



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

**INFLUENCIA DE LA RECOLECCIÓN DEL
ESPARRAGO EN SU PERFIL FITOQUÍMICO Y
FARMACOLÓGICO**

JOSÉ ANTONIO GARCÍA MÁRQUEZ



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
TRABAJO FIN DE GRADO - GRADO EN FARMACIA.
PROYECTO DE CARÁCTER EXPERIMENTAL:

INFLUENCIA DE LA RECOLECCIÓN DEL
ESPARRAGO EN SU PERFIL FITOQUÍMICO Y
FARMACOLÓGICO

Autor: José Antonio García Márquez

Tutores:

- **María Dolores García Gimenez** (Departamento de Farmacología)
- **Pedro Cermeño Sacristán** (Centro IFAPA "Las Torres-Tomejil", Departamento de Horticultura)

Área: Farmacología

Fecha: 19 de Septiembre (10:00 AM)

Lugar: Aula 0.4

- **RESUMEN**

El objeto de nuestro proyecto ha sido un estudio sobre los espárragos pertenecientes a la especie *Asparagus officinalis* var. 'grande', que forma parte de la familia Asparagaceae.

Los espárragos se recolectan naturalmente en nuestra zona geográfica entre marzo y abril, pudiendo ampliarse a mayo en función de las condiciones climatológicas y edafológicas de cada año.

En el centro I.F.A.P.A. (Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía) "Las Torres-Tomejil" situado en Alcalá del Río, Sevilla, se ha desarrollado un método de recolección cuyo propósito es prolongar la época natural de recolección, con el objetivo de comercializar y consumir espárragos frescos durante más tiempo sin tener que recurrir a la congelación. Dicho método de recolección se realizó en los años 2009 y 2012, y con él se ha demostrado que, efectivamente, es posible seguir recolectando espárragos de manera natural durante algunos meses más, pudiendo mantener la recolección concretamente hasta el mes de Octubre en el caso del año 2012. Lo que queremos comprobar con este trabajo es si estos espárragos recolectados varios meses después de su fecha de recolección natural tienen unas propiedades y calidad comparables a los recogidos en su época supuestamente óptima. Para ello mediremos la humedad y las proteínas totales presentes en cada una de las 1383 muestras de espárragos, 550 recolectadas en 2009 y 833 en 2012, teniendo en cuenta su fecha de recolección y su proximidad al río Guadalquivir para diferenciar las muestras.

Por otra parte, se ha comparado la cantidad de fenoles presentes en muestras frescas y en muestras descongeladas, para comprobar si el espárrago pierde o no parte de este componente que otorga al alimento la capacidad antioxidante tan característica de este alimento, y con ello comprobaremos si un método de conservación como la congelación es eficiente para mantener las propiedades del espárrago.

PALABRAS CLAVE: Espárragos, recolección, Fenoles, Humedad, Proteínas

•	<u>ÍNDICE</u>	<u>Página</u>
I.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	7
	I.1 Origen	9
	I.2 Importancia económica y distribución geográfica	10
	I.3 Descripción botánica	11
	I.4 Composición química y actividad farmacológica	13
II.	<u>OBJETIVOS</u>	16
III.	<u>MATERIALES UTILIZADOS</u>	
	III.1 Material vegetal	17
	III.2 Materiales para los análisis	
	III.2.1 Humedad	17
	III.2.2 Proteínas totales	17
	III.2.3 Fenoles	18
IV.	<u>METODOLOGÍA</u>	
	IV.1 Humedad	18
	IV.2 Proteínas totales: Método Kjeldahl	19
	IV.3 Determinación de fenoles: método de Folin-Ciocalteu	21
V.	<u>RESULTADOS</u>	24
VI.	<u>DISCUSIÓN</u>	33
VII.	<u>CONCLUSIONES</u>	35
VIII.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	36

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del espárrago consta de tres fases: fase vegetativa, fase de producción (o recolección) y fase de parada invernal.

En la fase vegetativa, la planta se va desarrollando, sus tallos van creciendo y la planta realiza la fotosíntesis de modo natural.

En la fase de producción, que suele durar unos tres meses como máximo (marzo, abril y mayo), la planta se recolecta al completo, interrumpiendo así su fase vegetativa. Se recolectarán todos los turiones de más de 23 cm de longitud.

En la fase de parada invernal (diciembre, enero y febrero) se siega completamente la parte aérea de la planta, dejando así sólo la parte subterránea para que se desarrolle de nuevo cuando la temperatura ambiental se lo permita.

El centro IFAPA "LAS Torres - Tomejil" desarrolló en 2009 un método de recolección de espárragos que volvió a poner en práctica en el año 2012, en el que se combinaban las fases vegetativa y de producción (Figura 1).

Para ello se separó la plantación en cuatro bloques, y en cada bloque se realizaron cuatro tratamientos diferenciales dispuestos al azar, compuesto cada uno de ellos por tres parcelas dentro de cada bloque. Tenemos así doce parcelas en cada bloque, cada una de ellas con varias plantas.

Lo que llamamos "tratamiento diferencial" no es otra cosa que especificar a la hora de recolectar cada parcela cuántos de los tallos madre que haya en cada planta de esa parcela deben dejarse sin recolectar. Esto quiere decir que la planta no se recolecta al completo, pudiendo volver a desarrollarse nuevos turiones gracias a esos tallos madre que se han dejado tras la siega.

Cabe destacar que absolutamente todas las plantas pertenecían a la misma especie, *Asparagus officinalis* L. var. 'grande', (familia Asparagaceae), y que todas las plantas fueron abonadas y regadas del mismo modo para que el único tratamiento diferencial se diese en la fase de recolección.

Entrando en detalles, se dejaron concretamente cero, uno, tres y cinco tallos madre según se hubiera definido cada bloque aleatoriamente.

Como era de esperar, en el primer tratamiento, en el que se recolecta absolutamente toda la planta, no se prolongaba el tiempo de recolección, terminando

la producción de espárragos frescos en la primera quincena de Mayo, tanto en 2009 como en 2012.

En el caso de las plantas a las que se dejaba con un tallo madre, siguieron proporcionando turiones frescos hasta Junio tanto en 2009 como en 2012 ya que seguía en plena fase vegetativa en algunos casos.

En los casos en los que se dejaron tres tallos madre, la recolección se pudo realizar hasta Julio en 2009 pero se optimizó en 2012, llegándose a producir turiones en algunos casos aislados hasta el mes de Octubre.

Dejando cinco tallos madre también se alcanzó el mes de Octubre en numerosas plantas, demostrando que el método era muy eficaz para duplicar fácilmente la producción, lo que evitaría a los consumidores tener que adquirir el producto procedente de otros países, con el aumento de precio y la disminución de calidad que ello conlleva. Se comprobó además que las propiedades organolépticas de los turiones eran mejores, ya que estaban más sombreados y menos lignificados, por tanto su sabor también era más preciado. Sin embargo podrían plantearse algunas preguntas sobre el método. ¿Conservarían sus propiedades estos espárragos recolectados hasta cinco meses más tarde de su fecha natural?

Esa es la pregunta que se ha intentado resolver con este proyecto, no sin antes hablar sobre la planta que nos atañe, la esparraguera.



Figura 1: Centro IFAPA "Las Torres – Tomejil". (www.dronevisión.es)

I.1 Origen

Los primeros vestigios de espárragos aparecieron en forma de pinturas en los monumentos egipcios (3.000 a.C.), eran dibujados atados en manojos en dos o tres ligaduras (Figura 2); en este caso parecían ser utilizados como ofrenda a los dioses (Espejo y cols, 2000). Fue una hortaliza apreciada por los griegos, pero serían los romanos quienes introdujeran este cultivo en Europa septentrional. Tras las invasiones bárbaras, su cultivo solo se conservó en España hasta el final de la Edad Media, en que volvieron a cultivarse en el norte y centro de Europa. Las actuales variedades parece ser que tienen su procedencia en selecciones llevadas a cabo en Holanda en el siglo XVIII.



Figura 2: Manejo tradicional de espárragos

I.2 Importancia económica y distribución geográfica

La producción de espárragos a nivel mundial se ha constituido durante los últimos años, en una actividad con un creciente auge especialmente en las importaciones, por ser un producto con un nivel preferencial en el mercado internacional que le permite obtener elevados beneficios, dado el incremento de su consumo y la variedad de preparaciones, así como por sus propiedades organolépticas y su actividad biológica.

El principal país productor de espárragos es China con aproximadamente el 89% de la producción mundial, la cual está mayormente dedicada al consumo interno (Figura 3). Le sigue Perú con una participación equivalente al 3-4% de la producción mundial, estando en continuo aumento, debido a que las condiciones climáticas le permiten producir durante todo el año.

