



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

*Este trabajo ha sido financiado con el Proyecto de Investigación*

*RTA2014-00062-00-00: “Genómica aplicada a la selección de patrones mejor adaptados al cambio climático y variedades de almendro con alta calidad de fruto”*

*INIA-Ministerio de Economía y Competitividad (2016-2018)*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Características nutricionales de la almendra.....	5
1.2 Compuestos fitoquímicos en frutos secos.....	6
1.3 Compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante.....	9
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1 REACTIVOS Y PATRONES .....	11
3.2 Equipamiento y material .....	12
3.3 Muestras: origen y preparación.....	14
3.4 Extracción de antioxidantes .....	15
3.5 Determinaciones analíticas .....	16
a) Determinación de polifenoles totales .....	16
b) Determinación de flavonoides totales .....	17
c) Determinación de proantocianidinas totales .....	18
d) Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo FRAP .....	20
e) Determinación de compuestos fenólicos por HPLC .....	22
3.6 Validación de los métodos analíticos.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1 Extracción de antioxidantes .....	27
4.2 Validación de los métodos analíticos.....	28
4.3 Análisis de genotipos de almendra .....	31
5. CONCLUSIONES.....	46
6. BIBLIOGRAFÍA .....	47

## RESUMEN

Las almendras son uno de los frutos secos más populares, producidas y consumidas en todo el mundo. Nutricionalmente son reconocidas por su perfil lipídico y por su contenido en antioxidantes, principalmente tocoferoles. Sin embargo, el término antioxidantes agrupa numerosos tipos de compuestos químicamente diferentes, y es importante conocer la contribución de los distintos grupos a la calidad del fruto.

Con la finalidad de aportar nuevos datos en la investigación de once genotipos seleccionados de almendras españolas, en este trabajo se ha optimizado un sistema de extracción de antioxidantes y se ha cuantificado por medio de técnicas espectrofotométricas el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales, y proantocianidinas totales. También se han identificado trece compuestos antioxidantes por cromatografía de alta resolución con detectores Diodo Array y Fluorescencia. Cinco flavonoides han sido cuantificados en las almendras estudiadas: (+)-catequina, (-)-epicatequina, isorhamnetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido e isorhamnetina -3-O-rutinósido.

Además, se ha determinado la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro), y se ha verificado la existencia de una alta correlación con el contenido total de compuestos antioxidantes estudiados.

Los resultados obtenidos amplían el conocimiento de la composición y calidad del fruto en los genotipos de almendras analizadas, distinguiendo dos grupos en función de los parámetros estudiados.

## **ABSTRACT**

Almonds are one of the most popular nuts, produced and consumed throughout the world. Nutritionally they are recognized for their lipid profile and for their antioxidant content, mainly tocopherols. However, the term antioxidants groups together many different types of chemically different compounds, and it is important to know the contribution of these different groups to the quality of the fruit.

In order to provide new data in the research of eleven selected genotypes of Spanish almonds, this work has optimized an antioxidant extraction system and has quantified the content of total polyphenols, total flavonoids, and total proanthocyanidins by means of spectrophotometric techniques. Thirteen antioxidant compounds have also been identified by high resolution chromatography with Diode Array and Fluorescence detectors. Five flavonoids have been quantified in the almonds studied: (+)-catechin, (-)-epicatechin, isorhamnetine-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside and isorhamnetine-3-O-rutinoside.

In addition, the antioxidant activity has been determined by the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test, and the existence of a high correlation with the total content of antioxidant compounds studied has been verified.

The results obtained broaden the knowledge of the composition and quality of the fruit in the genotypes of almonds analysed, differentiating two groups according to the parameters studied.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las almendras (*Prunus dulcis* (Mill.)) pertenecen a la familia de las Rosáceas y son uno de los frutos secos más populares a nivel mundial (Jahanban-Esfahlan, *et al.*, 2010). Del mismo modo que otros frutales de hueso, el almendro tiene su origen en Asia Central. La proximidad de poblaciones de almendros silvestres a centros de civilizaciones de las montañas de Asia Central hizo posible su cultivo desde épocas remotas. La expansión por diferentes países asiáticos se vio favorecida por el hecho de que la semilla era al mismo tiempo la unidad de propagación y la parte comestible (Felipe, *et al.*, 2017).

El almendro se viene cultivando en los países mediterráneos desde épocas antiguas, habiendo sido propagado casi exclusivamente mediante la siembra de sus semillas. A medida que se difundió el uso del injerto en estos países, fueron utilizándose las variedades locales adaptadas y asociadas a zonas de producción con condiciones ambientales específicas (Felipe, *et al.*, 2017).

Estados Unidos es el mayor productor de almendras del mundo y la mayoría de las almendras estadounidenses se cultivan en California. Las cinco variedades americanas principales incluyen Nonpareil, Mission, California, Neplus Ultra y Peerless (Jahanban-Esfahlan & Jamei, 2012). El tercer país con mayor producción de almendras es España. En 2017, produjo un total de 255503 toneladas (Ministerio de Agricultura, 2017).

En los últimos años numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Tienen también efectos antiinflamatorios y son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Quiñones, *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el consumo regular de las almendras, como parte de una dieta equilibrada, puede ayudar a prevenir la aparición de la obesidad, así como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas asociadas con el daño oxidativo (Smeriglio, *et al.*, 2016).

## 1.1 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA ALMENDRA

La parte comestible de la almendra es la semilla. En la figura 1 se presenta una imagen de la sección transversal del fruto. Además de su utilización en alimentación, consumidas tanto enteras como elaboradas en un gran número de productos derivados, son muy solicitadas por la industria farmacéutica y cosmética. Las almendras se valoran por encima de cualquier otro fruto seco por su diversidad de usos, siendo el más demandado por los tecnólogos, los diseñadores de nuevos alimentos, los cocineros y los científicos (Felipe, *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Sección transversal de una almendra (Felipe, *et al.*, 2017).

El elevado valor nutritivo de las almendras proviene especialmente de su alto contenido en aceite que, si bien constituye una fuente elevada de calorías, no contribuye a la formación de colesterol por su nivel muy alto de ácidos grasos no saturados. Además, la proteína de las almendras es de muy elevada calidad y de fácil asimilación (Felipe, *et al.*, 2017). En la tabla 1 se muestra los datos medios de componentes nutricionales de la almendra que figuran en la Base Española de Composición de Alimentos (BEDCA).

**Tabla 1.** Datos de componentes nutricionales en almendra fresca. (BEDCA: [www.bedca.net](http://www.bedca.net))

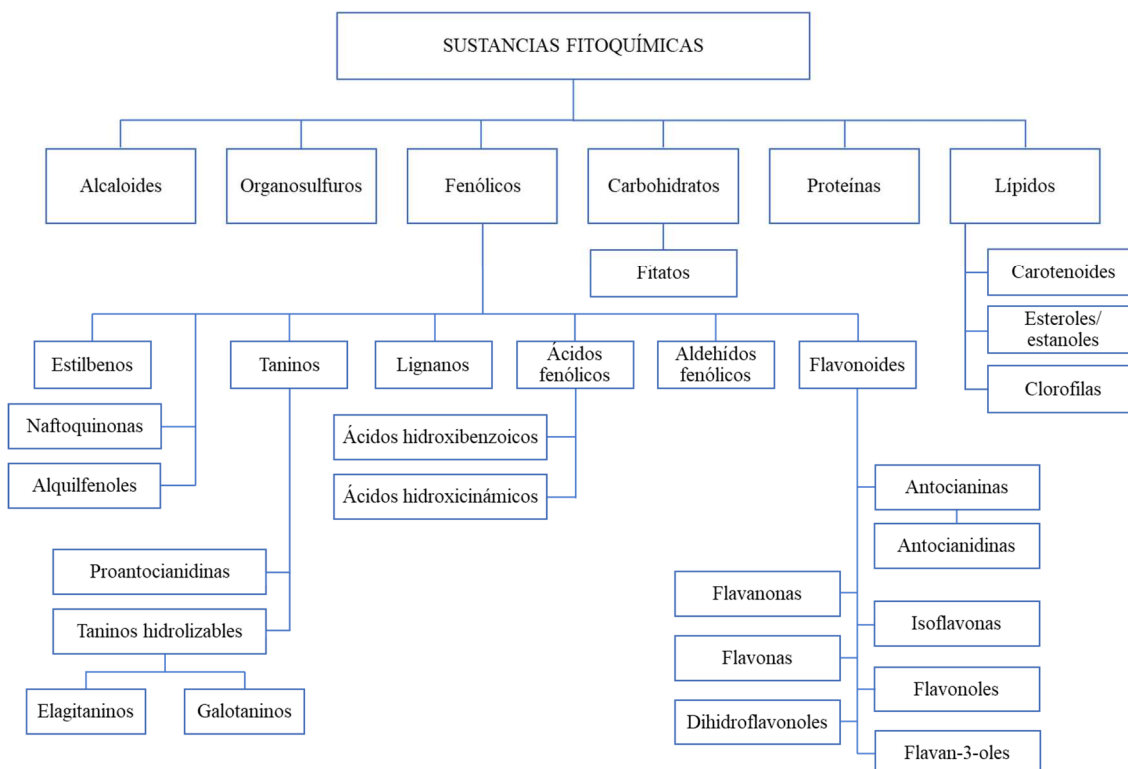
<b>Componente</b>	<b>g/100g almendra</b>
Humedad	5.87
Grasa	45.22
Proteína	19.13
Fibra	8.35
Carbohidratos	6.20

La revisión hecha por Yada *et al.* (2011) muestra unos rangos medios de composición nutricional de las almendras en diferentes regiones de producción. Los rangos de lípidos, proteínas y carbohidratos publicados son, respectivamente, 35-66; 16-23; 2.1-7.4g/100g almendra en California, 40-67; 15-22; 1.8-7.6g/100g almendra en España y 42-57; 18-20; 2.1-5.5 g/100g almendra en Italia.

Los ácidos grasos monoinsaturados suponen un 27.88g/100g almendra y los poliinsaturados 11.14g/100g almendra. Su principal vitamina es la E (24mg/100g) y sus minerales mayoritarios son: potasio (767.25mg/100g almendra), fósforo (524.87mg/100g almendra), magnesio (258.13mg/100g almendra) y calcio (248.25mg/100g almendra) (BEDCA: [www.bedca.net](http://www.bedca.net)).

## 1.2 COMPUESTOS FITOQUÍMICOS EN FRUTOS SECOS

Entre las sustancias químicas que sintetizan las plantas, o fitoquímicos, hay muchas que cuando se consumen son fisiológicamente activas (denominadas sustancias bioactivas) y que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos con efectos beneficiosos para la salud (Carbajal, 2013). En la figura 2 se presenta un esquema de la clasificación de fitoquímicos.



**Figura 2.** Esquema de fitoquímicos (Bolling, *et al.*, 2011).

El contenido de sustancias bioactivas de los frutos secos puede variar considerablemente según el tipo de fruto, el genotipo, las condiciones previas y posteriores a la cosecha y las condiciones de almacenamiento. El genotipo afecta a los ácidos fenólicos, los flavonoides, los estilbenos y los fitosteroles, pero faltan datos para muchas otras clases de fitoquímicos (Bolling, *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones, *et al.*, 2012).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de compuestos polifenólicos incluyen: ácidos fenólicos, aldehídos fenólicos, estilbenos, flavonoides, lignanos, y taninos. Aproximadamente 130 polifenoles diferentes se han identificado en la almendra, aunque no todos han sido cuantificados (Bolling, 2017). El presente trabajo ha estudiado los compuestos fenólicos, flavonoides y proantocianinas.

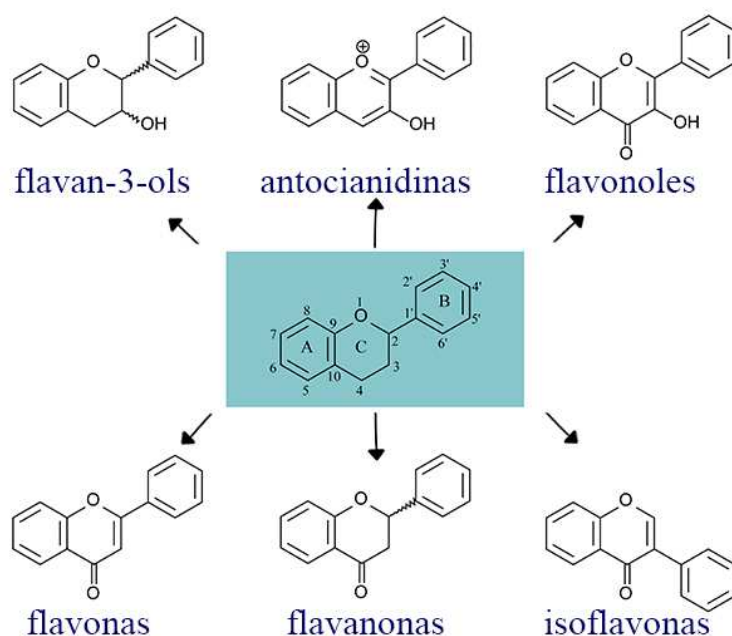
*Fenoles totales:* son una clase de sustancias bioactivas importante, e incluyen el término amplio "polifenoles", que significa una molécula con uno o más grupos fenólicos. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (Quiñones, *et al.*, 2012).

*Flavonoides:* son una subclase de compuestos fenólicos, con bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), formado por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico.

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides). Además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros o polímeros. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de

átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios (Quiñones, *et al.*, 2012).

Existen varios subgrupos de flavonoides que se clasifican en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides se muestran en figura 3, e incluyen: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavan-3-ols (Quiñones, *et al.*, 2012). En la base de datos Phenol Explorer (Neveu, *et al.*, 2010) se han registrado para las almendras valores medios de flavanoles ((+)-catequina, (+)-galactocatequina-3-O-galato, (-)-epicatequina y (-)-epigalactocatequina); flavanonas (eriodictiol, naringenina y naringenina-7-O-glucósido); flavonoles (6,8-dihidroxi-kaempferol, isorhamnetina, isorhamnetina-3-O-galactósido, kaempferol, kaempferol-3-O-galactósido, kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido, quercetina, quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-rutinósido).



**Figura 3.** Estructura básica de las subclases de flavonoides.

(Higdon, 2005)

**Proantocianidinas:** son monómeros de flavan-3-ol, oligómeros y polímeros que forman antocianidinas por hidrólisis en minerales ácidos (Bolling, 2017).

Las proantocianidinas de los frutos secos se componen principalmente de (+)-catequina y (-)-epicatequina. Solo las proantocianidinas de tipo A se han encontrado en almendras. La mayoría de ellas están altamente polimerizadas.

### 1.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La presencia de antioxidantes naturales en los alimentos es importante, no sólo porque estos compuestos contribuyen a definir las características organolépticas y a preservar la calidad nutricional de los productos que los contienen sino, además, porque al ser ingeridos, ayudan a preservar la salud de los individuos que los consumen (INTA, 2013).

En la ciencia de los alimentos, el antioxidante se define como una sustancia en los alimentos que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, disminuye o previene significativamente los efectos adversos de las especies reactivas, como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), sobre la función fisiológica normal en los seres humanos (Huang, *et al.*, 2005). Según esta definición, no todos los reductores que intervienen en una reacción química son antioxidantes; sólo los compuestos capaces de proteger el objetivo biológico de la oxidación cumplen este criterio.

Diferentes ensayos químicos pueden distinguir grupos de compuestos con importancia en la actividad antioxidante.

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza comúnmente como una medida no específica de "fenoles totales" o "polifenoles totales" (Singleton, *et al.*, 1999). Una reacción redox colorimétrica se produce entre el anión fenolato y el reactivo Folin-Ciocalteu después de un período de aproximadamente 60 minutos a temperatura ambiente (en oscuridad) (Granato, *et al.*, 2016).

La cuantificación de flavonoides se llevaba a cabo adoptando el método del acetato de plomo en medio acuoso y la posterior cuantificación del complejo metálico mediante gravimetría. Experimentos posteriores demostraron que este método no era adecuado ya que una gran cantidad de flavonoides permanecía en la disolución sin acomplejarse con el acetato de plomo. Actualmente los métodos usados emplean diferentes condiciones experimentales: pH del medio, tiempo de reacción, presencia o ausencia de cloruro de aluminio y lectura de absorbancia (Granato, *et al.*, 2016).

El ensayo Butanol-HCl es el más ampliamente utilizado para propósitos cuantitativos de proantocianidinas totales. Se trata de un sistema preciso, reproducible, estándar, económico y rápido para la cuantificación en diferentes matrices alimentarias (Granato, *et al.*, 2016).

La capacidad antioxidante está relacionada con los compuestos capaces de proteger un sistema biológico contra el efecto potencialmente dañino de procesos o reacciones que involucran especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). Estos efectos protectores de los antioxidantes han recibido cada vez más atención en los campos de la biología, la medicina, la nutrición y los agroquímicos y han dado lugar a la necesidad de métodos de determinación de la capacidad antioxidante simples, convenientes y fiables (Karadag, *et al.*, 2009).

