



**"COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
DIFERENTES ALIMENTOS VEGETALES Y SU  
VARIACIÓN TRAS LOS PROCESOS HABITUALES DE  
PREPARACIÓN."**

ALUMNO: Francisco Javier Martín García

TUTOR: Tomás Girbés Juan

# 1. ÍNDICES:

<b>1. ÍNDICES:</b>	<b>I</b>
1.1 ÍNDICE DE FIGURAS:	III
1.2 ÍNDICE DE TABLAS:	III
1.3 ABREVIATURAS UTILIZADAS:	IV
<b>2. RESÚMEN:</b>	<b>V</b>
2.1 PALABRAS CLAVE:	V
<b>3. INTRODUCCIÓN:</b>	<b>1</b>
3.1 LOS RADICALES LIBRES, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL EFECTO ANTIOXIDANTE:	1
3.2 SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LOS ALIMENTOS:	3
3.2.1 Brócoli:	4
3.2.2 <i>Calocybe gambosa</i> :	5
3.2.3 Uvas:	6
3.2.4 Cereales:	7
3.2.5 <i>Sambucus nigra</i> y <i>Sambucus ebulus</i> :	8
3.3 BIODISPONIBILIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES:	9
3.4 JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO:	10
<b>4. OBJETIVOS:</b>	<b>11</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>12</b>
5.1 DISEÑO:	12
5.2 MATERIAL DE LABORATORIO:	12
5.2.1 Equipos, Material Fungible y Reactivos Químicos: ANEXOS I, II y III.	12
5.2.2 Material Biológico:	12
5.3 MÉTODOS:	13
5.3.1 Preparación de los extractos:	13

5.3.2	Determinación del contenido fenólico total mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu:	14
5.3.3	CUPRAC para determinar la capacidad antioxidante:	15
5.3.4	DPPH para determinación de la actividad antirradicalaria:	15
5.3.5	Método diferencial de pH:	15
5.3.6	Determinación del poder reductor:	16
5.3.7	Determinación del contenido total de flavonoides:	17
5.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	17
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN:</b>	<b>18</b>
6.1	Brócoli:	19
6.2	<i>Calocybe gambosa</i> :	21
6.3	Copos de avena y maíz:	23
6.4	Uva Tempranillo:	24
6.5	Análisis de la metodología, comparación de resultados y limitaciones del estudio:	26
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES:</b>	<b>28</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>29</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS:</b>	<b>32</b>
9.1	ANEXO I: Equipos	32
9.2	ANEXO II: Material fungible	33
9.3	ANEXO III: Reactivos químicos	34
9.4	ANEXO IV: Rectas patrón de los diferentes ensayos realizados:	35
9.5	ANEXO V: Resultados de todas las muestras en los diferentes ensayos:	36

## 1.1 ÍNDICE DE FIGURAS:

✓ <b>FIG. 1:</b> Respuesta Hormética.	2
✓ <b>FIG. 2:</b> Esquema general de las sustancias antioxidantes presentes en los alimentos.	3
✓ <b>FIG. 3:</b> Resultados obtenidos para los diferentes extractos del brócoli.	20
✓ <b>FIG. 4:</b> Resultados obtenidos para los diferentes extractos del hongo <i>Calocybe gambosa</i> .	21
✓ <b>FIG. 5:</b> Diferencias observadas entre los extractos de A y B.	22
✓ <b>FIG.6:</b> Resultados obtenidos para los extractos de copos de maíz y avena.	23
✓ <b>FIG. 7:</b> Gráfico de las actividades antioxidantes libre, atrapada y la total en maíz y avena.	24
✓ <b>FIG. 8:</b> Resultados obtenidos para los diferentes extractos de la uva Tempranillo y bayas de saúcos.	24

## 1.2 ÍNDICE DE TABLAS:

✓ <b>Tabla 1:</b> Resultados de la búsqueda realizada en PUBMED el 19/03/2017.	10
✓ <b>Tabla 2:</b> Resultados de la uva Tempranillo (piel + pulpa en sus correspondientes proporciones).	25
✓ <b>Tabla 3:</b> Resultados de otros estudios comparativos y diferentes bases de datos a los efectos de constatar diferencias dentro de cada alimento y entre los distintos alimentos.	27
✓ <b>Tabla 4:</b> Resultados de los diferentes ensayos realizados en cada una de las muestras estudiadas.	38

### 1.3 ABREVIATURAS UTILIZADAS:

**min.** : Minutos

**°C** : Grados Celsius

**μl** : Microlitros

**ADN** : Ácido desoxirribonucleico

**AM** : Antocianidina monomérica

**ARN** : Ácido ribonucleico

**CUPRAC** : Cupric reducing Antioxidant capacity

**DPPH** : Diphenil-1-picrylhydrazyl

**DS** : Desviación estándar

**FIG** : Figura

**FRAP** : Ferric Ion Reducing Antioxidant Power

**g** : Gramos

**M** : Concentración molar

**mg** : Miligramos

**ml** : Mililitros

**mM** : Milimolar

**mmol** : Milimol

**NADPH** : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**nM** : Nanomolar

**RL** : Radical libre

**RNS** : Especies reactivas del nitrógeno

**ROS** : Especies reactivas del oxígeno

## 2. RESÚMEN:

**INTRODUCCIÓN:** Los alimentos vegetales aportan diferentes elementos antioxidantes que junto a otros fitoquímicos han demostrado reducir el desarrollo de determinadas enfermedades degenerativas. Por ello es necesario conocer las diferencias de dicho contenido en los alimentos y sus partes, así como su variación tras los procesos de preparación previos al consumo.

**OBJETIVO:** Comparación de la actividad antioxidante de diferentes alimentos, sus diferentes partes y el efecto de los procesos habituales de preparación.

**MÉTODOS:** estudio experimental básico realizando diferentes ensayos (FOLIN, CUPRAC, DPPH, Determinación de flavonoides, de antocianinas y poder reductor del ion férrico) en muestras de brócoli, *Calocybe gambosa*, copos de maíz, copos de avena, uvas y vino "Tempranillo" y saúcos.

**RESULTADOS:** El estudio muestra pequeñas diferencias entre la flor y el tronco del brócoli al igual que entre el sombrero y el pie del hongo, siendo los valores del tronco y del pie los inferiores. Tras la adición de leche en ambos cereales o la ebullición del brócoli, el contenido antioxidante disminuye aunque de manera diferente en función del ensayo realizado. En el caso de el salteado del hongo, prácticamente no le afecta.

**CONCLUSIONES:** En general, se muestran los diversos elementos antioxidantes que ingerimos a través de los vegetales, analizando su gran variabilidad y biodisponibilidad. Este trabajo trata de proponer la mejor forma de consumo de cada alimento, para conservar el mayor contenido antioxidante posible, recomendando el aprovechamiento de los tallos de los diversos vegetales, así como las pieles de las frutas (como en el caso de la uva) o la utilización de cocciones que eviten la ebullición.

### 2.1 PALABRAS CLAVE:

Antioxidantes; polifenoles; *Brassica oleracea* (var. *italica*); *Calocybe gambosa*; copos de maíz; copos de avena; uvas "Tempranillo"; saúcos.

### 3. INTRODUCCIÓN:

#### 3.1 LOS RADICALES LIBRES, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL EFECTO ANTIOXIDANTE:

De manera continuada se producen en el organismo gran número de especies reactivas, derivadas, tanto del oxígeno (ROS), como del nitrógeno (RNS). Los cuales a pequeñas concentraciones son esenciales en la regulación de diversas funciones fisiológicas de señalización (Di Meo, Reed, Venditti, & Victor, 2016). Se conocen generalmente como radicales libres (RL) y proceden de reacciones endógenas (en la cadena respiratoria, sistema NADPH oxidasa, etc.) y diversas fuentes exógenas (a través de la exposición ambiental, fármacos o alimentos).

Una sobreproducción de estas especies reactivas, al igual que una alteración de sus sistemas reguladores puede desencadenar una alteración en la homeostasis del sistema redox de las células, originando un problema denominado daño o estrés oxidativo. Se trata del efecto destructivo ocasionado por los radicales libre sobre diferentes estructuras celulares o macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN y ARN). Pueden actuar como factor desencadenante o coadyuvante del desarrollo de diversas enfermedades, entre las que podemos destacar: envejecimiento, cáncer, cataratas, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, autoinmunes, etc. (Lindsay, 2002). Aunque se debe de tener en cuenta que una cierta cantidad de RL es necesaria para la activación del sistema inmune y quizás otros procesos, al actuar como moléculas "señal" en la proliferación, diferenciación y muerte celular.

El sistema regulador encargado de mantener el equilibrio entre el sistema redox y los antioxidantes está formado, fundamentalmente, por dos grupos (Poljsak, Šuput, & Milisav, 2013):

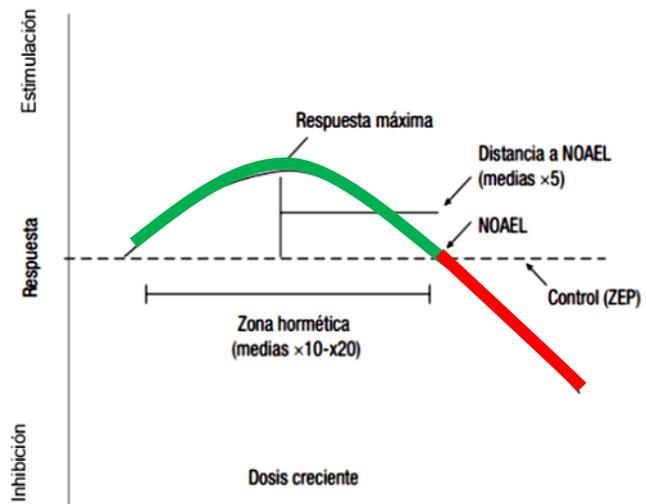
- Antioxidantes endógenos:
  - Enzimáticos: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión (GSH).
  - No enzimáticos: diversas proteínas y captadores de bajo peso molecular (ácido úrico, coenzima Q y el ácido lipóico).

- Antioxidantes exógenos: aquellas sustancias aportadas directamente a través de los alimentos u obtenidas por la transformación de estos, como son: las vitaminas C y E, los carotenoides y los polifenoles.

**FIG. 1:** Respuesta hormética. La suplementación de antioxidantes ejerce efectos diferentes en función de la dosis administrada, siguiendo una respuesta bifásica. (Jiménez López et al., 2017)

NOAEL (máxima dosis que no produce efectos perjudiciales).

ZEP (Dosis a partir de la que la estimulación se convierte en inhibición).



Todos estos elementos antioxidantes participan, en el complejo proceso de la homeostasis redox, reduciendo especies reactivas, disminuyendo al mínimo sus niveles y evitando su actuación sobre otros substratos.

