaves Based on Experimental Designs Methodologies. *Antioxidants* **2023**, *12*, 369, doi:10.3390/antiox12020369.
  38. Álvarez-Romero, M.; Ruíz-Rodríguez, A.; Barbero, G.F.; Vázquez-Espinosa, M.; El-Mansouri, F.; Brigui, J.; Palma, M. Comparison between Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum Vulgare* L.). *Foods* **2023**, *12*, 2638, doi:10.3390/foods12142638.
  39. Machado, A.P.D.F.; Montes, A.; Valor, D.; Fernández-Ponce, M.T.; Barbero, G.F.; Maróstica Júnior, M.R.; Pereyra, C.; De La Ossa, E.M. Co-Precipitation of Grape Residue Extract Using Sub- and Supercritical CO<sub>2</sub> Technology. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* **2022**, *61*, 102010, doi:10.1016/j.jcou.2022.102010.
  40. Zhang, H.; Birch, J.; Ma, Z.F.; Xie, C.; Yang, H.; Bekhit, A.E.-D.; Dias, G. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from New Zealand and Chinese *Asparagus Officinalis* L. Roots. *Journal of Food Science and Technology* **2019**, *56*, 799–810, doi:10.1007/s13197-018-3540-0.
  41. Domínguez-Rodríguez, G.; Marina, M.L.; Plaza, M. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Non-Extractable Polyphenols from Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.) Pomace. *Food Chemistry* **2021**, *339*, 128086, doi:10.1016/j.foodchem.2020.128086.



42. V. González-de-Peredo, A.; Vázquez-Espinosa, M.; Espada-Bellido, E.; Ferreiro-González, M.; F. Barbero, G.; Palma, M.; Carrera, C. Optimization of a Microwave Assisted Extraction Method for Maximum Flavonols and Antioxidant Activity of Onion Extracts. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2393, doi:10.3390/antiox11122393.
43. Vázquez-Espinosa, M.; V. González de Peredo, A.; Ferreiro-González, M.; Carrera, C.; Palma, M.; F. Barbero, G.; Espada-Bellido, E. Assessment of Ultrasound Assisted Extraction as an Alternative Method for the Extraction of Anthocyanins and Total Phenolic Compounds from Maqui Berries (*Aristotelia Chilensis* (Mol.) Stuntz). *Agronomy* **2019**, *9*, 148, doi:10.3390/agronomy9030148.
44. Gonzalez-Gonzalez, M.; Yarena-Prieto, B.J.; Carrera, C.; Vázquez-Espinosa, M.; González-de-Peredo, A.V.; García-Alvarado, M.Á.; Palma, M.; Rodríguez-Jimenes, G. del C.; Barbero, G.F. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Method for the Extraction of Gingerols and Shogaols from Ginger (*Zingiber Officinale*). *Agronomy* **2023**, *13*, 1787, doi:10.3390/agronomy13071787.
45. Aliaño-González, M.J.; Barea-Sepúlveda, M.; Espada-Bellido, E.; Ferreiro-González, M.; López-Castillo, J.G.; Palma, M.; Barbero, G.F.; Carrera, C. Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Mushrooms. *Agronomy* **2022**, *12*, 1812, doi:10.3390/agronomy12081812.
46. Santos-Martín, M.; Cubero-Cardoso, J.; González-Domínguez, R.; Cortés-Triviño, E.; Sayago, A.; Urbano, J.; Fernández-Recamales, Á. Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Blueberry Leaves Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) for the Valorization of Agrifood Wastes. *Biomass and Bioenergy* **2023**, *175*, doi:10.1016/j.biombioe.2023.106882.
47. Stężycka, O.; Frańska, M. Comment on the “Response Surface Methodology Optimization and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis on Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Okra (*Abelmoschus Esculentus*) and Their Antioxidant Activity.” *Food Chemistry* **2023**, *414*, doi:10.1016/j.foodchem.2023.135729.
48. Fang, F.; Li, J.-M.; Pan, Q.-H.; Huang, W.-D. Determination of Red Wine Flavonoids by HPLC and Effect of Aging. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 428–433, doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.036.
49. Li, A.-P.; Kang, J.-Y.; Shi, Y.-P. Simultaneous Determination of Multiple Components in Farfaræ Flos by UHPLC-DAD and Its Application in Quality Control of Decoction Pieces. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **2021**, *44*, 766–775, doi:10.1080/10826076.2022.2038197.
50. Zhu, Z.; Li, X.; Zhang, Y.; Wang, J.; Dai, F.; Wang, W. Profiling of Phenolic Compounds in Domestic and Imported Extra Virgin Olive Oils in China by High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection. *LWT* **2023**, *174*, doi:10.1016/j.lwt.2023.114424.
51. Serni, E.; Tomada, S.; Haas, F.; Robatscher, P. Characterization of Phenolic Profile in Dried Grape Skin of *Vitis Vinifera* L. Cv. Pinot Blanc with UHPLC-MS/MS and Its Development during Ripening. *Journal of Food Composition and Analysis* **2022**, *114*, doi:10.1016/j.jfca.2022.104731.
52. Shrivastava, K.; Setou, M. Imaging Mass Spectrometry: Sample Preparation, Instrumentation, and Applications. In *Advances in Imaging and Electron Physics*; Elsevier, 2012; Vol. 171, pp. 145–193.
53. Romanet, R.; Sarhane, Z.; Bahut, F.; Uhl, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R.D. Exploring the Chemical Space of White Wine Antioxidant Capacity:



- A Combined DPPH, EPR and FT-ICR-MS Study. *Food Chemistry* **2021**, 355, 129566, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129566.
54. Li, C.; Mora, L.; Toldrá, F. Characterization of Antioxidant Efficacy of Peptide Extracts as Affected by Peptide Interactions during the Ripening of Spanish Dry-Cured Ham. *Food Research International* **2021**, 147, 110525, doi:10.1016/j.foodres.2021.110525.
55. Amiri, S.; Shakeri, A.; Sohrabi, M.R.; Khalajzadeh, S.; Ghasemi, E. Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Fatty Acids from *Aesculus Hippocastanum* Fruit by Response Surface Methodology. *Food Chemistry* **2019**, 271, 762–766, doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.144.
56. AOAC INTERNATIONAL Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **2016**, 1–18.
57. Lee, E.J.; Yoo, K.S.; Patil, B.S. Development of a Rapid HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Protodioscin and Rutin in White and Green Asparagus Spears. *Journal of Food Science* **2010**, 75, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01824.x.
58. Park, J.; Lim, J. Comparison of Biological Activities of Different Parts of Asparagus. *Current Developments in Nutrition* **2020**, 4, nzaa052\_040, doi:10.1093/cdn/nzaa052\_040.



## 11. APÉNDICES

### APÉNDICES I

**Tabla A6.** Muestras reales recolectadas y sus coordenadas.

#	Especie	Parte y Color	Localización	Coordenadas de la localización
1	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Morado	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
2	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Morado	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
3	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Morado	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
4	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Verde	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
5	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Verde	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
6	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Verde	Breñas, Barbate	36.18386° N, 5.97129° W
7	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Verde	Salina, Puerto Real	36.51535° N, 6.16456° W
8	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Morado	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
9	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Morado	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
10	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Morado	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
11	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Verde	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
12	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Verde	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
13	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Verde	Pinar Fuentebravia, Puerto de Santa María	36.61219° N, 6.25621° W
14	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Verde	Campus UCA, Puerto Real	36.53051° N, 6.21400° W
15	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Verde	Torredera, Jerez de la Frontera	36.11147° N, 5.939681° W
16	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Morado	Sierra Anderas, Arcos de la Frontera	36.77347° N, 5.71130° W
17	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Verde	Sierra Anderas, Arcos de la Frontera	36.77347° N, 5.71130° W
18	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Verde	Sierra Anderas, Arcos de la Frontera	36.77347° N, 5.71130° W
19	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Verde	Sierra Anderas, Arcos de la Frontera	36.77347° N, 5.71130° W
20	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Verde	Valdelagrana Puerto de Santa María	36.578473° N, - 6.217467° W