En la bibliografía se recogen muchos métodos que difieren entre sí en términos de mecanismos de reacción, especies objetivo y oxidantes, condiciones de reacción y expresión de resultados (Huang, *et al.*, 2005). La mayor parte de los ensayos empleados para la determinación de la actividad antioxidante de un alimento se basan en la medición de la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado, o del potencial que tales compuestos tendrían para reducir un complejo formado entre iones Fe (III) y el reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina). Entre aquellos ensayos que se basan en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con un radical libre, cabe destacar los siguientes: Ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante como Equivalentes Trolox) y Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil). Y entre los que se basan en la medición del potencial destaca el ensayo FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro) (INTA, 2013).

Hasta el momento, no parece haber consenso para concluir el método más conveniente como método estándar para declarar la capacidad antioxidante total y puede deberse a diferentes razones, por ejemplo, las limitaciones para la determinación de los antioxidantes hidrófilos, los problemas que se presentan en la determinación del punto final de la reacción, la preocupación por la sensibilidad a la luz de los iniciadores o las sondas, la realización del análisis en la irrelevancia fisiológica del pH, la posible interferencia de ciertos componentes alimentarios, o el uso de diferentes normas para expresar los resultados que causan las dificultades en la comparación (Karadag, *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar los niveles de antioxidantes fenólicos en almendras españolas de genotipos seleccionados, para ampliar el conocimiento de la composición del fruto. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Poner a punto un método de extracción que permita determinar por métodos espectrofotométricos la cantidad de polifenoles totales, flavonoides totales, proantocianidinas totales y actividad antioxidante de las almendras y, con el mismo extracto, identificar y cuantificar por cromatografía de alta resolución los compuestos fenólicos individuales.
- Validar los métodos analíticos espectrofotométricos y cromatográficos.
- Aplicar los métodos a muestras de almendras de once genotipos cultivadas en Aragón y recogidas en la cosecha de 2017.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 REACTIVOS Y PATRONES

Los reactivos empleados en la parte experimental del estudio se detallan a continuación agrupados según el tipo de análisis:

- Cuantificación de polifenoles totales: reactivo de Folin & Ciocalteu's phenol (Panreac), ácido gálico (Sigma Aldrich) y carbonato de sodio (Carlo Erba).
- Análisis de flavonoides totales: nitrito sódico 98% (Alfa Aesar), cloruro de aluminio anhidro (VWR), hidróxido de sodio (Carlo Erba) y (+)-catequina hidrato (Sigma Aldrich).
- Análisis de proantocianidinas totales: n-butanol (Merck) y cloruro de cianidina (Extrasynthese).
- Capacidad antioxidante *Ensayo FRAP*: sulfato de hierro (II) heptahidrato, cloruro de hierro (III) hexahidrato y 2,4,6-Tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) 98% (Alfa Aesar), Trolox 97% (Acros Organics), acetato de amonio (Carlo Erba) y ácido clorhídrico al 37% (VWR).

- Cromatografía líquida de alta resolución: se utilizó para la fase móvil ácido fórmico (Merck) y metanol (VWR). Los patrones utilizados fueron (+)-catequina hidrato (Sigma Aldrich), quercetina dihidrato, quercetina-3-D-galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-rutisósido (Alfa Aesar), (-)-epicatequina, ácido protocatéquico, aldehído protocatéquico, ácido clorogénico, kaempferol-3-rutinósido, isorhamnetina-3-O-rutinósido, isorhamnetina-3-O-glucósido, naringenina (Extrasynthese) y daidzeína (Sigma Aldrich). Nitrógeno comprimido 5.0 (Messer Ibérica).

El agua utilizada en los ensayos fue de calidad Milli-Q

### 3.2 EQUIPAMIENTO Y MATERIAL

#### **Equipos**

- Balanza analítica Sartorius modelo BP-210S.
- Agitador Multi-Reax Heidolph con accesorio para 12 recipientes con diámetros de entre 16 y 32mm, velocidades de 150 a 2.000rpm y temporizador digital.
- Baño de ultrasonidos P-Selecta con temporizador.
- Centrífuga de alta velocidad P-selecta modelo “Medifriger” refrigerada con selector de temperatura regulable de -12 a 40 °C.
- Baño termostatzado P-selecta modelo “Precisdig”. Regulación electrónica y lectura digital del tiempo y de temperatura (desde ambiente +5 °C hasta 99.9 °C). Estabilidad:  $\pm 0.1$  °C.
- Rotatubos (VWR International).
- Concentrador de muestra con Nitrógeno, modelo SBHCONC/1 (Stuart Equipment).
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-1700 (Shimadzu). Incluye funciones de validación integrales y cuenta con una resolución de 1 nm. Es un espectrofotómetro con capacidad integrada para fotometrías, cinética, análisis, cuantificación y validación. Opera controlado por un ordenador mediante el software UV-Probe.

Las medidas realizadas durante el estudio se han realizado en modo continuo y en modo cinético de escaneo durante un tiempo fijado. Se utilizaron cubetas semimicro de cuarzo, material que permite hacer un barrido a todo el espectro Vis-UV, con una anchura de 10mm.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC modelo 1100 (Agilent Technologies). Consta de varios módulos independientes: bomba, inyector, horno para columna, detectores de diodos (DAD) y Fluorescencia (FLD) (modelo 1200). La columna utilizada fue: Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150mm, 5 $\mu$ m) (Zorbax). Software de control: Open Lab CDS Chemstation Edition. Rev.C.01.08.

En la figura 4 se presentan dos de los equipos empleados en el laboratorio.



**Figura 4.** A la izquierda aparece el Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Shimadzu modelo UV-1700 y a la derecha el cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1100.

### **Material**

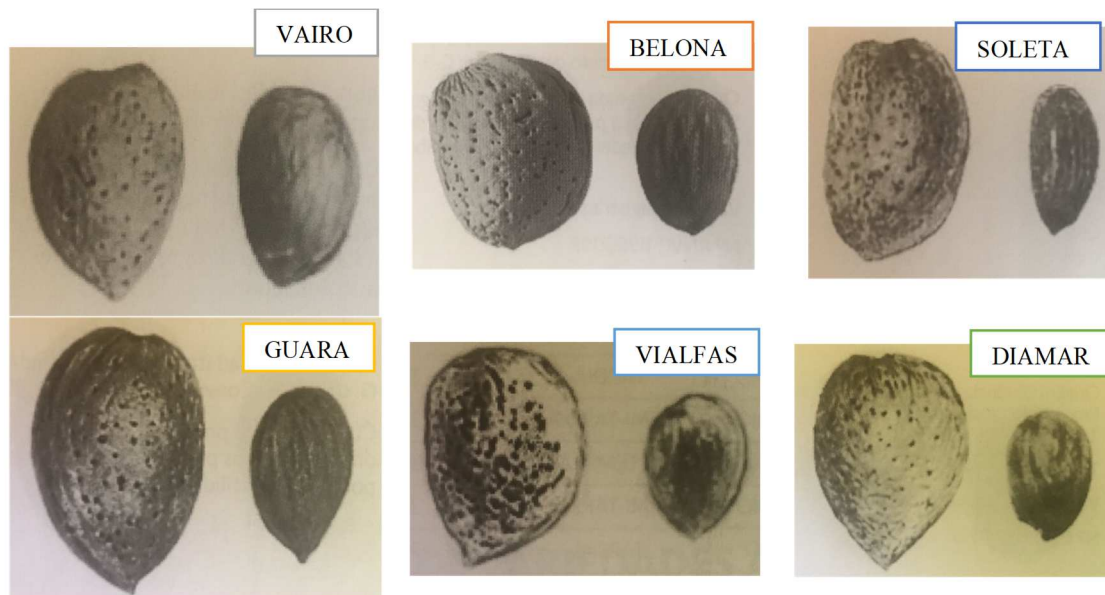
- Matraces aforados clase A de 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 y 200mL
- Vasos de precipitados 25, 100 y 500mL
- Embudos de vidrio
- Papel de filtro Whatman n°1, 125mm
- Filtros jeringa de nylon de 0.45 $\mu$ m, 25m
- Jeringas 10mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Pesasustancias 10mL
- Mortero
- Dewar 1L Jencons
- Tubos Falcon de 50mL
- Viales de vidrio de 40mL con tapón de rosca
- Viales de vidrio ámbar de 2mL con tapón de rosca y septum PTFE
- Gradillas para tubos y viales
- Frascos topacio con tapón de 100, 200 y 500mL
- Macropipeta de 10mL y micropipetas de 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L y 1mL

### 3.3 MUESTRAS: ORIGEN Y PREPARACIÓN

Las muestras objeto de estudio fueron once genotipos de almendras, cinco experimentales, G-2-22, G-3-3, G-3-4, G-5-25, I-3-67, y seis comercializadas, Belona-Isabelona, Diamar-Mardía, Guara, Soleta, Vairo y Vialfas. Una de ellas, la variedad Vairo, fue obtenida en el IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Mas Bover, Tarragona) y todas las demás fueron obtenidas en el CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón).

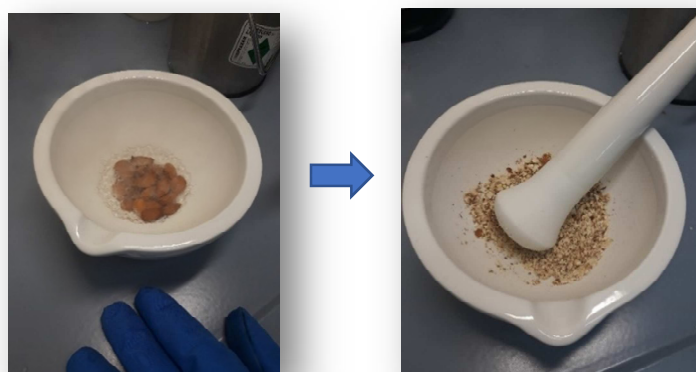
Todos los genotipos se han cultivado en Aragón (finca experimental de Caspe, CITA) en las mismas condiciones de suelo, riego y abonado. Los frutos se cosecharon durante su periodo de maduración en los meses de agosto y septiembre de 2017. Todas tenían consistencia de cáscara dura y se dejaron secar al aire de la misma forma y el mismo tiempo. Después se descascarillaron y se guardaron las semillas, enteras y con tegumento, introducidas en bolsas selladas al vacío correctamente identificadas. Las muestras se conservaron congeladas a -20°C hasta su análisis.

En la figura 5 se muestran los seis genotipos comerciales analizados en el estudio.



**Figura 5.** Almendras españolas comerciales analizadas. (Felipe, *et al.*, 2017)

En el momento de realizar los ensayos, la muestra se trituró en un mortero con nitrógeno líquido y se tamizó para obtener una muestra fina lo más homogénea posible (figura 6). La muestra picada y tamizada se analizó y el resto se guardó congelada en un bote tomamuestras perfectamente etiquetado.



**Figura 6.** Preparación de la muestra. A la izquierda las almendras con adición de N<sub>2</sub> líquido y a la derecha la muestra picada.

### 3.4 EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

El procedimiento optimizado y aplicado a las muestras, por triplicado, fue el siguiente:

Pesar en balanza analítica 0.5 g de muestra preparada en un tubo Falcon. Añadir 30mL de la disolución de extracción formada por ácido clorhídrico, agua Milli-Q y metanol (3.7:46.3:50, v/v/v). Agitar en oscuridad en Multi-Reax a 1700rpm durante 2h. Centrifugar 5 minutos a 3000 g a una temperatura de 4°C. Separar el sobrenadante filtrando los extractos con papel Whatman n°1 a un matraz de 100mL. Repetir el proceso extrayendo el residuo con otros 30mL de disolución de extracción durante 1h de agitación. Centrifugar y filtrar en el matraz anterior. Realizar una tercera extracción del residuo con 20mL de disolución de extracción, agitando durante 30 min. Filtrar, lavar el tubo Falcon y el papel de filtrado recogiendo y enrasando el matraz con la misma disolución (figura 7).



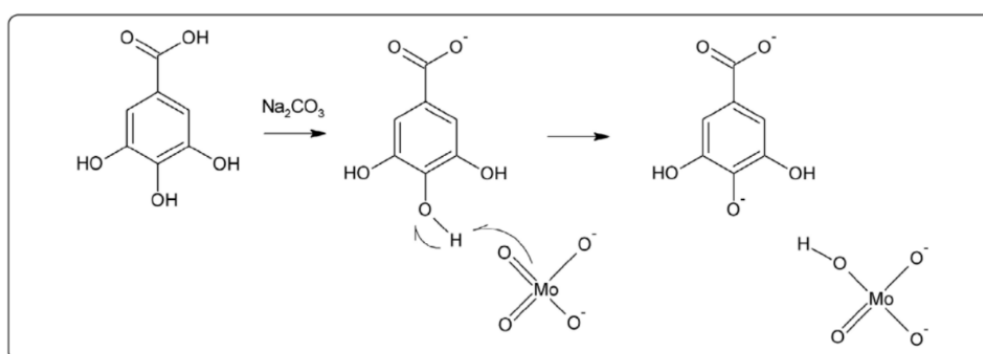
**Figura 7.** Proceso de extracción de las muestras.

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida, 4mL del extracto se evaporaron con nitrógeno hasta un volumen de 2mL. Se filtraron con filtro de jeringa de nylon a un vial ámbar para su inyección.

### 3. 5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### a) Determinación de polifenoles totales

El método de polifenoles totales tiene como referencia el método descrito por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventós (1999). El ensayo está basado en un mecanismo de transferencia de electrones en el que se produce una reacción redox colorimétrica (Matic, *et al.*, 2017). Para proporcionar condiciones básicas, el carbonato de sodio 1N se utiliza en la disociación de los protones fenólicos dando lugar a aniones fenolato mientras que el reactivo de Folin-Ciocalteu que contiene una mezcla de fosfotungstato y molibdeno, se reduce de Mo (VI) a Mo (V) (figura 8). Durante esta reducción se observa un cambio de coloración en la reacción ya que la disolución cambia de amarillo a azul. Dichos cambios en el color son proporcionales a la concentración de la muestra y se pueden medir por espectrofotometría.



**Figura 8.** Reacción entre el ácido gálico y el reactivo Folin Ciocalteu (Muñoz-Bernal, *et al.*, 2017)

La determinación de polifenoles se ha realizado siguiendo el protocolo descrito por distintos autores (Bolling, *et al.*, 2010), (Bolling, 2017), (Milbury, *et al.*, 2006), (Monagas, *et al.*, 2009) y (Mandalari, *et al.*, 2010). A 800  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q, se añadieron 200 $\mu\text{L}$  del extracto de muestra y 5mL de reactivo Folin Ciocalteu 1:10. La mezcla se dejó reposar en oscuridad 1 min y se añadieron 4mL de carbonato sódico 1N. Se agitó en el rotatubos 1 min y, seguidamente, se guardaron en oscuridad durante 1h para que tuviera lugar la reacción colorimétrica. Trascurrido ese tiempo se midieron la recta de calibrado y las muestras en el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible a una longitud de onda de 725nm.

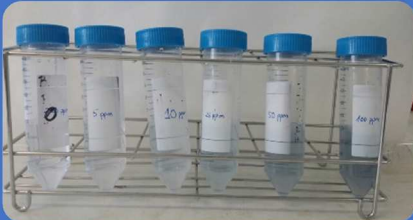
Las rectas de calibrado se prepararon usando como patrón de referencia ácido gálico de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir de una disolución madre de 0.1g de dicho ácido

disuelto en 100mL de la disolución de extracción. Los puntos de la recta de calibrado se prepararon como se describe en la tabla 2.

**Tabla 2.** Recta de calibrado para la determinación de polifenoles totales.

Concentración final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Volumen final (mL)	Volumen Disol. patrón $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )
5	25	125
10	25	250
25	25	625
50	25	1250
75	25	1875
100	10	1000

**Imagen recta calibrado P.T**



La siguiente fórmula se aplicó para la cuantificación de polifenoles totales:

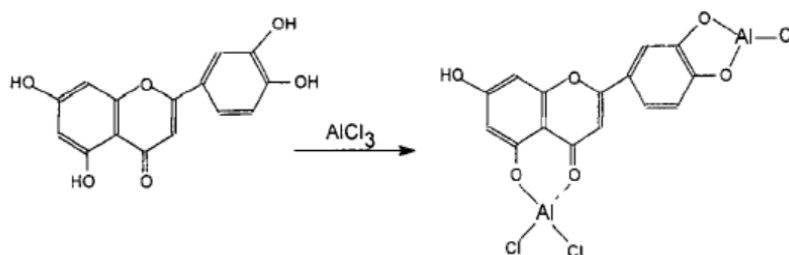
$$\text{mg AG}/100 \text{ g MF} = \frac{\text{Volumen final (L)} \cdot \frac{(\text{Abs} - a)}{m}}{\text{peso muestra (g)}} \cdot 100$$

Donde mg AG/ 100g MF, son mg de ácido gálico en 100g de muestra fresca, *Abs* la absorbancia medida, *a* la ordenada en el origen de la recta de calibrado y *m* la pendiente.

### b) Determinación de flavonoides totales

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se basó en el método de trabajo descrito por Zhishen, Mengcheng y Jianming (1999) y modificado por otros autores (Jahanban-Esfahlan & Jamei, 2012) y (Yildiz, *et al.*, 2014). Este método se basa en la reacción de los iones de aluminio con las moléculas flavonoides en condiciones básicas (figura 9). Los productos de esta reacción son quelatos rojos de aluminio-flavonoides capaces de absorber a una cierta longitud de onda.

La intensidad de color y la sensibilidad del método dependen del número de grupos hidroxilo en la molécula de flavonoides y de las propiedades de los iones de aluminio.