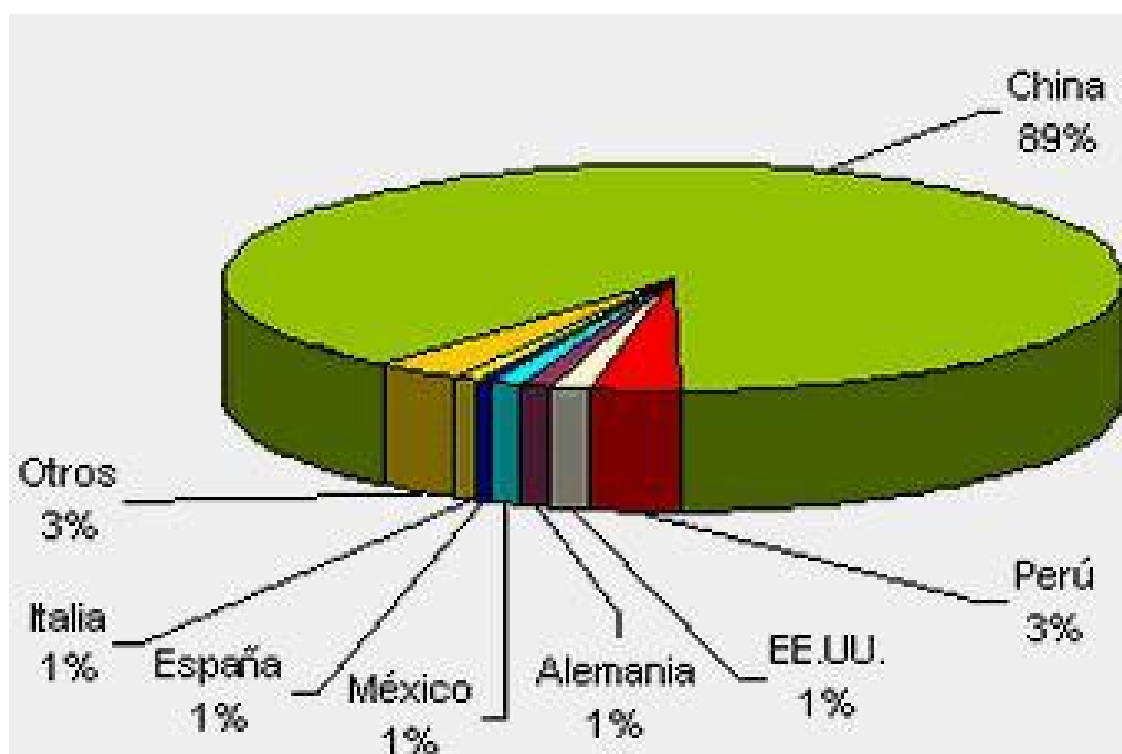


Figura 3: gráfico comparativo del porcentaje de producción total de espárragos a nivel mundial de los principales países con respecto a la producción total.

Estados Unidos y Alemania no se quedan lejos, y España suele rondar cada año sobre la 5ª posición como productora de espárragos, aun muy lejos de las cantidades producidas por China (del orden de las 50.000 toneladas al año frente a los 6-7 millones de toneladas al año producidas por China en los últimos años).

Dentro de nuestro país, Andalucía es la responsable de más del 50% de la producción. Las previsiones apuntan a que España debe convertirse en uno de los principales abastecedores de espárrago verde en el mercado europeo en los próximos años (Benson, 2008; Behr, 2006; Pierron-Darbonne, 2006).

I.3 Descripción Botánica

El espárrago objeto de estudio pertenece a la especie *Asparagus officinalis* L. var. `grande`. Es una planta de la familia de las Asparagáceas y su parte comestible son los tallos jóvenes, carnosos y tiernos, llamados turiones. Es una planta perenne pero su fase de aprovechamiento comercial se ve limitada entre los 10 y 15 años como mucho.

La planta está formada por tallos aéreos ramificados, y su parte subterránea está constituida por raíces y yemas, a lo que coloquialmente se le llama zarpa (Figura 4).



Figura 4: parte aérea de la planta conocida como esparaguera.

Con un sistema radical muy potente, las raíces principales son cilíndricas, carnosas y gruesas, y pueden acumular reservas para favorecer el desarrollo de nuevos

turiones. De éstas salen unas raicillas, encargadas de absorber el agua y las sales minerales.

El tallo está formado por un disco sobre el que se forman las yemas q originarán a los turiones.

Es una planta dioica, pudiendo verse plantas con flores masculinas, plantas con flores femeninas y otras plantas con flores de ambos sexos. Las plantas masculinas son más productivas en turiones, ya que a diferencia de las femeninas, no utilizan sus reservas en la formación de frutos y semillas, sino que las acumulan en las raíces para producir turiones. Además son más precoces y longevas (Benages, 1990).

Los frutos son bayas rojas en su maduración de hasta 6 mm, con 5 ó 6 semillas negras (Figura 5).



Figura 5: Bayas maduras de la esparraguera.

Para el cultivo en nuestro caso se utilizó el método de trasplante de garras, que son obtenidas en semilleros. Se recomienda que las garras pesen unos 60 g, siendo conveniente desechar aquellas cuyo peso es inferior a los 20 g. También es importante tener en cuenta la orientación de la garra al introducirla en el suelo, ya que el crecimiento aéreo de la planta podría retrasarse.

Al año de realizar la plantación con garra en climas cálidos se obtiene la primera recolección; siendo recomendada esta forma de plantación para cultivo forzado en invernadero (Figura 6).



Figura 6: Turiones emergentes tras el cultivo del espárrago.

1.4 Composición química y actividad farmacológica

El espárrago es una hortaliza muy apreciada por sus propiedades organolépticas y nutricionales, pero además se puede considerar un alimento de gran calidad funcional, al contener diversos fitoquímicos con una evidente actividad biológica (Bast, 2005). Entre éstos debemos destacar los fenoles, además de las saponinas, esteroides, fructanos y polisacáridos de la pared celular.

Muchos estudios (Yu y cols., 1996; Kamat y cols., 2000; Wiboonpun y cols., 2004) demuestran que los extractos poseen diversas actividades biológicas, destacando entre el resto su capacidad antioxidante y su actividad antitumoral, así como la capacidad de influir en el metabolismo lipídico para ayudar a disminuir los niveles de colesterol en el organismo (García y cols, 2012; Vázquez-Castilla y cols, 2013). Ya en la antigüedad se usaban sus extractos como tónico, laxante, diurético o antitusivo, por tanto los estudios recientes sólo demuestran lo que ya podían intuir aquellos que los utilizaban hace siglos.

Existen dos tipos de espárragos comercializados, los blancos y los verdes, y su diferencia de color únicamente se debe a que los blancos aun no han sido expuestos al sol y por tanto no realizan la fotosíntesis, mientras que los verdes ya forman parte de la parte aérea de la planta y están expuestos al sol. Se ha demostrado que existen unas diferencias notables en la composición nutricional del espárrago según sea blanco o verde, siendo este último el más rico en nutrientes generalmente, excepto en el caso de las proteínas y azúcares, donde es mayor la cantidad que presenta el blanco normalmente (Amaro, 1993).

Debido al estudio al que nos vamos a referir, nos centraremos especialmente en tres de sus componentes: el agua, las proteínas totales y los fenoles.

Análisis realizados por el Consejo Regulador de la Denominación Específica “espárrago de Huétor-Tájar” en el laboratorio del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva en Molina de Segura (Murcia) indican que hay ligeras diferencias en el porcentaje de agua entre los distintos espárragos en función de su variedad, pudiendo contener nuestra variedad una humedad del 92-93%, frente al 91-92% de humedad que presenta la variedad Huétor-Tájar (Espejo y cols., 2000).

El aporte medio de macronutrientes por 100 g de espárrago verde es de 2 a 4 g de proteínas, de 3 a 4,5 g de hidratos de carbono, y en cuanto a lípidos, los niveles son de trazas. Cuentan con una importante presencia de minerales como potasio, fósforo, calcio y magnesio, y un alto contenido en Vitaminas B1, B2, B3, C, A y E (Amaro y cols., 1995; Amaro y cols., 1999)

En cuanto a las proteínas, hoy día aun se sigue discutiendo sobre si las proteínas resistentes deben considerarse como parte de la fibra. Todas las paredes celulares en desarrollo contienen glicoproteínas, con un 67% de carbohidratos como máximo. Las más conocidas son las extensinas, que aparecen glicosiladas con cadenas de arabinosa y son ricas en el aminoácido hidroxiprolina, conteniendo también lisina, tirosina, valina y serina (showalter, 1993). Están distribuidas de manera uniforme en la pared y pueden formar entramados celulares a través de enlaces con otros polímeros de la misma. Otro tipo de glicoproteínas son las arabino-galactana-proteínas, ricas en hidroxiprolina, serina, alanina y glicina (Fincher y cols., 1983).

Los espárragos son ricos en asparagina, un aminoácido no esencial para el ser humano que recibe su nombre gracias a que la planta es rica en dicho aminoácido. La asparagina fue aislada por primera vez en 1805 por el químico francés Pierre Robiquet, quien la analizó en 1806 junto con Louis-Nicolas Vauquelin, a partir del jugo del espárrago, en el que abunda, convirtiéndose en el primer aminoácido en ser aislado.