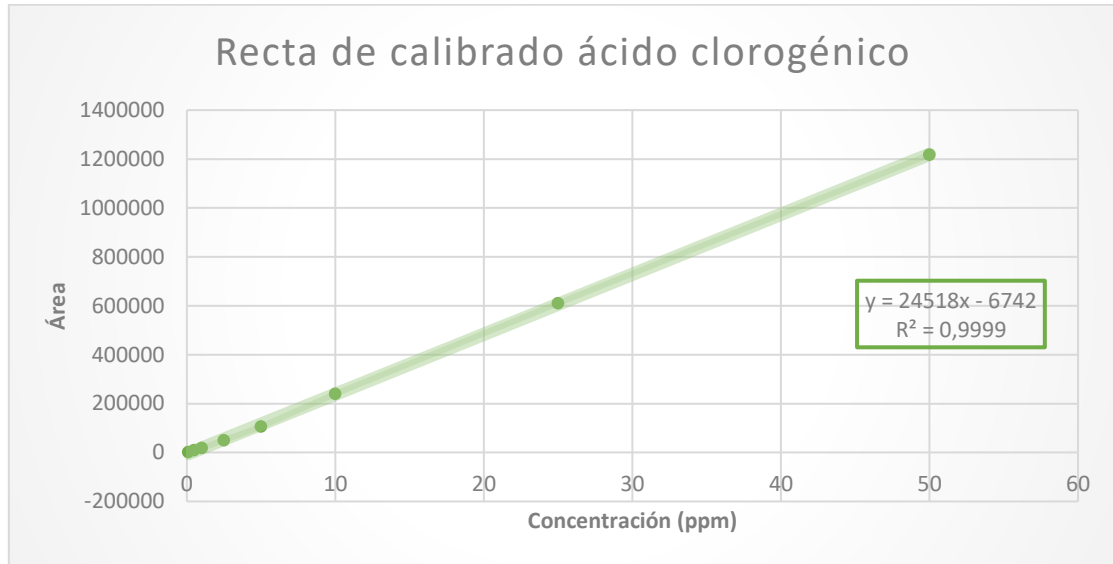


<b>21</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Verde	La Pinaleta, Puerto Real	36.52784° N, 6.16484° W
<b>22</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Verde	La Pinaleta, Puerto Real	36.52784° N, 6.16484° W
<b>23</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Verde	La Pinaleta, Puerto Real	36.52784° N, 6.16484° W
<b>24</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Morado	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>25</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Morado	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>26</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Morado	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>27</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Yema Verde	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>28</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Medio Verde	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>29</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Tallo Verde	Algaida, Puerto Real	36.53375° N, 6.20841° W
<b>30</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Entero Morado	La Pinaleta, Puerto Real	36.52784° N, 6.16484° W
<b>31</b>	<i>A. acutifolius</i> L.	Verde Entero	La Pinaleta, Puerto Real	36.52784° N, 6.16484° W

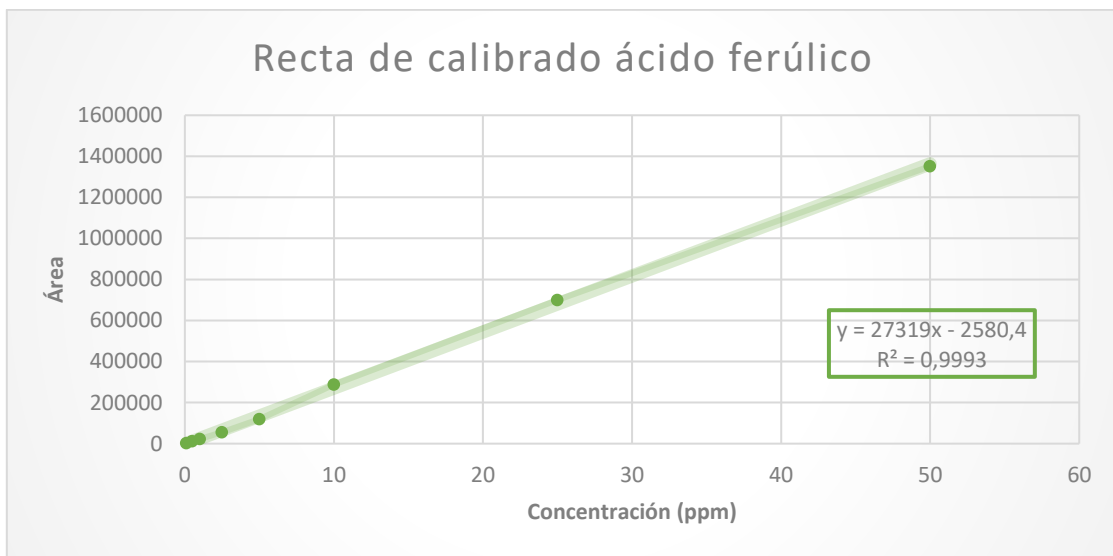


APÉNDICES II

En este apartado se muestran las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los compuestos bioactivos determinados.



**Figura A1.** Recta de calibrado obtenida para el ácido clorogénico.



**Figura A2.** Recta de calibrado obtenida para el ácido ferúlico.

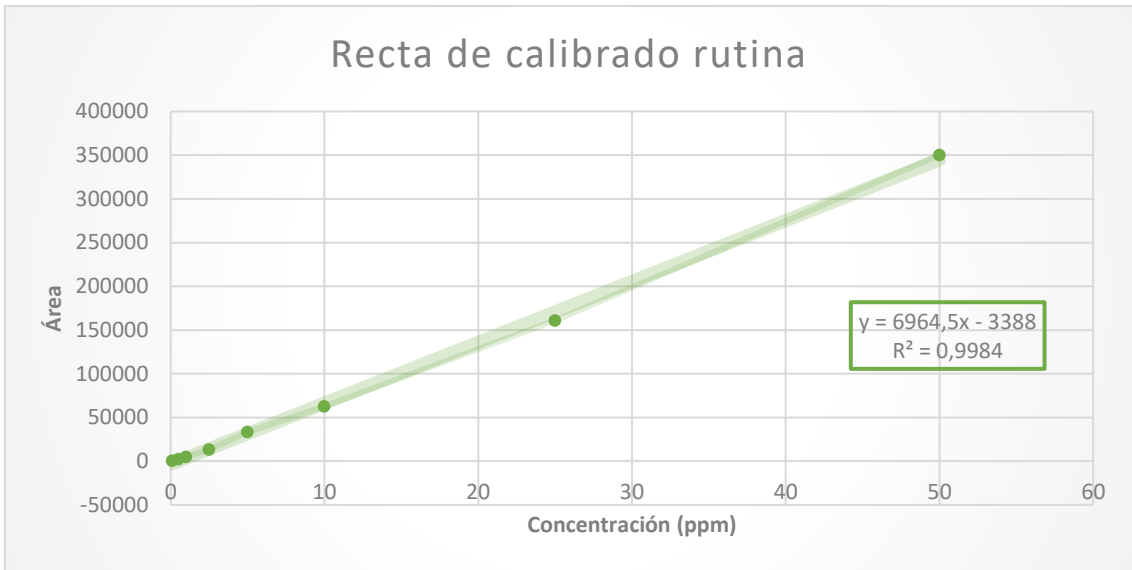


Figura A3. Recta de calibrado obtenida para la rutina.