**Figura 9.** Formación del complejo con  $\text{Al}^{3+}$

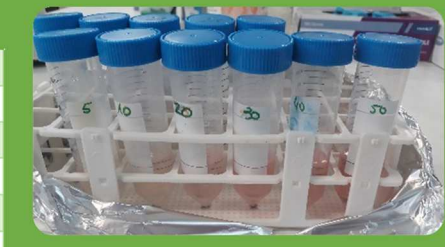
(Ulubelen, *et al.*, 2005)

Para la determinación de flavonoides totales, en un tubo Falcon se añadieron 7.5 mL de agua Milli-Q, 1.5mL de extracto de muestra y 0.45mL de nitrito de sodio al 5.3%. A continuación, se agitó en el rotatubos y se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Después se añadieron 0.9mL de AlCl<sub>3</sub> al 10% y se volvió a agitar en el rotatubos. Se dejó reposar 6 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, se añadieron 4mL de hidróxido de sodio 1N y 1.650mL de agua Milli-Q. Se agitó y midió, junto con la recta de calibrado, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510nm.

Para la cuantificación de flavonoides totales se preparó una recta de calibrado usando catequina como patrón. En la tabla 3 se muestra la preparación de los distintos puntos de la recta de calibrado, a partir de una disolución madre de 4000 µg.mL<sup>-1</sup> de catequina.

**Tabla 3.** Recta de calibrado para la determinación de flavonoides totales.

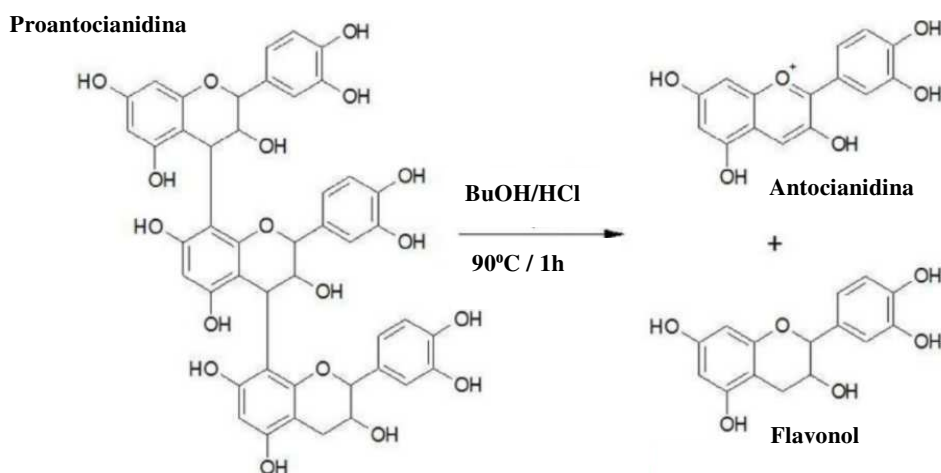
Concentración final (µg mL <sup>-1</sup> )	Volumen final (mL)	Volumen Disol. patrón 4000 µg mL <sup>-1</sup> (µL)	Imagen recta calibrado F.T
5	25	125	
10	25	250	
20	25	625	
30	25	1250	
40	25	1875	
50	10	1000	

Se aplicó la siguiente fórmula para la cuantificación de flavonoides totales, expresados como mg de catequina en 100g de muestra fresca:

$$mg\ CAT/100g\ MF = \frac{Volumen\ final\ (L) \cdot \frac{(Abs - a)}{m}}{peso\ muestra\ (g)} \cdot 100$$

### c) Determinación de proantocianidinas totales

Se siguió el procedimiento descrito por Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1966), basado en la transformación de las proantocianidinas en antocianidinas por calentamiento en medio ácido en presencia de Fe (II), con algunas modificaciones (Garrido, *et al.*, 2007) y (Garrido, *et al.*, 2008) (figura 10).



**Figura 10.** Reacción entre proantocianidina y BuOH/HCl a 90°C (Granato, et al., 2016)

En un tubo de vidrio con tapón de rosca, se introdujo 1 mL de muestra y 10 mL de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) 0.539 mM en n-butanol/ ácido clorhídrico concentrado (50:50, v/v). Se calentó en un baño de agua a 90°C durante una hora para que se completara la reacción. A continuación, se midió la absorbancia a 550 nm frente a un blanco, preparado al mismo tiempo y de igual forma, conteniendo 1mL de agua Milli-Q.

Para la recta de calibrado se utilizó como patrón cloruro de cianidina, a partir de una disolución madre de 500 µg.mL<sup>-1</sup> preparada en metanol. La recta de calibrado se preparó como se describe en la tabla 4.

**Tabla 4.** Recta de calibrado para la determinación de proantocianidinas totales.

Concentración final (µg mL <sup>-1</sup> )	Volumen final (mL)	Volumen Disol. patrón 500 µg mL <sup>-1</sup> (µL)
2	5	20
5	5	50
10	5	100
15	5	60
20	5	80
25	2	100

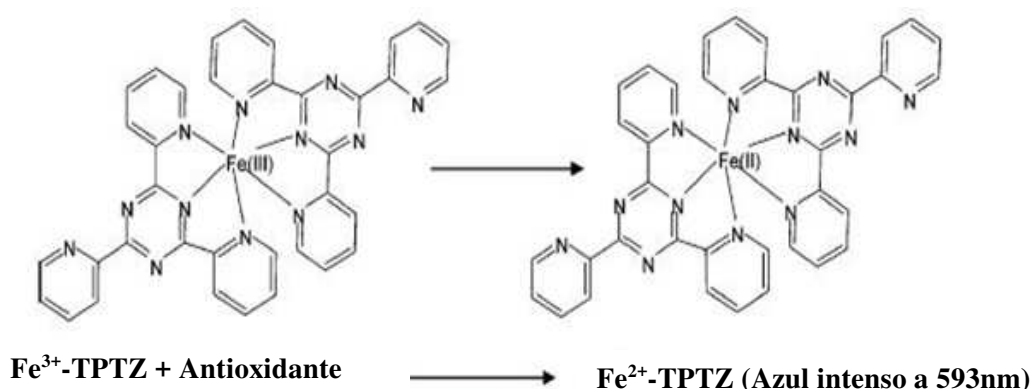
**Imagen recta calibrado PR.T**

Se aplicó la siguiente fórmula para la cuantificación de proantocianidinas totales, expresados como mg de cianidina en 100g de muestra fresca:

$$mg\ CND/100\ g\ MF = \frac{Volumen\ final\ (L) \cdot (Abs - a)}{peso\ muestra\ (g)} \cdot 100$$

#### d) Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo FRAP

Para el ensayo FRAP se siguió el método descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el complejo amarillo de tripiridiltriazina férrica (Fe (III) -TPTZ) a un complejo ferroso azul (Fe (II) -TPTZ) por la acción de antioxidantes donantes de electrones (figura 11). El color azul resultante de la reducción total de capacidad de antioxidantes donantes de electrones se mide espectrofotométricamente a 593 nm (Karadag, *et al.*, 2009). El ensayo FRAP para mantener la solubilidad del hierro necesita un pH ácido.



**Figura 11.** Reacción ensayo FRAP

(Prior, *et al.*, 2005)

El reactivo de trabajo, denominado FRAP, se prepara diariamente mezclando en un tubo Falcon 10.83mL buffer de acetato de amonio (300mM, pH= 3.6) con 1.085mL TPTZ preparado en HCl 40mM y 1.085mL de una disolución de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 20mM.


Se prepararon tubos en los que se añadió el reactivo FRAP y se calentaron en un baño termostatzado a 37°C durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de la mezcla FRAP a 593nm y se anotó como absorbancia inicial.

Tras la incubación de los tubos se añadió 1mL de muestra y se esperó 1h en ambiente de oscuridad a que se completara la reacción cinética y la lectura de absorbancia final tuviera un valor estable. La absorbancia inicial se restó de la lectura final obteniendo así una variación de absorbancia que se interpoló en las rectas de calibrado.

En este estudio se prepararon dos rectas de calibrado, una con FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y otra con el reactivo Trolox, para poder comparar los resultados con diferentes referencias bibliográficas.

En el primer caso se pesó 0.1g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se disolvió en 100mL de agua Milli-Q, obteniendo una disolución madre de  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de Fe (II) con la que se prepararon los distintos puntos de la recta. Para ello, a tubos Falcon que contenían el reactivo FRAP se les adicionó diferentes volúmenes de patrón según se detalla en la tabla 5.

**Tabla 5.** Recta de calibrado de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para el ensayo FRAP.

Concentración final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Volumen final (mL)	Volumen Disol. patrón $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Imagen recta calibrado FRAP
5	25	125	
10	25	250	
25	25	625	
50	20	1000	
75	20	1500	
100	20	2000	

Para la recta de calibrado con Trolox se procedió de la misma forma, pero añadiendo al reactivo FRAP el reactivo Trolox preparado con diferentes concentraciones. La preparación de los puntos de esta recta se indica en la tabla 6 a partir de una disolución madre de Trolox de  $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  que se obtuvo disolviendo 0.25g del reactivo en 10mL agua Milli-Q y metanol (50:50, v/v).

**Tabla 6.** Recta de calibrado con Trolox para el ensayo FRAP.

Concentración final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Volumen final (mL)	Volumen Disol. patrón $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )
1	5	250
2	5	500
5	5	1000
7,5	5	1875
10	5	2500
15	5	3750

En la determinación de la capacidad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol Fe}^{2+} / 100\text{g MF} = \frac{\text{Volumen final (L)} \cdot \frac{(\Delta\text{Abs} - a)}{m}}{\text{peso muestra (g)}} \cdot \frac{10^5}{Pm}$$

Siendo  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  en 100g de muestra fresca,  $\Delta\text{Abs}$  la variación de absorbancia medida,  $a$  la ordenada en el origen de la recta de calibrado,  $m$  la pendiente y  $Pm$  el peso molecular del sulfato de hierro (II) heptahidrato.

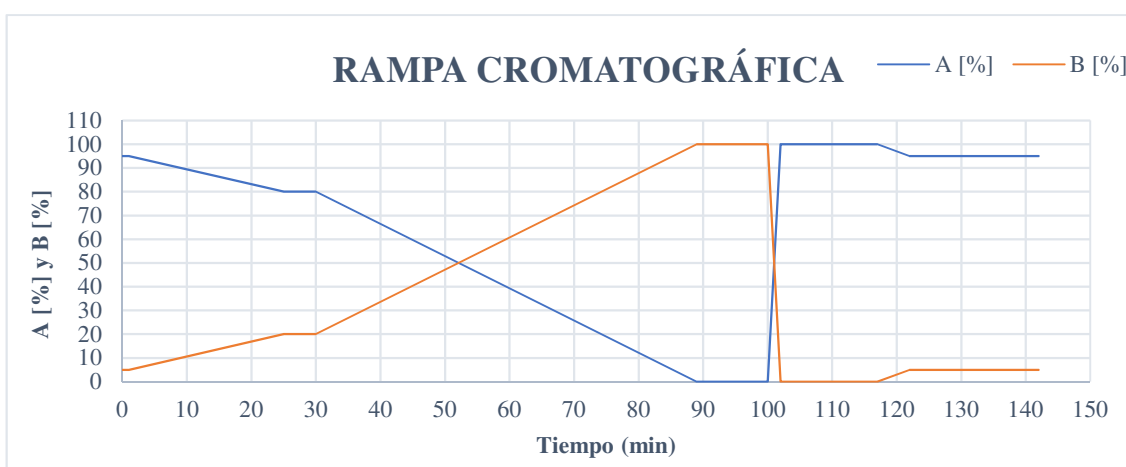
Cuando la recta utilizada contenía Trolox los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de TE en 100g de muestra fresca y se obtuvieron aplicando la misma fórmula.

### e) Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Para la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se empleó un equipo HPLC con detectores DAD y FLD, con las siguientes condiciones cromatográficas:

La fase móvil estaba formada por agua Milli-Q acidificada con ácido fórmico 1% (A=fase acuosa) y metanol (B=fase orgánica). El gradiente aplicado, expresado como % de A, fue: 0-1 min 95%, 1 a 25 min hasta 80%, 25-30 min 80% ,30 a 90 min hasta 0%, 90-100 min 0%, 100-102 hasta 100%, 102-122 min 100%, 122-123 min hasta 95%, 123 a 142 min 95%. (Figura 12) Se aplicó un flujo constante de 1 mL/min.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Eclipse XDB-C18 (150mm x 4,6mm;  $4\mu\text{m}$ ). El volumen de inyección fue de 100  $\mu\text{l}$ . Para la identificación y cuantificación se registraron las señales a 280nm y 360nm en DAD y en 230nm en FLD.



**Figura 12.** Gradiente de la fase móvil utilizada en el método cromatográfico.

Se identificaron trece compuestos fenólicos, utilizando patrones de calidad analítica, que se inyectaron de forma individual y conjunta. A partir de ellos se identificaron los tiempos de retención (TR), los tiempos de retención relativa (TRR) y se crearon bibliotecas de espectros.

Para la preparación de los patrones cromatográficos se prepararon disoluciones madre entre 1500 y 4000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  empleando metanol como disolvente. A partir de ellas se obtuvieron disoluciones de trabajo de 500  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  y de 20  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

La recta de calibrado multipatrón se construyó como se indica en la tabla 7 incorporando, antes de completar el volumen, 250µL de daidzeína (Bolling, *et al.*, 2009) y (Bolling, *et al.*, 2010) como patrón interno con una concentración final de 1 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 7.** Recta de calibrado multipatrón para HPLC.

Concentración final (µg mL <sup>-1</sup> )	Volumen final (mL)	Volumen (µL) de cada disolución patrón 20 µg mL <sup>-1</sup>
0.02	5	5
0.05	5	12,5
0.1	5	25
0.2	5	50
0.3	5	75
0.4	5	100
0.5	5	125

### 3.6 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Validar un método es, básicamente, el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas.

La validación del método permite demostrar que un método es “adecuado para el uso previsto”. Para que un resultado analítico sea apto para su uso, debe ser lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en él, pueda ser tomada con confianza.

Los parámetros de validación que se evaluaron fueron: selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo de trabajo, veracidad y precisión.

Los criterios aplicados en este estudio se basan en el documento de Eurachem-Eurolab: *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos* (Eurolab España: Morillas & colaboradores, 2016).

- Selectividad

La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.

Se midió un blanco de reactivo, un blanco de reactivo con adición de patrón, una muestra y una muestra fortificada para su determinación.

- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

El límite de detección es la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certeza. El límite de cuantificación es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable.

Para determinarlos se realizaron 10 medidas de muestras de blanco.

Para su cálculo se aplicó:

$$LD = 3 \cdot \frac{s'_0}{m}$$

$$LC = 10 \cdot \frac{s'_0}{m}$$

Siendo  $s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$ , donde  $n=1$  (número de réplicas de observación promediadas),  $n_b=1$  (número de observaciones de blanco promediadas cuando se calcula la corrección del blanco),  $s_0$  es la desviación estándar de las medidas y  $m$  la pendiente.

En cromatografía, el límite de detección se ha determinado como tres veces la señal/ruido. Y se ha establecido un valor de seis veces dicha señal/ruido para el límite de cuantificación.

Se empleó la siguiente fórmula el cálculo:

$$LD = 3 \cdot \frac{C_0}{S/R}$$

$$LC = 6 \cdot \frac{C_0}{S/R}$$

Siendo  $C_0$  la concentración del punto más bajo de la recta de calibrado. Y  $S/R$  la relación señal/ruido del equipo.

- Linealidad e Intervalo de trabajo

Para su estudio se midieron tres veces, en tres días diferentes, un blanco y los patrones de calibración.

En un primer momento la linealidad se evaluó por inspección visual de la gráfica obtenida al representar los pares de puntos señal/concentración y con el estudio de los residuales. Si se cumplía la linealidad con el método de los mínimos cuadrados se calculaba la línea de regresión.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es el parámetro estadístico que permite la evaluación del porcentaje de variación total de los datos. Además, se realizó un estudio de las pendientes obtenidas con las diferentes curvas de calibración para calcular el coeficiente de linealidad (%), calculado como la relación entre la pendiente y su desviación estándar, que da idea del grado de dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración. La fórmula que se utilizó para calcularlo fue:

$$\text{Coeficiente de linealidad (\%)} = \left(1 - \frac{s_m}{m}\right) \times 100$$

Siendo  $s_m$  la desviación estándar de la pendiente y  $m$  la pendiente.

Se calculó la pendiente y ordenada y se calcularon los errores en cada caso.

El intervalo de trabajo es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LC, y el extremo superior está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

- Veracidad

Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad en este trabajo se ha calculado como porcentaje de recuperación. Se entiende como recuperación la fracción de la sustancia obtenida al ser analizadas muestras fortificadas (o enriquecidas) y sin fortificar. Una muestra fortificada es aquella a la que se le ha adicionado un patrón antes del análisis.

En el estudio se realizaron cinco repeticiones de cada uno de los niveles de fortificación y diez mediciones de las muestras sin fortificar. Los niveles de fortificación se establecen considerando el rango de la curva de calibración del método, el límite de detección y el punto medio de la curva de calibración establecido.