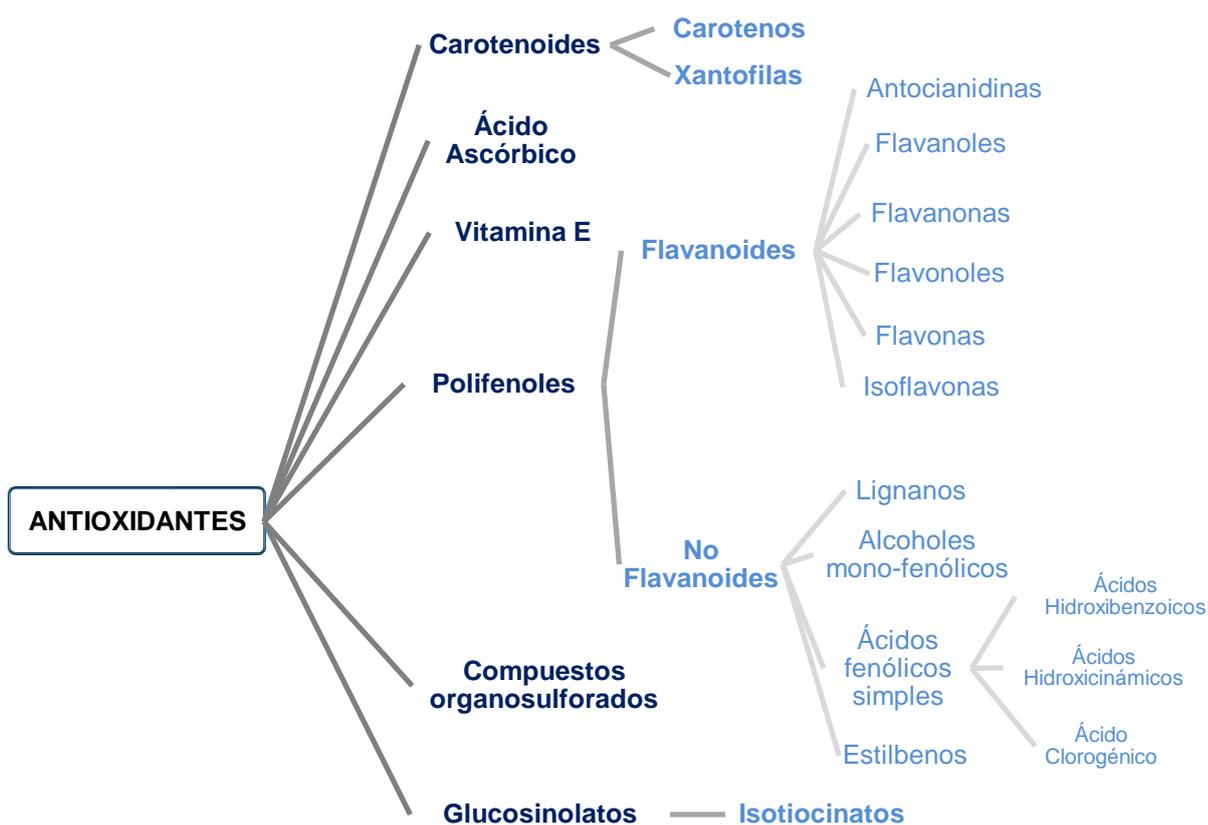
La administración exógena, a través de suplementos, de cantidades excesivas de antioxidantes puede llegar a ser perjudicial, no sólo debido a la eliminación masiva de radicales libre (necesarios en una determinada cantidad), sino al el efecto prooxidante que ejercen tras alcanzar su dosis de máximo efecto. Este efecto es explicado por la curva de respuesta bifásica (**FIG. 1**) y es conocido en toxicología como hormesis. Es decir, el efecto antioxidante de estas sustancias a dosis bajas se transforma en prooxidante cuando la dosis es superior a la del máximo efecto (Mattson, 2008).

Por lo tanto, el uso de suplementos, sólo es recomendado en aquellos procesos que cursen con un elevado estrés oxidativo. Aún, no se ha demostrado, que en situaciones normales protejan frente al estrés oxidativo o prevengan las enfermedades y deterioros que cursan a partir de este (Poljsak et al., 2013). Por ello este estudio se centra en los elementos antioxidantes aportados a través de alimentos.

### 3.2 SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LOS ALIMENTOS:

A través de una dieta variada y rica en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras y las semillas (frutos secos o cereales)), se aporta gran cantidad de sustancias bioactivas, denominadas fitoquímicos, denominadas así por las diversas funciones reguladoras que se les atribuye, entre las que podemos destacar la función antioxidante.

Los más importantes son clasificados (**FIG. 2**) y descritos a continuación:



**FIG. 2:** Esquema general de las sustancias antioxidantes presentes en los alimentos.

VITAMINA C (ácido ascórbico): se trata de uno de los principales agentes reductores en fase acuosa, que además, actúa evitando el efecto prooxidante de algunas sustancias como la vitamina E. Se debe tener en cuenta que la vitamina C también puede ser el desencadenante de diversas especies reactivas, este es el caso de las situaciones patológicas en las que se encuentra Fe y Cu libres en los fluidos corporales, donde la vitamina C genera radicales hidroxilo (Lindsay, 2002).

VITAMINA E: este término alberga un gran conjunto de tocoferoles y tocotrienoles considerados como los principales antioxidantes liposolubles en el ser humano. Puede llegar a actuar como prooxidante, pudiéndose evitar con la acción de la vitamina C, entre otros (Lindsay, 2002).

CAROTENOIDES: son denominados comúnmente como vitamina A, junto con los retinoides. Ambos grupos con efectos antioxidantes, aunque los carotenoides de manera mucho más importante. Los carotenoides se pueden diferenciar, en función de su estructura, en carotenos y xantofilas, siendo todos ellos aportados a través de el consumo de frutas, verduras y hortalizas (Lindsay, 2002).

COMPUESTOS FENÓLICOS: son todos aquellos compuestos que poseen en su estructura, al menos, un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (factor que, junto con el grado de metilación, determina su actividad antioxidante). Son muchos los compuestos fenólicos que podemos encontrar en los vegetales, por ello no resulta extraño que representen, aproximadamente, el 90% de la ingesta de antioxidantes de la dieta (Pérez-Jiménez, Díaz-Rubio, & Saura-Calixto, 2013). Destacando principalmente el grupo de los flavonoides, junto con otros como los estilbenos, lignanos o ácidos fenólicos (Lindsay, 2002).

La función antioxidante de este grupo de compuestos se atribuye a diferentes mecanismos (Valls i Bellés, 2009):

- Reducción directa de los radicales libres.
- Estabilización de los compuestos inestables creados por los radicales libres.
- Coadyuvante de la defensa antioxidante endógena.
- Actividades antivirales y antitumorales.

A continuación, se describen brevemente los alimentos estudiados y sus compuestos antioxidantes mayoritarios.

### 3.2.1 Brócoli:

Brócoli, bróculi o brécol son algunos de los nombres que recibe este vegetal de la familia de las *Brasicáceas* en el que se centra el estudio, cuyo nombre botánico es *Brassica oleracea (var. italica)*. Está formada por un pedúnculo floral similar al de la coliflor (*Brassica oleracea botrytis*) aunque menos compacto. Otra de las características clave es la presencia de hojas erguidas alrededor de dicho pedúnculo.

El color es uno de los aspectos clave en la diferenciación de las variedades, pudiendo encontrar variedades moradas, blancas, rojizas, amarillentas o verdes oscuras, siendo esta última la más conocida y por ello la elegida en este estudio.

En la actualidad, las *Brasicáceas*, son uno de los principales cultivos de hortalizas a nivel mundial, formando parte, cada vez más, de la alimentación habitual de las personas (Sotelo, Carrea, Velasco, & Soengas, 2014). Esto puede deberse entre otras causas a la atribución de numerosos beneficios para la salud, encontrados en gran número de artículos, tanto científicos como de divulgación. Como los efectos antioxidante y el preventivo del desarrollo cancerígeno, siendo los más destacados (Lindsay, 2002).

Los compuestos antioxidantes más relevantes son los glucosinolatos, productores de isotiocinatos tras su hidrólisis, de entre los que destaca el sulforafano. Este último, conocido como antioxidante indirecto, neutraliza radicales libres y modula enzimas de desintoxicación. Otros, no menos importantes, son las vitaminas C y E, carotenoides (entre los que destacan el  $\beta$ -caroteno y la luteína), ácidos fenólicos (ácidos cafeico y ferúlico), flavonoles (quercetina y Kaempferol) y el selenio, que actúa como antioxidante, directa e indirectamente, participando en la activación de diversas enzimas protectores del estrés oxidativo (Mahn & Reyes, 2012).

Uno de los compuestos fenólicos menos estudiados son las ligninas, pero no por ello menos importante. Se trata de la única fibra no polisacárida conocida, cuya concentración destaca principalmente en el tronco y aumenta con el tiempo de almacenamiento (Schäfer, Stanojlovic, Trierweiler, & Bunzel, 2017).

### **3.2.2 Calocybe gambosa:**

El *Calocybe gambosa* es un hongo silvestre comestible del género *Calocybe*, el cual abarca a más de 40 especies. También es denominada popularmente "Perrochico" o "Seta de San Jorge", entre otros. Crece durante la primavera en prados, claros de los bosques u otros lugares herbosos del norte de España, Reino Unido y el sur de Francia, principalmente. Se caracteriza por un monocolor que varía entre el blanco y el amarillo cremoso, un tronco corto y robusto y láminas blancas que con el tiempo cambian a color crema. La característica que más le define es su olor y sabor a harina fresca, que hacen de él, uno de los más comercializados y apreciados en el mundo gastronómico.

Sin embargo, en cuanto a sus componentes antioxidantes, no es una de las setas más estudiadas, por ello se describen a continuación los compuestos antioxidantes que se encuentran en los hongos comestibles de manera general, intentando centrarlos en *Calocybe gambosa* concretamente (Ramírez Anguiano, Soler Rivas, & Santoyo Díez, 2009). El Se, uno de los compuestos más comunes en los hongos comestibles, destaca por sus importantes funciones antioxidantes (destacando su efecto sinérgico junto con la Vitamina E o el efecto como cofactor de enzimas antioxidantes). Aunque los mayores responsables del efecto antioxidante son los compuestos fenólicos, que aún no han sido identificados concretamente (teniendo en cuenta su gran número, como se aprecia en la amplia variedad de caracteres organolépticos que originan). Los polisacáridos fúngicos, formando complejos con proteínas (en la mayoría de los casos), son otro de los responsables de las actividades antirradicalaria, inmunomoduladora y potenciadora de las defensas antioxidantes endógenas.

Otro compuesto de interés es el ergosterol, uno de los principales esteroides producidos por dicho hongo, esencial de su pared celular y con numerosas propiedades antioxidantes. (Villares, Mateo-Vivaracho, García-Lafuente, & Guillamón, 2014).

### 3.2.3 Uvas:

La uva es un fruto ampliamente consumido, como fruta fresca o alguno de sus derivados como el zumo o el vino. Se trata de frutos carnosos, redondeados, obtenidos de la vid, que conforman grandes racimos apretados, inmersos entre las grandes hojas verdes lobuladas de la vid. Se trata de una planta perteneciente a la familia de las Vitáceas, siendo la *Vitis vinifera* la especie más cultivada en toda Europa. Concretamente la variedad "Tempranillo", caracterizada por frutos de color negro, será en la que se centre este trabajo, al tratarse de una las variedades más característica y producida de España.

El propio metabolismo de la uva origina un gran número de compuestos beneficiosos para la misma (protegiéndola frente a las condiciones estresantes). Siendo los polifenoles los más destacados, que se clasifican a continuación en dos grupos:

- **No flavonoides:** como el resveratrol, principal estilbeno de la uva con un gran efecto antioxidante. Imprescindible en el sistema de defensa de la propia vid (con efecto similar al de una fitoalexina).

- **Flavonoides:** compuestos responsables del color y astringencia del vino y la estabilidad de los frutos frente a la oxidación. Destacan:
  - Flavanoles (catequina, epicatequina o proantocianidinas) : en piel y semillas.
  - Flavonoles: en forma glicosilada en la piel y como agliconas en el vino.
  - Antocianinas: aumentan según el grado de madurez y el color rojizo de la uva.

La concentración de dichos compuestos fenólicos en el vino requiere un contacto eficiente entre el mosto y las partes sólidas de los racimos durante la fermentación, sólo al transfiere sólo una fracción de los polifenoles totales de la uva. De ahí la importancia de desarrollar procesos que sean lo más eficientes posible, en cuanto al contenido fenólico. Valorando, la influencia, sobre el contenido fenólico del vino, de otros muchos factores (microbiológicos, químicos, físicos o la propia variedad de la uva) (Giovinazzo & Grieco, 2015).

#### 3.2.4 Cereales:

Los cereales, entendidos como el conjunto de semillas de los diferentes alimentos vegetales, son alimentos básicos de la vida diaria. Su alto grado de elaboración, ha ido acompañado de un aumento en azúcares y grasas poco saludables, que transforman a estos productos en poco o nada saludables. Por ello, dentro de la amplia variedad de productos procesados para el desayuno a base de cereales, se han seleccionado los copos de maíz y de avena, cuya composición es la más semejante a la del grano natural del que proceden.

La mayor parte de las sustancias con propiedades antioxidantes se encuentran en las capas más externas de los granos, por lo tanto reducir el refinamiento, sería una de las mejores formas de reducir su pérdida (Ragae, Seetharaman, & Abdel-Aal, 2014).

Entre los compuestos fenólicos menos estudiados se encuentran los lignanos, muy presentes en ambos cereales y destacados por su gran número de efectos biológicos, entre los que se encuentra el efecto antioxidante. El 7-Hidroxymatairesinol es un tipo de lignano anteriormente atribuido únicamente al abeto, aunque actualmente se ha descrito su presencia en otros vegetales, como es el caso de los cereales. Anteriormente no ha sido identificado debido a su inestabilización en presencia de los ácidos y álcalis fuertes usados en las anteriores técnicas de identificación (Spilioti, Holmbom, Papavassiliou, & Moutsatsou, 2014).