Entre los compuestos responsables de la actividad biológica del espárrago cabe destacar a los compuestos fenólicos, como ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, además de otros compuestos como terpenoides (saponinas, esteroides), carbohidratos (inulina), fructo-oligosacáridos y los polisacáridos insolubles de la llamada fibra alimentaria. Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de

sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos (Martínez y cols., 2002). Los factores genéticos y medioambientales influyen considerablemente en el contenido fenólico y en la capacidad antioxidante de los turiones, de modo que se ha visto que los espárragos trigueros autóctonos de Huétortájar (Granada) poseen mayor capacidad antioxidante y son más ricos en fenoles que los híbridos americanos cultivados en la misma zona. (Rodríguez y cols., 2005).

Los principales fenoles del espárrago blanco son los derivados de los ácidos hidroxicinámicos, mientras que en el verde predominan los flavonoides, concretamente los glicósidos de flavonoles (guillén y cols., 2008; Narayama y cols., 2001).

Existen numerosos trabajos sobre el papel de los flavonoides en la prevención de diversas enfermedades, basados en la alta capacidad antioxidante que presentan estos compuestos (Harborne y Williams, 2000; Nijveldt y cols, 2001; Fukumoto y Mazza, 2000).

Durante algún tiempo se pensó que la cantidad absorbida de flavonoides era despreciable, pero desde hace unos años se ha comprobado que no es así (Hollman y Katan, 1998; Spencer, 1999; Rechner y cols., 2002; Ross y Kasum, 2002). Los derivados de la quercetina han sido los más estudiados hasta el momento y se ha visto que son ampliamente metabolizados en nuestro organismo (Hollman, 2004) y que algunos de sus metabolitos podrían jugar un papel destacado en la prevención de enfermedades relacionadas con procesos oxidativos, tales como enfermedades cardiovasculares y tumorales (Manach y cols., 1998).

Los flavonoides han mostrado un efecto protector *in vitro* frente a distintos tipos de cáncer (colon, glándula mamaria, etc.), y por su capacidad antioxidante y captadora de radicales libres poseen propiedades quimiopreventivas en distintos tipos de cáncer, como se ha comprobado en algunos estudios (Colic y Pavelic, 2000; Moon y cols, 2006). En otros experimentos *in vitro* se ha demostrado el papel protector de la quercetina, provocando la inhibición de las células cancerígenas en humanos, sobre todo en colon, glándula mamaria, ovario, región gastrointestinal y en la leucemia (Martínez-Flores y cols., 2002).

II. OBJETIVOS

Este estudio consta de tres objetivos:

- El principal objetivo es comprobar la viabilidad de este método, con el que prolongamos la recolección hasta cinco meses más de lo habitual, manteniendo la calidad organoléptica en la especie vegetal.
- Por otra parte también comprobaremos si existen diferencias en el porcentaje de agua y proteínas totales que posee cada muestra en función a su proximidad o lejanía al río.
- El último objetivo pretende demostrar la diferencia entre muestras recién recolectadas y muestras de la misma planta que habían permanecido congeladas a una temperatura de -40°C .

III. MATERIALES UTILIZADOS

III.1 Material Vegetal

Las 1383 muestras analizadas eran turiones de *Asparagus officinalis* var. 'grande', que pertenece a la familia Asparagaceae, cultivados en la vega del Guadalquivir dentro del centro IFAPA "LAS TORRES – Tomejil" en una zona cercana a la orilla, y recolectadas a lo largo de dos periodos separados en el tiempo, comprendidos entre Abril y Julio de 2009 y entre Marzo y Octubre de 2012.

III.2 Materiales y reactivos para los análisis

- **III.2.1 determinación de humedad**
 - Balanza de precisión (0.0001 g)
 - Estufa 70°C
 - Sobres

- **III.2.2 Determinación de Proteínas totales**
 - Ácido sulfúrico puro con dosificador
 - Agua destilada
 - Autoanalizador
 - Balanza de precisión (0.0001 g)
 - Catalizador de Kjeldahl
 - Cuchara con espátula
 - Estufa 70°C
 - Frascos de 50 ml con tapón de rosca
 - Papel fino para empaquetar las muestras (libre de Nitrógeno)
 - Sobres para cada muestra individual
 - Tubos digestores específicos para nuestro aparato
 - Vaso de precipitados
 - Viales de 10 ml con tapón

- **III.2.3 Determinación de fenoles**
 - Ácido gálico
 - Agua destilada
 - Carbonato de sodio
 - Espectrofotómetro
 - Reactivo de Folin Ciocalteu
 - Vórtex

IV. METODOLOGÍA

En todos los casos se utilizaron procedimientos oficiales de análisis de la AOAC International, reconocidos mundialmente como los óptimos para dichas determinaciones.

IV.1 Determinación de humedad

El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa que experimenta la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire.

Todas las muestras se analizaron por triplicado. El procedimiento consiste en introducir una muestra en un sobre y anotar el peso (previamente se deberá haber anotado el peso del sobre vacío). Introducir en la estufa de aire a 70°C al menos 48 horas para conseguir peso constante. Una vez comprobado que el peso es constante anotamos el nuevo valor.

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Donde:

m1: masa del sobre vacío, en gramos.

m2: masa del sobre con la muestra antes del secado, en gramos.

m3: masa del sobre más la muestra desecada, en gramos.

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

La diferencia de los resultados no debe ser superior al 5% del Promedio para considerarlos válidos. (AOAC International, 1990)

IV.2 Determinación de proteínas totales por el Método Kjeldahl

El contenido proteínico de los alimentos puede determinarse por medio de diversos métodos. La forma más habitual es su cuantificación de forma indirecta y aproximada, bien a partir del contenido en nitrógeno de la muestra, o bien deduciendo su cantidad a partir del contenido de uno o dos aminoácidos particulares que conforman la proteína, fáciles de identificar y de cuantificar por su reactividad química específica. En el caso que nos ocupa, el aminoácido principal es la Asparagina. Este segundo procedimiento conlleva una mayor inexactitud.

Desde hace más de 100 años se está utilizando el método Kjeldahl para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras (alimentos y bebidas, piensos, forrajes, fertilizantes) para el cálculo del contenido en proteína.

También se utiliza el método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno en aguas residuales y suelos. Es un método oficial descrito en múltiples normativas: AOAC, USEPA, ISO, farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias.

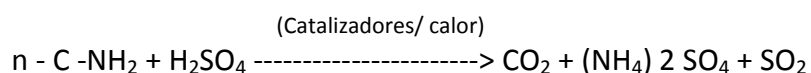
La convención general, sobreentendida, es que la totalidad del nitrógeno de la muestra está en forma proteica, aún cuando la realidad es que, según la naturaleza del producto, una fracción considerable del nitrógeno procede de otros compuestos nitrogenados (bases púricas y pirimidínicas, creatina y creatinina, urea, amoníaco, etc.), por ello se denomina “proteína bruta” o “proteína total” a la obtenida por este método (García-Martínez y Fernández-Segovia, 2013).

El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizando, en nuestro caso, los turiones de la variedad ‘grande’ de la especie *Asparagus officinalis*, cuyo factor de conversión es de 6,25 (Nielsen, 2003).

Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre un

exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón o sobre una disolución de ácido bórico. Ello condicionará la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados. En nuestro caso se empleó el ácido sulfúrico en exceso.

(a) Etapa de digestión: un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ión amonio, según la siguiente ecuación:



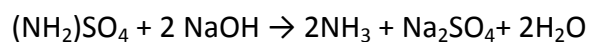
Procedimiento: Se introduce 1 g de muestra previamente desecada durante al menos 48 horas y homogeneizada en un tubo de mineralización. Dicha muestra se introduce empaquetada en un papel fino libre de nitrógeno.

Se añaden 3 g de catalizador, que suele estar constituido por una mezcla de sales de cobre, óxido de titanio o/y óxido de selenio. De forma habitual se utiliza como catalizador una mezcla de K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se (10:1:0,1 en peso). Después se adicionan 7 ml de H_2SO_4 concentrado. Posteriormente se digiere a 370 °C durante un mínimo de 5 horas. Se sabe que la digestión ha terminado porque la disolución adquiere un color amarillento-verdoso característico (AOAC Internacional, 2000).

La cantidad de H_2SO_4 concentrado añadida se fue optimizando en función a la actuación de los tubos durante la digestión, ya que en un principio se producían proyecciones de la muestra hacia la parte alta del tubo, dificultando el trabajo posterior y pudiendo provocar pérdidas, empezando con el procedimiento añadiendo 10 ml hasta dar con la cantidad adecuada, 7 ml.

El nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico en caliente. Este proceso se realizó en un digestor Gerhardt Kjeldatherm Block Digestion, con capacidad para 40 tubos de 100 ml sin estrangulamiento, específicos para nuestro modelo del digestor.