En este estudio los niveles de fortificación para la determinación de polifenoles totales fueron tres: 25, 75 y 100 mg/L. En el caso de los flavonoides totales y el ensayo FRAP se emplearon dos niveles de enriquecimiento, 8 y 15 mg/L para el primero y 25 y 50 mg/L para el segundo. Un nivel de fortificación de 2 mg/L se utilizó para la cuantificación de proantocianidinas totales. El porcentaje de recuperación se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adición}} \times 100$$

Donde  $\bar{x}'$  es el valor medio de la muestra adicionada,  $\bar{x}$  es el valor medio de la muestra sin fortificar y  $x_{adición}$  es la concentración añadida.

- Precisión

La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados. Se establece en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

- a) Repetibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en un conjunto de análisis idénticos en el mismo laboratorio, por el mismo operador, utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. En el estudio se determinó registrando 5 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, aparato, laboratorio y en corto intervalo de tiempo) y se ha expresado como desviación estándar relativa RSD (%).
- b) Reproducibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en conjuntos idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la reproducibilidad se registraron 5 medidas en tres días distintos, no consecutivos, por diferentes analistas y se calculó el RSD (%).

Todos los análisis estadísticos en este trabajo se han realizado utilizando el paquete estadístico XLSTAT de Microsoft Excel.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Con el fin de optimizar las condiciones para la extracción de compuestos antioxidantes, se realizaron una serie de ensayos y se cuantificaron los polifenoles y flavonoides totales en la variedad de almendra Guara de la cosecha 2016. Se estudiaron las siguientes variables del proceso: tipo de disolventes de extracción, cantidad de muestra, modo y tiempo de agitación, número de extracciones y volumen total de disolvente.

Un objetivo de este trabajo era obtener un mismo extracto que permitiera el ensayo de compuestos antioxidantes totales por espectrofotometría y, además, la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales por cromatografía líquida. Esto obligó a buscar un compromiso entre la ratio de muestra utilizada y el volumen final de disolvente. Para el estudio se realizaron todas las pruebas por triplicado y se estableció como criterio de aceptación de la extracción que el rendimiento al hacer una nueva extracción en el residuo de la muestra extraída no superase el 10% de la cantidad total que se había obtenido.

A partir del estudio bibliográfico se optó por dos disoluciones polares distintas, MeOH:HCl (1000:1, v/v) y HCl:H<sub>2</sub>O:MeOH (3.7:46.3:50, v/v/v). La primera disolución de extracción era la óptima para extraer fracciones ricas en compuestos antioxidantes de subproductos de procesado industrial de la almendra (piel, cáscara y mesocarpio) según los trabajos publicados por Garrido *et al.* (2007), quienes descartaron otras disoluciones de trabajo que fueron menos efectivas MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) y CH<sub>3</sub>(CO)CH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). La segunda disolución de extracción elegida fue usada por Milbury *et al.* (2006) para identificar y cuantificar veinte compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución. En este trabajo la disolución de extracción que obtuvo mayores valores de polifenoles totales y permitió identificar más compuestos fenólicos en el cromatograma fue la disolución de extracción formada por HCl:H<sub>2</sub>O:MeOH (3.7:46.3:50, v/v/v).

Se ensayaron distintas cantidades de muestra: 0.5g, 1g y 3g. Se optó por pesar 0.5g porque mayores cantidades requerían de volúmenes de disolvente elevados para obtener la extracción total de compuestos antioxidantes y dificultaba su detección en el cromatograma. Los tipos de agitación que se compararon fueron con el equipo Multi-Reax, a temperatura ambiente y velocidad controlada, y en ultrasonidos, con control de temperatura a valores no superiores a 4°C. Barreira *et al.* (2008) publicaron que el factor más significativo en la extracción de antioxidantes era la temperatura y obtuvieron los mejores resultados a 25°C, ya que a temperaturas más altas algunos compuestos fenólicos podían ser destruidos. Otros factores ensayados fueron el tiempo de agitación, con periodos de 1h, 2h y 3.5h. y los volúmenes finales de extracción: 10mL, 30mL, 50mL, 100mL y 200mL.

Con el método de extracción puesto a punto los porcentajes de polifenoles totales y de flavonoides totales en el residuo de la muestra extraída fueron de 1.4% y de 1.3%, respectivamente por lo que la extracción de antioxidantes con este método se consideró óptima.

#### 4.2 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Para comprobar la selectividad de los métodos, se midieron la señal de un blanco de reactivo y la señal de un blanco de reactivo más patrón obteniendo que la señal medida correspondía con la señal del patrón de esa concentración. También se midió muestra y muestra enriquecida con patrón y en este caso la diferencia entre ambas señales coincidía con la señal del patrón añadido a la muestra fortificada.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos en las diferentes determinaciones se muestran en las tablas 8 y 9.

**Tabla 8.** Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) en determinaciones de antioxidantes totales.

<b>Determinación</b>	<b>LD (µg/mL)</b>	<b>LC (µg/mL)</b>
Polifenoles Totales	1	3.2
Flavonoides Totales	0.5	1.5
Proantocianidinas Totales	0.3	0.9
Ensayo FRAP	0.2	0.7

**Tabla 9.** Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) en determinaciones de compuestos fenólicos.

<b>Determinación</b>	<b>LD (µg/mL)</b>	<b>LC (µg/mL)</b>
Catequina	0.01	0.02
Epicatequina	0.01	0.02
Isorhamnetina-3-O-glucósido	0.01	0.02
Kaempferol-3-O-glucósido	0.007	0.01
Isorhamnetina-3-O-rutinósido	0.007	0.01

En la determinación de polifenoles totales se obtuvo un límite de cuantificación mayor que para el resto, 3.2 µg/mL. En el caso de la cromatografía líquida catequina, epicatequina y isorhamnetina-3-O-glucósido son los tres compuestos que presentan un mayor límite de cuantificación, de entre los compuestos fenólicos identificados en las muestras.

La relación obtenida al representar la concentración (mg/L) frente a la señal obtenida, es una relación lineal en todos los casos que se puede ajustar por mínimos cuadrado.

En las tablas 10 y 11 se presenta un resumen de los datos obtenidos en el estudio de linealidad con el rango de trabajo, la pendiente (m), el error de la pendiente ( $S_m$ ), la ordenada en el origen (a) y su error ( $S_a$ ), los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y de linealidad (C.LIN), en %, obtenidos en las distintas determinaciones. En todos los casos los valores de  $R^2$  fueron superiores a 0.98 y los coeficientes de linealidad mayores del 94%.

**Tabla 10.** Estudio del intervalo de trabajo y la linealidad en determinaciones de antioxidantes totales y capacidad antioxidante

	<b>Determinación</b>			
	<i>Polifenoles Totales</i>	<i>Flavonoides Totales</i>	<i>Proantocianidinas Totales</i>	<i>Ensayo FRAP</i>
<b>RANGO (mg/L)</b>	5-100	5-50	2-25	5-100
<b>m</b>	0.0022	0.0037	0.0058	0.0069
<b><math>S_m</math></b>	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000
<b>a</b>	0.0003	-0.0032	-0.0023	-0.0004
<b><math>S_a</math></b>	0.0033	0.0010	0.0014	0.0019
<b><math>R^2</math></b>	0.9949	0.9987	0.9959	0.9996
<b>C. LIN (%)</b>	98.4	99.1	98.4	99.5

**Tabla 11.** Estudio del intervalo de trabajo y la linealidad en determinaciones de compuestos fenólicos.

	<b>Determinación</b>				
	<i>Catequina</i>	<i>Epicatequina</i>	<i>Isorhamnetina-3-O-glucósido</i>	<i>Kaempferol-3-O-glucósido</i>	<i>Isorhamnetina-3-O-rutinósido</i>
<b>RANGO (mg/L)</b>	0.02-0.5	0.02-0.5	0.02-0.5	0.02-0.5	0.02-0.5
<b>m</b>	103.0	99.2	161.3	202.2	179.4
<b>S<sub>m</sub></b>	4.350	5.100	1.527	3.941	1.826
<b>a</b>	-2.026	-2.582	-0.320	2.206	0.875
<b>S<sub>a</sub></b>	1.223	1.433	0.429	1.107	0.513
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9912	0.9870	0.9996	0.9981	0.9995
<b>C. LIN (%)</b>	95.8	94.9	99.1	98.1	99.0

La recuperación es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico (Decisión 2002/657/CE, 2002). En este trabajo el estudio de recuperación se ha realizado a diferentes niveles según el método de análisis. Los datos se presentan en la tabla 12, con resultados entre 88 y 124%.

**Tabla 12.** Resultados de recuperación (%) obtenidos con los diferentes métodos.

<b>Determinación</b>	<b>Concentración adicionada (mg/L)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<i>Polifenoles Totales</i>	25	104.1
	75	89.0
	100	97.3
<i>Flavonoides Totales</i>	8	88.1
	15	112.7
<i>Proantocianidinas Totales</i>	2	107.3
<i>Ensayo FRAP</i>	25	124.0
	50	107.4

Los resultados obtenidos del estudio de precisión, en términos de repetibilidad y reproducibilidad para las distintas determinaciones, se presentan en la tabla 13 expresados como desviación estándar relativa (%RSD). Los valores de repetibilidad oscilan entre 0.5 y 18.7 % y los de reproducibilidad entre 3.1 y 20.3%. En la determinación de polifenoles totales es donde se han obtenido mayores desviaciones relativas.

**Tabla 13.** Resultados de repetibilidad y reproducibilidad expresados como %RSD en las diferentes determinaciones.

<b>Determinación</b>	<b>Repetibilidad %RSD</b>	<b>Reproducibilidad %RSD</b>
Polifenoles Totales	18.7	20.3
Flavonoides Totales	0.5	5.5
Proantocianidinas Totales	6.8	7.6
Ensayo FRAP	1.6	3.1

Bolling *et al.* (2010) determinaron con el ensayo FRAP la capacidad antioxidante del tegumento de siete variedades de almendras americanas. Su repetibilidad y reproducibilidad durante el ensayo fueron del 0.7% y 4.2% RSD.

Los resultados obtenidos en los parámetros de selectividad, LD y LC, linealidad, recuperación y precisión muestran que la metodología propuesta en este trabajo fue confiable para la cuantificación de los métodos de antioxidantes propuestos.

#### 4.3 ANÁLISIS DE GENOTIPOS DE ALMENDRA

El método de extracción optimizado se aplicó para la cuantificación de polifenoles, flavonoides y proantocianidinas totales, así como a la capacidad antioxidantes de once genotipos de almendras españolas: G-2-22, G-3-3, G-3-4, G-5-25, I-3-67, Belona, Diamar, Guara, Soleta, Vairo y Vialfas.

Los resultados del contenido total de polifenoles (expresado como mg de ácido gálico/100g de MF) de las muestras de estudio se presenta en las tablas 14.

**Tabla 14.** Contenido de polifenoles totales en las muestras de almendras.

<b>GENOTIPO</b>	<b>POLIFENOLES TOTALES (mg AG/100g MF)</b>
<b>G-2-22</b>	245.2 ± 16.1
<b>G-3-3</b>	359.9 ± 16.0
<b>G-3-4</b>	422.7 ± 32.5
<b>G-5-25</b>	438.6 ± 21.8
<b>I-3-67</b>	299.1 ± 17.1
<b>BELONA</b>	424.9 ± 19.9
<b>DIAMAR</b>	307.9 ± 25.2
<b>GUARA</b>	486.8 ± 9.3
<b>SOLETA</b>	324.7 ± 12.5
<b>VAIRO</b>	317.9 ± 4.6
<b>VIALFAS</b>	476.4 ± 39.0

El valor medio de polifenoles en las muestras fue de 373.1 mg AG/ 100g MF, correspondiendo los valores más altos a las variedades Guara y Vialfas, con 486.8 y 476.4 mg AG/100g MF, respectivamente. Por el contrario, el contenido más bajo correspondió al genotipo G-2-22 con un 245.2 mg AG/100mg MF.

Milbury *et al.* (2006) obtuvieron en las variedades Padre y Price valores medios de 199.5 y 240.8 mg AG/ 100g MF.

Bolling *et al.* (2010) estudiaron el contenido de polifenoles totales de siete variedades americanas en el tegumento de la almendra. El resultado más alto lo obtuvieron las variedades Sonora y Nonpareil  $155.0 \pm 21$  y  $108.0 \pm 25$  mg AG/100g MF y los dos más bajos las variedades Butte y Fritz, ambas con 58.1 mg AG/100g MF. Los resultados obtenidos en nuestro estudio reportaron valores superiores a los de las variedades americanas.

Bolling *et al.* (2011) en su revisión sobre los frutos secos mostraron como resultado de la cuantificación de polifenoles totales en almendra, 261 mg AG/100g MF.

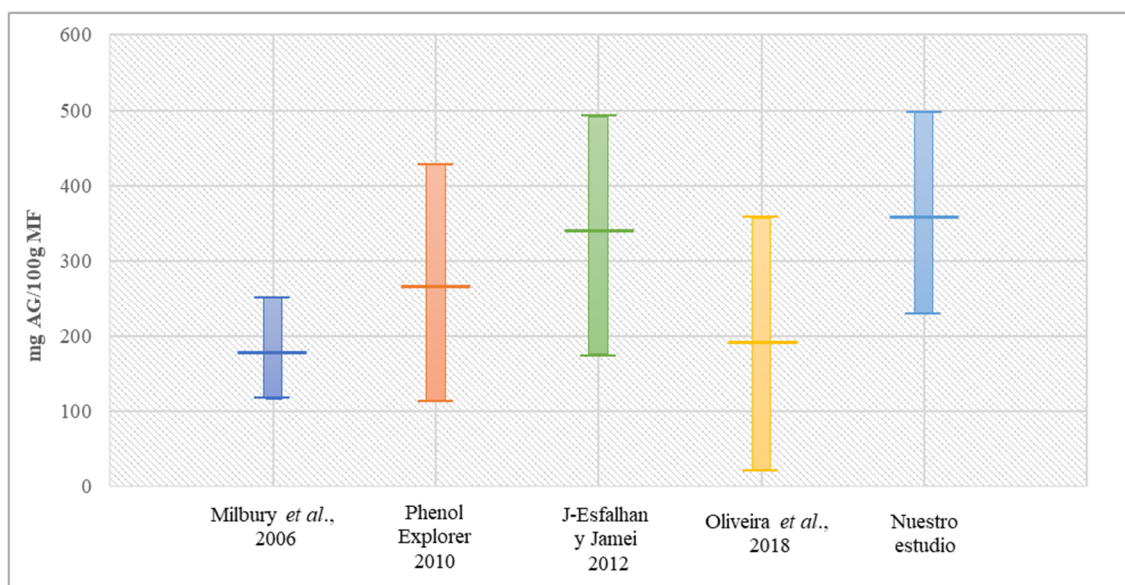
En el estudio de diez variedades de almendras salvajes realizado por Jahanban-Esfahlan y Jamei (2012) el rango de valores obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales fue de  $184.1 \pm 2.3$  a  $482.3 \pm 1.2$  mg AG/ 100g MF.

La revisión bibliográfica realizada por Bolling (2017), tenía como objetivos determinar los polifenoles registrados en almendras, resumir los métodos de análisis empleados y determinar la contribución de estos a la calidad de la almendra y a la actividad promotora de la salud. Los valores de veintiún estudios se registraron en dicha revisión, estableciendo como valor medio de polifenoles totales 190.0 mg AG/ 100g MF, aunque encontró un rango muy amplio entre 47.0 y 1340.0 mg AG/100g MF.

Oliveira *et al.* (2018) estudiaron el contenido fenólico de ocho variedades de almendras portuguesas obteniendo resultados comprendidos entre 32.0 y 347.3 mg AG/100g MF en las variedades Bonita y Casanova, respectivamente.

Existen varias bases de datos que registran valores de antioxidantes en alimentos. En la Phenol Explorer 3.6 (Neveu, *et al.*, 2010) el valor medio de polifenoles totales de los estudios registrados era de 287.09 mg AG/100g MF y en la de Actividad Antioxidante y de Contenido de Polifenoles Totales en Frutas (INTA, 2013) el contenido medio de polifenoles en almendras fue de 238.0 mg AG/100g MF.

Los rangos y valores medios de la cuantificación de polifenoles totales de diferentes publicaciones y el obtenido en nuestro estudio se representan en la figura 13.



**Figura 13.** Rangos y valores medios de polifenoles totales publicados y el obtenido en este estudio.

El contenido de flavonoides totales (expresado como mg de catequina /100g de MF) obtenido con el método propuesto en este trabajo se presenta en la tabla 15. El valor medio en las muestras de almendras analizadas fue de 132.4 mg CAT/100g MF, con un valor mínimo de 105.0 mg CAT/100g MF en el genotipo G-2-22 y máximos de 156.0 y 168.1 mg CAT/100g MF en las variedades Belona y Vialfas, respectivamente.

**Tabla 15.** Contenido de flavonoides totales en las muestras de almendras.

GENOTIPO	FLAVONOIDES TOTALES (mg CAT/100g MF)
<b>G-2-22</b>	105.7 ± 3.2
<b>G-3-3</b>	122.0 ± 4.6
<b>G-3-4</b>	149.5 ± 2.9
<b>G-5-25</b>	127.2 ± 6.7
<b>I-3-67</b>	133.3 ± 3.8
<b>BELONA</b>	156.0 ± 4.3
<b>DIAMAR</b>	113.3 ± 4.0
<b>GUARA</b>	151.68 ± 4.3
<b>SOLETA</b>	112.3 ± 9.5
<b>VAIRO</b>	118.3 ± 4.4
<b>VIALFAS</b>	168.1 ± 6.4

Los datos de flavonoides publicados en la bibliografía para muestras de almendras son menores que los obtenidos en este estudio, siendo la diferencia principal el proceso de extracción.