#### 3.2.4.1 Copos de Maíz:

El color de los granos de maíz puede variar desde el blanco amarillento hasta el rojizo casi negro. Esta variación del color se debe al diferente contenido en carotenoides y antocianinas, compuestos con gran poder antioxidante, que varían según la especie. Por ello, una gran mejora sería la realización de copos de maíz con variedades más oscuras, como podría ser la variedad "Meiro". El resto de los elementos con función antioxidante presentes en el maíz son los fenoles, principalmente ácidos fenólicos, de los que destacan los derivados del ferúlico (formando parte de los arabinoxilanos) y del cinámico (Ragae et al., 2014).

La transformación molecular que sufren los granos de maíz en la extrusión (altas temperaturas y presiones durante breves periodos de tiempo) aumenta su capacidad antioxidante y su contenido en compuestos fenólicos, debido a la reducción de la disponibilidad de lisina tras la reacción de Maillard. La extrusión, además, mejora la estabilidad del cereal y la biodisponibilidad de su fibra insoluble (Ragae et al., 2014). Por ello los copos de maíz, son una buena forma de aportar carbohidratos a nuestra alimentación, siempre que se valore su contenido en azúcares, grasas y sal.

#### 3.2.4.2 Copos de Avena:

La *Avena sativa* L. ha cobrado gran importancia dentro de la alimentación humana, al descubrir su gran contenido de fitoquímicos, entre los que destacan los B-glucanos. Muchos de ellos con función antioxidante, como los carotenoides, la vitamina E, el selenio y una gran variedad de compuestos fenólicos (ácido ferúlico, flavonoide, etc.) (Ragae et al., 2014). Dentro de los compuestos fenólicos destacan las avenantramidas, únicos en la avena. Se trata de un gran grupo de alcaloides fenólicos que ha demostrado una potente actividad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque se desconozcan los mecanismos subyacentes (Sang & Chu, 2017).

#### 3.2.5 Sambucus nigra y Sambucus ebulus:

El *Sambucus nigra* es un árbol-arbusto de hoja caduca cuyas bayas son de color morado-negro, similares a las del *Sambucus ebulus* (planta herbácea) aunque se dispongan de forma diferente, racimos colgantes en el *S. nigra* y de forma erecta en la parte superior del tallo en el *S. ebulus*. Ambas cuentan con una larga tradición medicinal. En este estudio se analizan, únicamente, para comparar su destacado contenido en antocianinas, con el de las diferentes partes y derivados de la uva.

### 3.3 BIODISPONIBILIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES:

Al igual que existe un gran número de compuestos con efecto antioxidante existe un gran número de mecanismos de acción, de absorción, biodisponibilidad, etc. Teniendo en cuenta que los polifenoles componen el 90% de la ingesta de antioxidantes, únicamente se tratará su biodisponibilidad y sus mecanismos de acción (Pérez-Jiménez et al., 2013). Dentro de este grupo se diferencian compuestos con estructuras muy diferentes y por ello disponibilidades muy diversas, variando incluso en función del alimento, como los glucósidos de quercetina que presentan mayor disponibilidad en la cebolla que en la manzana.

Se estima que sólo un 5-10% de la ingesta total de polifenoles son absorbidos directamente en el intestino delgado (sobre todo aquellos con estructuras diméricas o monoméricas, tras sufrir reacciones de desconjugación o desglicosilación), mientras que el resto son metabolizados por la microflora intestinal a estructuras con funciones fisiológicas diferentes.

Los fenoles ingeridos, pueden ser sustrato de otras transformaciones, además de las necesarias para la absorción, como las de conjugación sufridas en el hígado e intestino (dando lugar a metabolitos solubles en agua), o con menor frecuencia las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (Grootaert, Kamiloglu, Capanoglu, & Van Camp, 2015).

Son muchos los estudios *in vitro* que demuestran el efecto quelante de los polifenoles, sin embargo existen varias razones, estudiadas en los flavonoides, para no esperar dichos efectos *in vivo*. Se observa una menor concentración en tejidos y en la circulación sistémica que la de los propios antioxidantes endógenos u otros elementos antioxidantes. Además durante los procesos de digestión, absorción y metabolización, que sufren hasta llegar a los tejidos, se produce un cambio de su capacidad antioxidante. Sin embargo, aunque su función antioxidante no sea neutralizar directamente especies reactivas, se han estudiado otros efectos que respaldan su función antioxidante, a través de una acción indirecta sobre los enzimas antioxidantes endógenos (Sies, 2010).

### 3.4 JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO:

Tras realizar una búsqueda bibliográfica en PUBMED (**Tabla 1**), se observó que durante los últimos años se ha realizado un gran número de estudios sobre los elementos antioxidantes, su identificación, su efecto o cuantificación en diferentes productos. Aún así, siguen existiendo aspectos muy poco estudiados. Entre los que caben destacar la comparación entre alimentos y el efecto de los diferentes procesos de transformación o por ejemplo los antioxidantes en el hongo *Calocybe gambosa*.

Al observar el número de artículos obtenido en la búsqueda no parece tan cierta la escasa investigación en ciertos aspectos, pero se debe de tener en cuenta que la mayoría de esos artículos no se relacionan con el aspecto realmente buscado. Siendo pocos los estudios que comparan el contenido antioxidante de diferentes alimentos y menos, aún, los que estudian el efecto del procesamiento.

Términos de búsqueda en PUBMED	TOTAL	Últimos 10 años		Últimos 5 años	
		TOTAL	Revisiones sistemáticas	TOTAL	Revisiones sistemáticas
Antioxidant	484.494	204.525	19.243	112.467	10.112
Antioxidant + Food +comparison + Cooking	67.752 2.832 51	38.755 1.784 36	3.692 48 1	23.621 1.076 22	2.141 28 1
Antioxidant + health	48.627	30.854	4.981	19.681	2.990
Antioxidant + Brassica oleracea italica + Cooking	47 3	38 2	2 1	24 2	2 1
Antioxidant + Mushrooms +Cooking	1.199 17	939 14	46 1	628 10	34 0
Antioxidant + <i>Calocybe gambosa</i> +Cooking	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Antioxidant + oat	265	183	16	120	10
Antioxidant + Corn +Flakes	2.515 5	1.292 2	37 0	765 2	18 0
Antioxidant + grapes +Tempranillo	2.359 21	1.669 20	160 0	958 15	87 0
Antioxidant + wine	2.874	1.693	281	887	143

**Tabla 1:** Resultados de la búsqueda realizada en PUBMED el 19/03/2017. Clasificados en función de los términos utilizados, la fecha de publicación y el tipo de estudio.

La mayoría de los estudios revisados realizan los extractos con metanol o etanol con el objetivo de cuantificar todos los elementos antioxidantes presentes. Sin embargo lo realmente relevante en nutrición es conocer los elementos antioxidantes que realmente se ingieren en solución o suspensión acuosa, por ello en este trabajo se realizan extractos acuosos con el objetivo de determinar la fracción ingerida.

Tanto la cantidad como el efecto de los fitoquímicos antioxidantes pueden modificarse por los procesos de preparación previos al consumo. Por ello otro objetivo del trabajo se basa en conocer los efectos de estos procesos, analizando las muestras en fresco y tras dicha transformación.

#### **4. OBJETIVOS:**

Comparación de la actividad antioxidante de diferentes alimentos vegetales, sus diferentes partes y el efecto de los procesos habituales de preparación.

- Realizar un resumen actual sobre los diferentes aspectos de las sustancias antioxidantes; tipos, efectos, biodisponibilidad, etc.
- Identificación bibliográfica de los principales elementos antioxidantes de los alimentos estudiados (brócoli, Calocybe gambosa, copos de avena, copos de maíz, uvas y vino variedad "Tempranillo" y bayas de saúco).
- Determinación del contenido fenólico total mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC.
- Determinación de la capacidad antirradicalaria mediante el método del DPPH.
- Determinación del poder reductor (del ión férrico) mediante el método FRAP modificado.
- Determinación del contenido total de flavonoides mediante el complejo aluminio-flavonoide y el contenido en antocianinas mediante el método diferencial del pH.
- Determinación del efecto de los diferentes métodos de cocción (salteado y hervido) y preparación de los alimentos sobre su contenido antioxidante y su capacidad antirradicalaria.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS:

### 5.1 DISEÑO:

Se trata de un estudio experimental básico, en el que se compara la capacidad antioxidante de alimentos de consumo habitual, representantes de los principales grupos vegetales. Utilizando cinco metodologías diferentes para la determinación de las capacidades antioxidantes y antirradicalarias de dichas muestras, con la intención de compararlas entre sí.

### 5.2 MATERIAL DE LABORATORIO:

**5.2.1 Equipos, Material Fungible y Reactivos Químicos:** ANEXOS I, II y III.

**5.2.2 Material Biológico:**

- Copos de maíz de la marca comercial Kellogg's® (Corn Flakes).
- Copos de Avena de la marca comercial Brüggem®.
- Uvas variedad Tempranillo con Denominación de Origen Cigales recogidas el 28 /10 /2016 en la localidad de Mucientes (Valladolid) y congeladas a -24°C hasta su utilización. El vino tinto, se realizó en su totalidad con la variedad de uvas, anteriormente citada. Tanto las uvas como el vino fueron cedidos por la Bodega Salvueros® de dicha localidad vallisoletana.
- Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* cv. Parthenon) de origen murciano comprado en los supermercados Lupa® de Valladolid en febrero de 2017.
- Seta *Calocybe gambosa* I recolectada en la localidad de Villameriel (Palencia) en Abril del 2016 y congelada a -24°C hasta su utilización. La Seta *Calocybe gambosa* II, también fue recolectada en la misma zona, pero era de mayor tamaño y fue troceada antes de la congelación.
- Mermelada de *Sambucus nigra* realizada en Cuenca por *Eduardo Soto Producciones*® con 56% bayas, 40% azúcar y 4% ácido cítrico.
- Bayas de *Sambucus ebulus* congeladas a -24°C hasta su utilización.

## 5.3 MÉTODOS:

### 5.3.1 Preparación de los extractos:

Todos los extractos fueron preparados siguiendo un mismo procedimiento, con algunas modificaciones. Las muestras (25 g) se extrajeron en 100 ml de tampón 0,28 M NaCl y 5 mM de fosfato sódico (pH 7,4) a 4°C durante como mínimo 4 horas, en continua agitación. Tras la extracción se filtraron con una malla de nylon y tras medir el volumen de extracción obtenido se centrifugaron a 3500 rpm a 4°C durante 30 min. Finalmente, el sobrenadante se extrajo, se alicuotó y congeló a -20°C hasta el momento de su utilización para los diferentes ensayos.

- Brócoli: se utilizaron muestras frescas, que tras separar tronco y flores, fueron lavadas con agua millipore retirando posibles restos de tierra. Se trocearon y trituraron con una batidora (añadiendo parte del tampón) para garantizar una adecuada extracción.
- Brócoli cocido: en este caso las muestras se sometieron a ebullición por separado (tronco y flor). Con diferentes tiempos de cocción, 15 min. en la florescencia y 25 min. en el tronco (debido a la distinta dureza de las partes).
- Calocybe gambosa I y II: tras la descongelación de las setas, tanto el sombrero como el pie, se lavaron, trocearon y trituraron con parte del tampón, al igual que el brócoli.
- Calocybe gambosa I a la plancha: ambas partes se hicieron a la plancha durante 1,5 min. junto con 3 ml de aceite de oliva virgen. Transcurrido este tiempo se extrajo la máxima cantidad de aceite mediante papel de filtro y papel absorbente. Además, se retiró la grasa sobrenadante tras la centrifugación, evitando su influencia en los resultados.
- UVAS: pulpa, piel y vino: las tres muestras se extrajeron siguiendo el protocolo descrito. Triturando la piel y la pulpa con un mortero de porcelana y tijeras esterilizadas.
- Copos de maíz y copos de avena: ambas muestras se trituraron en un molinillo de café, utilizando 200 ml de tampón en vez de 100 ml debido a su contenido en  $\beta$ -glucanos. La centrifugación no se llevó a cabo tras la extracción sino tras la

reacción de los diferentes ensayos, con el objetivo de mantener la fibra durante la reacción (teniendo en cuenta el alto contenido en lignanos).

- Copos de maíz y de avena junto con leche caliente: ambos copos se mezclaron con leche semidesnatada a 50 °C durante 4 min. Pasado este tiempo se secaron con papel de filtro y se trituraron junto con 100 ml de tampón (no 200 ml como en los anteriores), teniendo en cuenta que los  $\beta$ -glucanos ya estaban en parte secuestrados por las proteínas de la leche.
- *Sambucus nigra* y *ebulus*: la mermelada se usó directamente para la determinación de antocianinas, mientras que las bayas de *S. ebulus* fueron triturados en un mortero tras su descongelación.

