



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición

Composición fenólica, lipídica, actividad
antioxidante y biodisponibilidad *in vitro* de 10
genotipos de nueces cultivados en la Región de
Murcia

Fernando Figueroa Morales

Directores:

Dra. Begoña Cerdá Martínez-Pujalte

Dra. Juana Mulero Cánovas

Murcia, julio de 2012



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU
PRESENTACIÓN**

La Dra. D^a. Begoña Cerdá Martínez-Pujalte y la Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Composición fenólica, lipídica, actividad antioxidante y biodisponibilidad *in vitro* de 10 genotipos de nueces cultivados en la Región de Murcia” realizada por D. Fernando Figueroa Morales en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 25 de julio de 2012.

Dra. D^a. Begoña Cerdá Martínez-Pujalte

Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

A quienes siempre han confiado

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en cualquier forma durante la realización de todo el trabajo que culmina con la escritura de esta memoria.

En primer lugar agradezco a la Universidad Católica San Antonio de Murcia la concesión de una Beca Asociada a Proyectos con Financiación Externa que me ha permitido realizar este Trabajo que aquí se presenta. Así como la formación académica y humana que desde ya muchos años viene ofreciéndome.

No existiría tal beca sin la apuesta de la Consejería de Agricultura de la Región de Murcia por la investigación y el desarrollo agrario, a la cual agradezco que en momentos complicados como los actuales, nos permita ilusionarnos en lo que creemos.

Al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), con Diego Frutos a la cabeza, por facilitarme el material vegetal y sus instalaciones siempre que lo he requerido.

La Tesis no sólo ha conseguido formarme profesionalmente, sino que me ha permitido encontrar la generosidad y cariño de personas a las que unas breves líneas no hacen justicia. Aquí me ceñiré al protocolo, a partir de aquí espero estar a la altura de lo que me habéis dado.

A mis Directoras, Juana y Begoña. Es obvio que sin vosotras hoy no estaría disfrutando de este momento. Habéis estado el día D, a la hora H. Sin embargo, lo que más os agradezco es que de alguna forma hayáis conseguido que la Tesis no suponga sólo una lanzadera profesional, sino que su desarrollo me haya dado la oportunidad de conocerme y de saber afrontar dificultades que antes me atenazaban.

A José M^a Cayuela, por confiar en mí, y permitir iniciarme en la docencia. No sólo has contribuido a una de mis ilusiones, sino que, de algún modo, has dado sentido a la Tesis.

A ti, Juana, por tu amistad sincera. Sé que Dios nos dará otra oportunidad y podré volver a disfrutar del trabajo a tu lado.

A Paco, por tu pausa-café en el momento oportuno que hemos disfrutado cual oasis sahariano. No sé si nos hemos hecho bien el uno al otro, pero aquí estamos!!!

A Adela, Alfonso, Carmen, Gabi, y demás compañeros del Departamento, gracias por aportar siempre. Gracias Eva por ser generosa.

Hasta aquí quizás era necesario plasmar en papel mi gratitud ya que, tal vez, no haya sido capaz de transmitirlos en todo momento.

A vosotros, mi familia, concepto éste que me habéis sabido inculcar, por vuestros valores y por poner el marcador a cero en cada caída. A ti, Mercedes, mi ejemplo, por ponerme en la parrilla de salida. A ti, Carolina, qué te voy a decir, gracias por soportar mis ausencias y gracias por contribuir a crear mi proyecto más ilusionante, personalizado hoy en Fernando III, no sé si el Santo (con esa cara de bicho va a ser difícil!!!), pero sí sé que él ha sido mi mayor estímulo para estar hoy aquí escribiendo las últimas palabras de esta Tesis.

