

10 y 11 de noviembre de 2020

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA

XLII JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

II Congreso Agroalimentario de Extremadura



**XLII JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS**
II Congreso agroalimentario de Extremadura

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

© Jaime Fenollera
Viñedos en Tierra de Barros

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-110-4

D.L.:

Imprime: Impresal

Desarrollo de un método de extracción asistida por ultrasonidos para la determinación de flavonoides en cebollas (*Allium cepa*)

GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.

VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.

ESPADA-BELLIDO, E.

FERREIRO-GONZÁLEZ, M.

BARBERO, G.F.¹

PALMA, M.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz,
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), IVAGRO, 11510,
Puerto Real, Cádiz, España.

RESUMEN

La cebolla, uno de los vegetales más cultivados y consumidos, es una fuente muy valiosa de sustancias antioxidantes. Concretamente, todos los tipos de cebollas (blancas, amarillas o rojas) son ricas en flavonoles, principalmente en quercetina, reconociéndose a la cebolla como la principal fuente dietética de este compuesto. En este trabajo, se propone el desarrollo de un método de extracción asistida por ultrasonidos (UAE), una técnica económica, verde y eficiente, para extraer dichos flavo-

noles de matrices de cebolla roja. Las variables de extracción más importantes (% metanol y pH del disolvente, temperatura, amplitud y ciclo del ultrasonido, y relación disolvente-muestra) se optimizaron utilizando la metodología de Box-Behnken. Las variables más influyentes ($p < 0,05$) fueron el % de metanol, la amplitud y el pH (79% de metanol en agua, pH 2 y 53,5% de amplitud). El método desarrollado presentó una alta repetibilidad y precisión intermedia (RSD $< 5\%$) así como una alta recuperación con tiempos de extracción muy cortos (2 minutos).

Palabras claves: *Allium cepa*, cebolla, compuestos fenólicos, flavonoides, quercetina, PDA, UHPLC.

ABSTRACT

Onion, one of the most cultivated and consumed vegetables, is a very valuable source of antioxidant substances. Specifically, all types of onions (white, yellow or red) are rich in flavonols, mainly quercetin, recognizing onion as the main dietary source of this compound. This work proposes the development of an ultrasound-assisted extraction method (UAE), an economical, green and efficient technique, to extract these flavonols from red onion matrices. The most important extraction variables (methanol % and solvent pH, temperature, amplitude and cycle of the ultrasound, and solvent-sample ratio) were optimized using the Box-Behnken methodology. The most influential variables ($p < 0.05$) were methanol %, amplitude and pH (79% of methanol in water, pH 2, and amplitude of 53.5%). The developed method showed a high repeatability and intermediate precision (RSD $< 5\%$) as well as a high recovery with very short extraction times (2 minutes).

Keywords: *Allium cepa*, flavonoids, quercetin, onion, PDA, phenolic compounds, UHPLC.

1. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa*) es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial¹. Como verdura se ha consumido y cultivado ampliamente en todo el mundo y ha aumentado su producción en más del 25% en los últimos años (FAO). Esto es debido, no solo a su amplio uso como saborizante gracias a su sabor y olor característicos, sino también a que es una fuente importante de compuestos beneficiosos²⁻⁴. El conocimiento actual sobre estos compuestos ha demostrado que los extractos de cebolla y sus compuestos bioactivos aislados tienen una amplia gama de efectos biológicos, que incluyen efectos antioxidantes, antiplaquetarios, antidiabéticos, anticancerígenos, antimicrobianos, anti-inflamatorios y antibióticos sobre la salud humana^{5,6}. Se puede concluir, por tanto, el enorme interés que presenta estudiar el perfil metabólico de este bulbo.

Dentro de estos compuestos beneficiosos, la cebolla es muy rica en compuestos fenólicos, especialmente en flavonoides. Con respecto a los flavonoides presentes en la cebolla, las antocianinas y los flavonoles han sido los compuestos mayoritarios reportados⁷. Mientras que las antocianinas se encuentran exclusivamente en las cebollas rojas, todos los tipos de cebollas (blancas, amarillas o rojas) son ricas en flavonoles, principalmente en quercetina, reconociéndose a la cebolla como la principal fuente dietética de este compuesto⁸. La quercetina, la quercetina 3,4-*O*-diglucósido y la quercetina 4'-*O*-glucósido son los flavonoles mayoritarios de la cebolla y representan aproximadamente el 95-99% del contenido total de flavonoles⁹. Estos compuestos poseen una elevada actividad antioxidante por lo que actúan como potentes donantes de electrones eliminando residuos de los radicales libres. Estas características les otorgan los efectos de promoción de la salud anteriormente mencionados y los convierten en el objeto de estudio de este trabajo.