### 5.3.2 Determinación del contenido fenólico total mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu:

El reactivo de Folin-Ciocalteu es un reactivo derivado de la mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato utilizado para la determinación de compuestos fenólicos, al igual que otras sustancias con poder reductor (ácido ascórbico, azúcares, etc.). Se utiliza el reactivo comercial, que tras su reducción da lugar a un color azulado cuantificado a 760 nm.

Para llevar a cabo la reacción se mezclan 0,6 ml de Carbonato sódico al 7.5 %, 0.2 ml de Reactivo de Folin junto con 0.02 ml del extracto de la muestra y hasta 1.5 ml de agua Elix. La mezcla resultante se incuba a 50 °C durante 10 min. y se determinan las absorbancias a 760 nm. Se utiliza el ácido gálico 2.5 mM para realizar la recta patrón con volúmenes 20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 60  $\mu$ l y 80  $\mu$ l. Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra estudiada.

### **5.3.3 CUPRAC para determinar la capacidad antioxidante:**

Se utiliza la reducción cúprica (Cu (II) a Cu (I)) para determinar la capacidad antioxidante reductora. El agente cromogénico oxidante usado es la neocuproína (reactivo comercial) disuelto en etanol. En esta reacción determinamos el contenido de polifenoles que se oxidan, reduciendo el Cu (II) de la neocuproína a Cu (I), lo que aporta el color cuya intensidad se determina a 450 nm.

Para llevar a cabo la reacción se mezclan 0.02 ml del extracto de la muestra, 1 ml de 10 mM de CuCl<sub>2</sub>, 1 ml de 10.5 mM de 96% neocuproína en etanol y 1 ml de 1M acetato de amonio a pH 7. Tras la preparación de la reacción se esperan 60 min. para permitir el desarrollo de la reacción y posteriormente se determinan las absorbancias a 450 nm. Se utiliza el ácido gálico 1mM en etanol para realizar la recta patrón con volúmenes 20 µl, 40 µl, 60 µl y 80 µl. Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de la muestra estudiada.

### **5.3.4 DPPH para determinación de la actividad antirradicalaria:**

El DPPH (diphenil-1-picrylhydrazyl) es un radical orgánico nitrogenado estable utilizado para determinar la capacidad antirradicalaria. Posee un electrón desapareado que le aporta el color violáceo, cuya intensidad disminuye a medida que el radical se reduce a DPPH-H por las muestras analizadas o el Trolox (en el caso de la recta patrón). A medida que aumenta la concentración de antioxidantes disminuye la concentración de radicales DPPH, disminuyendo la absorbancia a 515 nm.

Para llevar a cabo la reacción se utilizan 0.03 ml de la muestra, 0.07 ml de metanol y 2.9 ml de DPPH disuelto en metanol (al ser un disolvente orgánico) en el momento previo a la determinación. Pasados 10 min. de la adicción del DPPH se mide la absorbancia a 515 nm. El Trolox 1mM en etanol se utiliza para la realización de la recta patrón con volúmenes 25 µl, 50 µl, 75 µl y 100 µl. Los resultados se expresan en mg equivalentes de Trolox por gramo de la muestra estudiada.

### **5.3.5 Método diferencial de pH:**

Para determinar el contenido total de antocianinas se utiliza el método diferencial del pH, reduciendo el pH de los extractos a valores que transforman las antocianinas a catión flavilium de color rojo, el cual se cuantifica. Para ello se realizan dos soluciones con diferentes pH, cada una de ellas con 0.05 ml de muestra.

Una de las soluciones contiene 1.2 ml de 0.2 M KCl ajustado a pH 1 con HCl y la otra solución contiene 1.2 ml de 0.2 M acetato de sodio ajustado a pH 4.5 con ácido acético. Las absorbancias se determinan para ambas soluciones a dos longitudes de onda diferentes: 510 y 700 nm. El valor de  $A^*$  es calculado usando la siguiente ecuación:  $A^*=(A_{510}-A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510}-A_{700})_{\text{pH } 4.5}$ . Finalmente para determinar el contenido de antocianidina monomérica (AM) se usa la siguiente ecuación:  $\text{AM (mg/L)}= (A^* \cdot \text{Mr} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 1000)/26900 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  (coeficiente de extinción molar), donde Mr es el peso molecular del Cianidin-3-glucósido (449,6 g/mol). Para el cálculo del factor de dilución se usa la siguiente expresión:  $\text{FD}= (V_o / (V_m \cdot M_o))$ , donde  $V_o$  es el volumen inicial en el que se extrajo la muestra,  $V_m$  es el volumen utilizado para preparar la solución de la reacción y  $M_o$  el peso de la muestra utilizado para preparar el extracto. Los resultados se expresan en mg equivalentes de antocianidinas monoméricas por gramo de muestra.

#### **5.3.6 Determinación del poder reductor:**

Este método, también denominado FRAP, se basa en una reacción redox en la que intervienen un oxidante de fácil reducción en exceso (siendo  $\text{Fe}^{3+}$  en la mayoría de los casos) y la muestra antioxidante como reductor. A mayor reducción mayores valores de absorbancia se obtienen.

Se utilizan 150  $\mu\text{l}$  de muestra en 2.5 ml de 96% etanol, que se mezclan con 2.5 ml de 200 mM fosfato sódico a pH 6.6 y 2.5 ml de 1% de ferricianuro de potasio, se incuba la mezcla a 50 °C durante 20 min. Posteriormente se añaden 2.5 ml de 10% de ácido tricloroacético. En el caso de los cereales, la mezcla resultante se centrifuga durante 10 min. a 4°C y 3500 rpm, cogiendo 2, 5 ml del sobrenadante, sin embargo en el resto se cogen 2.5 ml de la mezcla resultante. En ambos casos esos 2,5 ml se mezclan con 2.5 ml de agua Elix y 0.5 ml de 0.03 % cloruro de hierro. Finalmente se determina la absorbancia a 700 nm. La recta patrón se realiza con ácido ascórbico en metanol 10 mM con volúmenes 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  y 60  $\mu\text{l}$ . Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra (Gülçin, Elmastaş, & Aboul-Enein, 2012).

### **5.3.7 Determinación del contenido total de flavonoides:**

Para la determinación del contenido de flavonoides se utilizó el complejo aluminio-flavonoide caracterizado por una coloración amarillenta salmonada cuya intensidad se cuantifica a 410 nm.

Para llevar a cabo la reacción se utilizan 0.25 ml de la muestra en 1,6 ml de agua Elix a lo que se añade 0.075 ml de 5%  $\text{NaNO}_2$  (a los 0'), 0.075 ml de 10%  $\text{AlCl}_3$  (a los 5 min.) y 0.5 ml de 1M  $\text{NaOH}$  (a los 6 min.). La absorbancia se determina a 410 nm. La recta patrón se realiza con 10 mM quercetina en metanol con volúmenes 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  y 60  $\mu\text{l}$ . Los resultados se expresan en mg equivalentes de quercetina por gramo de muestra (Kim, Yang, Lee, & Kang, 2011).

Para evitar que el propio color de las muestras (a la longitud de onda determinada) sea valorada como propia de la reacción, se ha calculado su densidad óptica tras ajustar con el blanco en cada uno de los ensayos. Manteniendo la proporción de muestra utilizada en el ensayo. Todas las absorbancias con las que se ha trabajado están corregidas, evitando posibles falsos resultados.

## **5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Todas las determinaciones se han realizado por triplicado con el objetivo de corregir el error del pipeteado, por ello los resultados se expresan con la media y la desviación estándar. Al tratarse de un estudio comparativo de muestras únicas de los diferentes alimentos no se ha llevado a cabo ninguna otra prueba de análisis estadístico. Es decir, no se ha calculado el tamaño muestral necesario para obtener valores estadísticamente significativos del contenido antioxidante de cada alimento (debido a su complejidad, además de la dificultad de generalizar ante muestras tan variables). Por ello se analizan grandes semejanzas y diferencias entre los diferentes alimentos y sus diferentes partes, justificando los resultados mediante revisión bibliográfica, sin la intención de buscar atribuir valores concretos a diferentes especies, por ejemplo no se busca conocer el contenido fenólico total de las uvas, sino la comparación de este con otros alimentos, o con él mismo, mediante otros ensayos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

La ingesta de sustancias antioxidantes en dosis habituales y de forma aislada no ha demostrado ningún beneficio directo. Aunque existen evidencias de la reducción del desarrollo de enfermedades degenerativas atribuida al conjunto de sustancias bioactivas aportadas a través del consumo elevado de frutas, verduras, cereales y algunas grasas (entre las que destacan los antioxidantes) (Astley & Lindsay, 2002). En este trabajo se compara la actividad antioxidante y antirradicalaria en varios alimentos de origen vegetal, mediante el uso de seis métodos diferentes, al no disponer aún de un ensayo estándar.

La capacidad antioxidante de un alimento puede verse modificada por un gran número de factores (variedad, condiciones y temporada de cultivo, almacenamiento y procesamiento) que dificultan la obtención de un valor estadísticamente significativos, al aumentar el número de muestras requeridas. Por ello, en este estudio, sólo se buscan resultados comparativos entre los diferentes alimentos, sus diferentes partes y las diferencias entre el producto recién adquirido y tras la preparación para su consumo.

Los procesos de cocción/preparación habituales a los que se someten los alimentos son los principales factores modificadores del contenido antioxidante. Los tratamientos térmicos en medio acuoso alteran a los antioxidante más polares (como los polifenoles o el ácido ascórbico), siendo la ebullición el método más perjudicial, al producir una lixiviación de los compuestos al medio, convirtiéndolos en sustancias diana para los procesos oxidativos. En el caso de las frituras, el efecto depende del tipo de fritura y aceite utilizado. En el caso de la frituras profundas, por ejemplo, algunos compuestos como los polifenoles y los tocoferoles pueden aumentar su contenido transfiriéndose del propio aceite. Aunque en ambos casos, debido a las altas temperaturas, se destruyen los fenoles más simples (Ramírez Anguiano et al., 2009).

Las frutas y verduras contienen la mayoría de los fitoquímicos en las formas conjugadas libres o solubles, pero no por ello se debe despreciar el 24% de compuestos fenólicos promedio que poseen unidos a la matriz. Sin embargo en el caso de los granos de cereal este tipo de fenoles (unidos covalentemente a los componentes estructurales de la pared celular) suponen en torno al 80% del total, en función del grano. Esta gran diferencia debe valorarse al analizar los resultados de

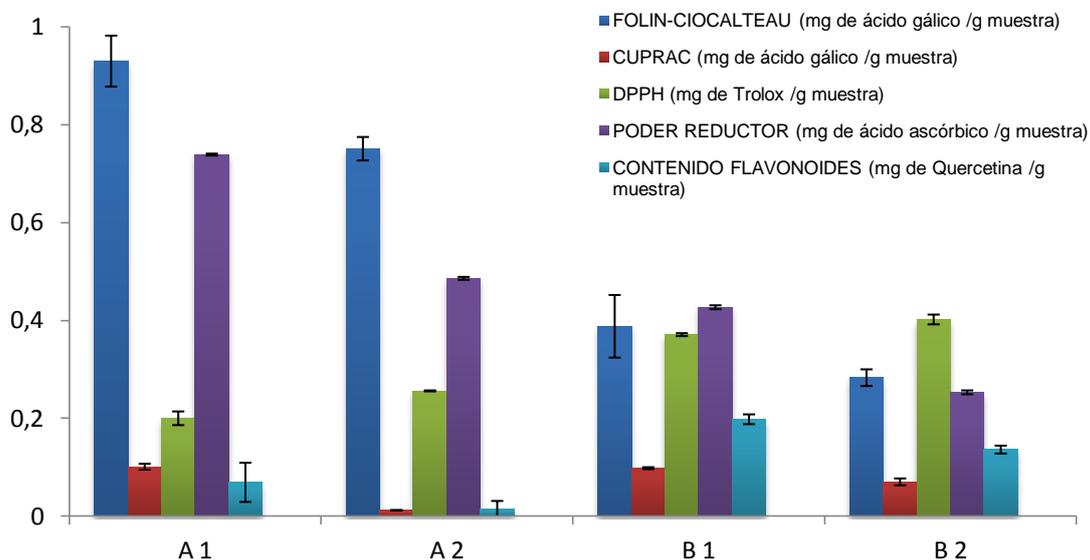
este trabajo, teniendo en cuenta que los ensayos utilizados reaccionan, únicamente, con los elementos libres (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014). Por ello, con estos ensayos, en el caso de las frutas y vegetales se determina la mayor parte de su contenido mientras que en los cereales sólo se valora una pequeña parte. Esta es la razón por la que no se centrifugan los extractos de los cereales en este estudio, manteniendo la matriz de los granos durante las reacciones, aunque no se trate de un método ideal para su completa liberación.