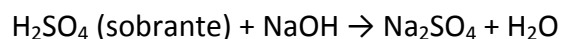
(b) Etapa de destilación: se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoniaco:



El amoniaco destilado se recoge sobre un exceso conocido de ácido sulfúrico:



(c) Etapa de valoración: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base usando como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Se valora el ácido sulfúrico o clorhídrico sobrante con una disolución de hidróxido sódico valorada (Skoog y West, 1989).



Si bien, en el laboratorio disponíamos de un autoanalizador calibrado para el nitrógeno que realizaba las etapas (b) y (c) facilitando y economizando por tanto el trabajo, ya que sólo requería una disolución del líquido obtenido tras la digestión aforando a 50 ml con agua destilada.

IV.3 Determinación de Fenoles Totales por el método Folin-Ciocalteu

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu, que fue el que utilizamos para el presente trabajo.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH

básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiito, 1985)

Se pesaron 10 g del material seco y pulverizado de cada planta, se pusieron a macerar en metanol acuoso al 80% en un frasco ámbar a temperatura ambiente durante 24 h agitándolo de vez en cuando, enseguida se filtró y el residuo de esta filtración se extrajo dos veces más de la misma manera. A continuación se reunieron los extractos y se evaporó la mayor parte del disolvente sin calentar más allá de 40 °C. El producto de la evaporación completamente seco se pesó y se guardó en refrigeración hasta su uso para los siguientes análisis.

Los fenoles totales se determinan mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando el ácido gálico como material de referencia.

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, se colocaron en un matraz aforado de 25 ml y se llevaron a volumen con agua destilada, enseguida se preparó una dilución 1:10 con agua destilada (siempre se utiliza una solución recién preparada).

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20 % pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, inicialmente se disolvió en 15 ml de agua grado HPLC y se llevó hasta su completa disolución, finalmente se llevó a su volumen de aforo con agua.

Por otro lado se preparó una disolución 1N del reactivo de Folin Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2N) en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso.

Los reactivos se deben adicionar en el orden indicado en el procedimiento que se encuentra debajo de la tabla I:

Nº Tubo	Sol. Ác. Gálico (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo de F-C (µL)	Carbonato de Sodio (µL)
Blanco	0	250	125	625
1	20	230	125	625
2	40	210	125	625
3	60	190	125	625
4	80	170	125	625
5	100	150	125	625
6	120	130	125	625
7	140	110	125	625
8	160	90	125	625

Tabla I: Cantidades totales de cada reactivo en su tubo correspondiente

Procedimiento:

- Rotular los tubos como se indica en la tabla anterior
- Adicionar a cada tubo la cantidad indicada de ácido gálico
- Adicionar a cada tubo la cantidad correspondiente de agua destilada
- Adicionar a cada tubo la cantidad correspondiente de Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Agitar en vórtex
- Añadir a cada tubo los 625 µL de la solución de Carbonato de Sodio
- Dejar reposar durante dos horas en oscuridad.
- Rellenar la microplaca y proceder a la determinación de la Absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro (Prior y cols., 2005).

V. RESULTADOS

V.1 HUMEDAD

En primer lugar vamos a observar las gráficas que representan la humedad determinada en cada muestra según el número de tallos madre que se dejaron sin recolectar, diferenciándolas a su vez en función de la cercanía al río. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en ninguno de los casos.

V.1.1 Cero tallos madre

En la tabla II representamos los resultados de humedad obtenidos en los turiones recolectados con el primer tratamiento, en el que se recolectaba la totalidad de las plantas que alcanzaran tamaño comercial (esto es, turiones de 23 cm al menos):

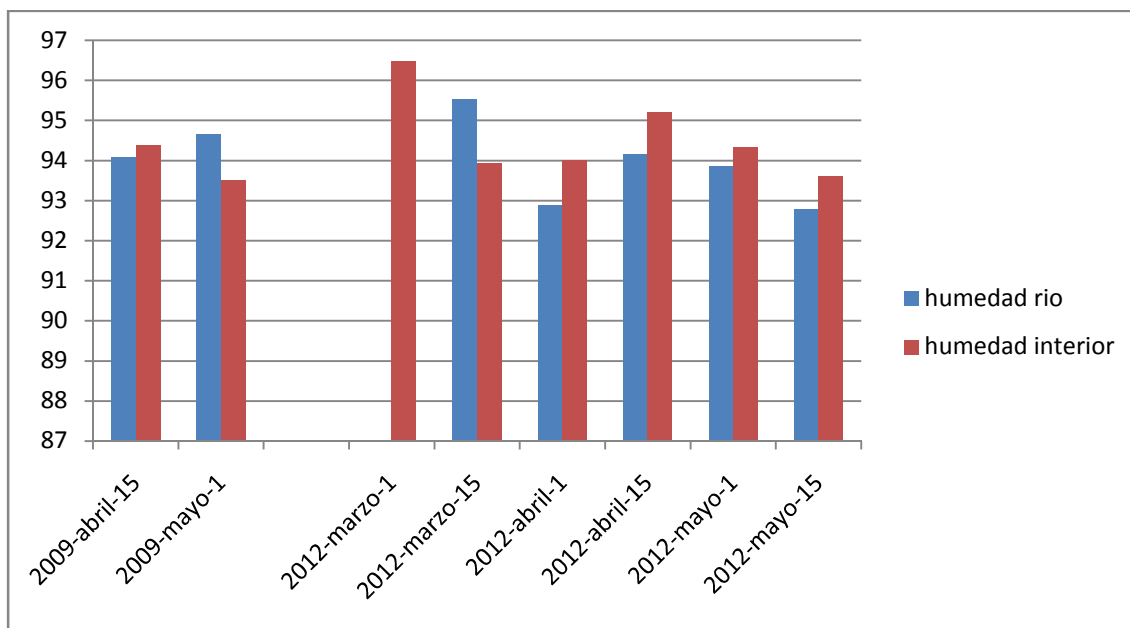


Tabla II: comparación entre la humedad determinada para el primer tratamiento en los turiones de plantas adyacentes al río (en color azul) y los turiones de plantas más alejadas del río (en color rojo), pudiéndose observar en ordenadas el % de agua y en abscisas la quincena en la que se recolectó.

V.1.2 Un tallo madre

La humedad determinada en los turiones recolectados con el segundo tratamiento, en el que se dejaba crecer uno de los tallos madre de cada planta, en función de la época de recolección se representa en la tabla III:

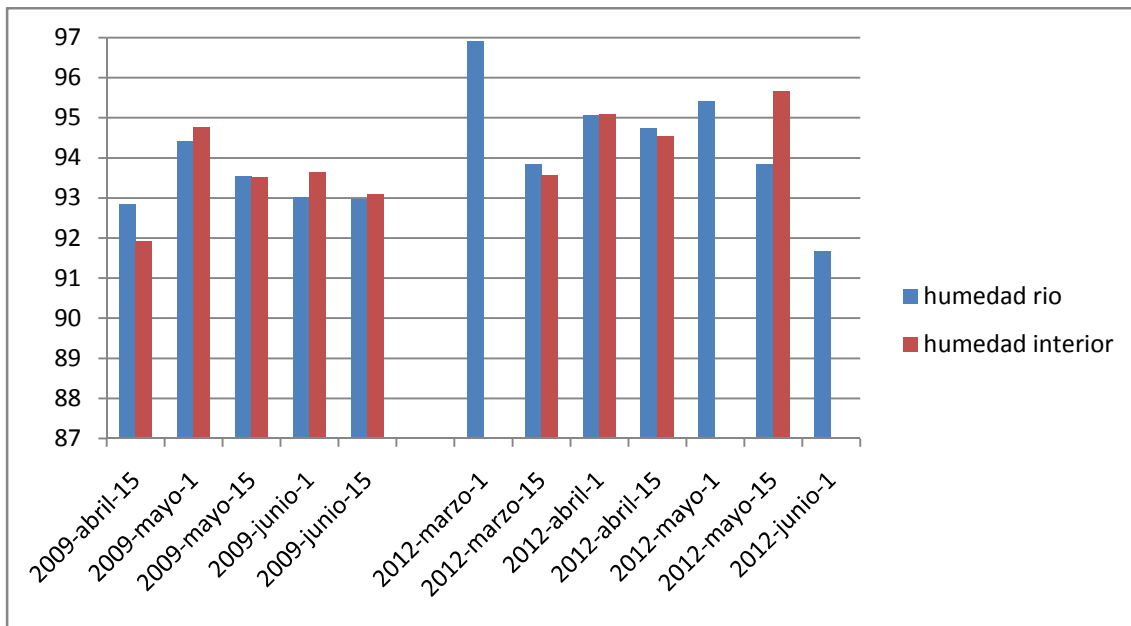


Tabla III: comparación entre la humedad determinada para el segundo tratamiento en los turiones de plantas adyacentes al río (en color azul) y los turiones de plantas más alejadas del río (en color rojo), pudiéndose observar en ordenadas el % de agua y en abscisas la quincena en la que se recolectó.