El análisis en detalle de estos compuestos es de gran importancia porque permite evaluar el perfil metabólico de las cebollas. Para ello, es fundamental contar con métodos de extracción óptimos que permitan extraer los compuestos de interés y analizarlos con fiabilidad¹⁰. Con respecto a los métodos de extracción empleados para extraer los compuestos fenólicos de la matriz de cebolla, en la mayoría de los estudios se emplean técnicas tradicionales como la maceración¹¹ o la agitación magnética¹². Estas técnicas tienen la desventaja de que suelen implicar largos tiempos de extracción

para generar rendimientos adecuados. Por ello, en este trabajo se ha decidido evaluar el efecto de la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) en la extracción de flavonoles en cebolla roja. En comparación con los métodos tradicionales, UAE permite una mayor dispersión de la fase sólida en la líquida, es decir, una mejor interfase de contacto. Esto conlleva que se puedan obtener buenos rendimientos en menores tiempos y con un menor uso de disolventes, lo que además de suponer un ahorro económico, permite que estas técnicas de extracción sean consideradas dentro de la denominada “química verde”.

Además de contar con una técnica de extracción eficiente, hay que tener en cuenta que los resultados de la extracción dependen mucho de las condiciones empleadas. Como variables influyentes cabe mencionar la temperatura, el tiempo, el tipo de disolvente, la proporción y/o mezcla de dichos disolventes, etc.^{13,14}. Mediante el empleo de las condiciones más adecuadas para cada aplicación, se pretende maximizar la recuperación de los compuestos de interés y limitar la degradación de éstos en el extracto¹⁵. Para el desarrollo y optimización de métodos de extracción lo más empleado es el uso de los diseños de experimentos de superficie de respuesta. Concretamente, uno de los diseños más utilizado actualmente es el conocido con el nombre de Box-Behnken (BBD) ya que requiere pocos experimentos y evita aquellos en condiciones extremas.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es el desarrollo y optimización de un método de extracción asistida por ultrasonidos para la extracción de los flavonoles mayoritarios en cebolla roja. Disponer de métodos de extracción eficientes es de gran utilidad porque permite evaluar la calidad de las muestras de cebolla y seleccionar aquellas variedades que presenten un mayor contenido de compuestos bioactivos, y que por tanto, tendrán mejores características biofuncionales para la salud de los consumidores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

El material biológico empleado en este estudio fue muestras de cebolla roja (variedad Morada) obtenidas de un supermercado local de la provincia de Cádiz, España. Concretamente, se estudió el contenido en flavonoles del

bulbo. Para ello, las capas externas de la cebolla se retiraron y el bulbo se cortó en pequeños trozos. Este bulbo cortado, se sometió a una etapa de liofilizado en un liofilizador LYOALFA (Azbil Telstar Technologies, Tarrasa, Barcelona, España), y una vez liofilizado se trituró en un molino de cuchilla ZM200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania). Finalmente, las muestras en polvo se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.2 Disolventes y reactivos

Para la extracción asistida por ultrasonidos se emplearon como disolventes mezclas de metanol (Fischer Chemical, Loughborough, Reino Unido) de pureza HPLC y agua Milli-Q, obtenida mediante un sistema de purificación Millipore (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Además, los disolventes presentaron distintos valores de pH por lo que fue necesario el empleo de una disolución de HCl y una de NaOH (Panreac, Barcelona, España) ambas a 0,1 M para el ajuste de pH. Para el análisis de los compuestos extraídos se emplearon los siguientes disolventes: metanol y acetonitrilo, ambos de grado HPLC y obtenidos de Panreac (Barcelona, España), agua Milli-Q, obtenida mediante el sistema de purificación Millipore anteriormente mencionado, y ácido acético (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para la cuantificación de los compuestos extraídos se empleó quercetina 3-glucósido (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como estándar comercial.

2.3 Extracción asistida por ultrasonidos

2.3.1 Equipo de extracción asistida por ultrasonidos

Para llevar a cabo la extracción asistida por ultrasonidos se empleó una sonda Sonopuls HD 2070.2 (BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Heinrichstrabe, Berlín, Alemania), acoplada a un procesador que permite ajustar tanto la amplitud como el ciclo y el tiempo de trabajo. Se utilizó además un baño termostático (Frigiterm-10, Selecta, Barcelona, España) en el cual se puede ajustar la temperatura deseada y un vaso de doble pared, para mantener la muestra introducida en su interior a la temperatura seleccionada.