*“El fracaso es una gran oportunidad para empezar
otra vez con más inteligencia”*

Henry Ford (1863-1947)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	21
ÍNDICE DE FIGURAS	27
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	33
1. INTRODUCCIÓN	37
2. OBJETIVOS.....	41
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	45
3. 1. EL CULTIVO DEL NOGAL	45
3.1.1. Antecedentes económicos	45
3.1.1.1. <i>El mercado mundial de la nuez</i>	45
3.1.1.2. <i>Consumo de la nuez</i>	48
3.1.2. Clasificación botánica	49
3.1.3. Morfología del árbol	50
3.1.4. Morfología del fruto	51
3.1.4.1. <i>El pericarpio</i>	51
3.1.4.2. <i>La cáscara</i>	51
3.1.4.3. <i>La semilla</i>	52
3.1.5. Biología y fisiología	52
3.1.5.1. <i>Ciclo anual de crecimiento del nogal</i>	52
3.1.5.2. <i>Latencia invernal y salida de receso</i>	54

3.1.5.3. Brotación y crecimiento de brote	54
3.1.5.4. Floración y fecundación.....	55
3.1.5.5. Crecimiento y desarrollo del fruto	56
3.1.6. Requerimientos edafoclimáticos.....	59
3.1.6.1. Temperatura	59
3.1.6.2. Agua	60
3.1.6.3. Suelo	60
3.1.7. Riego.....	61
3.1.8. Recolección de las nueces y postcosecha	61
3.1.9. Reglamentación europea	63
3. 2. VALOR NUTRICIONAL DE LA NUEZ	63
3.2.1. Macronutrientes	64
3.2.2. Micronutrientes y otros componentes no nutritivos	66
3. 3. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS NUECES	67
3.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos y sus fuentes	69
3.3.1.1. Flavonoides.....	70
3.3.1.1.1. Flavonoles	72
3.3.1.1.2. Flavonas.....	73
3.3.1.1.3. Flavan-3-oles.....	74
3.3.1.1.4. Proantocianidinas	74
3.3.1.1.5. Antocianidinas	75
3.3.1.1.6. Flavanonas	75
3.3.1.1.7. Isoflavonas	76
3.3.1.2. No flavonoides	76

3.3.1.2.1. Ácidos hidroxibenzoicos.....	76
3.3.1.2.2. Taninos hidrolizables	77
3.3.1.2.3. Ácidos hidroxicinámicos.....	78
3.3.1.2.4. Estilbenos	80
3.3.2. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de los compuestos fenólicos.....	81
3. 4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS NUECES	83
3. 5. ÁCIDOS GRASOS DE LAS NUECES	88
3. 6. INFLUENCIA DE LOS FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS EN LA COMPOSICIÓN DE LAS NUECES	90
4. MATERIAL Y MÉTODOS	97
4. 1. MATERIAL VEGETAL.....	97
4.1.1. Descripción edafoclimática de las fincas.....	97
4.1.2. Muestras de nueces.....	99
4. 2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	103
4.2.1. Fundamento	103
4.2.2. Preparación de la muestra y reactivos.....	103
4.2.3. Medidas analíticas	104
4.2.4. Cuantificación y expresión de resultados.....	104
4. 3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	105
4.3.1. Preparación de la muestra	105
4.3.2. Medidas analíticas	105
4.3.3. Cuantificación y expresión de resultados.....	106
4. 4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ELAGITANINOS	108
4.4.1. Fundamento	108

4.4.2. Preparación de la muestra	108
4.4.3. Medidas analíticas	109
4.4.4. Cuantificación y expresión de resultados	109
4. 5. MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	110
4.5.1. Ensayo del DPPH	111
4.5.1.1. <i>Fundamento</i>	111
4.5.1.2. <i>Preparación de la muestra y reactivos</i>	111
4.5.1.3. <i>Medidas analíticas</i>	112
4.5.1.4. <i>Cuantificación y expresión de resultados</i>	113
4.5.2. Ensayo del ABTS^{•+}	113
4.5.2.1. <i>Fundamento</i>	113
4.5.2.2. <i>Preparación de la muestra y reactivos</i>	113
4.5.2.3. <i>Medidas analíticas</i>	114
4.5.2.4. <i>Cuantificación y expresión de resultados</i>	114
4.5.3. Ensayo del ORAC	114
4.5.3.1. <i>Fundamento</i>	114
4.5.3.2. <i>Preparación de la muestra y reactivos</i>	115
4.5.3.3. <i>Medidas analíticas</i>	115
4.5.3.4. <i>Cuantificación y expresión de resultados</i>	116
4. 6. MEDIDA DEL CONTENIDO EN HUMEDAD	117
4.6.1. Fundamento	118
4.6.2. Preparación de la muestra y medidas analíticas	118
4.6.3. Cuantificación y expresión de resultados	119
4. 7. MEDIDA DEL CONTENIDO EN GRASA TOTAL	119