V.1.3 Tres tallos madre

En la tabla IV vemos el porcentaje de agua en los turiones recolectados siguiendo el tercer tratamiento, en el que se dejan 3 tallos madre en cada planta para su crecimiento vegetativo:

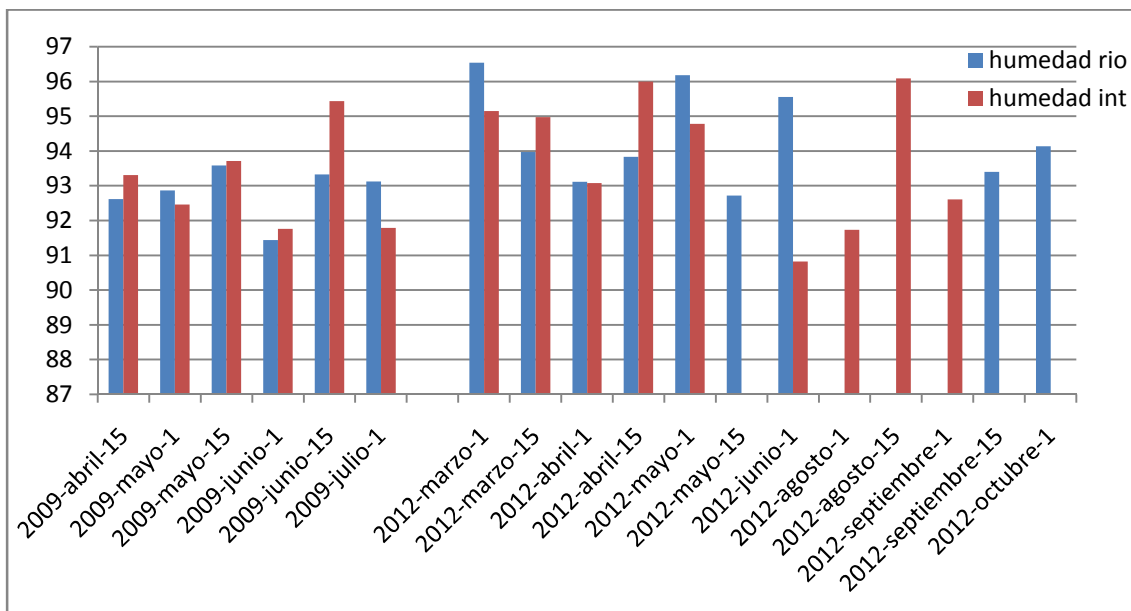


Tabla IV: comparación entre la humedad determinada en el caso de los turiones de plantas adyacentes al río (en color azul) y los turiones de plantas más alejadas del río (en color rojo), pudiéndose observar en ordenadas el % de agua y en abscisas la quincena en la que se recolectó siguiendo con el protocolo del tercer tratamiento.

V.1.4 Cinco tallos madre

El último tratamiento diferencial nos trajo el mayor número de muestras a lo largo del tiempo, como se muestra en las abscisas de la tabla V:

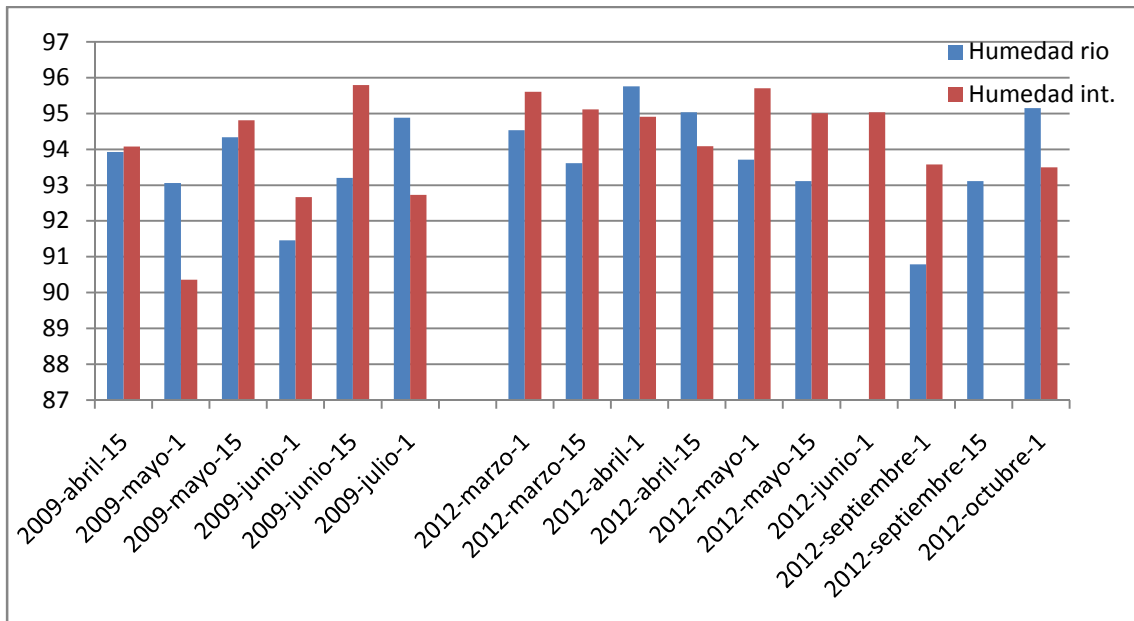


Tabla V: comparación entre la humedad determinada para el cuarto y último tratamiento en los turiones de plantas adyacentes al río (en color azul) y los turiones de plantas más alejadas del río (en color rojo), pudiéndose observar en ordenadas el % de agua y en abscisas la quincena en la que se recolectó.

V.2 PROTEÍNAS

Al igual que con la humedad, veremos las gráficas que representan los valores analizados de proteínas totales en función del tratamiento diferencial y considerando de igual modo la proximidad al río y la quincena en la que se recolectó.

5.2.1 Cero tallos madre:

En la tabla VI observamos las proteínas que se determinaron en las muestras recolectadas con el primer tratamiento, que no combinaba las fases vegetativa y de producción del espárrago.

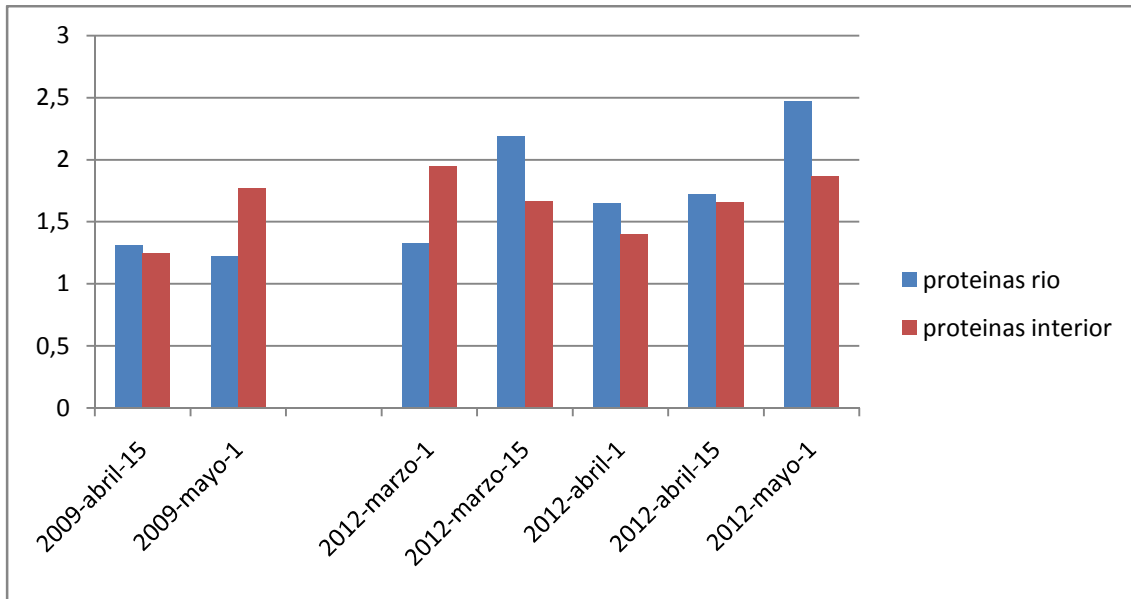


Tabla VI: Para el primer tratamiento, esta tabla refleja las proteínas determinadas (en gramos de proteína bruta por 100 gramos de muestra fresca) en función de la quincena de recolección y de su proximidad al río.