Milbury *et al.* (2006) pesaron un gramo de almendra y realizaron la extracción de la muestra dos veces con un volumen de 15mL de disolución HCl:H<sub>2</sub>O:MeOH (3.7:46.3:50, v/v/v) Publicaron unos valores de 14.56 hasta 27.18 mg CAT/100g MF en ocho variedades de almendras americanas distintas. Las dos variedades que obtuvieron mayor contenido de flavonoides totales fueron Nonpareil y Price. Los valores más bajo los mostraron las almendras Fritz y Monterey.

Barreira *et al.* (2008) cuantificaron el contenido de flavonoides totales en la variedad de almendra Guara y obtuvieron un rango de 6.24 a 25.02 mg CAT/100g MF en función de la mezcla de extracción empleada. Con 2g de muestra extraídos con 50mL de metanol y una hora de reacción obtuvieron el resultado mayor. Bolling *et al.* (2011) en una revisión sobre frutos secos publicaron que el valor medio de flavonoides totales para las almendras era de 25.01 mg CAT/100g MF. Jahanban-Esfahlan y Jamei (2012) pesaron 3g de muestra de diez variedades de almendras salvajes y usaron para la extracción 50mL de metanol. Se registró un rango medio de flavonoides totales  $11.3 \pm 1.2$  a  $35.6 \pm 1.1$  mg CAT/100g MF en su estudio.

Yildiz *et al.* (2014) escogieron veinticuatro genotipos de almendras cosechadas en Turquía para cuantificar el contenido de flavonoides totales. El contenido más alto lo registró la variedad Garrigues con 51.15 mg CAT/100g MF y el más bajo Picantalli con 15.11 mg CAT/100g M. Bolling (2017) publicó en una revisión valores medios de 61.2 mg CAT/100g MF con un rango más amplio, entre 13.0- 93.8.

En almendras, el contenido de proantocianidinas totales se determina en pocos estudios publicados. Los datos obtenidos en los once genotipos analizados se presentan en la tabla 16. Los resultados varían desde 103.4 mg CND /100g MF del genotipo G-2-22 hasta los 286.6 mg CND/100g MF de Vialfas. El valor medio fue de 196.0 mg CND/100g MF, del orden del publicado en los trabajos de revisión de Bolling *et al.* (2011) con un valor de 184.10mg CND/100g MF y algo menor, de 162.0 mg CND/100g MF, en Bolling (2017), si bien en este caso el rango entre los diecinueve estudios fue más amplio, entre 67.1 y 257 mg CND/100g MF.

**Tabla 16.** Contenido de proantocianidinas totales en las muestras de almendras.

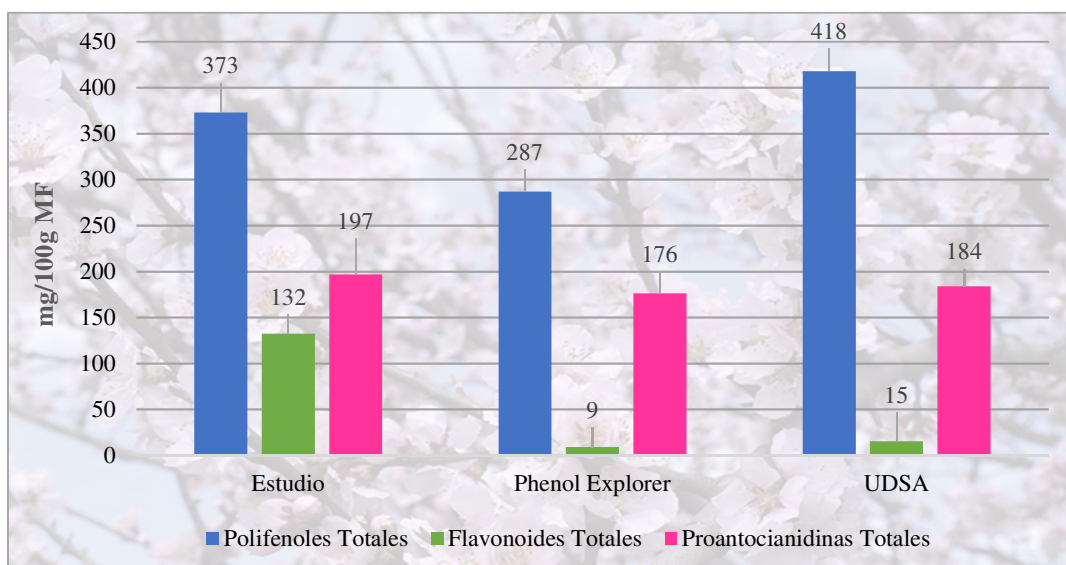
<b>GENOTIPO</b>	<b>PROANTOCIANIDINAS TOTALES (mg CND/100g MF)</b>
<b>G-2-22</b>	103.4 ± 6.3
<b>G-3-3</b>	163.9 ± 3.3
<b>G-3-4</b>	236.1 ± 8.5
<b>G-5-25</b>	216.1 ± 10.0
<b>I-3-67</b>	157.1 ± 13.2
<b>BELONA</b>	281.3 ± 21.8
<b>DIAMAR</b>	154.8 ± 7.7
<b>GUARA</b>	240.3 ± 18.5
<b>SOLETA</b>	153.9 ± 2.5
<b>VAIRO</b>	169.1 ± 1.6
<b>VIALFAS</b>	286.6 ± 15.6

Menores valores se han publicado en las variedades americanas. Así, Xie *et al.* (2012) obtuvieron un valor de 110.6 mg CND/100g MF para la variedad Nonpareil y valores inferiores para las variedades Butte y Carmel.

Son muchos los factores que pueden originar una gran variabilidad en el contenido de antioxidantes en las muestras de almendras estudiadas. Entre los factores extrínsecos, destacan las circunstancias del cultivo y las condiciones de conservación tras la recolección. Se ha demostrado que la presencia o ausencia de determinados nutrientes en el suelo y el exceso o déficit de riego pueden afectar a la composición fitoquímica de frutas y hortalizas. Se sabe que el calcio, el boro y el contenido en sustancias nitrogenadas del suelo tienen un efecto decisivo sobre el contenido en sustancias fenólicas antioxidantes. El grado de madurez, el grado de iluminación e irradiación de las plantas, junto con la temperatura de cultivo, ejercen también una gran influencia sobre el contenido de sustancias fitoquímicas (Tomás-Barberán, 2003).

En el siguiente gráfico (figura 14) se representan los valores medios de los datos obtenidos en el presente estudio junto con los publicados en bases de datos específicas, Phenol Explorer (Neveu *et al.* (2010) y USDA (US Department of Agriculture, 2018). De su comparación destaca la diferencia en el valor medio de flavonoides obtenido en las variedades analizadas frente a las publicadas, mientras que el valor medio de polifenoles totales se encuentra en el rango medio de los publicados, y las proantocianidinas totales son similares.

**Figura 14.** Gráfico comparativo de los datos medios obtenidos en este estudio y los publicados en las bases de datos Phenol Explorer (Neveu *et al.* (2010) y USDA (US Department of Agriculture, 2018).



Los datos de capacidad antioxidante, estudiada con el Ensayo FRAP en las almendras de estudio se muestran en la tabla 17. Los resultados están expresados como  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ , y como  $\mu\text{mol TE}$  (equivalentes de Trolox) en 100g MF.

**Tabla 17.** Resultados del Ensayo FRAP en las muestras de almendras.

GENOTIPO	ENSAYO FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ )	ENSAYO FRAP ( $\mu\text{mol TE}/100\text{g MF}$ )
<b>G-2-22</b>	4174.5 $\pm$ 282.4	115.43 $\pm$ 8.5
<b>G-3-3</b>	4990.8 $\pm$ 55.0	144.9 $\pm$ 1.7
<b>G-3-4</b>	7628.1 $\pm$ 267.5	230.2 $\pm$ 8.1
<b>G-5-25</b>	7262.16 $\pm$ 622.1	211.04 $\pm$ 18.4
<b>I-3-67</b>	5368.6 $\pm$ 122.7	154.0 $\pm$ 3.8
<b>BELONA</b>	8382.0 $\pm$ 514.1	251.8 $\pm$ 16.0
<b>DIAMAR</b>	4974.3 $\pm$ 154.5	142.4 $\pm$ 4.5
<b>GUARA</b>	8446.3 $\pm$ 166.1	243.8 $\pm$ 5.1
<b>SOLETA</b>	5328.9 $\pm$ 329.5	152.6 $\pm$ 9.7
<b>VAIRO</b>	5499.4 $\pm$ 141.1	165.7 $\pm$ 4.3
<b>VIALFAS</b>	9010.1 $\pm$ 354.4	260.2 $\pm$ 10.4

Los mayores valores para la capacidad antioxidante corresponden a las variedades Vialfas con 9010.1  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ , Guara con 8446.3  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$  y Belona con 8382.1  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ . Dichas variedades fueron las que mayor contenido de polifenoles, flavonoides y proantocianidinas totales mostraron. De la observación de los resultados se aprecian dos rangos de valores de capacidad

antioxidante, uno entre 4174.5-5450.0  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$  y otro entre 7262.2-9010.1  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ .

Bolling *et al.* (2010) estudiaron la capacidad antioxidante del tegumento de siete variedades de almendras americanas. El valor medio que obtuvieron fue de 642.3  $\mu\text{mol TE}/100\text{g MF}$ . Yildiz *et al.* (2014) hicieron un estudio en veinticuatro genotipos de almendras completas cultivadas en Turquía en el que registraron unos valores de capacidad antioxidante máximos para las muestras Nikitski y Garrignes de 6169  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$  y 6146  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$  respectivamente. El resultado más bajo lo obtuvieron en la muestra Gulcan con 2088  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ . Smeriglio *et al.* (2016) han publicado que en el tegumento de la almendra Avola se obtiene un valor medio de capacidad antioxidante de  $6034.5 \pm 122.5 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ .

No son muchos los trabajos que publican la capacidad antioxidante de almendras posiblemente debido, por una parte, a la controversia que existe entre la elección del método más adecuado y, por otra, a la dificultad que conlleva su aplicación.

Se ha realizado un estudio estadístico de correlación (Pearson) de los datos obtenidos entre el ensayo FRAP y las determinaciones de compuestos totales, polifenoles, flavonoides y proantocianidinas. Los resultados se muestran en la tabla 18, donde se observa que hay una mayor correlación entre el Ensayo FRAP y las proantocianidinas totales (0.976) seguido de polifenoles totales (0.944) y flavonoides totales (0.932).

**Tabla 18.** Datos de las correlaciones entre polifenoles, flavonoides, proantocianidinas totales y capacidad antioxidante de las almendras.

	<b>Polifenoles Totales</b> (mg AG/100g MF)	<b>Flavonoides totales</b> (mg CAT/100g MF)	<b>Proantocianidinas Totales</b> (mg CLC/100g MF)	<b>FRAP</b> ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g MF}$ )
<b>P. Totales</b>	1	0.844	0.917	0.944
<b>F. Totales</b>	0.844	1	0.936	0.932
<b>Pr. Totales</b>	0.917	0.936	1	0.976
<b>FRAP</b>	0.944	0.932	0.976	1

De forma similar, Jahanban-Esfahlan y Jamei (2012) registraron unos valores que muestran una mayor correlación entre el ensayo FRAP y los polifenoles totales (0.961) y menor con los flavonoides totales (0.893).

Sarkis *et al.* (2014) obtuvieron una correlación algo menor (0.926) entre los polifenoles totales vs el ensayo FRAP. Sin embargo, Smeriglio *et al.* (2016) encontraron una alta correlación (0.997).

La correlación entre los polifenoles totales y tres métodos que medían la capacidad antioxidante fue estudiada por Oliveira *et al.* (2018). Para el ensayo FRAP el valor de correlación fue de 0.916 y para el ensayo TEAC de 0.922.

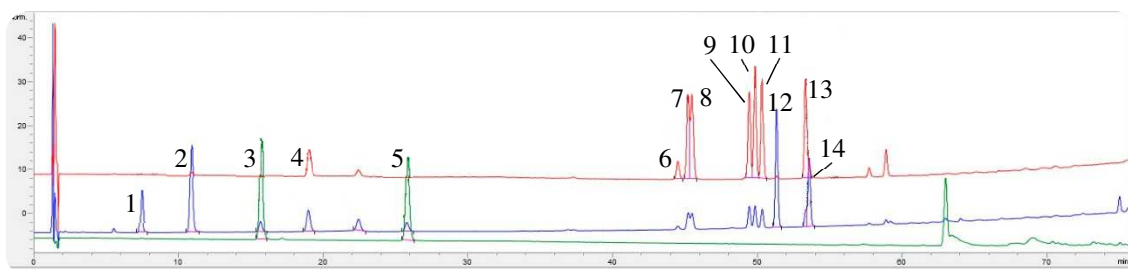
En la determinación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida se identificaron trece compuestos fenólicos y se utilizó como patrón interno, daidzeína, una isoflavona que se encuentra en alimentos vegetales (Bolling, *et al.*, 2009) y (Bolling, *et al.*, 2010).

Los tiempos de retención (TR), el tiempo de retención relativa (TRR), tipo de detección con Diodo Array (DAD) o Fluorescencia (FLD), la longitud de onda de cuantificación ( $\lambda$ ), y longitud de onda máximas se presentan en la tabla 19.

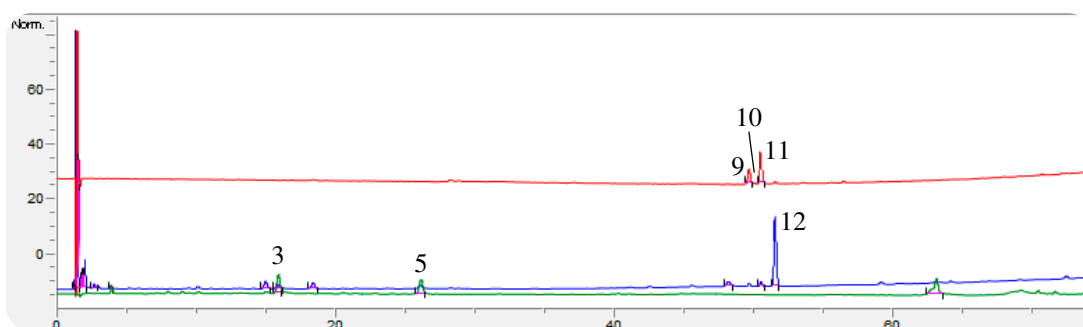
**Tabla 19.** Identificación de compuestos fenólicos por HPLC.

Nº PICO	COMPUESTO	TR (min)	TRR	DETECCIÓN	CUANTIFICACIÓN $\lambda$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	Ácido protocatéquico	7.3	0.142	DAD	280	255; 293
2	Aldehído protocatéquico	10.8	0.209	DAD	280	279; 309
3	(+)-Catequina	15.5	0.301	FLD	230	230; 279
4	Ácido clorogénico	18.6	0.361	DAD	280	291; 322
5	(-)-Epicatequina	25.6	0.498	FLD	230	230; 279
6	Quercetina-3-D-galactósido	44.5	0.865	DAD	360	253; 354
7	Quercetina-3-glucósido	45.3	0.879	DAD	360	254; 354
8	Quercetina-3-rutina	45.5	0.884	DAD	360	253; 354
9	Isorhamenetina 3-O-glucósido	49.6	0.962	DAD	360	251; 351
10	Kaempferol 3-O-rutinósido	49.9	0.969	DAD	360	254; 353
11	Isorhamenetina 3-O-rutinósido	50.4	0.979	DAD	360	252; 353
12	Daidzeína = PI	51.5	1	DAD	280	249; 302
13	Quercetina	53.5	1.04	DAD	360	255; 369
14	Naringenina	53.8	1.05	DAD	280	232; 289

El cromatograma de una mezcla de los patrones y de una muestra de almendra se presenta en las figuras 15 y 16, respectivamente. En azul se muestra la señal DAD ( $\lambda=280$  nm), en rojo DAD ( $\lambda=360$  nm) y en verde FLD ( $\lambda=230$  nm).