La liberación de los compuestos atrapados por la fibra se consigue con diferentes procedimientos, como la fermentación (por microorganismos formadores de esterasas), la germinación controlada, las hidrólisis ácidas, alcalinas y enzimáticas, así como los procesos termomecánicos. La extrusión en los copos de maíz o la cocción en los copos de avena, son ejemplos de procesos termomecánicos que consiguen desintegrar la matriz de la pared celular, liberando los polifenoles (Acosta-Estrada et al., 2014).

A continuación se muestran los resultados de los ensayos realizados en cada uno de los alimentos estudiados, además se adjuntan en el ANEXO V todos los resultados agrupados en forma de valores numéricos (**Tabla 4**) para su mejor comprensión. En ambas presentaciones los resultados se muestran mediante el valor medio y la DS.

## 6.1 Brócoli:

Las inflorescencias de este vegetal demuestran alcanzar mayores resultados que el tronco (en los diferentes ensayos realizados) (**FIG. 3**). Aunque, teniendo en cuenta la pequeña diferencia y valorando el alto contenido en fibra del tronco, se recomienda su consumo, al ser despreciado en la mayoría de los casos. Además, en la determinación de la actividad antirradicalaria el tronco ha llegado a alcanzar valores superiores, tanto en la muestra fresca como en la cocida, lo que apoya dicha recomendación, aunque las diferencias sigan siendo mínimas. En el caso de las muestras cocidas se debe tener en cuenta el tiempo de cocción, siendo 10 min. mayor el del tronco (debido a su dureza), lo que podría ser la causa de esa pequeña diferencia con las flores cocidas en los diferentes ensayos.



**FIG. 3:** Resultados obtenidos para los diferentes extractos del brócoli. Siendo **A1** la fluorescencia del brócoli fresco, **A2** el tronco del brócoli fresco, **B1** flor del brócoli cocido y **B2** el tronco del brócoli cocido.

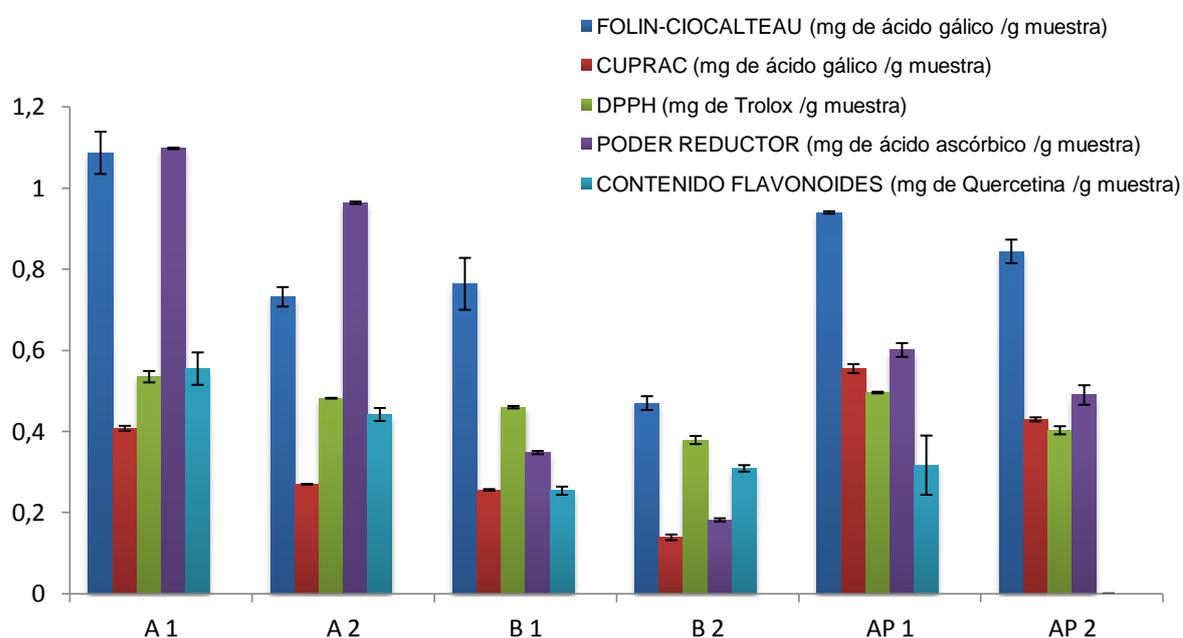
El proceso de cocción reduce en gran medida el contenido fenólico total, al igual que el poder reductor del ion férrico. Mientras que los valores del resto de los ensayos llegan incluso a aumentar. Este aumento podría atribuirse al contenido en flavonoides, u otras sustancias con actividad antioxidante atrapados por la matriz fibrosa y liberados tras el proceso térmico. Aún así, debido al mayor efecto negativo, la mejor opción sería optar por métodos de cocción que hayan demostrado menor daño al contenido antioxidante, como la cocción al vapor, en la que se evita la lixiviación promovida por la ebullición. También cabe destacar que la pérdida del tronco con la cocción es menor que la de la flor incluso tras 10 min. más de cocción, pudiendo tratarse del diferente tipo de polifenoles predominantes en cada una de las partes.

La quercetina, principal flavonoide en el brócoli, es un importante compuesto bioactivo caracterizado por una alta inestabilidad en presencia del oxígeno atmosférico, llegando incluso a degradarse totalmente, dificultando su determinación. Por ello el bajo contenido en flavonoides que se percibe en los resultados del brócoli de este estudio puede deberse a la inestabilidad del flavonoide mayoritario (Ramešová et al., 2012). Su correcta determinación requeriría un sistema que trabajase con  $N_2$  (para evitar dicha oxidación), sistema descartado en este estudio por su elevado coste. Esta posible subestimación debe de tenerse en cuenta al analizar los resultados de la determinación de flavonoides en el resto de muestras (aunque teniendo en cuenta el tipo de flavonoide mayoritario).

## 6.2 *Calocybe gambosa*:

Se pretenden conocer las diferencias entre sombrero y pie de dicho hongo, al igual que los efectos del salteado y del troceado previo a la congelación. Para ello se analizan tres muestras diferentes, una entera congelada (A) (parte de la cual, se saltea (AP)) y otra congelada tras el troceado (B).

Los resultados confirman la idea inicial de la que se partía al observar la conclusión de la mayoría de los estudios que han analizado diferentes especies de hongos. El sombrero posee valores superiores al pie en todos los ensayos, aunque las diferencias sean mínimas, siendo el contenido fenólico total el que presenta mayores diferencias entre ambas partes en las tres muestras (**FIG. 4**). Aún así, el pie posee una importante actividad antioxidante, siendo incluso mayor que la de otros alimentos, como la inflorescencia o el tronco del brócoli analizado.



**FIG. 4:** Resultados obtenidos para los diferentes extractos del hongo *Calocybe gambosa*. Siendo los 1 los sombrero y los 2 el pie de las siguientes setas: **A** *C.gambosa* I, **AP** *C.gambosa* I a la plancha y **B** *C.gambosa* II (troceada al congelar).

Los valores de B son menores que los de A e incluso que los de AP. El troceado previo a la congelación reduce el contenido antioxidante en mayor medida que el calor al que se le somete durante el salteado. Esta diferencia podría deberse a la actividad del enzima polifenoloxidasas, aumentada enormemente tras el troceado.

Los extractos de B (sombrero y pie) poseen un color más oscuro (**FIG. 5**) que los de A, debido a la mayor concentración de melanina tras el pardeamiento (la polifenoloxidasa transforma sustratos como los mono y difenoles en melanina). La diferencia observada (**FIG. 5**) no es mayor, teniendo en cuenta que la imagen fue tomada 2 meses tras la preparación de los extractos, tiempo en el que se también se produjo el pardeamiento de A, aunque la actividad de dicho enzima fuera menor durante la congelación



**FIG. 5:** Diferencias observadas entre los extractos de A y B.. Se observa el mayor efecto de la polifenoloxidasa en el extracto de ambas partes

Estas diferencias entre A y B podrían deberse a otros factores, como el diferente día de recolección o el diferente tamaño de los ejemplares (teniendo en cuenta que los ejemplares B eran de mayor tamaño). Aún así, se recomienda evitar trocear los vegetales para su congelación o evitar adquirir verduras congeladas troceadas hasta que se obtengan resultados estadísticamente significativos que analicen dichas diferencias.

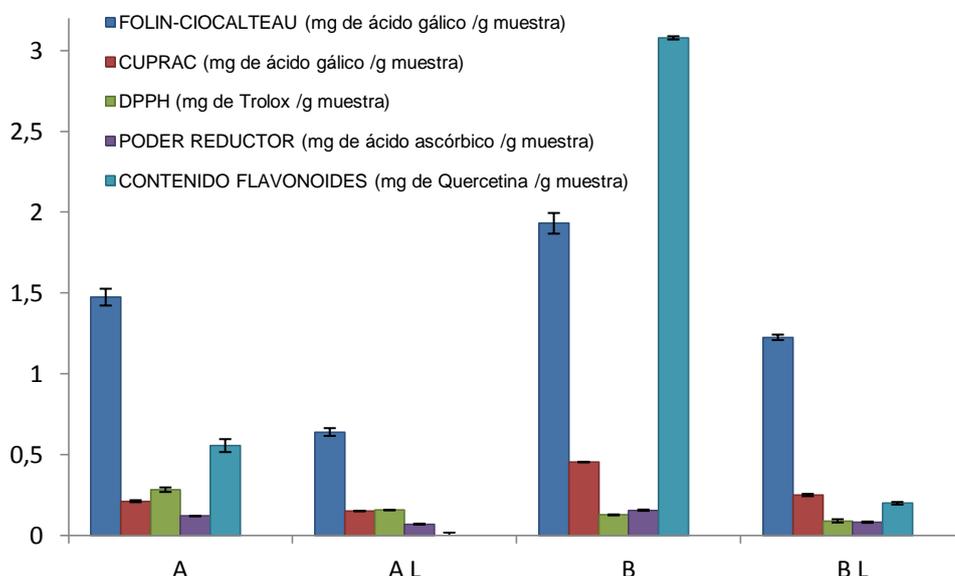
El salteado reduce de forma mínima los compuestos antioxidantes así como sus capacidades, llegando incluso a aumentarlos en alguno de los casos. Este aumento se atribuye a la mayor accesibilidad de los polifenoles no extraíbles<sup>1</sup> por la alta temperatura del salteado, siendo uno de los factores de liberación, aunque no tan eficaz como las hidrólisis ácidas, alcalinas o enzimáticas.

Partiendo de que el aumento es insignificante, puede que los 1,5 min. no fue tiempo suficiente para observar grandes aumentos, o puede que ese aumento se deba a otros factores, como el aceite de oliva usado en el cocinado, que hubiera podido quedar en el extracto, aportando fenoles. Incluso, pudiera deberse a la inactivación de parte de la polifenoloxidasa por el calor, evitándose la pérdida fenólica tras el salteado.

<sup>1</sup> Compuestos de alto peso molecular o polifenoles con enlaces a macromoléculas de la pared celular, a diferentes proteínas o atrapados por la fibra (Pérez-Jiménez et al., 2013).

### 6.3 Copos de avena y maíz:

Excepto en la capacidad antirradicalaria, los copos de avena han demostrado mayor potencial antioxidante que los copos de maíz, incluido el contenido en polifenoles, con una mayor diferencia en cuanto al contenido en flavonoides (**FIG. 6**).

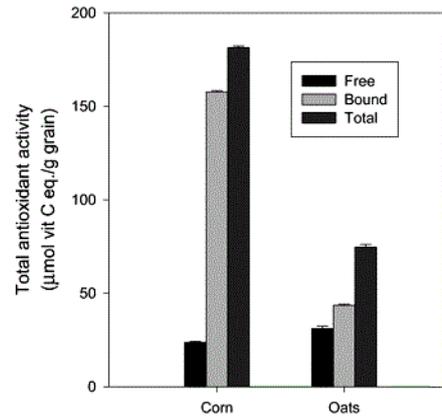


**FIG. 6:** Resultados obtenidos para los extractos de copos de maíz y avena.

Siendo **A** los de maíz, **B** los de avena y **L** la adición de leche a 50°C.