V.2.2 Un tallo madre:

En la tabla VII observamos la comparación de valores determinados de proteínas en las muestras que se recolectaron por el método que define al segundo tratamiento:

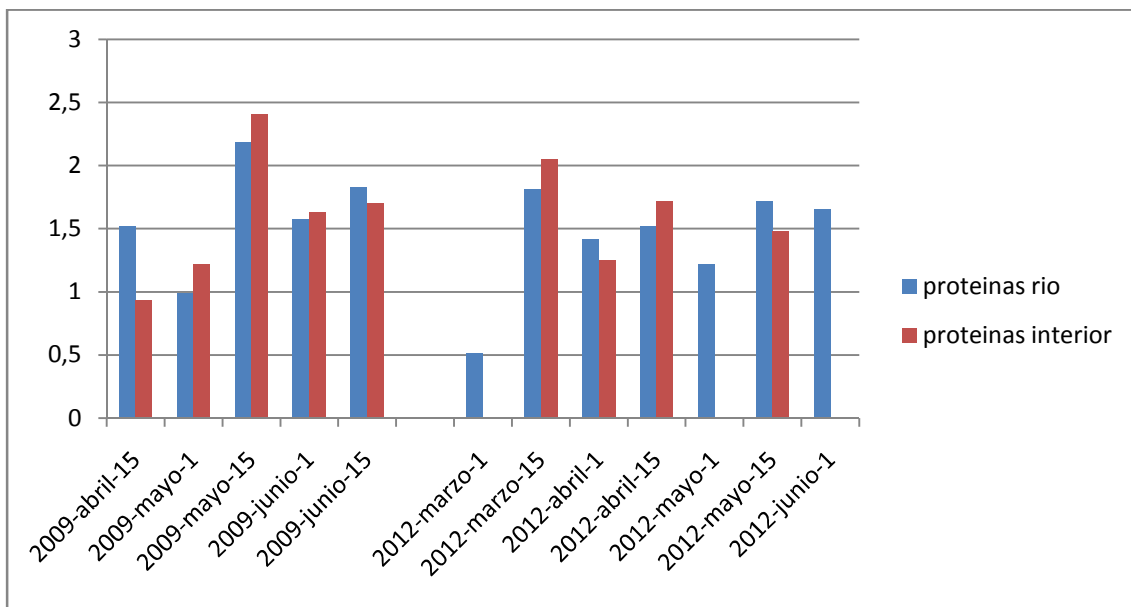


Tabla VII: Proteínas determinadas (en gramos de proteína bruta por 100 gramos de muestra fresca) en función de la quincena de recolección y de su proximidad al río para el segundo tratamiento.

V.2.3 Tres tallos madre:

En la tabla VIII podemos observar las medias de proteínas existentes en las muestras recolectadas con el tercer tratamiento:

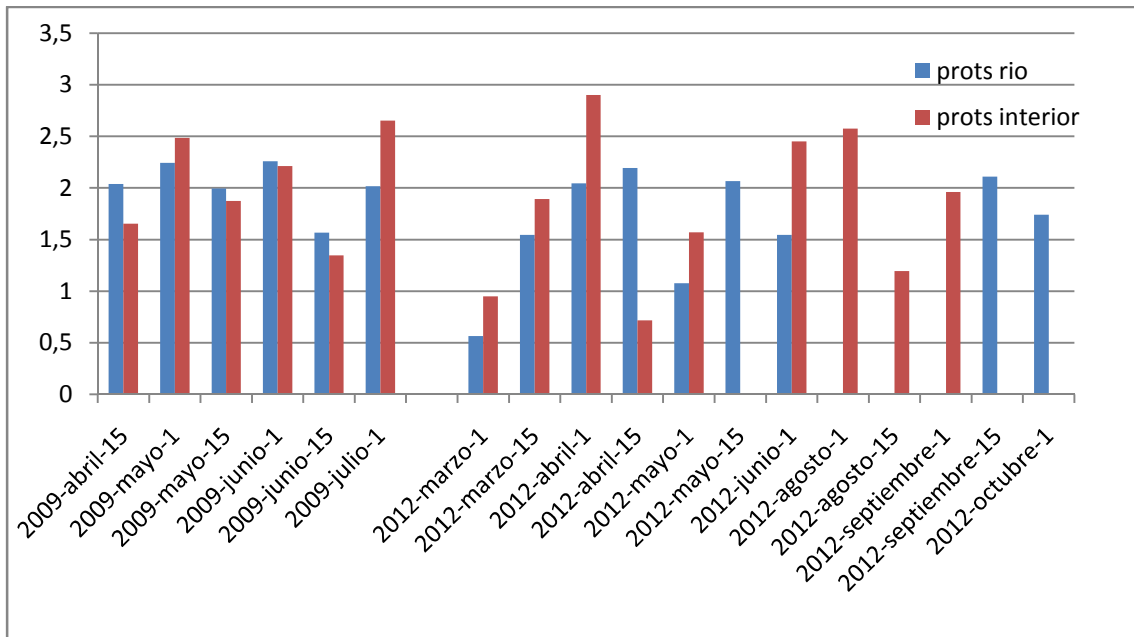


Tabla VIII: Para el tercer tratamiento, esta tabla muestra las proteínas determinadas (en gramos de proteína bruta por 100 gramos de muestra fresca) en función de la quincena de recolección y de su proximidad al río.

V.2.4 Cinco tallos madre:

El último tratamiento se ve reflejado en cuanto a la cantidad de proteínas de sus muestras en la tabla IX:

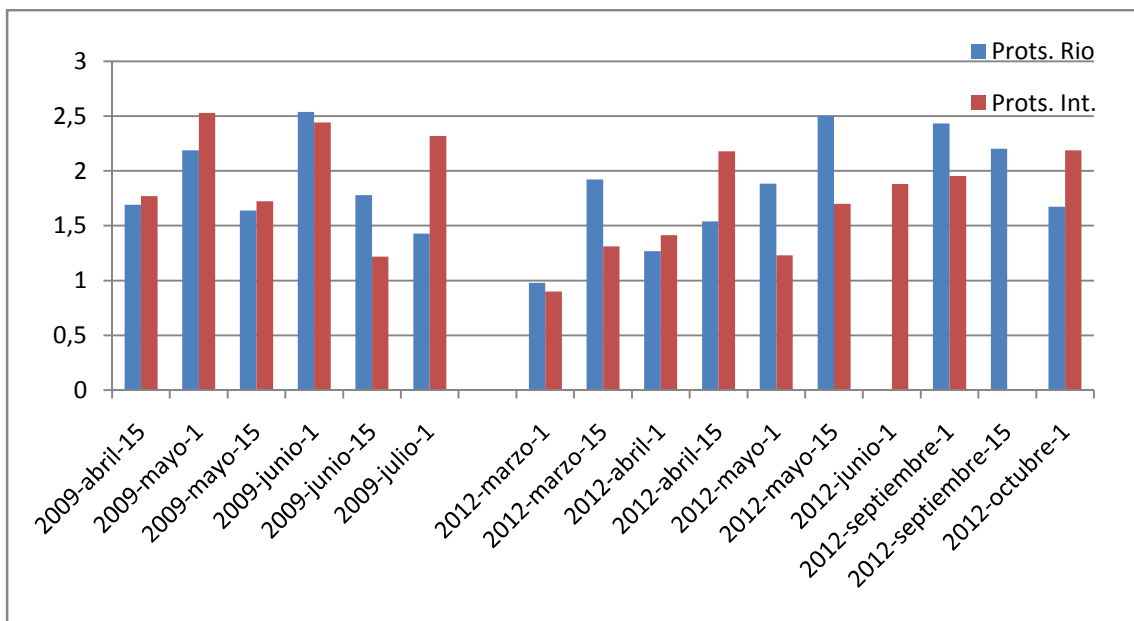


Tabla IX: Esta tabla refleja las proteínas determinadas (en gramos de proteína bruta por 100 gramos de muestra fresca) en muestras del quinto tratamiento, en función de la quincena de recolección y de su proximidad al río.

V.3 FENOLES

Para la determinación de fenoles, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, obtuvimos la recta de calibrado que se representa en la Figura 7. En ordenadas representamos los valores de absorbancia, y en abscisas los equivalentes en μg de ácido gálico.