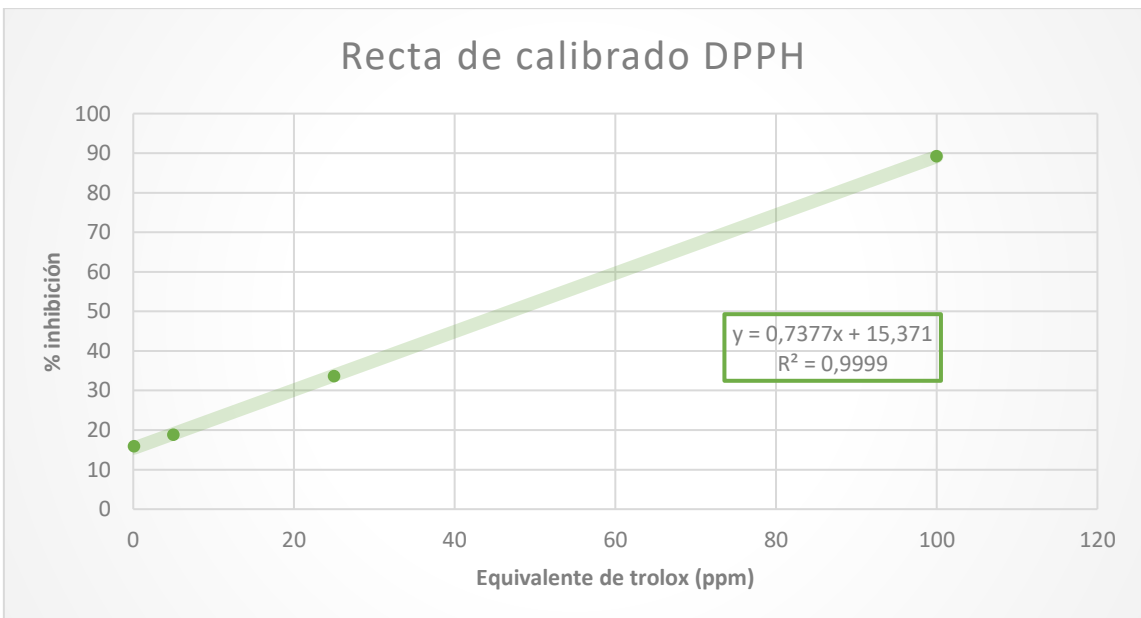
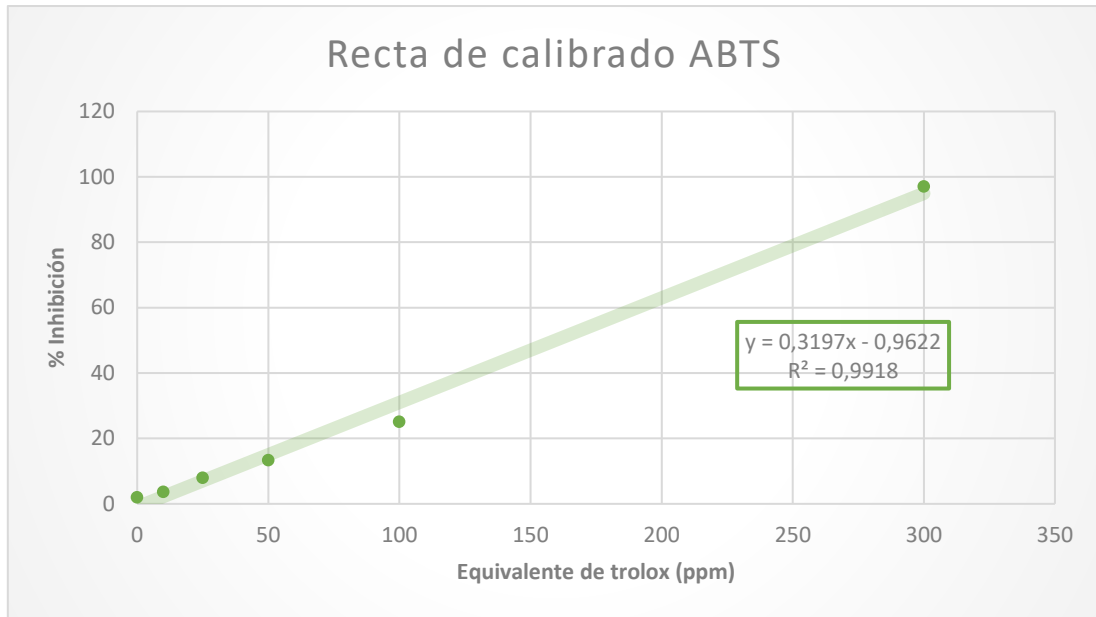


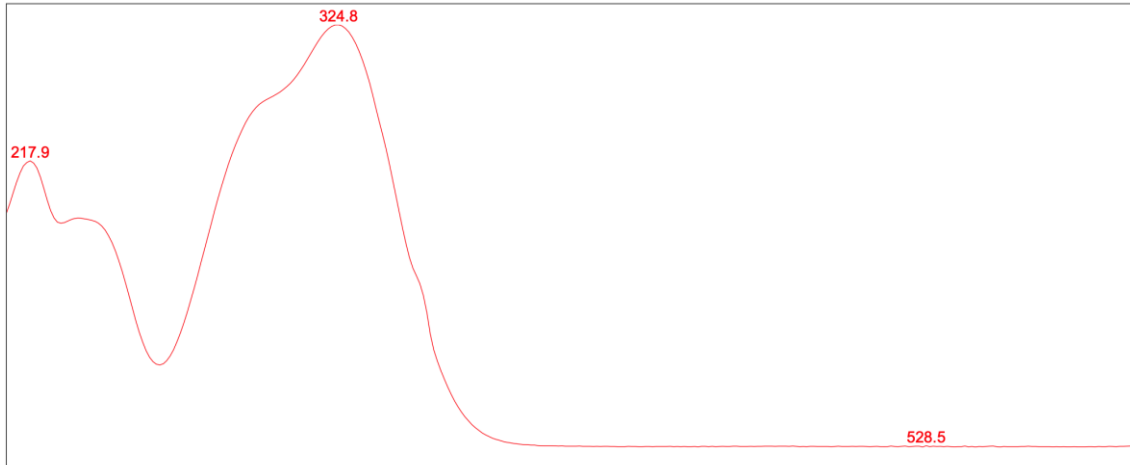
Figura A4. Recta de calibrado obtenida para el DPPH.



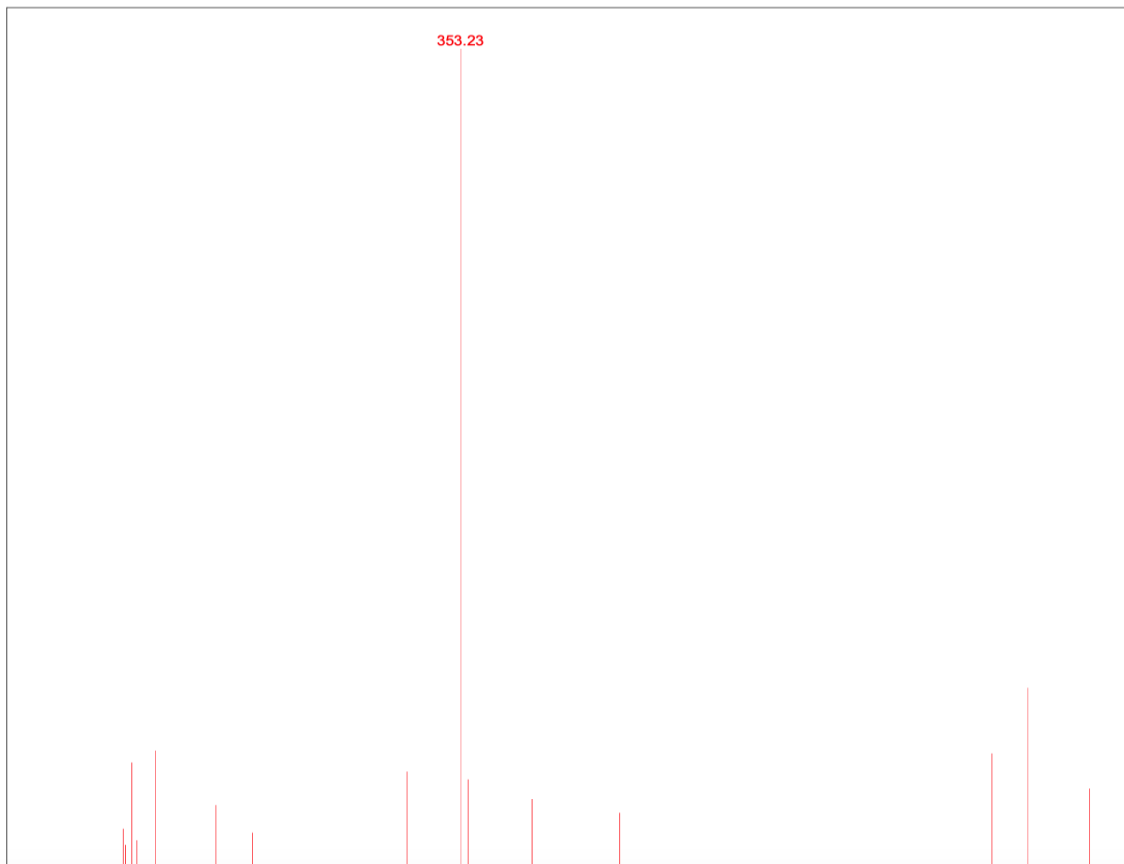
**Figura A5.** Recta de calibrado obtenida para el ABTS.