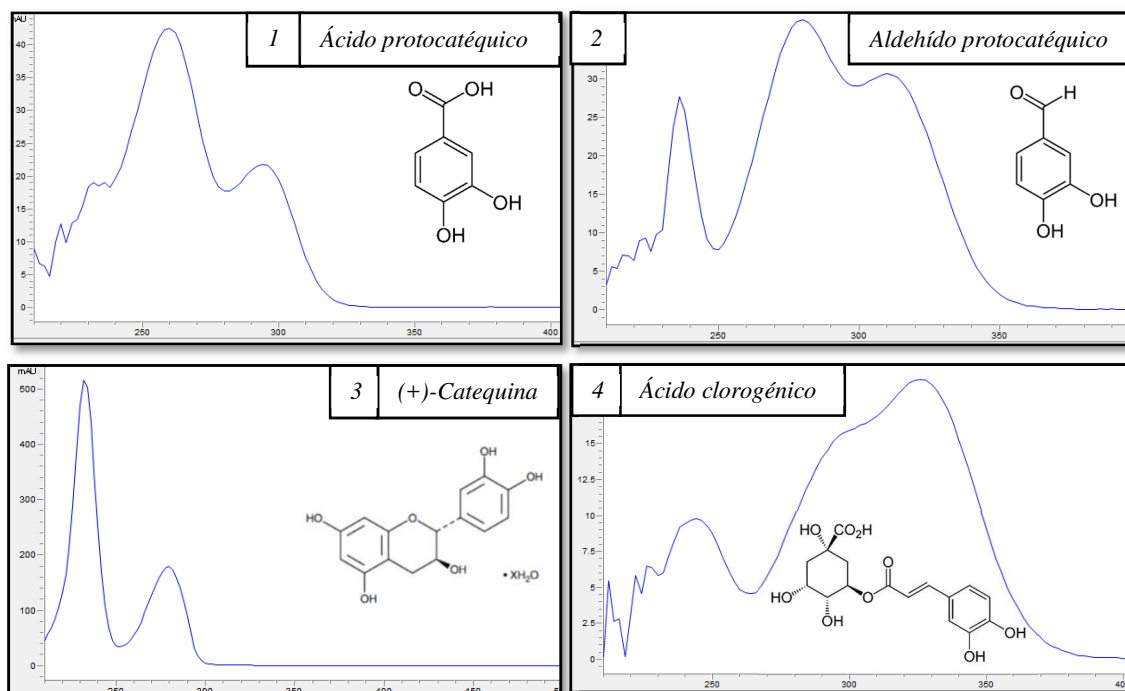


**Figura 15.** Cromatograma de una mezcla de patrones junto con el patrón interno. (Referencias de los picos en la tabla 19)



**Figura 16.** Cromatograma de una muestra junto con el patrón interno. (Referencias de los picos en la tabla 19)

La identificación de los compuestos se realizó por comparación con los TRR y las librerías de espectros creadas con los compuestos puros, aceptando un Match superior a 900. Los espectros de los patrones se presentan en la figura 17.



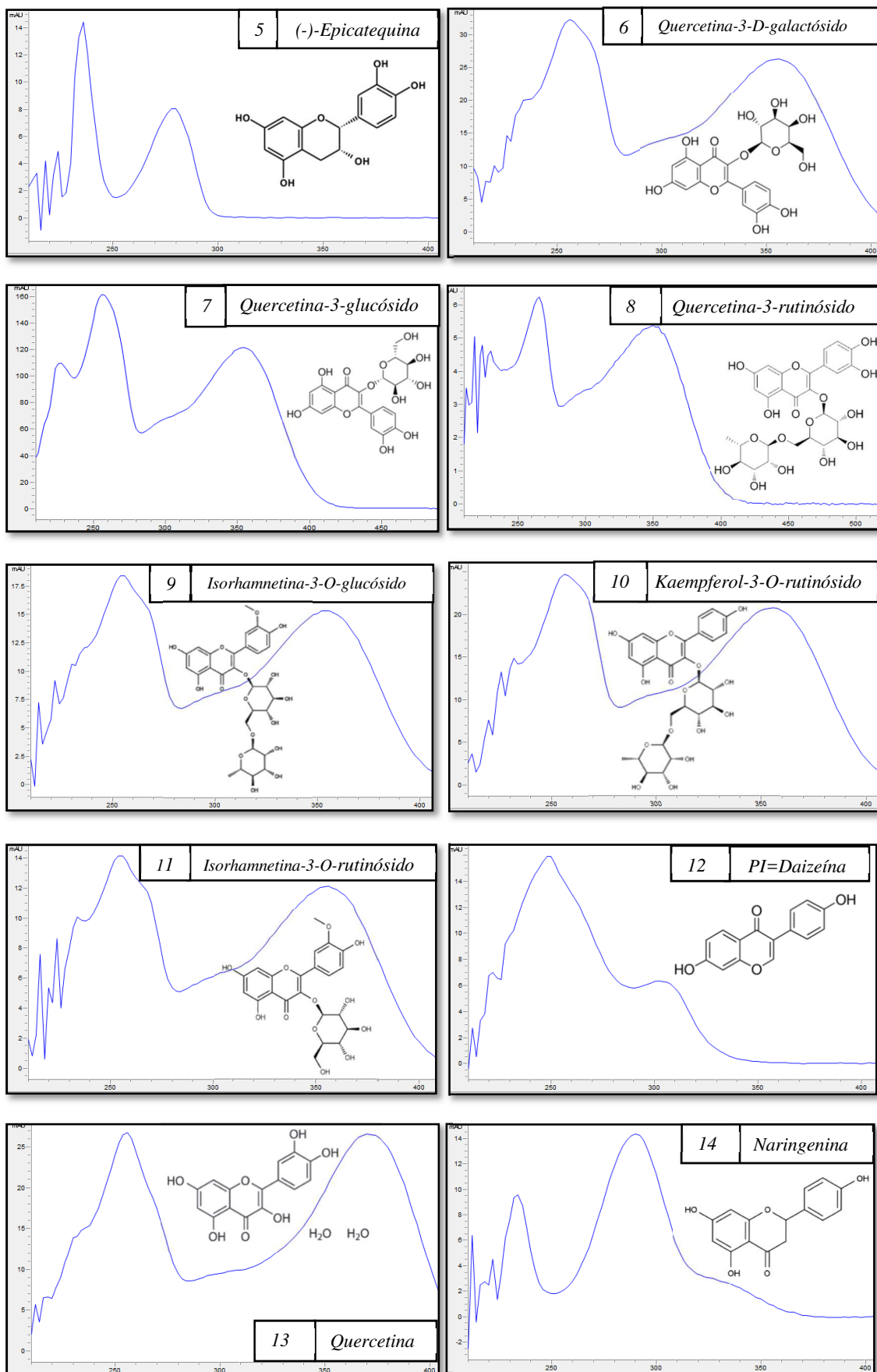


Figura 17. Espectros de los compuestos fenólicos identificados por HPLC.

La tabla 20 muestra los resultados de flavonoides obtenidos en la determinación cromatográfica. En las muestras analizadas se identificaron cinco compuestos polifenólicos pertenecientes a dos subclases de flavonoides distintas, flavon-3-ol: (+)-catequina, (-)-epicatequina, y flavonoles: isorhamnetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido y isorhamnetina -3-O-rutinósido.

**Tabla 20.** Compuestos fenólicos en las muestras analizadas (mg/100g MF)

GENOTIPO	Cat	Epi	$\Sigma$ Flavan-3-ol	I3-G	K3-R	I3-R	$\Sigma$ Flavonoles	Total	% F.T.
<b>G-2-22</b>	13.99	6.22	20.21	2.96	0.24	8.89	12.08	32.29	30.5
<b>G-3-3</b>	10.31	5.61	15.93	0.77	<LD	1.88	2.66	18.58	15.2
<b>G-3-4</b>	14.98	11.14	26.12	1.91	0.30	7.36	9.58	35.69	23.9
<b>G-5-25</b>	12.52	8.31	20.83	2.53	1.13	4.43	8.09	28.93	22.7
<b>I-3-67</b>	14.02	14.69	28.71	3.44	<LC	6.96	10.40	39.11	29.3
<b>BELONA</b>	13.86	15.86	29.72	2.82	0.87	6.55	10.23	39.95	25.6
<b>DIAMAR</b>	11.83	6.68	18.51	3.16	0.03	5.33	8.52	27.03	23.9
<b>GUARA</b>	16.65	15.05	31.70	4.69	<LC	8.39	13.08	44.78	29.5
<b>SOLETA</b>	11.67	9.67	21.34	1.54	0.35	4.16	6.05	27.39	24.4
<b>VAIRO</b>	9.39	7.56	16.95	2.63	<LC	5.50	8.13	25.08	21.2
<b>VIALFAS</b>	10.86	7.88	18.74	0.85	<LC	4.87	5.73	24.47	14.5

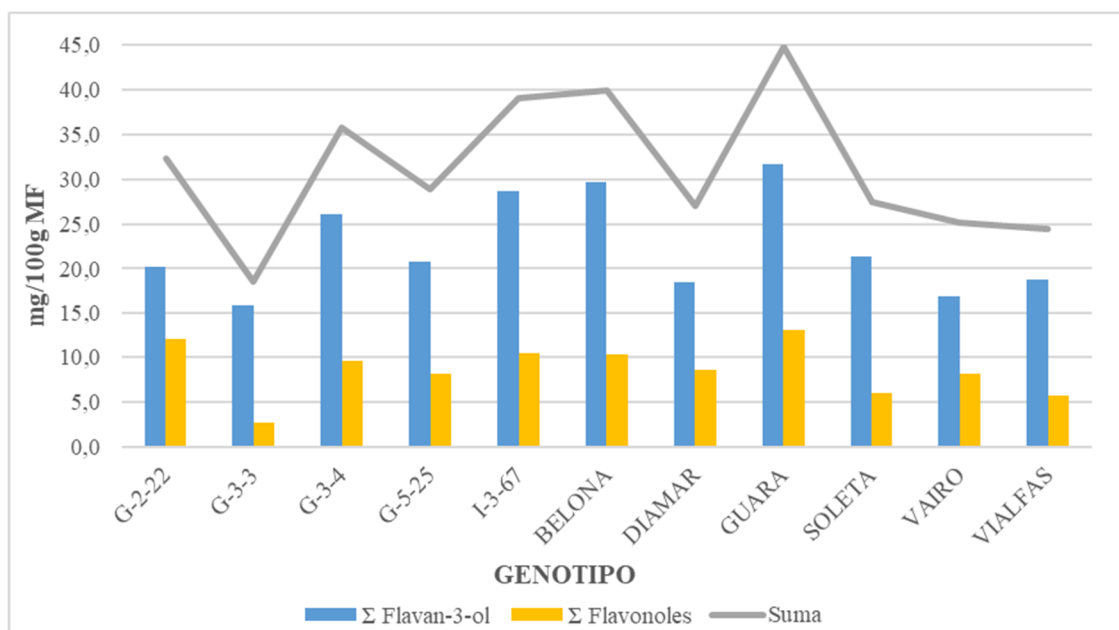
\**Cat*: (+)-catequina, *Epi*: (-)-epicatequina, *I3-G*: isorhamnetina-3-O-glucósido, *K3-R*: kaempferol-3-O-rutinósido, *I3-R*: isorhamnetina-3-O-rutinósido, *Total*: sumatorio de los cinco compuestos, *%F.T.*: porcentaje de flavonoides totales.

El compuesto mayoritario es catequina, y la suma catequina y epicatequina supone entre un 60-80% de los flavonoides detectados en todas las variedades de almendras analizadas.

De entre los flavonoles, kaempferol-3-O-rutinósido, es el que se ha encontrado en menores concentraciones. En los estudios de Chang *et al.* (2016) y la revisión hecha por Bolling (2017) el valor medio de kaempferol-3-O-rutinósido también fue menor que el de otros flavonoles.

Los cinco compuestos detectados suponen un porcentaje de flavonoides totales en las muestras entre el 14.6 y el 30.5%, según la variedad. Sin embargo, en el trabajo de Chang *et al.* (2016) en el tegumento de la almendra el porcentaje de flavonoides totales supuso entre el 5.7-11.4% en función de la muestra.

La representación gráfica de los grupos de flavonoides y su suma se presentan en la figura 18. Se observa que el genotipo G-3-3 tiene el menor contenido y Guara el mayor.



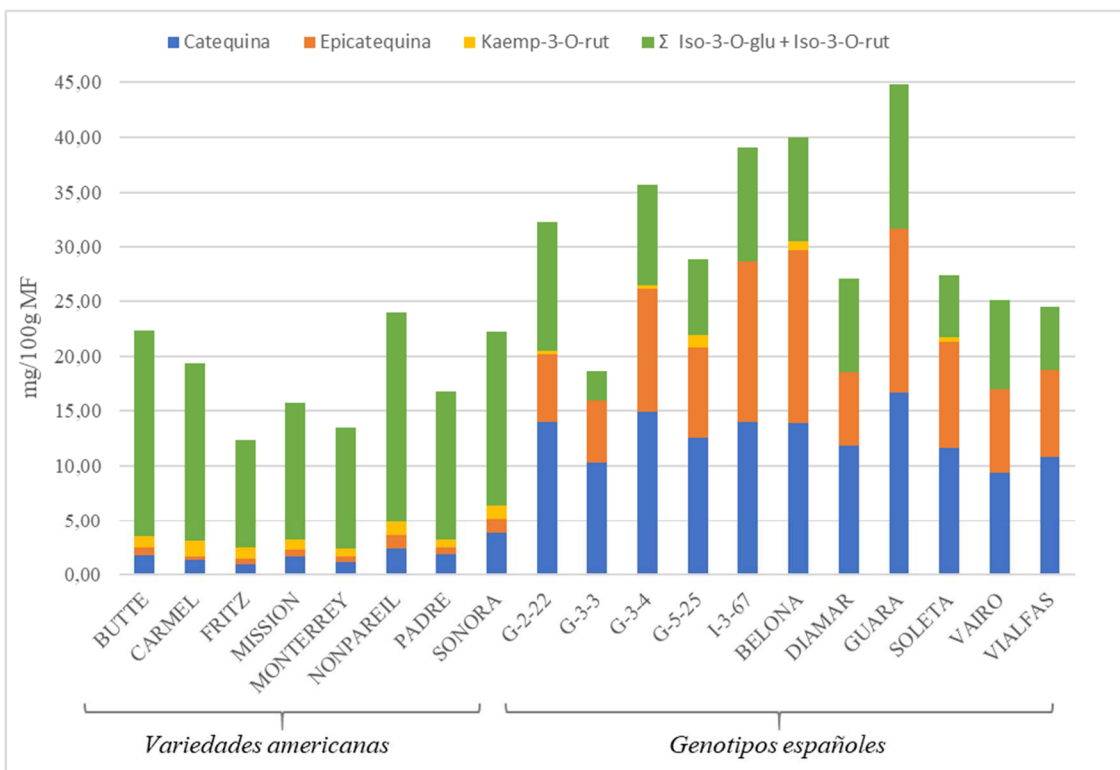
**Figura 18.** Grupos de flavonoides en los genotipos de almendras analizados.

Algunos autores cuantificaron por cromatografía de alta resolución y espectrometría de masas el contenido de antioxidantes en las variedades de almendras americanas. Veinte flavonoides, en ocho variedades de almendras enteras, fueron identificados por Milbury *et al.* (2006). Dieciséis flavonoides y dos ácidos fenólicos en el tegumento de siete variedades identificaron Bolling *et al.* (2010).

De los polifenoles cuantificados por ambos análisis, catequina, epicatequina, kaempferol-3-O-rutinoside, isorhamnetina-3-O-rutinósido e isorhamnetina-3-O-glucósido fueron los principales flavonoides encontrados. Cada uno de ellos representaba un porcentaje de polifenoles totales igual o superior al 3%. Además, en las almendras enteras se cuantificaron resultados elevados de ácido protocatéquico, quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-rutinósido e isorhamnetina-3-O-galactósido (Milbury *et al.* (2006). Sin embargo, en el tegumento se encontraron cantidades mayores de naringenina-7-O-glucósido, dihidroxikaempferol, y naringenina (Bolling *et al.*, (2010).

En la figura 19 se compararon los resultados de las variedades americanas y las del presente trabajo. Los valores registrados por Milbury *et al.* (2006) fueron inferiores para los Flavan-3-ol (catequina y epicatequina). Sin embargo, se registraron valores

superiores de Flavonoles (kaempferol-3-O-rutinósido, isorhamentina-3-O-glucósido e isorhamentina-3-O-rutinósido) en las variedades americanas. La suma de estos cinco flavonoides cuantificados individualmente en el presente trabajo fue superior en todos los casos, a excepción del genotipo G-3-3 que registró valores más bajos que algunas de las variedades americanas.



**Figura 19.** Gráfico de comparación de flavonoides entre variedades americanas y genotipos españoles.

En la base de datos Phenol Explorer (Neveu, *et al.*, 2010) el contenido medio de catequina registrado fue de 1.28 mg/100g MF, el de epicatequina 0.59 mg/100g MF y el de kaempferol-3-O-rutinósido 1.03 mg/100g MF. Estos valores son similares a los registrados en la base de datos USDA (US Department of Agriculture, 2018). No hay valores publicados en ambas bases de datos para isorhamentina-3-O-glucósido e isorhamentina-3-O-rutinósido.