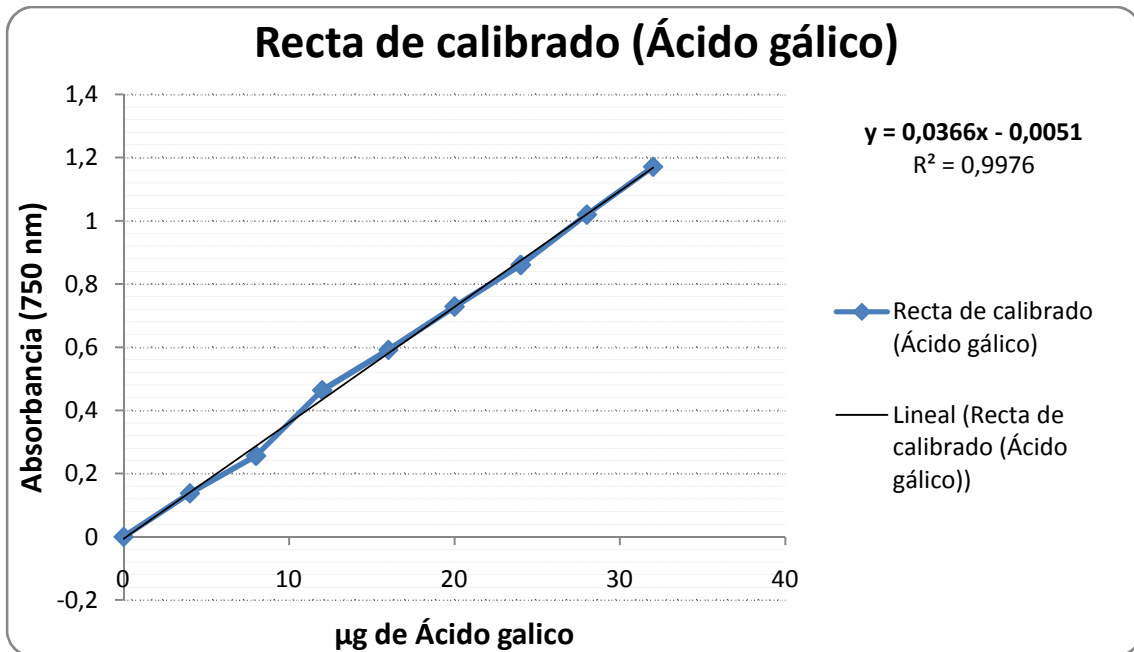


Figura 7: Recta de calibrado donde representamos la absorbancia detectada a 750 nm en nuestro espectrofotómetro para diferentes cantidades conocidas de ácido gálico.

En la tabla X vemos los valores obtenidos en nuestro espectrofotómetro para calcular dicha recta, cuya ecuación es $y = 0,0366x - 0,0051$

Y su coeficiente de determinación $R^2 = 0,9976$

Valores medidos para la recta patrón										
A (Promedio)	0	0,138	0,257	0,464	0,592	0,729	0,861	1,02	1,172	EJE Y
μg Ácido gálico	0	4	8	12	16	20	24	28	32	EJE X

Tabla X: Valores de absorbancia medidos para las cantidades conocidas de ácido gálico mostradas

Para la determinación de fenoles se analizaron diversos tipos de muestras para poder comparar en igualdad de condiciones unas muestras descongeladas con otras recién recolectadas expresamente para el análisis. En la figura 8 podemos ver la identificación que se hizo a una microplaca de 96 pocillos analizada, para conocer el contenido de cada uno de los pocillos. Se puede observar que se colocaron muestras de patrón por duplicado, así como del blanco, y varias muestras congeladas de 2009 y 2012 seleccionadas al azar. Las últimas dos columnas se refieren a muestras recién recolectadas en el campo en el momento del análisis. Para la medición se centrifugó a distintas revoluciones por minuto para comprobar también si esto podía afectar a la determinación, y también queda reflejado en la identificación de la microplaca del espectrofotómetro.

El contenido de fenoles de cada extracto es expresado en $\mu\text{g/g}$ de peso seco de la planta, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término “Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada”.

En la tabla XI vemos los valores ya calculados de equivalentes en ácido gálico por cada gramo de muestra seca.

Equivalentes en μg de ácido gálico/g de muestra seca											
540,0	626,3	842,9	1344,8	594,5	153,8	294,4	498,9	519,6	1485,0	956,7	1243,6
591,8	656,5	987,1	1414,0	665,4	236,5	388,1	596,9	642,5	1967,7	1170,8	1330,1
2227,7	2706,8	3790,9	4165,9	2597,3	2703,5	1662,0	1700,4	2655,3	2728,1	4495,0	4895,7
535,7	587,5	825,6	1310,2	582,7	149,9	311,4	511,7	501,4	1521,4	997,7	1225,4
557,2	596,1	900,6	1373,6	629,9	212,9	375,3	515,9	569,7	1762,8	1002,3	1230,0
2262,2	2680,9	3756,3	3946,6	2436,0	2699,6	1610,9	1674,8	2550,5	2687,2	4399,4	4891,2

Tabla XI: Valores calculados de equivalentes en ácido gálico para las absorbancias medidas en algunas muestras frescas y otras congeladas (su identificación se puede ver en la figura 8 por su posición)

En la Figura 9 podemos observar algunos ejemplos de los tratamientos estadísticos que se realizaron para valorar si las diferencias que observamos entre los resultados obtenidos son o no significativas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistix (Versión 8.0).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
patrón A	BLK	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8			
		4	8	12	16	20	24	28	32			
patrón B	BLK	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8			
		4	8	12	16	20	24	28	32			
Eppendorfs. 20 µl M/100 µl disol	SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	SPL22	SPL31	SPL34	SPL25	SPL28
	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca
viales 20 µl M/100 µl disol	SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	SPL23	SPL32	SPL35	SPL26	SPL29
	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca
muestras concentradas (100 µl)	SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	SPL24	SPL33	SPL36	SPL27	SPL30
	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca
Eppendorfs. 20 µl M/100 µl disol	SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	SPL22	SPL31	SPL34	SPL25	SPL28
	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca
viales 20 µl M/100 µl disol	SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	SPL23	SPL32	SPL35	SPL26	SPL29
	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm	5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca
muestras concentradas (100 µl)	SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	SPL24	SPL33	SPL36	SPL27	SPL30
	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm	11000 rpm al sobrenadante de 5000 rpm	5000 rpm
	11d	11d	10c	10c	11a	11a	10b	10b	mezcla de anteriores	macerada	fresca	fresca

Figura 8: Identificación de la microplaca utilizada en la determinación de fenoles para la comparación entre las cantidades presentes en muestras frescas y en muestras descongeladas.

Analysis of Variance Table for QUINCENA

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	3	3.239E-31	1.079E-31	0.00	1.0000
TRATAMIEN	3	64.1634	21.3878	0.87	0.4583
Error	265	6531.78	24.6482		
Total	271				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 8.9861 CV 55.25

Analysis of Variance Table for HUMEDAD

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	3	1.012	0.33721	0.14	0.9379
TRATAMIEN	3	3.147	1.04886	0.43	0.7350
Error	165	406.773	2.46529		
Total	171				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 93.939 CV 1.67

LSD All-Pairwise Comparisons Test of HUMEDAD for TRATAMIEN

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
1	94.146	A
2	93.952	A
4	93.915	A
3	93.742	A

Alpha 0.05
 Critical T Value 1.974
 Error term used: Error, 165 DF
 There are no significant pairwise differences among the means.

Analysis of Variance Table for QUINCENA

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	3	1.459E-28	4.865E-29	0.00	1.0000
TRATAMIEN	3	1.459E-28	4.865E-29	0.00	1.0000
Error	281	7752.00	27.5872		
Total	287	7752.00			

Grand Mean 9.5000 CV 55.29

Analysis of Variance Table for PROTEINAS

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	3	0.3602	0.12007	0.41	0.7449
TRATAMIEN	3	2.2033	0.73445	2.52	0.0600
Error	165	48.1365	0.29174		
Total	171				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.7258 CV 31.30

LSD All-Pairwise Comparisons Test of PROTEINAS for TRATAMIEN

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
3	1.8380	A
4	1.8360	A
1	1.6493	AB
2	1.5800	B

Alpha 0.05
 Critical T Value 1.974
 Error term used: Error, 165 DF
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Figura 9: Análisis de varianza realizado con un nivel de confianza del 95% para la humedad y las proteínas en función del tratamiento y de la quincena. En el caso de la humedad no existe diferencia significativa, y en el caso de las proteínas se observa un aumento con respecto a las proteínas en los dos últimos tratamientos (3 y 5 tallos madre) pero sin poder considerarse significativo ya que no supera su LSD (mínima diferencia significativa, cuyo valor en este caso es de 1.974).

VI. DISCUSIÓN

En los análisis estadísticos realizados en las distintas muestras no hemos encontrado diferencias significativas con respecto a su contenido en agua o proteínas en ninguno de los casos. Veamos datos concretos:

V.1 Humedad y proteínas:

La media de humedad en el primer tratamiento en 2009 fue de $94,15 \pm 0,66$ % y la de proteínas, $1,29 \pm 0,30$ % y en 2012, la humedad media fue de $94,14 \pm 1,45$ % y la cantidad de proteínas, $1,75 \pm 0,54$ %.

En el segundo tratamiento, la humedad media total fue en 2009 de $93,38 \pm 1,24$ y las proteínas, $1,62 \pm 0,45$ %. En 2012 tenemos una humedad de $94,55 \pm 1,21$ y un porcentaje de proteínas de $1,53 \pm 0,41$ %.

En el tercer tratamiento, las medias son para 2009 de $93,03 \pm 1,49$ % de humedad y $1,98 \pm 0,65$ % de proteínas, y para 2012 tenemos los valores de $94,29 \pm 1,72$ % de humedad y de $1,71 \pm 0,63$ % de proteínas.