La adición de leche a 50 °C reduce, en ambos tipos de copos, la disponibilidad de los diferentes compuestos antioxidantes, así como sus propiedades (llegando al 50% en algunos casos). El tratamiento térmico, podría ser la causa, siendo uno de los principales factores perjudiciales sobre el contenido fenólico y su actividad antioxidante. Sin embargo, en nuestro caso la temperatura de 50°C no puede ser la causa de tan gran disminución. En el té verde sí que se ha estudiado el efecto de la leche sobre el contenido antioxidante, mostrando un efecto perjudicial sobre las catequinas y sus propiedades antioxidantes. Atribuyendo dicho efecto a las proteínas de la leche así como a los glóbulos de grasa de la misma. Dentro de las proteínas podemos diferenciar: las caseínas, con alta afinidad por los fenoles altamente polimerizados (debido a la alta proporción de prolina que posee la caseína) y las proteínas del suero, mostrando afinidad por los fenoles más simples (Rashidinejad, Birch, Sun-Waterhouse, & Everett, 2015). Por lo que se podrían generalizar estos resultados del té verde a otros alimentos consumidos con leche como es el caso de los cereales, estudiados en este trabajo, cuyos resultados demuestran dicho efecto.

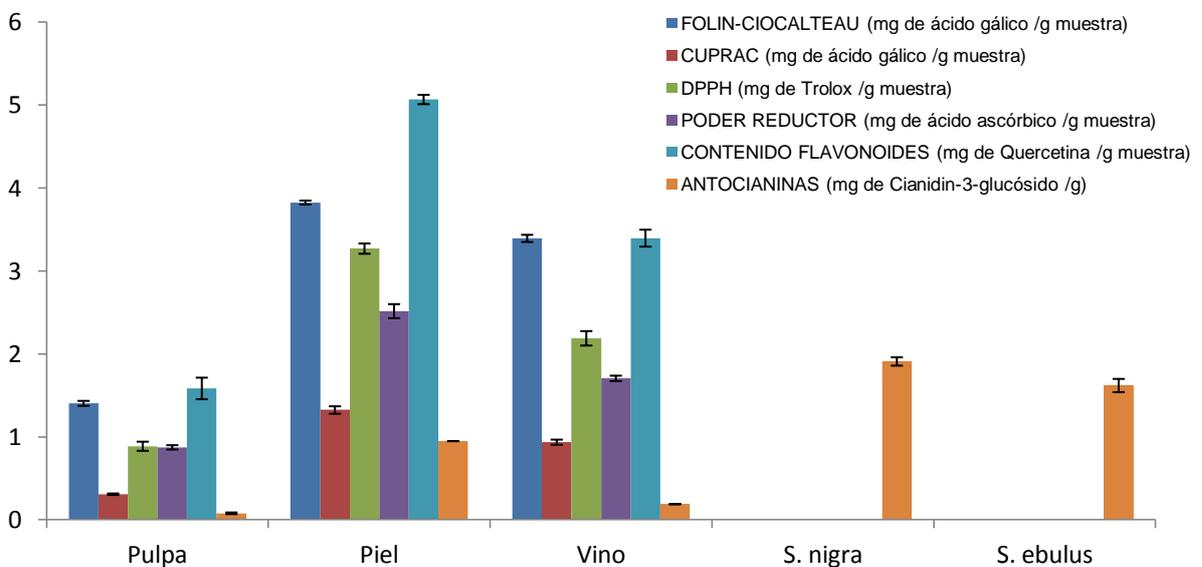
Los cereales son alimentos que presentan una gran proporción de fenoles unidos a la matriz, lo que se traduce en una incorrecta determinación del contenido fenólico, valorando únicamente el contenido fenólico libre. Tras observar el perfil antioxidante completo (FIG. 7) se aprecia una gran diferencia entre ambos granos. El grano de maíz presenta un gran contenido de fenoles atrapados en la fibra, de ahí que el perfil antioxidante completo sea mayor que en la avena, la cual posee mayor cantidad de fenoles libres. Por ello, al determinar únicamente la fracción libre (en este estudio), se detecta mayor actividad antioxidante en los copos de avena. Aunque debe de tenerse en cuenta que ambos cereales han sufrido procesos termomecánicos durante su elaboración, procesos que liberan fenoles atrapados en la matriz.



**FIG. 7:** Gráfico de las actividades antioxidantes libre, atrapada y la total en maíz y avena (Kafui Kwami & Rui Hai, 2002).

#### 6.4 Uva Tempranillo:

Las diferentes partes de la uva, así como el vino, destacan con grandes diferencias sobre el resto, en la mayoría de los ensayos realizados. Siendo, la piel, la parte más destacada por su contenido en polifenoles (principalmente el contenido en flavonoides) y sus capacidades antioxidante, reductora y antirradicalaria (FIG. 8).



**FIG. 8:** Resultados obtenidos para los diferentes extractos de la uva tempranillo y bayas de saúco.

La piel representa un pequeño porcentaje del peso de la uva, por ello se valora la uva en conjunto para poder compararla con el vino. Para ello se pesa cada una de las partes en 5 uvas obteniendo un valor medio de 9,56  $\pm$ 2,87% para la piel y 87,24  $\pm$ 2,95 % para la pulpa, pudiendo así comparar la uva con los valores del vino (**Tabla 2**).

	<b>FOLIN</b> (mg de ácido gálico /g muestra)	<b>CUPRAC</b> (mg de ácido gálico /g muestra)	<b>DPPH</b> (mg de Trolox /g muestra)	<b>PODER REDUCTOR</b> (mg de ácido ascórbico /g muestra)	<b>FLAVONOIDES</b> (mg de Quercetina /g muestra)	<b>ANTOCIANINA</b> (mg de Cianidin-3-glucósido /g muestra)
<b>UVA</b> (sin pepitas)	1,592 $\pm$ 0,024	0,397 $\pm$ 0,004	1,087 $\pm$ 0,054	1,004 $\pm$ 0,031	1,786 $\pm$ 0,224	0,164 $\pm$ 0,005
<b>VINO</b>	3,393 $\pm$ 0,043	0,937 $\pm$ 0,031	2,189 $\pm$ 0,087	1,706 $\pm$ 0,033	3,396 $\pm$ 0,102	0,19 $\pm$ 0,0

**Tabla. 2:** Resultados de la uva Tempranillo (piel +pulpa en sus diferentes proporciones) comparados con los del vino de dicha uva.

El vino obtiene mayores resultados en todos los ensayos, esto se debe a que la pulpa, componente mayoritario de la uva, es la parte con menor concentración de sustancias antioxidantes, por ello aunque la piel tenga gran contenido su aportación es menor. Con esta gran diferencia, entre el vino y la uva, se le puede atribuir al vino un mayor contenido en polifenoles, flavonoides y antocianinas, así como las capacidades antioxidantes, antirradicalarias y el poder reductor, que las mismas uvas de las que procede.

En cuanto al contenido en antocianinas se comparó con bayas de los *S. ebulus* y *nigra*, cuyo contenido, en ambas, fue mucho mayor que el de la piel de la uva (parte con el mayor contenido), no llegando a la mitad del contenido de las bayas del *S. ebulus*, (la baya que menos contiene de las dos). Tanto el vino como la uva son caracterizados por un alto contenido en antocianinas, que podemos caracterizarlo como despreciable (10 veces inferior) al compararlo con los frutos del saúco.

Durante los procesos de fermentación, clarificación y almacenamiento diversos factores (químicos, microbiológicos y físicos) intervienen en la adecuada extracción de los compuestos fenólicos (presentes en la piel, semillas y restos vegetales de los tallos). Por ello su contenido en el vino no puede generalizarse a partir del contenido de los mismos en la uva precursora. En el caso del vino analizado, se puede hablar de un alto rendimiento, al preservar e incluso aumentar el contenido fenólico de la propia uva. Este resultado es el buscado con la práctica de procedimientos como la termo-vinificación o la aplicación de impulsos eléctricos (Giovinazzo & Grieco, 2015).

En ningún caso debe despreciarse el contenido en alcohol de este producto, de ahí que su mayor poder antioxidante no sea criterio suficiente para justificar su consumo. Es decir, el consumo de uvas (siempre que no se despojen de la piel), al igual que el de otros productos de naturaleza vegetal, aporta gran contenido de sustancias antioxidantes y su consumo en vez del vino evita los indeseables efectos del alcohol. Esta diferencia entre la piel y la pulpa, en cuanto al contenido antioxidante, puede extrapolarse a otras frutas, demostrando la gran importancia del consumo de la piel de los frutos.

## 6.5 Análisis de la metodología, comparación de resultados y limitaciones del estudio:

Se ha trabajado únicamente con ensayos espectrofotométricos, que aportan una estimación del contenido fenólico total (no separan, ni cuantifican compuestos individuales). Tratándose de una de las principales limitaciones en la cuantificación del contenido absoluto. Otras limitaciones, son las propias de cada ensayo, teniendo en cuenta que la actividad antioxidante medida en cada ensayo refleja únicamente la reactividad química de esa muestra bajo las condiciones específicas de ese ensayo.

Aunque todos los ensayos utilizados en este estudio se basan en reacciones de transferencia de electrones (semejantes a la valoraciones redox en el análisis químico clásico), podemos hablar de numerosas diferencias entre ellos. El pH utilizado varía en función del ensayo (siendo, por ejemplo, ácido en FRAP y básico en Folin), modificando los elementos antioxidantes, al suprimir su capacidad reductora en condiciones ácidas o mejorarla bajo condiciones básicas, al disociarse protones de los compuestos fenólicos. Los diferentes tipos de especies reactivas, muestran comportamientos diferentes frente a los antioxidantes al igual que el medio en el que se desarrolla la reacción, pudiendo ser o no acuoso (lo que limita el tipo de antioxidantes detectables) (Dejian, Boxin, & Prior, 2005). También debe de tenerse en cuenta la sustancia utilizada como patrón, por ejemplo en el ensayo FRAP se utiliza el ácido ascórbico, antioxidante de fácil detección, que puede sobreestimar los valores de las muestras.

Estas y otras diferencias, dificultan la comparación (**Tabla 3**) de los resultados entre diferentes estudios.

	(Carlsen et al., 2010) Método FRAP (mg Fe <sup>2+</sup> / g)	(Bhagwat, Haytowitz, & Holden, 2007) Fenoles totales (mg Ácido gálico / g)	Phenol Explorer (Neveu et al., 2010) FOLIN (mg Ácido gálico / g)
<b>Copos de Avena</b>	5,25	1,67	1,93
<b>Copos de Maíz</b>	3,56	8,42	8,42
<b>Uva</b>	3,61	1,77	1,85
<b>Vino tinto</b>	6,95	1,84	2,15
<b>Brócoli fresco</b>	1,89	3,37	1,99
<b>Brócoli cocido</b>	1,39	2,25	-

**Tabla 3:** Resultados de otros estudios comparativos y diferentes bases de datos a los efectos de constatar diferencias dentro de cada alimento y entre los distintos alimentos.

La mayoría de los estudios utilizan extractos de alcohol o metanol para conseguir una extracción más eficaz, pero como ya se ha explicado anteriormente, el presente estudio pretende conocer lo realmente ingerido. Además lo que se quiere analizar es el resultado de la comparación y no los valores absolutos de cada muestra. En la 1ª columna de la **Tabla 3** se muestran los valores de un estudio, un mismo equipo analizó todas las muestras y obtuvo conclusiones similares a las de este estudio, sin embargo las otras dos columnas son revisiones de otros estudios, por lo que los valores de cada alimento fueron analizados por equipos diferentes, dificultando la correcta comparación. En ambas revisiones se observan grandes diferencias con el presente estudio, como es el caso de los copos de maíz cuyo valor destaca, incluso, por encima del vino o la uva. Lo que demuestra la gran variabilidad entre estudios y la dificultad de comparar estrictamente sus resultados.

El tiempo de extracción, es otra posible limitación en este estudio, al tener en cuenta que durante largos periodos de extracción los polifenoles pueden oxidarse perdiendo sus propiedades reductoras (Arranz Martínez & Saura-Calixto, 2010). La escasa disponibilidad de tiempo para el desarrollo de este trabajo fin de grado ha originado diferencias en los tiempos de extracción, desde 4 horas (tiempo mínimo) hasta 14 horas de extracción, por lo que las condiciones de extracción pueden dificultar la comparación, aunque los extractos se mantuvieron siempre a 4°C.

La piel de la uva y el vino destacan en la mayoría de las pruebas por su mayor actividad antioxidante, con una gran diferencia respecto al resto. Posteriormente en función del ensayo pueden encontrarse diferentes alimentos con elevada actividad antioxidante, siendo en la mayoría de los casos los copos de avena frescos, la pulpa de la uva o la seta *Calocybe gambosa I* (tanto sombrero como pie). Mientras que *Calocybe gambosa II* y el brócoli (el cocido especialmente) poseen los valores más bajos en la mayoría de los ensayos.