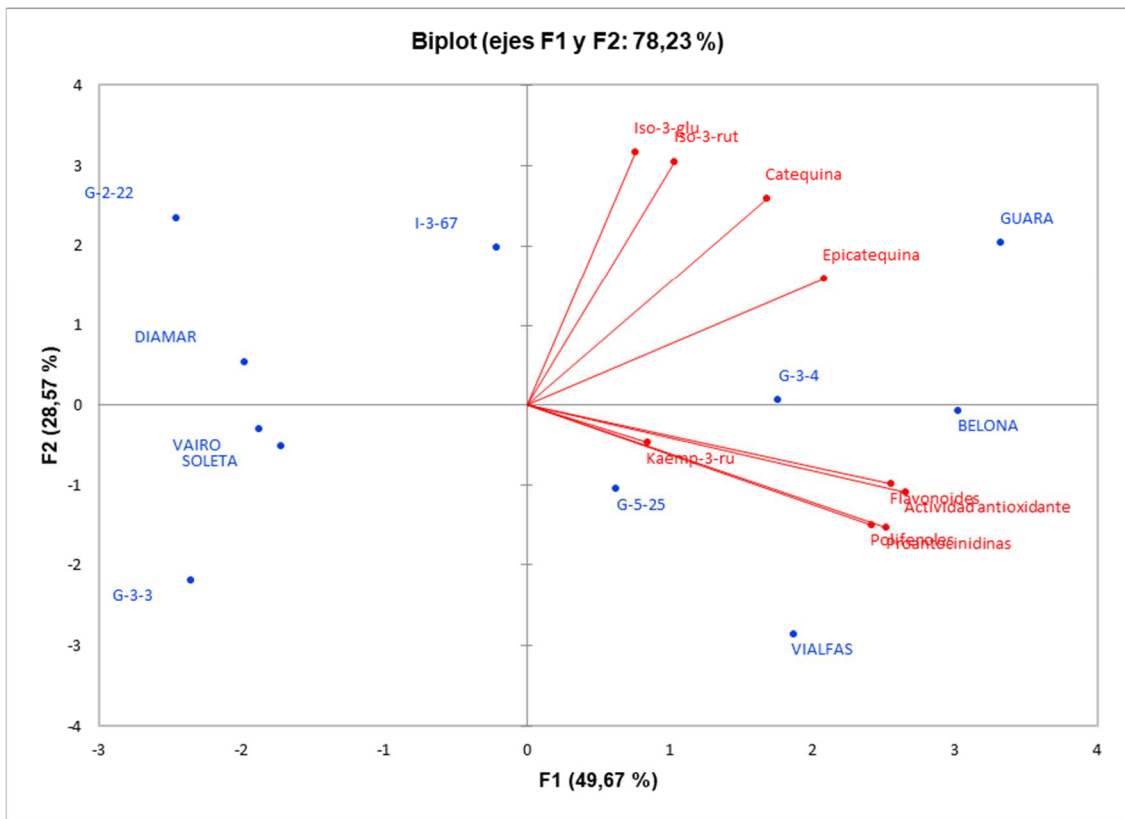
Chang *et al.* (2016) obtuvieron en sus estudios los siguientes rangos para cada uno de estos compuestos: catequina 0.95-3.86 mg/100g MF, epicatequina 0.32-1.17 mg/100g MF, isorhamentina-3-O-glucósido 9.85-19.07 mg/100g MF, kaempferol-3-O-rutinósido 0.71-1.43 mg/100g MF e isorhamentina-3-O-rutinósido 9.85-19.07 mg/100g MF.

Bolling (2017) obtuvo como valores medios: catequina 5.40 mg/100g MF, epicatequina 2.11 mg/100g MF, isorhamentina-3-O-glucósido 9.27 mg/100g MF, kaempferol-3-O-rutinósido 5.18 mg/100g MF y isorhamentina-3-O-rutinósido 22.90 mg/100g MF.

Se ha realizado un análisis de componentes principales (ACP) con los resultados obtenidos en todos los ensayos realizados, configurando una matriz constituida por nueve variables y once genotipos. Se han elegido los dos primeros componentes F1 y F2 que explican el 78.230% de la variabilidad. El componente F1 explica el 49.669% de la variabilidad en los datos y las variables con mayores autovalores y contribución (%) fueron: la actividad antioxidante (0.944, 19.938%), flavonoides totales (0.907, 18.411%), proantocianidinas totales (0.898, 18.021%) y polifenoles totales (0.859, 16.524%). Estas variables mostraron también fuertes correlaciones entre ellas, como ya se ha comentado antes.

El componente F2 explica el 28.565% de la variabilidad en los datos y las variables con mayores autovalores y contribución (%) fueron: isorhamentina-3-O-glucósido (0.852, 28.268%), isorhamentina-3-O-rutinósido (0.822, 26.297%), catequina (0.696, 18.840%) y epicatequina (0.426, 7.057%). Las dos primeras mostraron una fuerte correlación entre ellas (0.719) y ligeramente menor con las otras dos (figura 20).

El primer componente, que corresponde con un gradiente en la actividad antioxidante, flavonoides, proantocianinas y polifenoles totales permite separar claramente dos grupos de genotipos: el primero con valores altos de todas estas variables (G-3-4, G-5-25, Belona, Guara y Vialfas) y el segundo con valores bajos (G-2-22, G-3-3, Diamar, Vairo y Soleta), quedando únicamente el genotipo I-3-67 en una posición intermedia. En cambio, el segundo componente corresponde con un gradiente en isorhamentina-3-O-glucósido, isorhamentina-3-O-rutinósido, y catequina que no separa los genotipos en grupos claramente contrastados. En este gradiente los genotipos G-2-22, I-3-67 y Guara definen los valores máximos y los genotipos Vialfas y G-3-3 los mínimos (figura 20).



**Figura 20.** Biplot de los dos primeros componentes del ACP.

## 5. CONCLUSIONES

Las almendras son una fuente excelente de antioxidantes. A su conocido contenido de tocoferoles y carotenos, hay que unir también sus constituyentes polifenólicos, menos estudiados. La variación en la composición de estos compuestos está afectada por diversos factores agronómicos y es distinta entre variedades. Para valorar la calidad del fruto es importante su caracterización, y con este trabajo se ha conocido el contenido de polifenoles de once genotipos de almendras españolas, cinco experimentales y seis comerciales.

El control de todos los factores que afectan a la extracción de polifenoles es fundamental en la recuperación de los polifenoles durante el análisis. La validación de los métodos que se han puesto a punto evidencia que éstos son óptimos para las determinaciones en almendras.

Los resultados de la aplicación de los métodos en almendras indican que existe una alta correlación entre la actividad antioxidante y los contenidos totales analizados, mayor con el contenido de proantocianidinas totales (0.976), y siguiendo en orden decreciente con el contenido de polifenoles totales (0.944) y flavonoides totales (0.932).

En los genotipos estudiados se han identificado cinco flavonoides, dos flavon-3-ol: (+)-catequina, (-)-epicatequina, y tres flavonoles: isorhamentina-3-O-glucósido, isorhamentina-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido. El contenido de flavon-3-ol ha sido mayoritario en todos los genotipos estudiados. El valor nutritivo de la almendra como alimento ha llevado a que se analizaran las almendras completas en este estudio, pero podría resultar de interés en investigaciones posteriores el análisis del tegumento aislado, ya que concentra la mayor parte de los polifenoles y podría aumentar el número de flavonoides identificados.

El estudio estadístico aplicado separa los genotipos analizados en dos grupos. Los genotipos G-3-4, G-5-25, Belona, Guara y Vialfas que están fuertemente correlacionados con la actividad antioxidante y los grupos de compuestos totales: polifenoles, flavonoides y proantocianidinas. Y en otro grupo se incluiría los genotipos que no lo están: G-2-22, G-3-3, Diamar, Soleta y Vairo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Barreira, J. C., Ferreira, I. C., Oliveira, M. B. P. & Pereira, J. A., 2008. Effects of different phenols extraction conditions on antioxidant activity of almond (*Prunus dulcis*) fruits. *Journal of food biochemistry*, 33(6), pp. 763-776.

BEDCA, 2007. *Base de datos española de composición de alimentos*. [En línea] Available at: [www.bedca.net](http://www.bedca.net) [Último acceso: 12 08 2018].

Benzie, I. F. F. & Strain, J. J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The Frap Assay. *Analytical Biochemistry*, Volumen 239, pp. 70-76.

Bolling, B. W., 2017. Almond polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Volumen 16, pp. 346-368.

Bolling, B. W., Dolnikowski, G., Blumberg, J. B. & Chen, C. O., 2009. Quantification of Almond Skin Polyphenols by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*, 74(4), pp. 326-332.

Bolling, B. W., Dolnikowski, G., Blumberg, J. B. & Chen, C.-Y. O., 2010. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, Issue 122, pp. 819-825.

Bolling, B. W., Oliver Chen, C.-Y., McKay, D. L. & Blumberg, J. B., 2011. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews*, Volumen 24, p. 244-275.

Carbajal, Á., 2013. *La Nutrición en la Red*. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. [En línea] Available at: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/> [Último acceso: 14 08 2018].

Chang, S. K., Alasalvar, C., Bolling, B. W. & Shahidi, F., 2016. Nuts and their co-products: The impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. *Journal of Functional Foods*, Volumen 26, pp. 88-122.

Decisión 2002/657/CE, 2002. *Decisión 2002/657/CE de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados*. s.l.:L221/8.

Eurolab España: Morillas, P. P. & colaboradores, 2016. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. s.l.:s.n.

Felipe, A. J., Rius, J. & Rubio-Cabetas, M. J., 2017. *El cultivo del almendro. El almendro II*. Zaragoza: s.n.

Garrido, I., Monagas, M., Gomez-Cordovés, C. & Bartolomé, B., 2007. Extracción de antioxidantes a partir de subproductos del procesado de la almendra. *Grasas y aceites*, 58(2), pp. 130-135.

Garrido, I., Monagas, M., Gomez-Cordovés, C. & Bartolomé, B., 2008. Polyphenols and Antioxidant Properties of Almond Skins: Influence of Industrial Processing. *Journal of Food Chemistry*, 73(2), pp. 106-115.

Granato, D., Sousa Santos, J., Galvao Maciel, L. & Savio Nunes, D., 2016. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 80, pp. 266-279.

Higdon, J., 2005. *Oregon State University*. [En línea] Available at: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> [Último acceso: 13 08 2018].

Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, Volumen 53, pp. 1841-1856.

INTA, 2013. *Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos-Portal Antioxidantes*. [En línea] Available at: <http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-antioxidantes/> [Último acceso: 10 08 2018].

Jahanban-Esfahlan, A. & Jamei, R., 2012. Properties of biological activity of ten wild almond (*Prunus amygdalus* L.) species. *Turk J. Biol*, Volumen 36, pp. 201-219.

Jahanban-Esfahlan, A., Jamei, R. & Jahanban Esfahlan, R., 2010. The importance of almond (*Prunus amygdalus* L.) and its by-products. *Journal Food Chemistry*, Volumen 120, pp. 349-360.

Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S., 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods*, Volumen 2, pp. 41-60.

Mandalari, G. y otros, 2010. Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, Volumen 23, pp. 166-174.

- Matic, P., Sabljic, M. & Jakobek, L., 2017. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *Journal of AOAC International*, 100(6), pp. 1795-1803.
- Milbury, P. E., Chen, C.-Y., Dolnikowski, G. & Blumberg, J. B., 2006. Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 54, pp. 5027-5033.
- Ministerio de Agricultura, p. y. a., 2017. *Superficies y producciones anuales de cultivo de acuerdo con el Reglamento (CE) 543 / 2009*. [En línea] Available at: <https://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> [Último acceso: 20 08 2018].
- Monagas, M. y otros, 2009. Comparative Flava-3-ol Profile and Antioxidant Capacity of Roasted Peanut, Hazelnut, and Almond Skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 57, pp. 10590-10599.
- Muñoz-Bernal, J. A. y otros, 2017. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), pp. 23-28.
- Neveu, V. y otros, 2010. *Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods*. [En línea] Available at: <http://phenol-explorer.eu>
- Oliveira, I. y otros, 2018. Morphological, mechanical and antioxidant properties of Portuguese almond cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, Volumen 55, pp. 467-478.
- Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 53, pp. 4290-4302.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A., 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), pp. 76-89.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E., 1966. Dósa ge des tannins du vin rouges et détermination du leur structure. *Chem Anal*, Volumen 48, pp. 188-196.
- Sarkis, J. R. y otros, 2014. Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Seed and Nut Cakes from Edible Oil Industry. *J Am Oil Chem Soc*, Volumen 91, pp. 1773-1782.

- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidant by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, Volumen 299, pp. 152-178.
- Smeriglio, A. y otros, 2016. Polyphenolic content and biological properties of Avola almond (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb) skin and its industrial byproducts. *Industrial Crops and Products*, Volumen 83, pp. 283-293.
- Tomás-Barberán, F. A., 2003. Los polifenoles en los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10(2), pp. 41-53.
- Ulubelen, A., Topcu, G. & Kolak, U., 2005. Labiatae flavonoids and their bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, Volumen 30, pp. 233-302.
- US Department of Agriculture, A. R. S. N. D. L., 2018. *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*. [En línea] Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/> [Último acceso: 15 08 2018].
- Xie, L., V. Roto, A. & Bolling, B. W., 2012. Characterization of Ellagitannins, Gallotannins, and Bound Proanthocyanidins from California Almond (*Prunus dulcis*) Varieties. *Journal of Agricultura of Chemistry*, Volumen 60, pp. 12151-12156.
- Yada, S., Lapsely, K. & Guangwei, H., 2011. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volumen 24, pp. 469-480.
- Yildiz, H. y otros, 2014. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of some local and cultivated almonds. *Oxidation Communication*, Volumen 37, pp. 733-740.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W., 1999. The Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, Volumen 64, pp. 555-559.

## ANEXOS

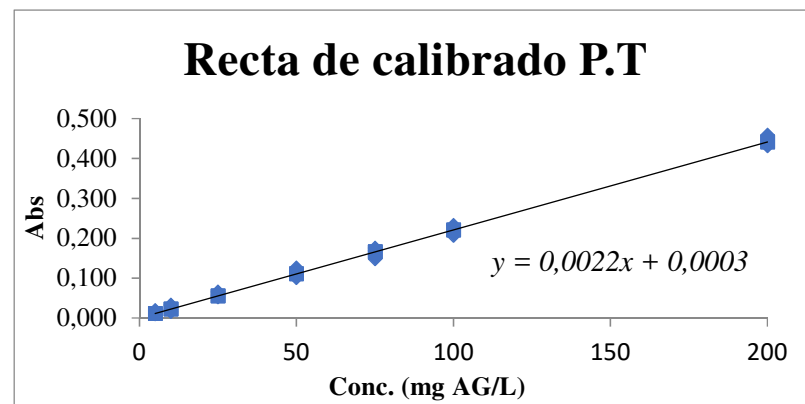
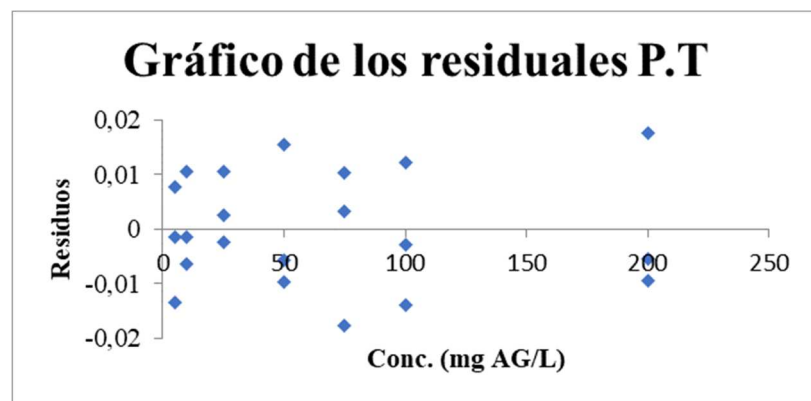
### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES: ESTUDIO DE LINEALIDAD

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9975
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9949
R <sup>2</sup> ajustado	0,9947
Error típico	0,0105
Observaciones	21

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,4084	0,4084	3723,8589	0,0000
Residuos	19	0,0021	0,0001		
Total	20	0,4105			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	0,0003	0,0033	0,1048	0,9176	-0,0066	0,0073	-0,0066	0,0073
Conc. (mg AG/L)	0,0022	0,0000	61,0234	0,0000	0,0021	0,0023	0,0021	0,0023



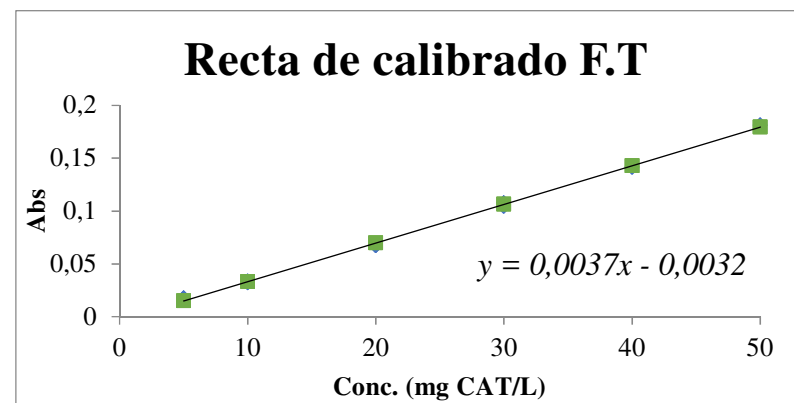
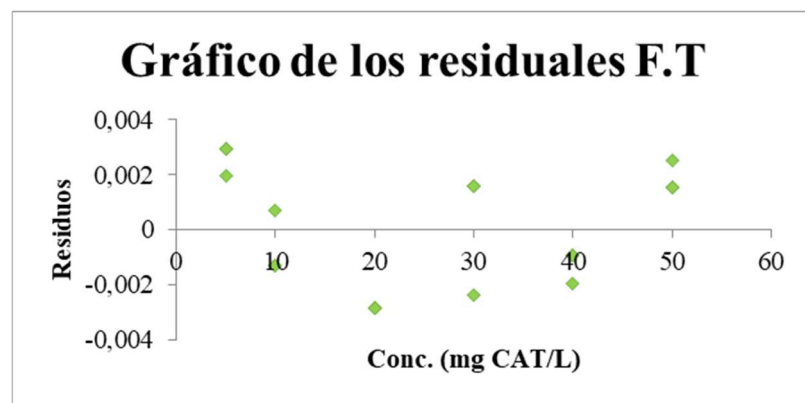
## DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES: ESTUDIO DE LINEALIDAD