APÉNDICES III

- Figuras A6 y A7. Espectro UV-vis y MS correspondiente al **ácido clorogénico** identificado en los extractos de espárrago.

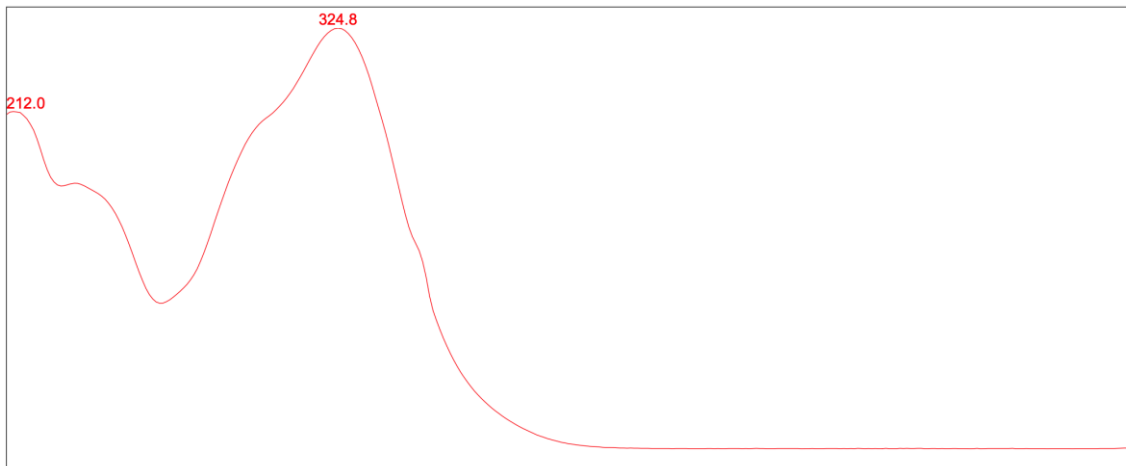


**Figura A6.** Espectro UV-Vis del ácido clorogénico.

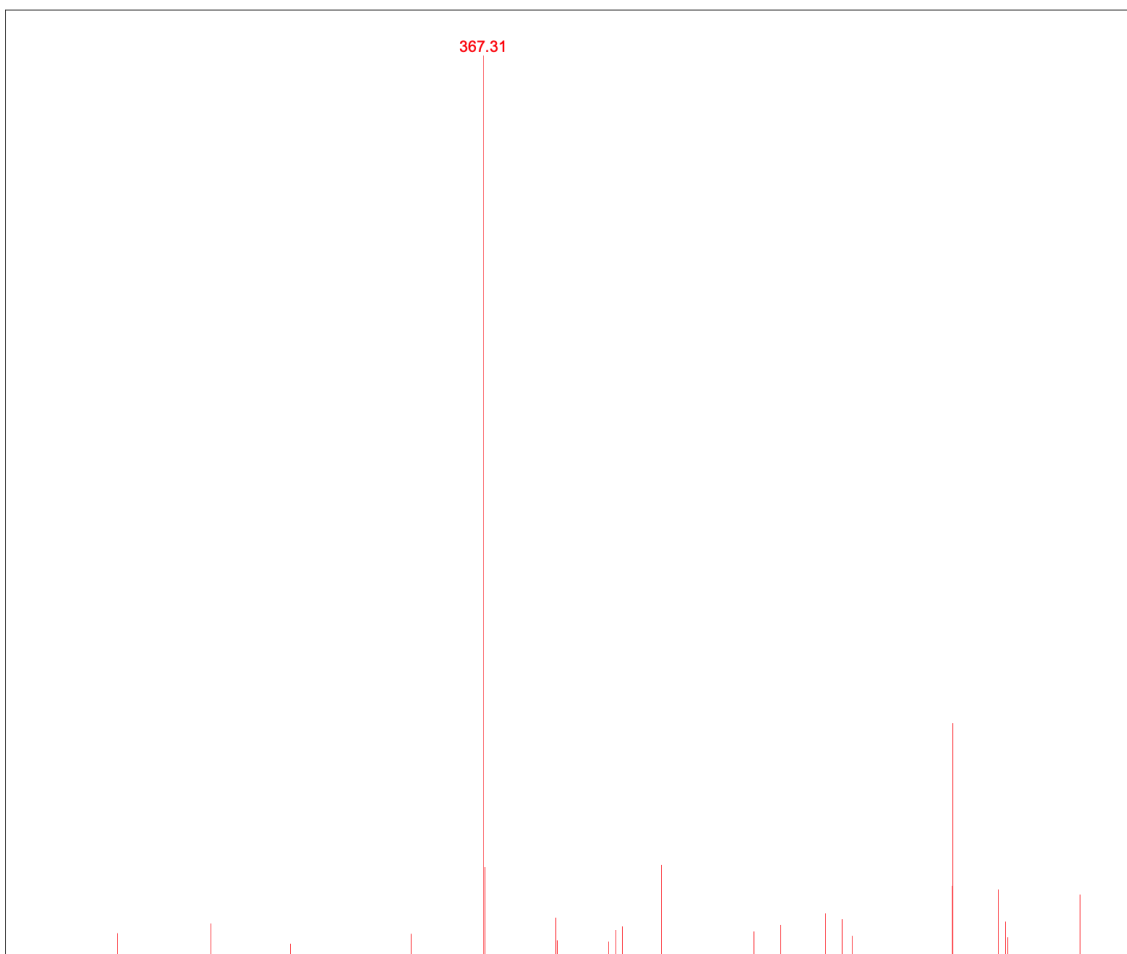


**Figura A7.** Espectro de masa del ácido clorogénico.

- Figuras A8 y A9. Espectro UV-vis y MS correspondiente al **ácido 3-feruloilquínico** identificado en los extractos de espárrago.