2.3.2 Procedimiento de extracción

Para el desarrollo del método de extracción de flavonoles de matrices de cebolla roja, se llevaron a cabo una serie de experimentos. Para cada experimento, se pesaron aproximadamente 0,2 gramos de muestra en un tubo Falcón y se añadió el volumen correspondiente de disolvente en función del experimento. El tubo Falcón se colocó en el vaso de doble pared, para mantener la muestra a la temperatura deseada, y en su interior se introdujo la sonda de ultrasonidos. El tiempo de extracción inicial fue de 10 minutos y las condiciones de extracción se fijaron en función de cada experimento. Concretamente, el rango estudiado para cada uno de los factores fue el siguiente: MeOH (%) (25-50-75), pH (2-4,5-7), temperatura (°C) (10-35-60), amplitud (%) (30-60-90), ciclo (s) (0,2-0,45-0,7) y ratio (g/mL) (0,2/10-0,2/15-0,2/20). Pasado el tiempo de extracción, los extractos obtenidos se centrifugaron y el sobrenadante se traspasó a un matraz aforado de 25 mL. El precipitado obtenido de la centrifugación se re-disolvió en 5 mL del mismo disolvente de extracción y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. El nuevo sobrenadante se volvió a traspasar al matraz aforado y este se terminó de enrasar con el mismo disolvente. Finalmente, el contenido del matraz se almacenó hasta su posterior análisis a -20 °C.

2.4 Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia

Para llevar a cabo la cuantificación y análisis de los flavonoles presentes en el bulbo de cebolla roja se hizo uso de la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC). Concretamente, se empleó un equipo ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (DAD eλ Detector). La columna empleada fue de fase reversa, Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 μm, 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Los disolventes empleados como fase móvil fueron: agua Milli-Q (Fase A) y acetonitrilo (Fase B), ambos acidificados al 2% con ácido acético. Ambos disolventes se filtraron con un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius, Gotinga, Alemania) y se sonicaron en un baño de ultrasonido S300 (Elma, Singen, Alemania). Por otro lado, todos los extractos de UAE se filtraron haciendo uso de un filtro de jeringa de 0,22 μL (Filter-Lab, Barcelona, España). Para conseguir una buena resolución de los picos cromatográficos se probaron varios métodos, flujos, etc. Finalmente, de entre todos los gra-

dientes se seleccionó el siguiente por proporcionar unos resultados óptimos, con unos picos cromatográficos bien resueltos y fácilmente integrables: 0,0 min, 10% B; 5 min, 53,03% B; 5.10 min, 100% B; 7 min, 100% B; 7.5 min, 0% B; 10 min, 0% B. Con respecto al volumen de inyección de muestra, el flujo de disolvente y la temperatura de columna se seleccionaron 3 μ L, 0,59 mL/min y 55 °C, respectivamente. Mediante el empleo de estas condiciones se consiguió separar de manera adecuada los 7 flavonoles mayoritarios de la cebolla (quercetina 3,7,4'-triglucósido, quercetina 7,4'-diglucósido, quercetina 3,4'-diglucósido, isorhamnetina 3,4'-diglucósido, quercetina 3-glucósido, quercetina 4-glucósido, e isorhamnetina 4'-glucósido) en un tiempo inferior a 2,6 minutos. En la Figura 1 se muestra el cromatograma obtenido. Todo el sistema fue controlado mediante el Software EmpowerTM 3 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

Una vez analizados los flavonoles, para llevar a cabo su cuantificación se usó una recta de calibrado preparada a partir de un patrón de referencia, quercetina 3-glucósido. El rango de linealidad estudiado fue 0,5-200 ppm. A partir de ésta, se obtuvo una recta de calibrado para cada uno de los flavonoles identificados en la cebolla suponiendo similar absorbancia entre ellos y teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada uno.

2.5 Diseño de Box-Behnken (BBD) para la optimización del método de extracción

Para el desarrollo y optimización del método de extracción de flavonoles en matrices de cebolla, se llevó a cabo un diseño de experimentos de superficie de respuesta conocido con el nombre de Box-Behnken (BBD). Este tipo de diseño se caracteriza por presentar únicamente tres niveles por factor: un nivel inferior (-1), uno intermedio (0), y uno superior (1). No obstante, el rasgo que diferencia a este diseño de otros, es que además de no tener un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado, no presenta puntos axiales, sino que posee un arreglo más esférico de los puntos del diseño, evitando así experimentos en condiciones extremas¹⁶. Cuando este diseño estadístico experimental se combina con la metodología de superficie de respuesta (RSM), se puede estudiar el efecto de los factores sobre la variable respuesta. En este trabajo, se estudiaron los siguientes 6 factores independientes: composición del disolvente (% metanol en agua) (X_1), pH del disolvente (X_2), temperatura de extracción (X_3), amplitud del ultrasonido (X_4), ciclo (X_5), y relación masa de la muestra:volumen del disolvente ("ra-