Los resultados obtenidos se basan en reacciones químicas *in vitro*, sin ninguna similitud a las propias de los sistemas biológicos. Dichas reacciones no asumen la biodisponibilidad, ni la reactividad *in vivo*. Por ello, su interpretación se encuentra limitada al sentido químico y al contexto del que se han obtenido.

## 7. CONCLUSIONES:

- Los fenoles son los elementos antioxidantes mayoritarios en los alimentos, pudiéndose encontrar en forma libre o atrapados en la fibra (fracción desconocida durante años). Su variabilidad y biodisponibilidad pueden verse afectadas por un gran número de factores.
- Una dieta rica en alimentos vegetales reduce la prevalencia de diversas enfermedades degenerativas, al aportar un gran conjunto de sustancias bioactivas (como los antioxidantes). Deben preservarse al máximo;
  - 1) Evitando largas cocciones mediante ebullición.
  - 2) Evitando el troceado de los vegetales previo a la congelación.
  - 3) Acompañando a los cereales de fruta u otros alimentos, evitando la leche.
  - 4) Aprovechando el tronco del brócoli o el pie de los hongos comestibles.
- La piel de la uva y el vino son los alimentos estudiados que presentan mayor contenido en polifenoles, flavonoides y mayores capacidades antioxidante, antirradicalaria y reductora. Siendo el vino el mayoritario al compararlo con la uva en vez de con sus partes específicas.
- La adicción de leche caliente a los copos de avena y a los de maíz reduce en un alto grado el contenido y la actividad de su diferentes sustancias antioxidantes. Siendo el contenido fenólico total y el poder reductor los más afectados.
- La ebullición es un método de cocción que reduce en gran medida el contenido fenólico total y el poder reductor del ión férrico de ambas partes del brócoli, pero no afecta e incluso mejora los resultados del resto de los ensayos.
- El sombrero del hongo *Calocybe gambosa* posee mayores propiedades antioxidantes que el pie. Al igual que la florescencia del brócoli en comparación al tronco, aunque en este caso en menor medida.

## 8. BIBLIOGRAFÍA:

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Arranz Martínez, S., & Saura-Calixto, F. (2010). *Compuestos Polifenólicos ( Extraíbles y No Extraíbles ) en Alimentos de la Dieta Española : Metodología para su Determinación e Identificación* . Universidad Complutense de Madrid.
- Astley, S. B., & Lindsay, D. G. (2002). European Research on the Functional Effects of Dietary Antioxidants (EUROFEDA). Conclusions. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1–3), 287–91. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00005-5)
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2007). USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected Foods. Beltsville: Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Department of Agriculture (USDA).
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Dejian, H., Boxin, O., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/JF030723C>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Giovinazzo, G., & Grieco, F. (2015). Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 454–462. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1>
- Grootaert, C., Kamiloglu, S., Capanoglu, E., & Van Camp, J. (2015). Cell Systems to Investigate the Impact of Polyphenols on Cardiovascular Health. *Nutrients*, 7(11), 9229–9255. <https://doi.org/10.3390/nu7115462>
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.016>
- Jiménez López, P., Descalzo, V., Girbés Juan, T., Safi Hakmi, S., Córdoba Díaz, M., & Córdoba Díaz, D. (2017). Antioxidantes de origen vegetal y efecto sobre el envejecimiento. *International Journal of Pharmtech Research*, 27, 80–85.
- Kafui Kwami, A., & Rui Hai, L. (2002). Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182–6187. <https://doi.org/10.1021/JF0205099>

- Kim, I.-S., Yang, M.-R., Lee, O.-H., & Kang, S.-N. (2011). Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 4120–4131. <https://doi.org/10.3390/ijms12064120>
- Lindsay, D. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants – EUROFEDA. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1–3), 1–38. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00005-5)
- Mahn, A., & Reyes, A. (2012). An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and the effect of processing. *Food Science and Technology International*, 18(6), 503–514. <https://doi.org/10.1177/1082013211433073>
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., ... Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010(0), bap024-bap024. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), 118–129. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000097>
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>
- Ragaei, S., Seetharaman, K., & Abdel-Aal, E.-S. M. (2014). The Impact of Milling and Thermal Processing on Phenolic Compounds in Cereal Grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 837–849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.610906>
- Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I., Bulíčková, J., Žabka, J., & Gál, M. (2012). On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(2), 975–982. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5504-3>
- Ramírez Anguiano, A. C., Soler Rivas, C., & Santoyo Díez, S. (2009). *Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., & Everett, D. W. (2015). Addition of Milk to Tea Infusions: Helpful or Harmful?; Evidence from In vitro and In vivo Studies on Antioxidant Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3188–3196. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1099515>
- Sang, S., & Chu, Y. F. (2017). Whole grain oats, more than just a fiber: Role of unique phytochemicals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(6). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600715>

- Schäfer, J., Stanojlovic, L., Trierweiler, B., & Bunzel, M. (2017). Storage related changes of cell wall based dietary fiber components of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) stems. *Food Research International*, 93, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.025>
- Sies, H. (2010). Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.006>
- Sotelo, T., Cartea, M. E., Velasco, P., & Soengas, P. (2014). Identification of antioxidant capacity -related QTLs in *Brassica oleracea*. *PloS One*, 9(9), e107290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107290>
- Spilioti, E., Holmbom, B., Papavassiliou, A. G., & Moutsatsou, P. (2014). Lignans 7-hydroxymatairesinol and 7-hydroxymatairesinol 2 exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(4), 749–759. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300318>
- Valls i Bellés, V. (2009). El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y Polifenoles. *Nutrición Clínica Y Dietética Hospitalaria*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1021/jf100364k>
- Villares, A., Mateo-Vivaracho, L., García-Lafuente, A., & Guillamón, E. (2014). Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 147, 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.144>

## 9. ANEXOS:

### 9.1 ANEXO I: Equipos

- Agitador de tubos: **Raypa**
- Agitador magnético: **J.Jimeno S.A.**
- Balanza de precisión: **GRAM**
- Balanza: **KERN 572**
- Baño de agua caliente: **VELP Scientifica**
- Centrífuga para tubos eppendorf: **Labnet**
- Centrífuga: **Digiten-R ORTO ALRESA**
- Congelador: **Fagor**
- Equipo de agua Elix: **MILLIPORE**
- Espectrofotómetro: **Helios Epsilon (Thermo Scientific)**
- Estufa: **P SELECTA**
- Frigorífico: **Edesa**
- pH metro: **CRISON**
- Picadora de hielo: **LOMI**
- Pipetas automáticas: **BIOHIT Proline Plus**

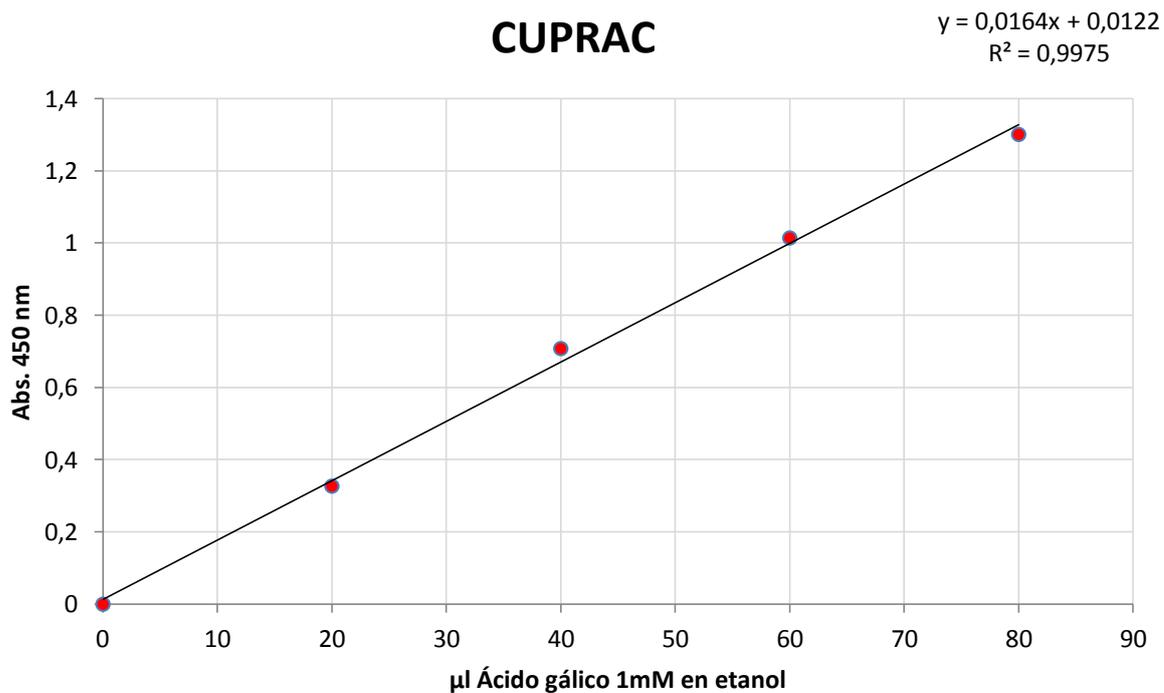
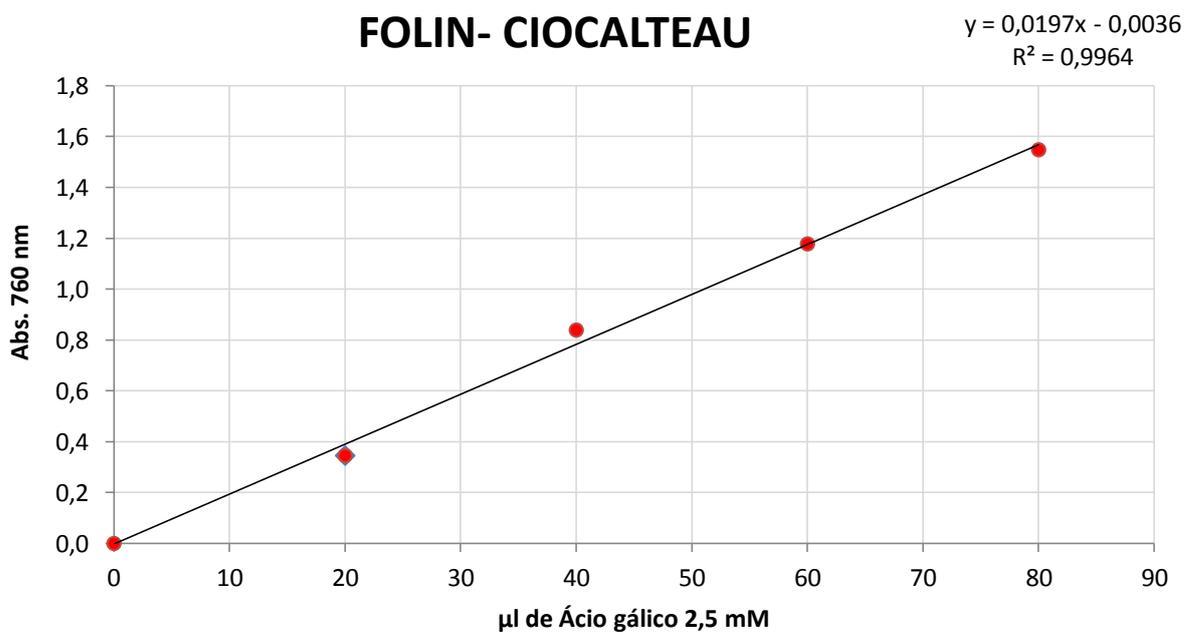
## 9.2 ANEXO II: Material fungible

- Botellas de vidrio (diferentes volúmenes)
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible de 1 y 3 ml
- Embudos de plástico
- Espátulas metálicas de diversos tamaños
- Frascos Erlenmeyers de vidrio de 250 ml
- Gradillas para tubos de diversos tamaños
- Guantes de Nitrilo
- Imanes agitadores de diversos tamaños
- Mortero de porcelana
- Papel de filtro
- Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml
- Pipetas pasteur de un solo uso
- Probetas de vidrio de diversos volúmenes
- Puntas de pipeta automática esterilizadas de diversos tamaños
- Tijeras metálicas
- Tubos de ensayo de plástico de diversos volúmenes con tapón
- Tubos eppendorf de 1 y 1.5 ml
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Varilla imantada para extraer los agitadores imantados
- Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diversos volúmenes