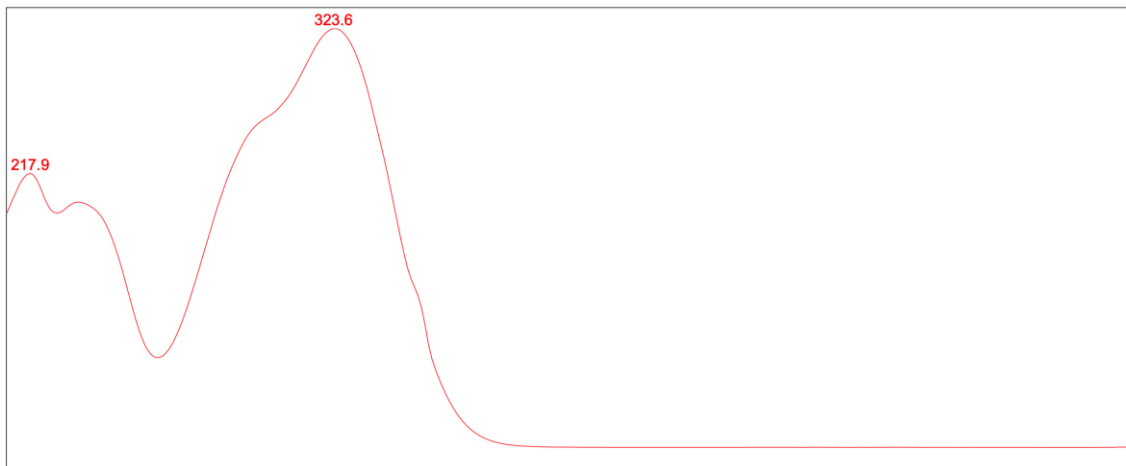


**Figura A8.** Espectro UV-Vis del ácido feruloilquínico.

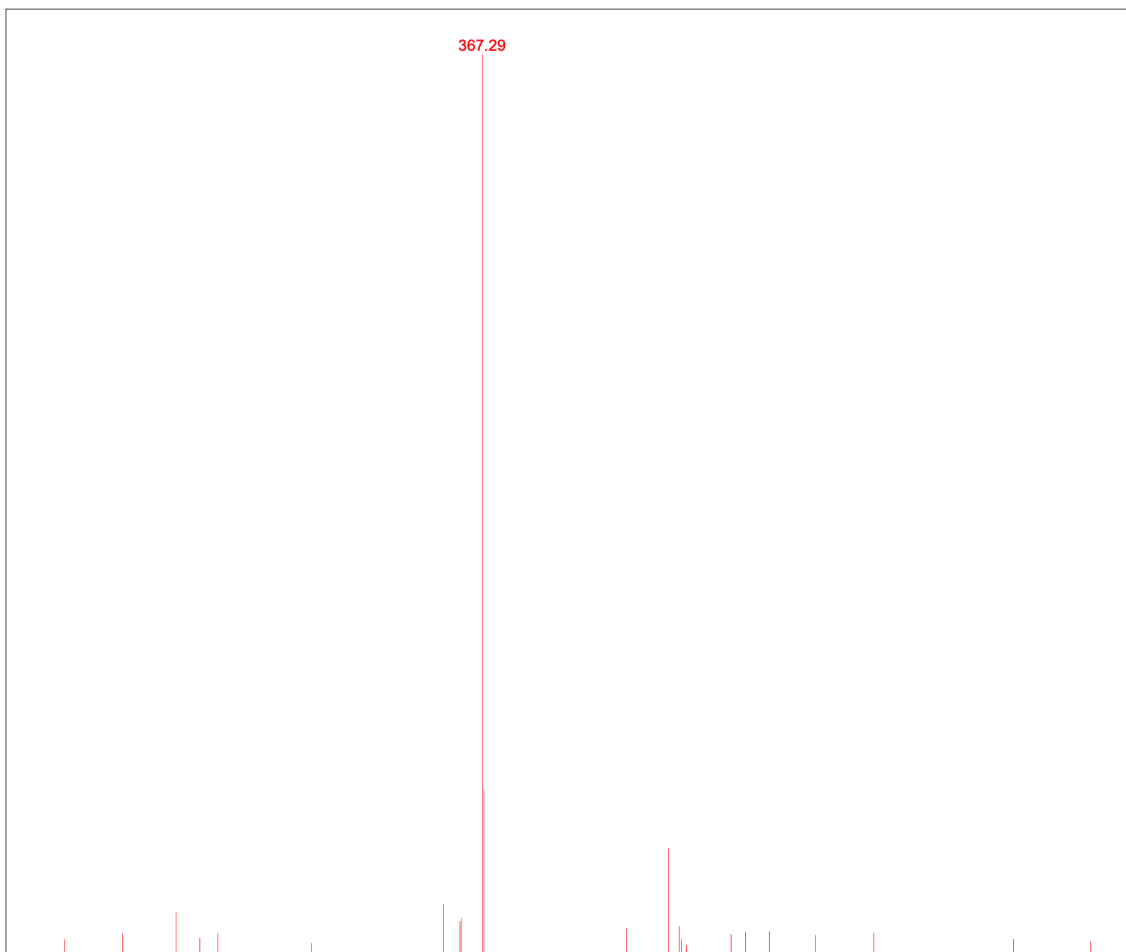


**Figura A9.** Espectro de masa del ácido feruloilquínico.

- Figuras A10 y A11. Espectro UV-vis y MS correspondiente al **ácido 4-feruloilquínico** identificado en los extractos de espárrago.

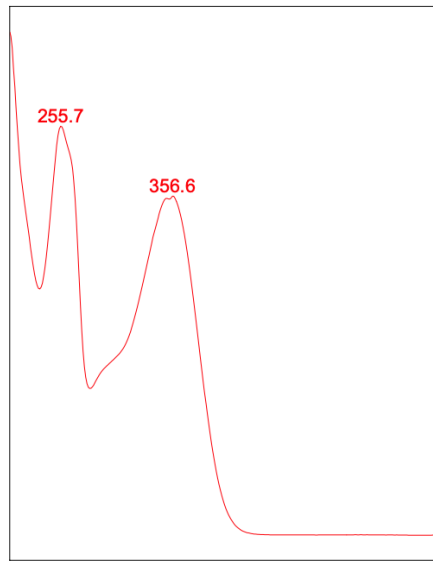


**Figura A10.** Espectro UV-Vis del derivado del ácido feruloilquínico.

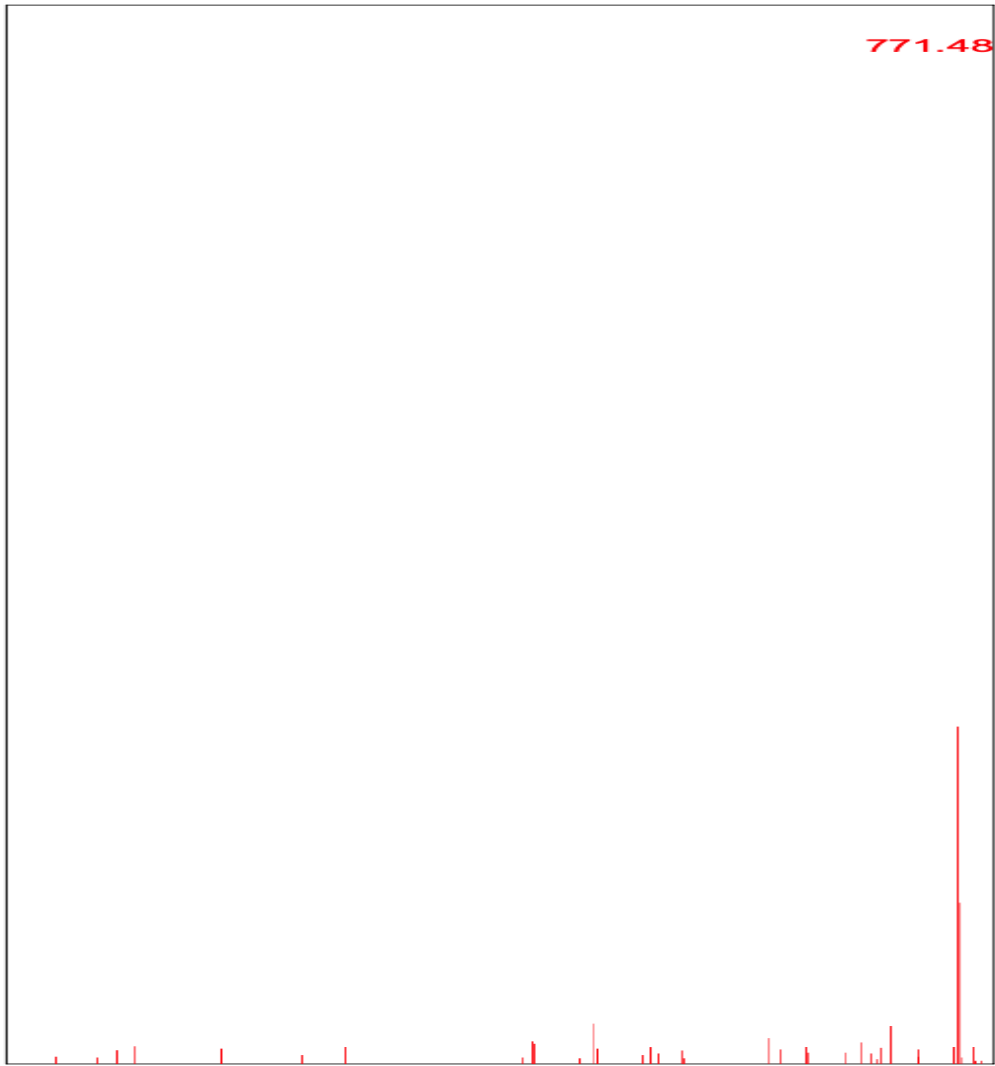


**Figura A11.** Espectro de masa del derivado del ácido feruloilquínico.

- Figura A12 y A13. Espectro UV-vis y MS correspondiente al **rutinósido** ( $m/z$  771) identificado en los extractos de espárrago.