tio") (X_6). Como se ha comentado anteriormente, cada factor se estudió en tres niveles, uno inferior, uno intermedio y uno superior. Específicamente, el rango estudiado para cada factor se muestra en la Tabla 1. La variable respuesta estudiada fue la concentración total de flavonoles presentes en el bulbo de cebolla roja (Y_{TF} , mg g^{-1}), calculada como suma total de la concentración de cada uno de los 7 flavonoles individuales obtenidos mediante UHPLC. El diseño consistió por tanto en 54 experimentos con seis puntos centrales para el cálculo del error. Todos los experimentos fueron realizados de manera aleatoria. Estos experimentos, junto con los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 1.

Mediante el tratamiento de los resultados obtenidos haciendo uso de RSM se obtiene un modelo matemático que se ajusta lo mejor posible a las respuestas experimentales obtenidas en función de las condiciones empleadas. La significancia estadística, la falta de ajuste y los términos de regresión se evaluaron a partir del análisis de la varianza (ANOVA). La calidad del ajuste del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2). Para llevar a cabo todo el diseño experimental se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, Estados Unidos).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desarrollo del método de UAE

Los resultados del diseño de experimentos (Tabla 1) se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el objetivo de evaluar el efecto de los factores de interés, así como las posibles interacciones entre ellos. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2. A partir de los resultados obtenidos se puede determinar que el análisis explica el 85,01% de la variabilidad total, lo cual es consistente con la semejanza estadística entre los valores experimentales y teóricos mostrados en la Tabla 1. Además, a raíz de estos resultados se puede conocer qué factores y/o interacciones son influyentes en la respuesta. Se consideró que aquellos factores y/o interacciones con p -valores inferiores a 0,05 tenían una influencia significativa en la respuesta al nivel de significancia seleccionado (95%). Esta información se suplementa con el gráfico de Pareto (Figura 2), a partir del cual se puede conocer de manera más sencilla y visual los factores o inte-

racciones influyentes. Aquellos factores y/o interacciones cuya barra horizontal supere la línea vertical son considerados influyentes.

En el caso concreto de la extracción de flavonoles en cebolla roja, las variables lineales más significativas (p -valor $< 0,05$) fueron el porcentaje de metanol en el disolvente y la amplitud del ultrasonido. Con respecto a las interacciones, la interacción cuadrática porcentaje de metanol-porcentaje de metanol, la interacción amplitud-amplitud y la interacción porcentaje de metanol-pH mostraron también un efecto significativo en la extracción de flavonoles. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía, los cuales indican que el porcentaje de metanol, el pH y la amplitud son variables muy influyentes en la extracción de compuestos bioactivos de matrices naturales¹⁷⁻¹⁹.

Concretamente, el porcentaje de metanol mostró un efecto positivo en la variable respuesta, lo cual indica que un incremento en el porcentaje de metanol del disolvente favorece la extracción de los flavonoles en cebolla roja. Las investigaciones han demostrado que las mezclas hidroalcohólicas son más eficientes que los disolventes puros en la extracción de moléculas anfífilas o moderadamente polares, como los polifenoles¹⁶. Esto se debe a la polaridad intermedia de tales mezclas, que es similar a las de los compuestos fenólicos. Esta similitud de polaridades mejora la solubilidad de los compuestos de interés en el disolvente, lo cual favorece su posterior extracción.

Con respecto a la amplitud, esta mostró un efecto negativo en la variable respuesta, lo cual indica que un incremento en la amplitud del ultrasonido puede desfavorecer la extracción de los flavonoles en cebolla roja. La energía proporcionada por el ultrasonido es necesaria para liberar los compuestos objetivo de la matriz, sin embargo, también puede acelerar el proceso de degradación de los compuestos fenólicos²⁰. Se ha encontrado que durante la extracción asistida por ultrasonido (durante 30 min) se puede producir una degradación de hasta el 75%²¹ **y todas las reacciones se promueven cuando se utilizan amplitudes altas**²², incluida la formación de radicales libres. En esos casos, los flavonoles pueden actuar como compuestos de eliminación en especies reactivas de oxígeno, y luego sufrir reacciones de oxidación.