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9994
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9987
R <sup>2</sup> ajustado	0,9987
Error típico	0,0022
Observaciones	18

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,0609	0,0609	12647,6784	0,0000
Residuos	16	0,0001	0,0000		
Total	17	0,0610			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-0,0032	0,0010	-3,2806	0,0047	-0,0053	-0,0011	-0,0053	-0,0011
Conc. (mg CAT/L)	0,0037	0,0000	112,4619	0,0000	0,0036	0,0037	0,0036	0,0037



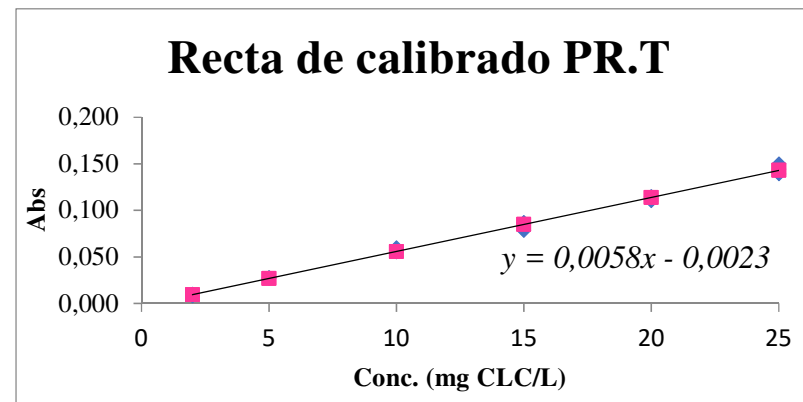
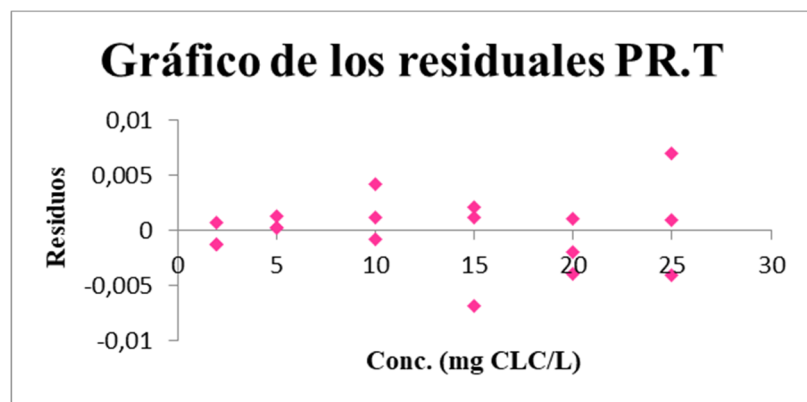
## DETERMINACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS TOTALES: ESTUDIO DE LINEALIDAD

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9979
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9959
R <sup>2</sup> ajustado	0,9956
Error típico	0,0032
Observaciones	18

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,0396	0,0396	3850,3424	0,0000
Residuos	16	0,0002	0,0000		
Total	17	0,0398			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-0,0023	0,0014	-1,6359	0,1214	-0,0053	0,0007	-0,0053	0,0007
Conc. (mg CLC/L)	0,0058	0,0001	62,0511	0,0000	0,0056	0,0060	0,0056	0,0060



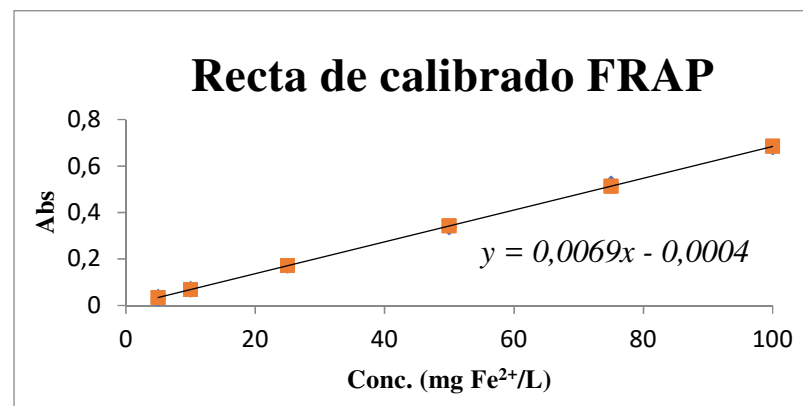
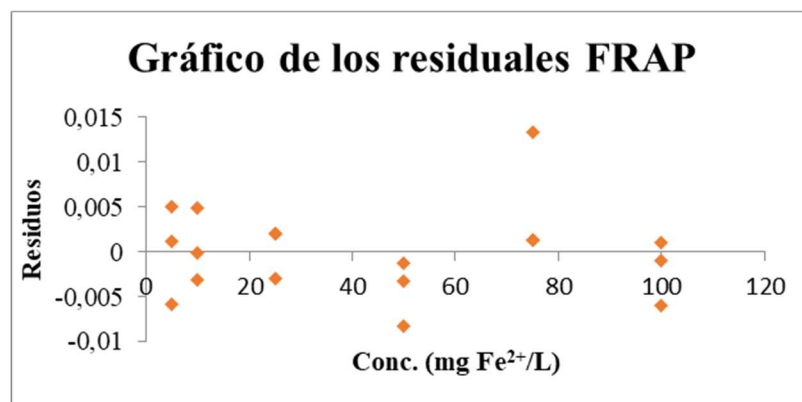
## DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-ENSAYO FRAP: ESTUDIO DE LINEALIDAD

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9996
R <sup>2</sup> ajustado	0,9996
Error típico	0,0051
Observaciones	18

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1,0105	1,0105	39054,5460	0,0000
Residuos	16	0,0004	0,0000		
Total	17	1,0109			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-0,0004	0,0019	-0,1909	0,8510	-0,0045	0,0038	-0,0045	0,0038
Conc. (mg Fe <sup>2+</sup> /L)	0,0069	0,0000	197,6222	0,0000	0,0068	0,0069	0,0068	0,0069



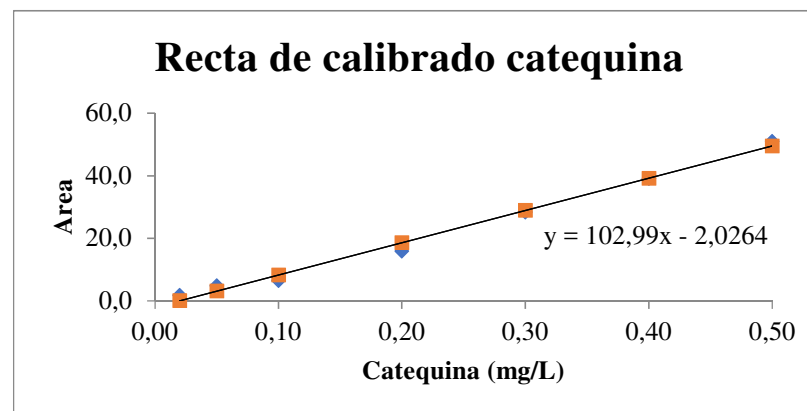
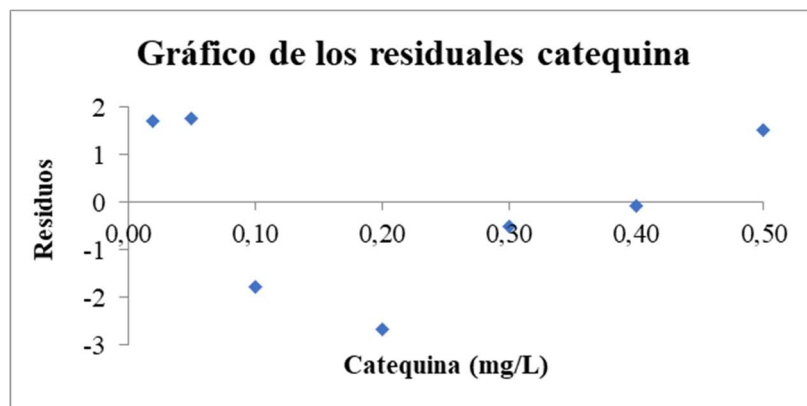
## ESTUDIO DE LINEALIDAD: CATEQUINA

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9956
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9912
R <sup>2</sup> ajustado	0,9894
Error típico	1,9491
Observaciones	7

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2129,5516	2129,5516	560,5776	0,0000
Residuos	5	18,9943	3,7989		
Total	6	2148,5458			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-2,0264	1,2225	-1,6576	0,1583	-5,1689	1,1161	-5,1689	1,1161
Catequina (mg/L)	102,9895	4,3499	23,6765	0,0000	91,8079	114,1712	91,8079	114,1712



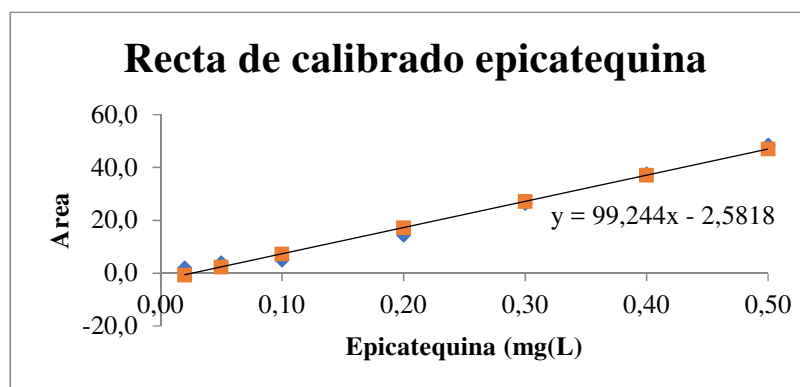
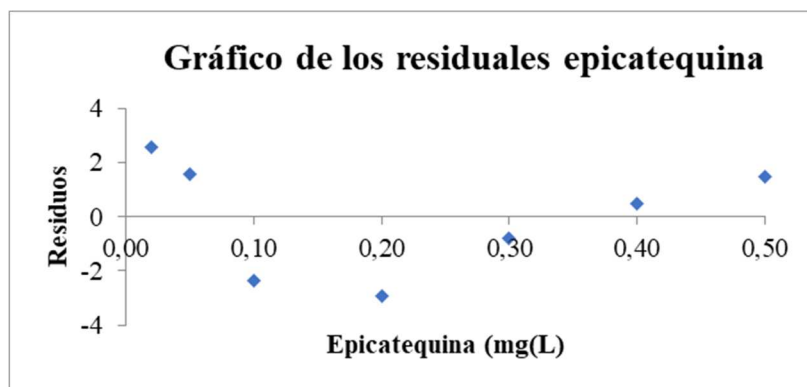
## ESTUDIO DE LINEALIDAD: EPICATEQUINA

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9935
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9870
R <sup>2</sup> ajustado	0,9844
Error típico	2,2851
Observaciones	7

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1977,4914	1977,4914	378,7100	0,0000
Residuos	5	26,1083	5,2217		
Total	6	2003,5996			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-2,5818	1,4333	-1,8013	0,1315	-6,2661	1,1026	-6,2661	1,1026
Epicatequina (mg(L))	99,2445	5,0998	19,4605	0,0000	86,1350	112,3539	86,1350	112,3539



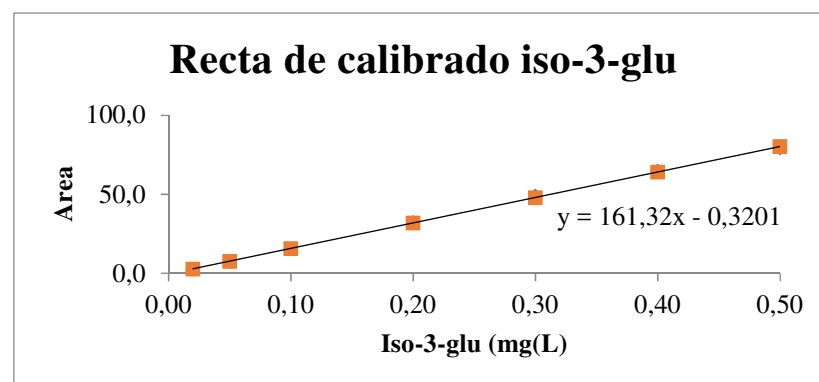
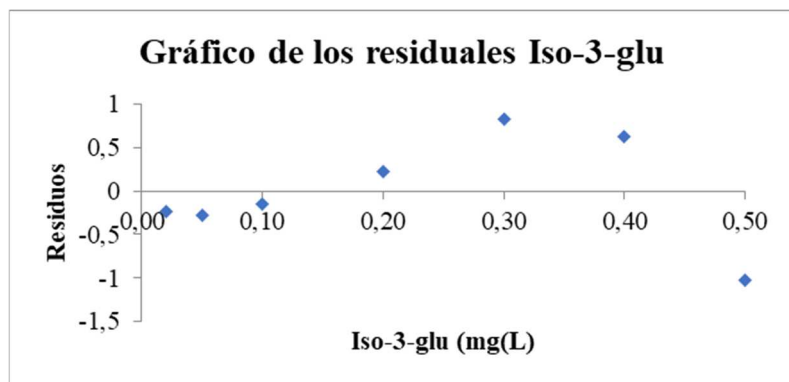
## ESTUDIO DE LINEALIDAD: ISORHAMNETINA-3-O-GLUCÓSIDO

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9996
R <sup>2</sup> ajustado	0,9995
Error típico	0,6844
Observaciones	7

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5225,0009	5225,0009	11155,9511	0,0000
Residuos	5	2,3418	0,4684		
Total	6	5227,3427			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	-0,3201	0,4293	-0,7458	0,4894	-1,4236	0,7833	-1,4236	0,7833
Iso-3-glu (mg(L))	161,3215	1,5274	105,6217	0,0000	157,3953	165,2477	157,3953	165,2477



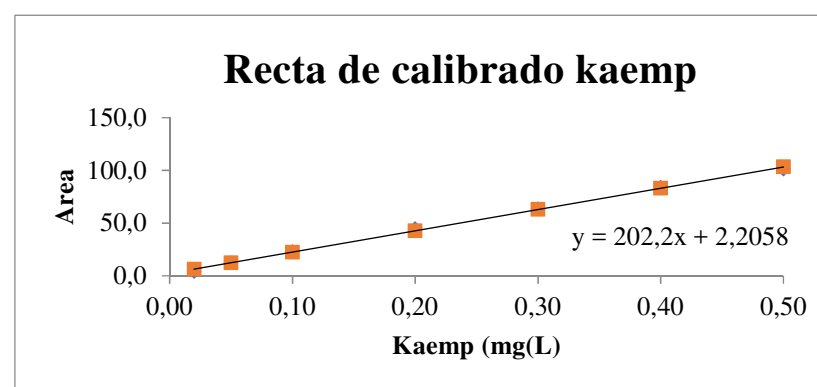
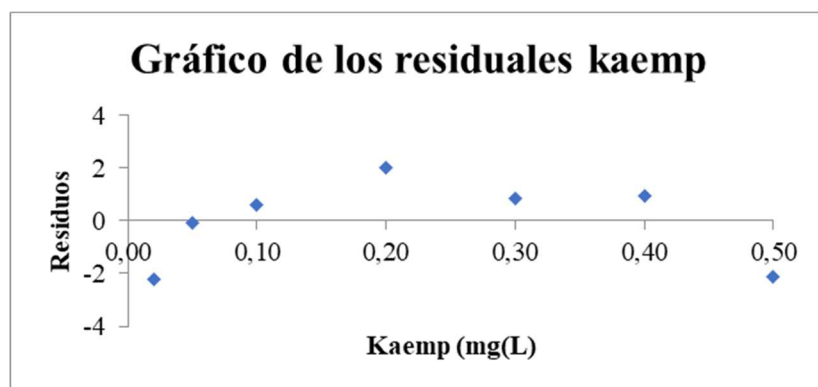
## ESTUDIO DE LINEALIDAD: KAEMPFEROL-3-O-RUTINÓSIDO

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9991
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9981
R <sup>2</sup> ajustado	0,9977
Error típico	1,7657
Observaciones	7

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	8208,2589	8208,2589	2632,7651	0,0000
Residuos	5	15,5887	3,1177		
Total	6	8223,8476			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	2,2058	1,1075	1,9917	0,1030	-0,6411	5,0527	-0,6411	5,0527
Kaemp (mg(L))	202,1969	3,9407	51,3105	0,0000	192,0672	212,3267	192,0672	212,3267



## ESTUDIO DE LINEALIDAD: ISORHAMNETINA-3-O-RUTINÓSIDO

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9995
R <sup>2</sup> ajustado	0,9994
Error típico	0,8181
Observaciones	7

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	6463,15527	6463,15527	9657,52343	0,00000
Residuos	5	3,34618	0,66924		
Total	6	6466,50144			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	0,8753	0,5131	1,7058	0,1488	-0,4437	2,1943	-0,4437	2,1943
Iso-3-rut (mg(L))	179,4202	1,8257	98,2727	0,0000	174,7270	184,1134	174,7270	184,1134