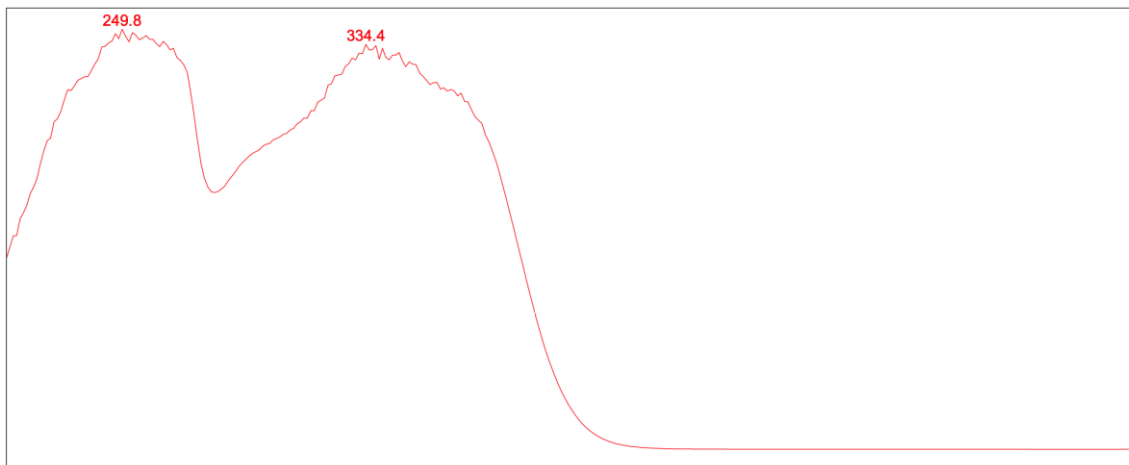


**Figura A12.** Espectro UV-Vis del rutinósido.



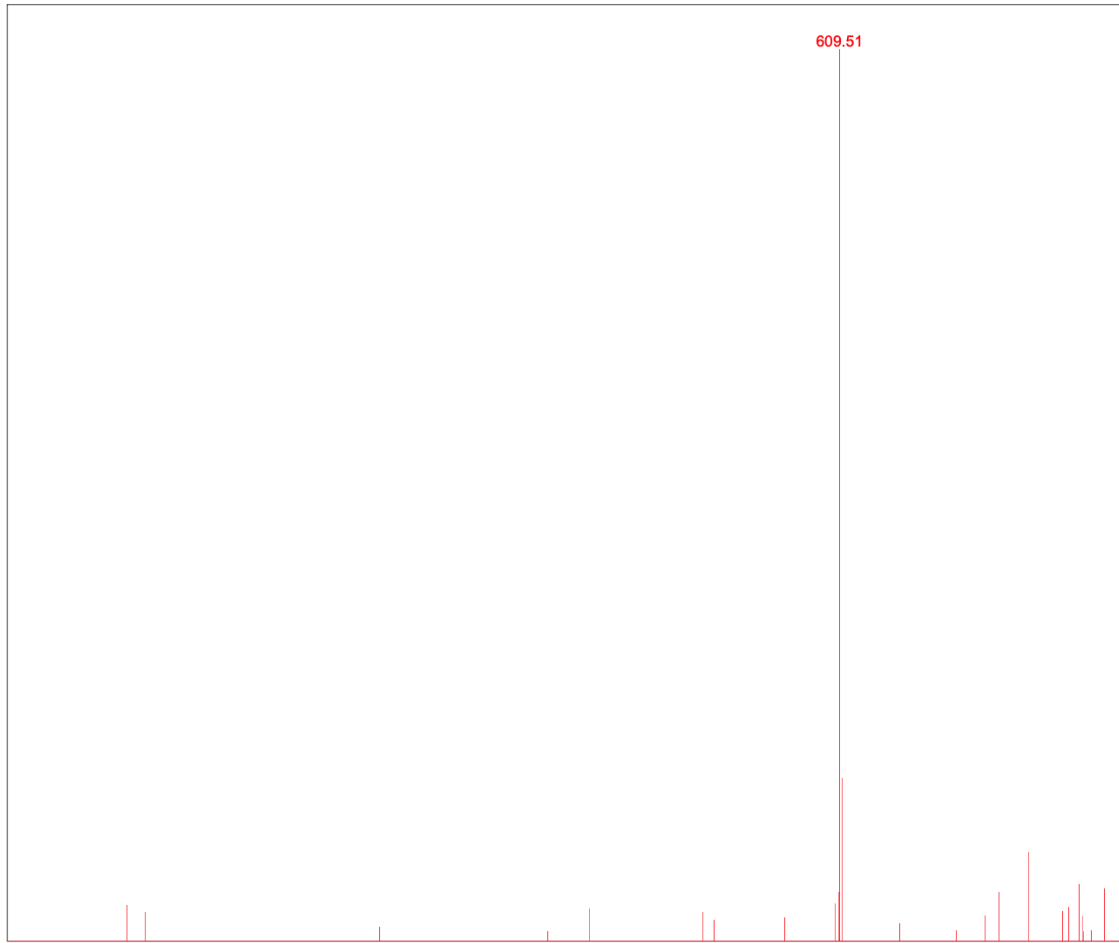
**Figura A13.** Espectro de masa del rutinósido.

- Figura A14 y A15. Espectro UV-vis y MS correspondiente a la **rutina** identificado en los extractos de espárrago.



**Figura A14.** Espectro UV-Vis de la rutina.





**Figura A15.** Espectro de masa de la rutina.

APÉNDICES IV**Tabla A2.** Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken con los valores de las variables dependientes.

#	% EtOH	Temperatura (°C)	Ratio (g muestra)	Ciclo (s <sup>-1</sup> )	Amplitud	Fenoles Totales (mg/g)	Actividad Antioxidante (mg/g)
1	62,5	40	0,5	0,6	50	7,45	4,48
2	25	40	0,5	0,2	50	6,55	4,68
3	62,5	40	0,25	0,6	70	9,03	9,42
4	25	40	0,5	1	50	6,03	3,96
5	62,5	40	0,25	0,2	50	9,05	9,44
6	100	40	0,5	1	50	2,82	2,59
7	62,5	70	0,5	1	50	8,76	4,81
8	25	70	0,5	0,6	50	6,34	4,71
9	100	40	0,75	0,6	50	2,54	2,33
10	62,5	40	0,5	0,6	50	8,12	4,59
11	62,5	40	0,25	1	50	9,40	9,39
12	62,5	40	0,5	0,6	50	7,47	4,40
13	62,5	70	0,25	0,6	50	9,56	9,82
14	25	40	0,5	0,6	30	3,11	2,26
15	62,5	40	0,75	0,2	50	6,56	3,11
16	62,5	10	0,5	1	50	7,75	4,62
17	100	40	0,25	0,6	50	3,63	1,75
18	62,5	10	0,5	0,6	30	7,39	4,52
19	62,5	10	0,5	0,2	50	8,13	4,64
20	62,5	40	0,5	1	70	7,75	4,73
21	62,5	70	0,5	0,6	30	8,92	4,81
22	62,5	40	0,5	0,6	50	7,82	4,56
23	25	40	0,25	0,6	50	6,41	8,73
24	62,5	10	0,75	0,6	50	6,33	3,08
25	62,5	40	0,5	0,2	70	7,42	4,38
26	100	10	0,5	0,6	50	2,07	1,87
27	25	40	0,5	0,6	70	6,28	4,49
28	62,5	40	0,5	0,6	50	7,54	4,76
29	62,5	10	0,25	0,6	50	8,64	9,35
30	25	40	0,75	0,6	50	5,17	3,12