3.2. Condiciones óptimas

Por último, del diseño de Box-Behnken se puede extraer información sobre los valores óptimos de cada factor para obtener una respuesta máxima, es decir, una mejor extracción de los flavonoles. Concretamente, para UAE se obtuvieron los siguientes valores óptimos: 79% de metanol en agua como disolvente, 60 °C como temperatura de extracción, 53,5% como amplitud del ultrasonido, ciclo de 0,54 s, pH 2 y 10,8 mL:0,2 g de "ratio". La temperatura óptima fue de 60 °C. Esto concuerda con los resultados encontrados en la bibliografía según los cuales altas temperaturas provocan que la tasa de transferencia de masa se incremente, al igual que la solubilidad, resultando en un mayor rendimiento global^{23,24}. De igual manera, tal y como se comentó anteriormente, el porcentaje de metanol óptimo también fue elevado (79%), lo cual indica que los flavonoles extraídos son moderadamente polares y por ello se extraen mejor con disolventes con mayor porcentaje de metanol que de agua. Con respecto al pH óptimo, este fue un pH ácido de 2. La acidificación del disolvente también ayuda a aumentar la eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos²⁵. Los ácidos en los disolventes juegan un papel clave en la rotura de las membranas celulares, mejorando así la liberación y solubilización de los compuestos de interés, como en este caso de los flavonoles de la matriz de cebolla²⁶.

3.3. Estudio de la cinética de extracción

Una vez obtenidos los valores óptimos, estos se emplearon para estudiar la cinética de extracción del método. Para ello, se realizaron experimentos dejando fijos los valores óptimos de los factores ya estudiados y variando el tiempo, con el objetivo de optimizarlo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los tiempos estudiados fueron 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. A partir de la gráfica puede apreciarse como los extractos que fueron sometidos a ultrasonidos durante 2 minutos presentan unos resultados mayores, es decir, una mayor cantidad de flavonoles totales extraídos. Además, a partir de los 2 minutos, un mayor tiempo de aplicación de ultrasonidos va dando lugar cada vez a peores resultados. Este hecho puede deberse a que los extractos empiezan a degradarse al verse sometidos a un largo tiempo de ultrasonidos a la temperatura de extracción programada.

3.4. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Por último, para dar por finalizado el estudio de la extracción de flavonoles por ultrasonidos de matrices de cebollas rojas, se llevó a cabo un estudio de la repetibilidad y precisión intermedia de dicho método. Para ello se realizaron un total de treinta experimentos durante tres días consecutivos, llevando a cabo diez experimentos cada uno de los días. Los resultados de repetibilidad obtenidos fueron del 3,61%, mientras que los de precisión intermedia fueron del 4,05%. Al ser ambos valores inferiores al 5%, el método se puede considerar que presenta buena repetibilidad y precisión intermedia, ya que suele considerarse en este tipo de trabajos un 5% como máximo error permitido²⁷. Al aplicar el método de UAE desarrollado bajo las condiciones de extracción óptimas se consiguió extraer $9,84 \pm 0,438$ mg flavonol g^{-1} de la matriz de cebolla roja en un tiempo de extracción de tan solo 2 min.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado y optimizado un método preciso de extracción asistida por ultrasonidos que permite la extracción de los flavonoles mayoritarios de matrices de cebolla roja. Las variables de extracción más influyentes obtenidas fueron el porcentaje de metanol (79% de metanol en agua), la amplitud (53,5%) y el pH (pH del disolvente 2). Además, el método de extracción desarrollado proporciona un ahorro sustancial de tiempo pues solo 2 minutos de extracción son suficientes para obtener unos rendimientos óptimos. Esta reducción en el tiempo de extracción conlleva también una reducción de disolventes y costes en comparación con los métodos empleados anteriormente. El método desarrollado presenta también una buena repetibilidad y precisión intermedia. Todos estos resultados, unidos al desarrollo de un método de análisis por UHPLC rápido y sencillo para el análisis y cuantificación de los flavonoles extraídos, hacen que el método UAE desarrollado pueda considerarse como una técnica adecuada para la extracción de compuestos bioactivos de matrices de cebolla roja. Esto es de gran interés para las industrias porque permite estudiar de manera rápida y eficaz la calidad de la cebolla y los productos elaborados a partir de ella, y por tanto también para la salud de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