### 9.3 ANEXO III: Reactivos químicos

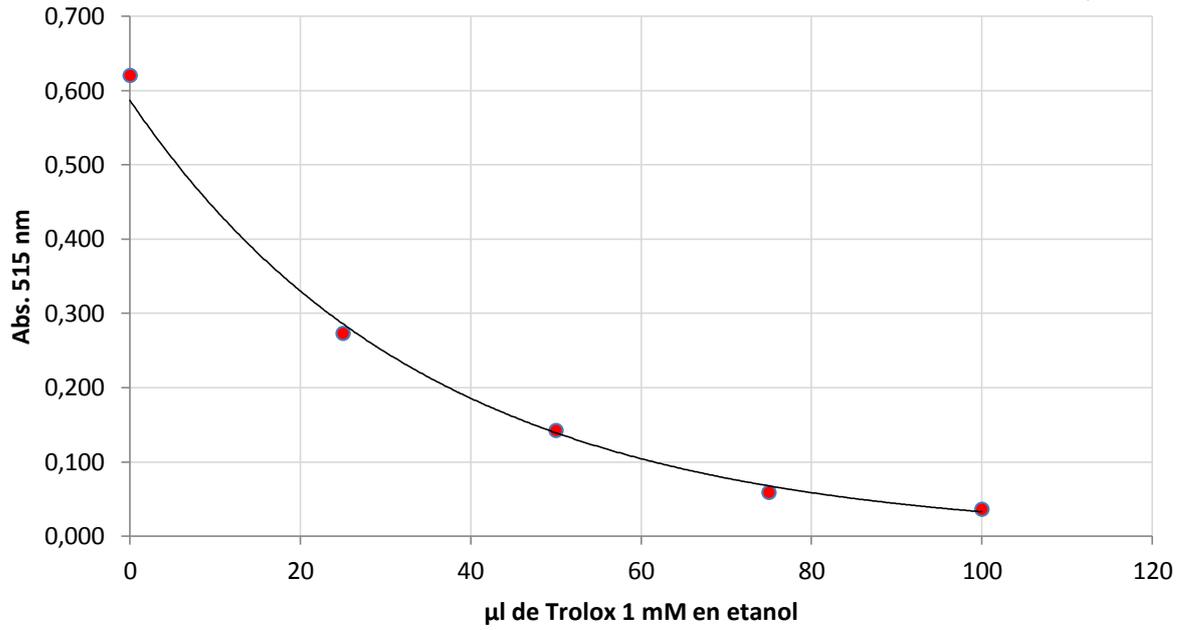
- Acetato de amonio: **SIGMA**
- Acetato sódico: **SIGMA**
- Ácido acético: **J.T. Baker**
- L (+) Ácido ascórbico: **Panreac**
- Ácido clorhídrico: **Panreac**
- Ácido gálico: **SIGMA**
- Ácido tricloroacético: **Panreac**
- Carbonato sódico: **SIGMA**
- Cloruro de cobre: **SIGMA**
- Cloruro férrico: **Panreac**
- Cloruro potásico: **SIGMA**
- DPPH: **SIGMA**
- Etanol: **PROLABO (VWR)**
- Ferricianuro potásico: **PanReac AppliChem**
- Fosfato sódico monobásico dihidratado: **SIGMA**
- Hidróxido de sodio: **Panreac**
- Metanol: **Panreac**
- Neocuproína: **SIGMA**
- Nitrito sódico: **PanReac AppliChem**
- Quercetina: **SIGMA**
- Reactivo Folin: **PROLABO (VWR)**
- Tricloruro de aluminio: **SIGMA**
- Trolox: **SIGMA**

## 9.4 ANEXO IV: Rectas patrón de los diferentes ensayos realizados:



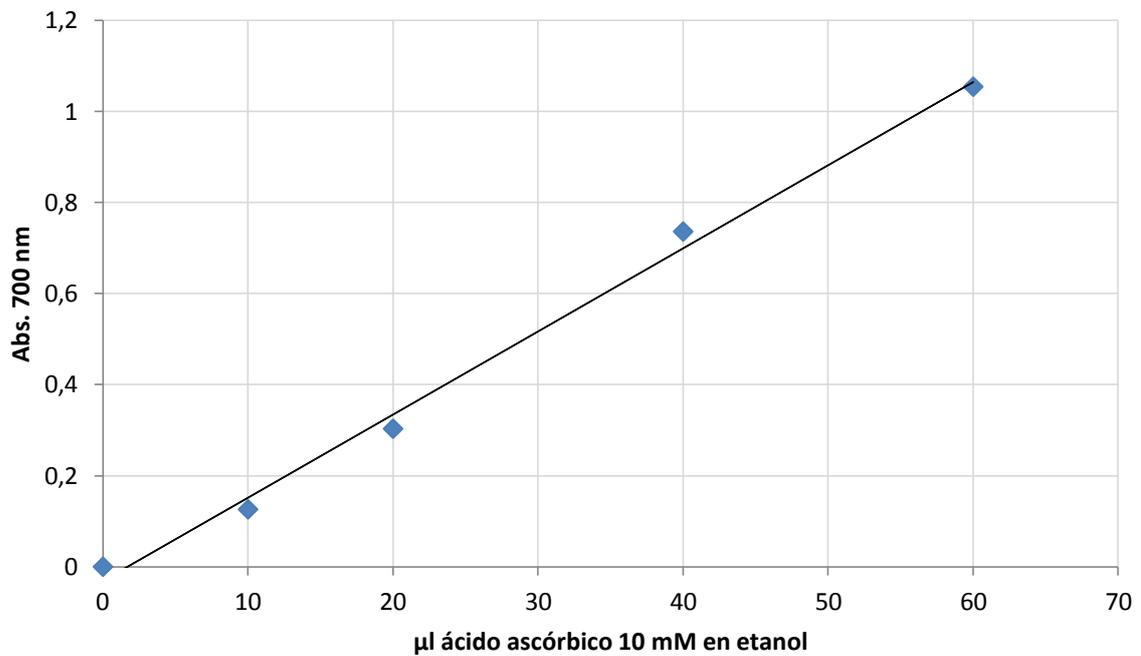
## DPPH

$$y = 0,5865e^{-0,029x}$$
$$R^2 = 0,9934$$



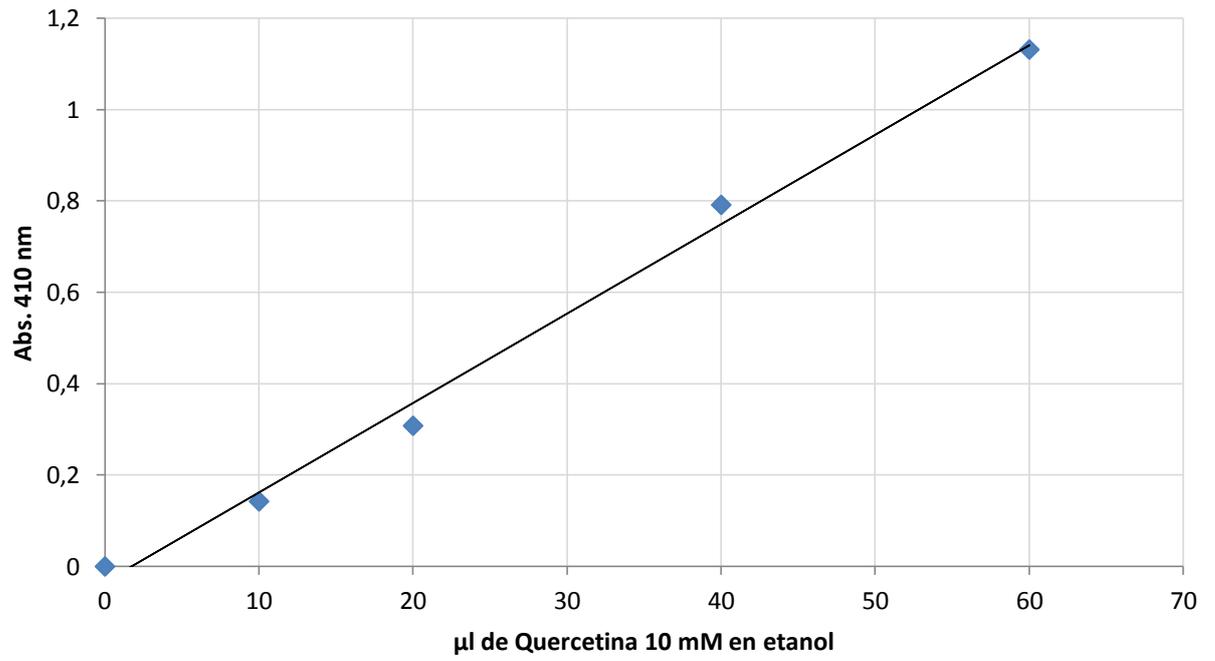
## PODER REDUCTOR (FRAP modif)

$$y = 0,0182x - 0,0303$$
$$R^2 = 0,9948$$



## DETERMINACIÓN FLAVONOIDES

$$y = 0,0196x - 0,0344$$
$$R^2 = 0,9935$$



## 9.5 ANEXO V: Resultados de todas las muestras en los diferentes ensayos:

		<b>FOLIN-CIOCALTEAU</b> (mg de ácido gálico /g muestra)	<b>CUPRAC</b> (mg de ácido gálico /g muestra)	<b>DPPH</b> (mg de Trolox /g muestra)	<b>PODER REDUCTOR</b> (mg de ácido ascórbico /g muestra)	<b>CONTENIDO FLAVONOIDES</b> (mg de Quercetina /g muestra)	<b>CONTENIDO TOTAL ANTOCIANINA</b> (mg de Cianidin-3-glucósido /g)
<b>Brócoli FRESCO</b>	<b>Florescencia</b>	0,935 ±0,052	0,101 ±0,006	0,200 ±0,014	0,739 ±0,002	0,069 ±0,04	–
	<b>Tronco</b>	0,751 ±0,024	0,012 ±0,0	0,256 ±0,001	0,486 ±0,003	0,015 ±0,016	–
<b>Brócoli COCIDO</b>	<b>Florescencia</b>	0,388 ±0,064	0,098 ±0,002	0,371 ±0,003	0,427 ±0,004	0,198 ±0,01	–
	<b>Tronco</b>	0,283 ±0,017	0,07 ±0,007	0,402 ±0,010	0,253 ±0,004	0,136 ±0,008	–
<b>Calocybe gambosa I</b>	<b>Sombrero</b>	1,087 ±0,003	0,408 ±0,011	0,535 ±0,002	1,098 ±0,017	0,555 ±0,073	–
	<b>Pie</b>	0,732 ±0,029	0,270 ±0,005	0,482 ±0,01	0,964 ±0,024	0,442 ±0,001	–
<b>Calocybe gambosa II</b>	<b>Sombrero</b>	0,764 ±0,038	0,256 ±0,004	0,460 ±0,004	0,348 ±0,002	0,254 ±0,009	–
	<b>Pie</b>	0,47 ±0,01	0,139 ±0,006	0,379 ±0,013	0,182 ±0,008	0,309 ±0,002	–
<b>Calocybe gambosa I a la plancha</b>	<b>Sombrero</b>	0,94 ±0,069	0,555 ±0,01	0,496 ±0,003	0,601 ±0,054	0,317 ±0,05	–
	<b>Pie</b>	0,844 ±0,095	0,430 ±0,024	0,403 ±0,006	0,490 ±0,006	0,0	–
<b>Copos de Maíz</b>	<b>Frescos</b>	1,474 ±0,004	0,211 ±0,023	0,282 ±0,02	0,119 ±0,001	0,555 ±0,001	–
	<b>+ Leche 50 °C</b>	0,639 ±0,045	0,150 ±0,009	0,156 ±0,003	0,069 ±0,0	0,0	–
<b>Copos de Avena</b>	<b>Frescos</b>	1,931 ±0,254	0,453 ±0,01	0,126 ±0,004	0,155 ±0,001	3,079 ±0,094	–
	<b>+ Leche 50 °C</b>	1,225 ±0,08	0,249 ±0,004	0,089 ±0,003	0,081 ±0,001	0,198 ±0,015	–
<b>Uva Variedad Tempranillo</b>	<b>Pulpa</b>	1,405 ±0,03	0,310 ±0,009	0,888 ±0,055	0,875 ±0,026	1,585 ±0,13	0,08 ±0,01
	<b>Piel</b>	3,825 ±0,024	1,325 ±0,045	3,27 ±0,062	2,516 ±0,085	5,067 ±0,056	0,95 ±0,0
	<b>Vino</b>	3,393 ±0,043	0,937 ±0,031	2,189 ±0,087	1,706 ±0,033	3,396 ±0,102	0,19 ±0,0
<b>Sambucus</b>	<b>S. nigra</b>	–	–	–	–	–	1,91 ±0,05
	<b>S. ebulus</b>	–	–	–	–	–	1,62 ±0,08

**Tabla. 4:** Resultados de los diferentes ensayos realizados (media ± desviación estándar) en cada una de las muestras estudiadas.