31	62,5	40	0,5	1	30	7,79	4,77
32	62,5	40	0,75	1	50	6,57	3,15
33	62,5	40	0,75	0,6	70	6,38	3,09
34	62,5	70	0,5	0,6	70	8,30	4,91
35	62,5	10	0,5	0,6	70	7,10	4,31
36	25	10	0,5	0,6	50	2,31	2,82
37	100	70	0,5	0,6	50	2,67	4,50
38	62,5	40	0,5	0,6	50	6,81	3,66
39	100	40	0,5	0,6	30	1,87	1,80
40	62,5	40	0,5	0,2	30	6,71	4,62
41	100	40	0,5	0,6	70	3,28	3,50
42	62,5	70	0,5	0,2	50	8,08	4,98
43	62,5	40	0,25	0,6	30	2,13	9,88
44	100	40	0,5	0,2	50	2,87	4,01
45	62,5	40	0,75	0,6	30	7,87	3,31
46	62,5	70	0,75	0,6	50	7,28	3,31

APÉNDICES V**Tabla A3.** Parámetros que influyen de manera significativa en la concentración de fenoles totales, coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y *p*-valor.

Parámetro	Coefficiente Estimado	<i>p</i> -valor
<b>A:% EtOH</b>	0,337354	0,0001
<b>B:Temperatura</b>	0,0419375	0,0290
<b>C:Ratio</b>	19,4042	0,0478
<b>D:Ciclo</b>	-2,8651	0,7358
<b>E:Amplitud</b>	0,412958	0,0359
<b>AA</b>	-0,00254652	0,0000
<b>AB</b>	-0,000762222	0,1313
<b>AC</b>	0,004	0,9461
<b>AD</b>	0,00783333	0,8324
<b>AE</b>	-0,000586667	0,4309
<b>BB</b>	0,000250694	0,5497
<b>BC</b>	0,001	0,9892
<b>BD</b>	0,0220833	0,6339
<b>BE</b>	-0,0001375	0,8819
<b>CC</b>	-0,496667	0,9342
<b>CD</b>	-0,85	0,8783
<b>CE</b>	-0,4195	0,0008
<b>DD</b>	2,76953	0,2449
<b>DE</b>	-0,0234375	0,7358
<b>EE</b>	-0,0011651	0,2220

APÉNDICES VI**Tabla A4.** Parámetros que influyen de manera significativa en la concentración de la actividad antioxidante, coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y *p*-valor.

Parámetro	Coefficiente Estimado	<i>p</i> -valor
<b>A:% EtOH</b>	0,0298926	0,0090
<b>B:Temperatura</b>	-0,0208611	0,1427
<b>C:Ratio</b>	-46,135	0,0000
<b>D:Ciclo</b>	-2,38177	0,6785
<b>E:Amplitud</b>	-0,0148854	0,5204
<b>AA</b>	-0,000990963	0,0009
<b>AB</b>	0,000164444	0,7386
<b>AC</b>	0,165067	0,0092
<b>AD</b>	-0,0116667	0,7523
<b>AE</b>	-0,000176667	0,8110
<b>BB</b>	0,000297917	0,4768
<b>BC</b>	-0,008	0,9137
<b>BD</b>	-0,003125	0,9460
<b>BE</b>	0,000129167	0,8887
<b>CC</b>	24,5833	0,0003
<b>CD</b>	0,225	0,9676
<b>CE</b>	0,012	0,9137
<b>DD</b>	2,10286	0,3734
<b>DE</b>	0,00625	0,9281
<b>EE</b>	0,000199479	0,8316



## APÉNDICES VII

**Tabla A5.** Valores medios de la concentración de rutina en las muestras reales de espárragos estudiadas (mg/g de muestra seca,  $n = 2$ ), y valores del coeficiente de variación (%).

#	Parte y Color	Municipio	Rutina (mg/g)	Coefficiente de variación (%)
1	Yema Morado	Breñas de Barbate	8,39 ± 0,07	0,83
2	Medio Morado	Breñas de Barbate	6,87 ± 0,02	0,24
3	Tallo Morado	Breñas de Barbate	3,81 ± 0,13	3,41
4	Yema Verde	Breñas de Barbate	7,25 ± 0,10	1,37
5	Medio Verde	Breñas de Barbate	6,62 ± 0,16	2,43
6	Tallo Verde	Breñas de Barbate	4,65 ± 0,21	4,42
7	Entero Verde	Puerto Real	6,66 ± 0,09	1,37
8	Yema Morado	Puerto de Santa María	6,82 ± 0,12	1,76
9	Medio Morado	Puerto de Santa María	4,34 ± 0,25	5,68
10	Tallo Morado	Puerto de Santa María	1,89 ± 0,07	3,75
11	Yema Verde	Puerto de Santa María	5,38 ± 0,09	1,59
12	Medio Verde	Puerto de Santa María	3,18 ± 0,05	1,49
13	Tallo Verde	Puerto de Santa María	1,46 ± 0,09	5,86
14	Entero Verde	Puerto Real	3,30 ± 0,08	2,41
15	Entero Verde	Torrecedera	2,18 ± 0,05	2,29
16	Entero Morado	Arcos de la Fra.	2,92 ± 0,12	4,22
17	Yema Verde	Arcos de la Fra.	2,83 ± 0,48	16,96
18	Medio Verde	Arcos de la Fra.	2,35 ± 0,07	2,99
19	Tallo Verde	Arcos de la Fra.	1,24 ± 0,02	1,87
20	Entero Verde	Puerto de Santa María	3,04 ± 0,32	10,58
21	Yema Verde	Puerto Real	4,32 ± 0,02	0,42
22	Medio Verde	Puerto Real	2,33 ± 0,26	11,37
23	Tallo Verde	Puerto Real	2,32 ± 0,02	0,70
24	Yema Morado	Puerto Real	3,78 ± 0,21	5,65
25	Medio Morado	Puerto Real	3,87 ± 0,05	1,28
26	Tallo Morado	Puerto Real	2,66 ± 0,07	2,47
27	Yema Verde	Puerto Real	3,01 ± 0,43	14,37
28	Medio Verde	Puerto Real	2,90 ± 0,14	4,92
29	Tallo Verde	Puerto Real	2,16 ± 0,01	0,53

<b>30</b>	Entero Morado	Puerto Real	$2,65 \pm 0,05$	1,90
<b>31</b>	Verde Entero	Puerto Real	$1,62 \pm 0,10$	6,05



## APÉNDICES VIII

**Tabla A6.** Valores medio de los mg equivalentes de trolox por gramo DPPH y ABTS (mg/g) de las muestras reales estudiadas, con sus respectivos valores del coeficiente de variación (%).