1. BÖTTCHER, C., KRÄHMER, A., STÜRTZ, M., WIDDER, S. & SCHULZ, H. "Comprehensive metabolite profiling of onion bulbs (*Allium cepa*) using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *Metabolomics*, 13, (4), 2017, 1–15.
2. BLOCK, E. "The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur", *Angewandte Chemie International Edition in English*, 31, (9), 1992, 1135–1178.
3. HIGUCHI, O., TATESHITA, K. & NISHIMURA, H. "Antioxidative Activity of Sulfur-Containing Compounds in *Allium* Species for Human Low-Density Lipoprotein (LDL) Oxidation in Vitro", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, (24), 2003, 7208–7214.
4. XIAO, H. & PARKIN, K. L. "Antioxidant functions of selected *Allium* thiosulfinates and S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (9), 2002, 2488–2493.
5. KO, E. Y., SHARMA, K. & NILE, S. H. "Effect of harvesting practices, lifting time, curing methods, and irrigation on quercetin content in onion (*Allium cepa* L.) cultivars", *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28, (9), 2016, 594–600.
6. SHARMA, K., ROK LEE, Y., PARK, S. W. & NILE, S. H. "Importance of growth hormones and temperature for physiological regulation of dormancy and sprouting in onions", *Food Reviews International*, 32, (3), 2016, 233–255.
7. HERTOOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H. & VENEMA, D. P. "Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, (9), 1992, 1591–1598.
8. SIDDIQ, M., ROIDOUNG, S., SOGI, D. S. S. & DOLAN, K. D. D. "Total phenolics, antioxidant properties and quality of fresh-cut onions (*Allium cepa* L.) treated with mild-heat", *Food Chemistry*, 136, (2), 2013, 803–806.
9. KO, E. Y., NILE, S. H., JUNG, Y. S. & KEUM, Y. S. "Antioxidant and antiplatelet potential of different methanol fractions and flavonols extracted from onion (*Allium cepa* L.)", *3Biotech*, 8, (3), 2018, 1–10.

10. CORELL, L., ARMENTA, S., ESTEVE-TURRILLAS, F. A. & DE LA GUARDIA, M. "Flavonoid determination in onion, chili and leek by hard cap espresso extraction and liquid chromatography with diode array detection", *Microchemical Journal*, 140, 2018, 74–79.
11. KHIARI, Z., MAKRIS, D. P. & KEFALAS, P. "An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems", *Food and Bioprocess Technology*, 2, (4), 2009, 337–343.
12. KIASOS, E., MYLONAKI, S., MAKRIS, D. P. & KEFALAS, P. "Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, (2), 2009, 246–252.
13. GONZÁLEZ DE PEREDO, A. V., VÁZQUEZ-ESPINOSA, M., ESPADA-BELLIDO, E., FERREIRO-GONZÁLEZ, M., AMORES-ARROCHA, A., PALMA, M., BARBERO, F. G., JIMÉNEZ-CANTIZANO, A. "Alternative Ultrasound-Assisted Method for the Extraction of the Bioactive Compounds Present in Myrtle (*Myrtus communis* L.)", *Molecules*, 24, (5), 2019, 1–22.
14. ESPADA-BELLIDO, E., FERREIRO-GONZÁLEZ, M., CARRERA, C., PALMA, M., BARROSO, C. G., BARBERO, G. F. "Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp", *Food Chemistry*, 219, 2017, 23–32.
15. LUZ M. ZAPATA; ANA M. HEREDIA; CARLOS F. QUINTEROS; ANTONIO D. MALLERET; GABRIELA CLEMENTE; JUAN A. CÁRCEL. "Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos", *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25, (49), 2014, 166–192.
16. FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., FERREIRA, H. S., MATOS, G. D., DAVID, J. M., BRANDÃO, G. C., DA SILVA, E. G. P., PORTUGAL, L. A., DOS REIS, P. S., SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods", *Analytica Chimica Acta*, 597, (2), 2007, 179–186.
17. KIDAK, R. & INCE, N. H. "Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols : A review of current research", *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, (3), 2006, 195–199.

18. MACHADO, A. P. D. F., PASQUEL-REÁTEGUI, J. L., BARBERO, G. F. & MARTÍNEZ, J. "Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods", *Food Research International*, 77, 2015, 675–683.
19. MACHADO, A. P. D. F., PEREIRA, A. L. D., BARBERO, G. F. & MARTÍNEZ, J. "Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination", *Food Chemistry*, 231, 2017, 1-10.
20. CARRERA, C., RUIZ-RODRÍGUEZ, A., PALMA, M., BARROSO, C. G. "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes", *Analytica Chimica Acta*, 732, 2012, 100–104.
21. BIESAGA, M. "Influence of extraction methods on stability of flavonoids", *Journal of Chromatography A*, 1218, (18), 2011, 2505–2512.
22. LUQUE DE CASTRO, M. D. & PRIEGO-CAPOTE, F. "Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool", *Analytica Chimica Acta*, 583, (1), 2007, 2–9.
23. WIJNGAARD, H., HOSSAIN, M. B., RAI, D. K. & BRUNTON, N. "Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin", *Food Research International*, 46, (2), 2012, 505–513.
24. WIJNGAARD, H. H., BALLAY, M. & BRUNTON, N. "The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids", *Food Chemistry*, 133, (4), 2012, 1123–1130.
25. IVANOVIC, J., TADIC, V., DIMITRIJEVIC, S., STAMENIC, M., PETROVIC, S., ZIZOVIC, I. "Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar Čačanska Bestrna", *Industrial Crops and Products*, 53, 2014, 274–281.
26. JU, Z. Y. & HOWARD, L. R. "Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, (18), 2003, 5207–5213.
27. AOAC Peer Verified Methods Advisory Committee. *AOAC Peer Verified Methods Program*. USA, AOAC International: Gaithersburg, 1998.