Para finalizar, en el último caso tenemos unos porcentajes en 2009 de humedad de $93,44 \pm 1,95$ % y de proteínas $1,94 \pm 0,53$ %. En 2012 calculamos los valores de $94,33 \pm 1,26$ % de humedad y de $1,75 \pm 0,48$ % de proteínas.

Se realizó un análisis estadístico con un nivel de confianza del 95% para comprobar si existían diferencias significativas. Para ello, el valor de P debía ser menor a 0,05) y en todos los casos se superaba dicho valor.

También se compararon los valores de humedad y proteínas entre los meses primeros y últimos de recolección, siendo la diferencia entre ellos no significativa en ninguno de los casos.

Por otra parte, también se realizaron análisis estadísticos entre la humedad y las proteínas de las muestras que habían sido cultivadas en la zona más cercana a la orilla del río con respecto a las muestras más alejadas, sin haberse encontrado tampoco ninguna diferencia significativa que nos llevara a la conclusión de que la distancia al río pudiera influir en el porcentaje de agua o de proteínas en nuestras muestras.

V.2 Fenoles:

En cuanto a los fenoles, se puede observar en base a los datos de la tabla XI cómo la media de equivalentes de ácido gálico por cada gramo de muestra seca en muestras con una concentración de 20 μL de muestra en 100 μL de la disolución (el equivalente al volumen del pocillo) es de $628,92 \pm 323,33$ mientras que la media en las muestras frescas es de $1144,58 \pm 139,31$.

En las muestras concentradas (los 100 μL de muestra en el pocillo de la microplaca no se encuentran diluidos y pertenecen a la muestra pura) se observa tras realizar un análisis estadístico que el promedio es de $2657,07 \pm 797,39$ equivalentes de ácido Cítrico en las muestras descongeladas, mientras que en las frescas es de $4670,31 \pm 260,60$ equivalentes.

Simplemente observando el error estándar ya se puede comprobar que los datos en las muestras descongeladas son especialmente erráticos, pero lo más llamativo es que los valores detectados en las muestras frescas prácticamente duplican los valores calculados en las muestras que se congelaron, pudiéndose observar en algunos casos concretos una pérdida de hasta seis veces la cantidad que cabía esperar de haber conservado sus cualidades iniciales.

Estos resultados nos llevaron inevitablemente a la conclusión de que no debíamos analizar los fenoles en las muestras congeladas de 2009 y 2012 para compararlos al igual que se hizo con humedad y proteínas, ya que la pérdida era considerable y los resultados no serían para nada fiables.

VII. CONCLUSIONES

1. Después de haber comparado las proteínas y la humedad presentes en 1383 muestras de *Asparagus officinalis* var. `grande`, 550 de ellas recolectadas en 2009 y 833 en 2012, se ha demostrado que no hay diferencias significativas entre las muestras recolectadas dentro de su época natural (desde febrero hasta mayo) y las muestras recolectadas fuera de esa fecha (ampliándose hasta julio en 2009 y octubre en 2012 gracias a nuestro método), por tanto el método empleado se puede considerar como beneficioso para la recolección de esta especie, ya que ampliamos la fecha de recolección y comercialización (limitada a la primavera principalmente) sin la pérdida de sus cualidades.

2. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la humedad y cantidad de proteínas totales de las muestras en función de su proximidad al río, por tanto demostramos que el método de cultivo y regadío había sido eficiente y que el suelo tenía una composición homogénea.

3. Por otra parte, al comparar los fenoles determinados en muestras frescas con los presentes en muestras descongeladas podemos afirmar que la pérdida es considerable.

4. Teniendo en cuenta todas las conclusiones anteriores, volvemos a reforzar nuestra idea de que el método de recolección empleado en el Centro IFAPA "Las Torres-Tomejil" es adecuado para mantener la calidad, ya que gracias a él es posible consumir espárragos recién recolectados y por tanto frescos durante el verano e incluso en otoño, aumentando sus cualidades organolépticas y reduciendo el precio con respecto a los productos importados o congelados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Amaro MA, Moreno R, Zurera G, García RM. Influence of vegetative cycle of asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) on copper, iron, zinc and manganese content. *Plant Foods hum. Nutr.* 1995; 47: 349-355.
- Amaro MA, Moreno R, Zurera G, Sánchez PJ. Nutritional changes in the essential trace elements content of asparagus during industrial processing. *Food Res. Int.* 1999; 32: 479-486.
- Amaro MA. Variaciones del contenido de elementos minerales en el espárrago (*Asparagus officinalis*, L). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. 1993.
- AOAC International. "Official Methods of Analysis". 15ª ed. 1990.
- AOAC International. "Official Methods of Analysis". 17ª ed. 2000.
- Bast A. Functional food and nutraceuticals. Proceedings of the XI International Asparagus Symposium in *Acta Horticulturae*; 2005.
- Behr H-C. International asparagus production and markets. Proceedings of the XI international Asparagus Symposium in *Acta Horticulturae*. 2006.
- Benages S. El espárrago. Ediciones Mundi-prensa, Bilbao; 1990: p. 179-212.
- Benson BL. Update of the world's asparagus production areas, spear utilization and production periods. *Proc. Of 11th Int. Asparagus Symp. Acta Hort.* 2008; 776: 495-507.
- Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J. Mol. Med.* 2000; 78 (6): 333-336.
- Espejo JA, González-Fernández JL. El arte culinario del espárrago de Huétor-Tájar. Consejo Regulador de la Denominación Específica "espárrago de Huétor-Tájar". 2000.
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1983; 34: 47-70.
- Fukumoto LR, Mazza G, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, 2000, 3597-3604.

- García MD, De la Puerta R, Sáenz MT, Márquez-Martín A, Fernández-Arche MA. Hypocholesterolemic and hepatoprotective Effects of “triguero” Asparagus from Andalusia in Rats Fed a High Cholesterol Diet. Hindawi Publishing Corporation; 2012. Article ID 814752.
- García-Martínez E, Fernández-Segovia I. “Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte”, Ed. Universidad Politécnica de Valencia. 2013 [En Línea]. [Consultado en Agosto de 2016]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/16338>
- Guillén R, Rodríguez R, Jaramillo S, Rodríguez G, Espejo JA, Fernández-Bolaños J, Heredia A, Jiménez A. Antioxidants from asparagus spears: phenolics. Acta Hort. 2008; 776: 247-254.
- Harborne JB, Williams CA. Advance in flavonoid research since 1992. Phytochem. 2000; 55: 481-504.
- Hollman PCH, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. Archives of toxicology. Supplement. Arch. Fur Toxicol. 1998; 20: 237-248.
- Hollman PCH. Absorption, Bioavailability and Metabolism of Flavonoids. Pharmaceutical Biol. 2004; 42: 74-83.
- Julkunen-Tiito R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1985; 33 (2): 213-217.
- Kamat J, Bloor K, Devasagayam PA, Venkatachalam SR. Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by irradiation in rat liver mitochondria. J. Ethnopharmacol; 2000. 71: 425-435.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Regéat F, Remeésy C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. F.E.B.S. Letters. 1998; 426: 331-336.
- Martínez Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Muñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 2002; XVII (6): 271-278.

- Martínez FS, González GJ, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 17(6): 271-278.
- Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*. 2006; 20: 187:200.
- Narayama K, Reddy R, Sripal M, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial. *Indian Journal Pharmacology*. 2001; Vol. 33: 2-16.
- Nielsen S. "Food Analysis", Ed. Kluwer Academic/Plenum Publ. 2003. p. 131-142.
- Nijveldt RJ, VanNood E, VanHorn DE, Boelens P, VanNorren K, VanLeuwen P. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74: 418-425.
- Peterson GL. Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*. 1979; 100 (2): 201-220.
- Pierron-Darbonne A. Past, present and future of the asparagus cultivation around the Mediterranean sea. *Proceedings of the XI International Asparagus Symposium in Acta Horticulturae*. 2006.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 4290-4302.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biol. Med.* 2002; 33: 220-235.
- Rodríguez R, Jaramillo S, Rodríguez G, Espejo JA, Guillén R, Fernández-Bolaños J, Heredia A, Jiménez A. Antioxidant activity of ethanolic extracts from several asparagus cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 5212-5217.
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu Rev. Nutr.* 2002; 22: 19-34.

- Showalter AM. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 1993; Vol 5: 9-23.
- Skoog DA, West DM. "Química analítica". 4ªed. McGraw-Hill; 1989. p. 231.
- Spencer JPE. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 1999; 133: 3255-3261.
- Vazquez-Castilla S, De la Puerta R, García MD, Fernández-Arche MA, 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.
- Wiboonpun N, Phuwapraisirisan P, Tip-Pyan S. Identification of Antioxidant Compound from *Asparagus racemosus*. *Phytother*; 2004. Res. 18: 771-773.
- Yu S, Chee-Kok C, Chi Tang H, Wei M, Garrison SA, Ho C. Huang M-T. Antitumor activity of the crude saponins obtained from asparagus. *Cancer let*; 1996. 104: 31-36.