#	Parte y Color	Municipio	DPPH (mg/g)	C. V. (%)	ABTS (mg/g)	C. V. (%)
1	Yema Morado	Breñas de Barbate	8,93 ± 0,11	1,21	26,6 ± 0,71	2,68
2	Medio Morado	Breñas de Barbate	9,06 ± 0,11	1,19	26,88 ± 0,27	0,99
3	Tallo Morado	Breñas de Barbate	8,78 ± 0,24	2,78	27,23 ± 1,14	4,19
4	Yema Verde	Breñas de Barbate	9,03 ± 0,01	0,05	26,69 ± 0,24	0,89
5	Medio Verde	Breñas de Barbate	8,77 ± 0,13	1,48	26,08 ± 0,01	0,04
6	Tallo Verde	Breñas de Barbate	8,98 ± 0,16	1,80	26,32 ± 0,50	1,89
7	Entero Verde	Puerto Real	8,96 ± 0,24	2,65	26,09 ± 0,26	0,99
8	Yema Morado	Puerto de Santa María	9,08 ± 0,03	0,34	26,70 ± 0,17	0,63
9	Medio Morado	Puerto de Santa María	9,05 ± 0,02	0,23	26,49 ± 0,25	0,95
10	Tallo Morado	Puerto de Santa María	6,96 ± 0,41	5,91	26,25 ± 0,29	1,10
11	Yema Verde	Puerto de Santa María	8,06 ± 0,04	0,50	26,69 ± 0,15	0,56
12	Medio Verde	Puerto de Santa María	7,41 ± 0,01	0,18	26,50 ± 0,42	1,60
13	Tallo Verde	Puerto de Santa María	6,60 ± 0,44	6,63	25,42 ± 1,31	5,14
14	Entero Verde	Puerto Real	8,86 ± 0,24	2,72	23,45 ± 0,05	0,22
15	Entero Verde	Torrecedera	8,75 ± 0,27	3,08	23,41 ± 0,72	3,08
16	Entero Morado	Arcos de la Fra.	9,01 ± 0,11	1,20	26,85 ± 0,27	1,00
17	Yema Verde	Arcos de la Fra.	8,63 ± 0,06	0,66	23,49 ± 0,79	3,36
18	Medio Verde	Arcos de la Fra.	8,34 ± 0,03	0,38	23,45 ± 0,34	1,45
19	Tallo Verde	Arcos de la Fra.	6,11 ± 0,04	0,61	22,78 ± 0,05	0,22
20	Entero Verde	Puerto de Santa María	8,98 ± 0,43	4,83	23,24 ± 0,15	0,66
21	Yema Verde	Puerto Real	8,92 ± 0,12	1,31	24,89 ± 0,22	0,87





22	Medio Verde	Puerto Real	8,45 ± 0,05	0,55	22,80 ± 0,26	1,12
23	Tallo Verde	Puerto Real	7,74 ± 0,11	1,40	22,72 ± 0,26	1,16
24	Yema Morado	Puerto Real	9,22 ± 0,14	1,49	23,39 ± 0,16	0,67
25	Medio Morado	Puerto Real	9,04 ± 0,11	1,16	23,24 ± 1,05	4,51
26	Tallo Morado	Puerto Real	8,58 ± 0,16	1,90	23,58 ± 0,45	1,89
27	Yema Verde	Puerto Real	8,69 ± 0,80	9,25	27,80 ± 2,41	8,66
28	Medio Verde	Puerto Real	7,99 ± 0,07	0,82	25,49 ± 0,04	0,16
29	Tallo Verde	Puerto Real	5,34 ± 0,22	4,10	25,67 ± 0,08	0,30
30	Entero Morado	Puerto Real	8,06 ± 0,05	0,62	23,52 ± 1,35	5,75
31	Verde Entero	Puerto Real	7,22 ± 0,07	1,02	23,49 ± 0,06	0,27

**Tabla A7.** Valores medio del porcentaje de inhibición obtenido en los ensayos DPPH y ABTS (%), con los valores del coeficiente de variación (%).

#	Parte y Color	Municipio	DPPH (% inh.)	C. V. (%)	ABTS (% inh.)	C. V. (%)
1	Yema Morado	Breñas de Barbate	81,82 ± 0,11	0,13	84,86 ± 0,71	0,84
2	Medio Morado	Breñas de Barbate	82,39 ± 0,11	0,13	85,23 ± 0,27	0,31
3	Tallo Morado	Breñas de Barbate	80,93 ± 0,24	0,30	87,12 ± 1,14	1,31
4	Yema Verde	Breñas de Barbate	83,17 ± 0,01	0,01	85,88 ± 0,24	0,28
5	Medio Verde	Breñas de Barbate	81,18 ± 0,13	0,16	83,86 ± 0,01	0,01
6	Tallo Verde	Breñas de Barbate	82,58 ± 0,16	0,20	84,41 ± 0,50	0,59
7	Entero Verde	Puerto Real	82,75 ± 0,24	0,29	84,08 ± 0,26	0,31
8	Yema Morado	Puerto de Santa María	81,48 ± 0,03	0,04	84,98 ± 0,17	0,20
9	Medio Morado	Puerto de Santa María	82,73 ± 0,02	0,03	85,53 ± 0,25	0,29
10	Tallo Morado	Puerto de Santa María	67,06 ± 0,41	0,61	84,76 ± 0,29	0,34
11	Yema Verde	Puerto de Santa María	76,06 ± 0,04	0,05	85,04 ± 0,15	0,17



12	Medio Verde	Puerto de Santa María	70,90 ± 0,01	0,02	85,59 ± 0,42	0,49
13	Tallo Verde	Puerto de Santa María	65,17 ± 0,44	0,67	81,94 ± 1,31	1,60
14	Entero Verde	Puerto Real	81,03 ± 0,24	0,30	74,38 ± 0,05	0,07
15	Entero Verde	Torrecedera	80,93 ± 0,27	0,33	75,04 ± 0,72	0,96
16	Entero Morado	Arcos de la Fra.	82,42 ± 0,11	0,13	85,60 ± 0,27	0,31
17	Yema Verde	Arcos de la Fra.	80,15 ± 0,06	0,07	75,40 ± 0,79	1,05
18	Medio Verde	Arcos de la Fra.	77,10 ± 0,03	0,04	74,26 ± 0,34	0,46
19	Tallo Verde	Arcos de la Fra.	61,32 ± 0,04	0,06	73,25 ± 0,05	0,07
20	Entero Verde	Puerto de Santa María	83,00 ± 0,43	0,52	74,96 ± 0,15	0,21
21	Yema Verde	Puerto Real	83,11 ± 0,12	0,14	80,96 ± 0,22	0,27
22	Medio Verde	Puerto Real	78,22 ± 0,05	0,06	73,49 ± 0,26	0,35
23	Tallo Verde	Puerto Real	73,80 ± 0,11	0,15	73,42 ± 0,26	0,36
24	Yema Morado	Puerto Real	83,52 ± 0,14	0,16	74,77 ± 0,16	0,21
25	Medio Morado	Puerto Real	83,49 ± 0,11	0,13	74,54 ± 1,05	1,41
26	Tallo Morado	Puerto Real	64,29 ± 0,16	0,25	75,04 ± 0,45	0,59
27	Yema Verde	Puerto Real	79,42 ± 0,80	1,01	88,02 ± 2,41	2,74
28	Medio Verde	Puerto Real	75,15 ± 0,07	0,09	81,75 ± 0,04	0,05
29	Tallo Verde	Puerto Real	55,28 ± 0,22	0,40	82,24 ± 0,08	0,09
30	Entero Morado	Puerto Real	76,39 ± 0,05	0,07	76,19 ± 1,35	1,78
31	Verde Entero	Puerto Real	69,62 ± 0,07	0,11	75,49 ± 0,06	0,08

APÉNDICES IX

**DECLARACIÓN PERSONAL DE NO PLAGIO**

D. Diego Alavarsa Cascales, con N.I.E.: Y6682262V, estudiante del Máster en Agroalimentación en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, curso 2023-2024, como autor de este documento académico, titulado:

***“Desarrollo y optimización de técnicas de extracción y análisis de compuestos con actividad biológica en espárragos (*Asparagus officinalis* L.)”.***

y presentado como Trabajo de Fin de Máster, para la obtención del Título correspondiente,

DECLARO QUE:

es fruto de mi trabajo personal, que no copio, que no utilizo ideas, formulaciones, citas integrales o ilustraciones diversas, extraídas de cualquier obra, artículo, memoria, etc. (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía.

Así mismo, que soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden legal.

En Cádiz, a 5 de diciembre de 2023.

Fdo.: Diego Alavarsa Cascales