Tabla 1. Diseño de experimentos de BBD para la extracción de flavonoles de cebollas rojas.

EXPERIMENTO	FACTORES*						RESPUESTAS	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	YTF (mg g ⁻¹)	
							Experimental	Teórico
1	0	0	-1	0	-1	-1	7,996	7,940
2	0	0	1	0	-1	-1	7,590	7,780
3	0	0	-1	0	1	-1	7,149	7,027
4	0	0	1	0	1	-1	7,089	6,718
5	0	0	-1	0	-1	1	6,672	6,894
6	0	0	1	0	-1	1	6,645	6,916
7	0	0	-1	0	1	1	7,555	7,215
8	0	0	1	0	1	1	6,881	7,087
9	0	-1	0	-1	-1	0	7,250	7,257
10	0	1	0	-1	-1	0	7,326	7,565
11	0	-1	0	1	-1	0	6,895	7,128
12	0	1	0	1	-1	0	7,507	7,649
13	0	-1	0	-1	1	0	7,098	7,169
14	0	1	0	-1	1	0	7,236	6,790
15	0	-1	0	1	1	0	7,188	7,162
16	0	1	0	1	1	0	7,217	6,997
17	-1	0	-1	-1	0	0	2,956	3,472
18	1	0	-1	-1	0	0	6,879	6,548
19	-1	0	1	-1	0	0	3,160	3,387
20	1	0	1	-1	0	0	6,517	6,065
21	-1	0	-1	1	0	0	2,772	3,297
22	1	0	-1	1	0	0	6,820	6,520
23	-1	0	1	1	0	0	3,087	3,492
24	1	0	1	1	0	0	6,907	6,318
25	0	-1	-1	0	0	-1	7,355	7,376
26	0	1	-1	0	0	-1	7,248	7,515
27	0	-1	1	0	0	-1	6,737	7,140
28	0	1	1	0	0	-1	6,985	7,282
29	0	-1	-1	0	0	1	7,164	7,017
30	0	1	-1	0	0	1	7,270	7,017
31	0	-1	1	0	0	1	7,379	6,963
32	0	1	1	0	0	1	7,135	6,965
33	-1	-1	0	0	-1	0	4,646	4,369

34	1	-1	0	0	-1	0	6,798	6,591
35	-1	1	0	0	-1	0	5,677	4,884
36	1	1	0	0	-1	0	6,875	6,905
37	-1	-1	0	0	1	0	3,755	3,513
38	1	-1	0	0	1	0	6,812	7,393
39	-1	1	0	0	1	0	2,922	3,342
40	1	1	0	0	1	0	6,530	7,020
41	-1	0	0	-1	0	-1	5,565	4,865
42	1	0	0	-1	0	-1	6,598	7,069
43	-1	0	0	1	0	-1	4,148	4,144
44	1	0	0	1	0	-1	6,890	6,495
45	-1	0	0	-1	0	1	2,699	3,168
46	1	0	0	-1	0	1	6,786	6,717
47	-1	0	0	1	0	1	4,363	3,819
48	1	0	0	1	0	1	6,742	7,516
49	0	0	0	0	0	0	7,352	7,498
50	0	0	0	0	0	0	7,644	7,498
51	0	0	0	0	0	0	7,746	7,498
52	0	0	0	0	0	0	7,525	7,498
53	0	0	0	0	0	0	7,310	7,498
54	0	0	0	0	0	0	7,412	7,498

*X corresponde a cada uno de los factores estudiados: X1, %metanol; X2, pH; X3, temperatura; X4, amplitud; X5, ciclo; X6, ratio.

Tabla 2. Resultados del análisis de ANOVA de la extracción UAE de flavonoles.

		COEFICIENTES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F-VALOR	P-VALOR
Constante		7,50					
A:%MeoH	X1	1,48	52,23	1	52,23	203,52	0,0000
B:Temperatura	X2	0,04	0,03	1	0,03	0,12	0,7336
C:Amplitud	X3	-0,07	0,12	1	0,12	0,48	0,4936
D:Ciclo	X4	0,02	0,01	1	0,01	0,04	0,8527
E:pH	X5	-0,19	0,82	1	0,82	3,21	0,0849
F:Ratio	X6	-0,17	0,69	1	0,69	2,67	0,1142
AA	X12	-1,94	38,79	1	38,79	151,15	0,0000
AB	X1X2	-0,05	0,02	1	0,02	0,08	0,7803
AC	X1X3	-0,10	0,08	1	0,08	0,31	0,5837
AD	X1X4	0,04	0,02	1	0,02	0,08	0,774
AE	X1X5	0,41	1,37	1	1,37	5,35	0,0288
AF	X1X6	0,34	0,90	1	0,90	3,53	0,0717
BB	X22	-0,05	0,02	1	0,02	0,09	0,7724
BC	X2X3	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,9975
BD	X2X4	0,05	0,02	1	0,02	0,09	0,7688
BE	X2X5	-0,17	0,47	1	0,47	1,84	0,1872
BF	X2X6	-0,03	0,01	1	0,01	0,04	0,8476
CC	X32	-0,44	1,99	1	1,99	7,75	0,0099
CD	X3X4	0,07	0,04	1	0,04	0,15	0,6993
CE	X3X5	-0,04	0,01	1	0,01	0,04	0,8357
CF	X3X6	0,05	0,03	1	0,03	0,13	0,723
DD	X42	-0,23	0,54	1	0,54	2,11	0,1586
DE	X4X5	0,03	0,01	1	0,01	0,03	0,8652
DF	X4X6	0,34	0,94	1	0,94	3,67	0,0664
EE	X52	-0,01	0,00	1	0,00	0,00	0,9589
EF	X5X6	0,31	0,76	1	0,76	2,96	0,097
FF	X62		0,22	1	0,22	0,86	0,3610
Error total			6,67	26	0,26		
Total (corr.)			119,10	53			

Figura 1. Cromatograma de los 7 flavonoles identificados. 1. Quercetina 3,7,4'-triglucósido, 2. Quercetina 7,4'-diglucósido, 3. Quercetina 3,4'-diglucósido, 4. Isorhamnetina 3,4'-diglucósido, 5. Quercetina 3-glucósido, 6. Quercetina 4-glucósido, e 7. Isorhamnetina 4'-glucósido.

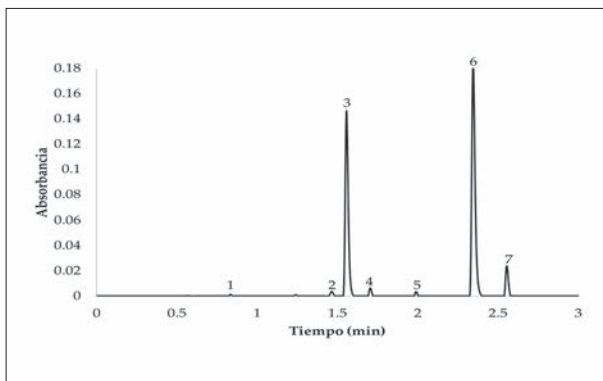


Figura 2. Diagrama de Pareto de la extracción por UAE de flavonoles.

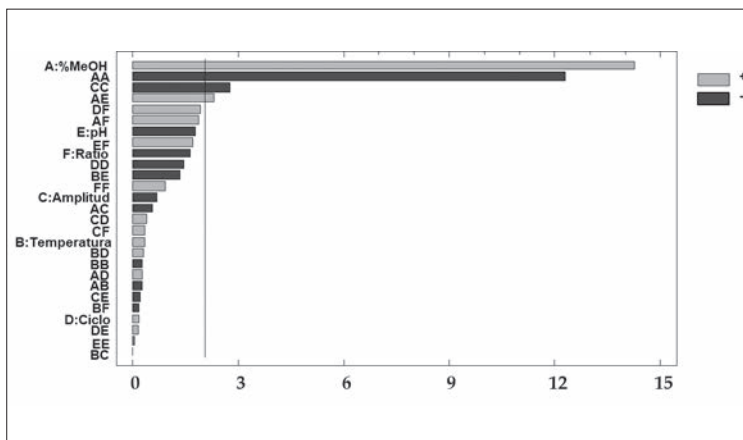


Figura 3. Optimización del tiempo para la extracción de flavonoles por UAE.