4.7.1. Fundamento	119
4.7.2. Preparación de la muestra y medidas analíticas	119
4.7.3. Cuantificación y expresión de resultados.....	120
4. 8. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	120
4.8.1. Fundamento	120
4.8.2. Preparación de la muestra y reactivos	121
4.8.3. Medidas analíticas	122
4.8.4. Cuantificación y expresión de resultados.....	122
4. 9. BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	123
4.9.1. Fundamento	123
4.9.2. Preparación de la muestra y reactivos	123
4.9.3. Procedimiento.....	123
4. 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	125
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
5. 1. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS NUECES.....	129
5.1.1. Contenido en fenoles totales de las nueces.....	129
5.1.2. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en las nueces	132
5.1.2.1. Contenido en compuestos flavonoides	133
5.1.2.2. Contenido en compuestos fenólicos no flavonoides	140
5.1.2.2.1. Contenido en ácidos fenólicos.....	144
5.1.2.2.2. Contenido en ácidos hidroxicinámicos	148
5.1.2.3. Total de compuestos fenólicos identificados y cuantificados	151
5.1.3. Actividad antioxidante de las nueces.....	153

5.1.3.1. Medidas de DPPH, ABTS y ORAC en nueces.....	153
5.1.3.2. Relación entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante en nueces ...	162
5.2. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO GRASO DE LAS NUECES	166
5.2.1. Humedad y Grasa total de las nueces	166
5.2.2. Perfil de ácidos grasos de las nueces	170
5.3. BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LAS NUECES	180
5.3.1. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de fenoles totales de las nueces	180
5.3.2. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de compuestos fenólicos de las nueces	182
5.3.2.1. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de compuestos flavonoides	182
5.3.2.2. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de compuestos fenólicos no flavonoides	191
5.3.3. Actividad antioxidante del dializado de las nueces	200
6. CONCLUSIONES	209
7. BIBLIOGRAFÍA	213
8. ANEXOS	275

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Fecha de los estados importantes en el desarrollo del fruto.....	58
Tabla 3.2. Aspectos climáticos en el cultivo del nogal.....	60
Tabla 3.3. Contenido energético de los frutos secos/100 g.....	64
Tabla 3.4. Contenido en ácidos grasos de la nuez.....	65
Tabla 3.5. Contenido en carbohidratos y fibra de la nuez	65
Tabla 3.6. Contenido en aminoácidos de la nuez.....	66
Tabla 3.7. Contenido en vitaminas y minerales de la nuez	67
Tabla 3.8. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica.....	70
Tabla 4.1. Características climatológicas de las fincas El Chaparral y Torre Blanca.....	99
Tabla 4.2. Características de la variedad Algaida	99
Tabla 4.3. Características de la variedad Amigo	100
Tabla 4.4. Características de la variedad Chico	100
Tabla 4.5. Características de la variedad Eureka.....	100
Tabla 4.6. Características de la variedad Franquette	101
Tabla 4.7. Características de la variedad Payne	101
Tabla 4.8. Características de la variedad Pedro.....	101
Tabla 4.9. Características de la variedad Serr	102
Tabla 4.10. Características de la variedad Sunland.....	102
Tabla 4.11. Características de la variedad Tehama	102
Tabla 4.12. Ecuaciones de las rectas de calibrado para la cuantificación de compuestos fenólicos.....	107
Tabla 5.1. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces.....	130
Tabla 5.2. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces en función de la finca (mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD)	131

Tabla 5.3. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces	134
Tabla 5.4a. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces en función de la finca.....	137
Tabla 5.4b. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces en función de la finca.....	138
Tabla 5.5. Contenido en No Flavonoides de las 10 variedades de nueces.....	142
Tabla 5.6. Contenido en ácidos fenólicos de las 10 variedades de nueces en función de la finca (mg/100 g de nuez \pm SD).....	147
Tabla 5.7. Contenido en ácidos hidroxicinámicos de las 10 variedades de nueces en función de la finca.....	150
Tabla 5.8. Contenido en compuestos fenólicos de las 10 variedades de nueces.....	152
Tabla 5.9. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces (μ M Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD ^{1,2}).....	155
Tabla 5.10. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces en función de la finca (μ M Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD ^{1,2}).....	160
Tabla 5.11. Contenido en Humedad y Grasa total de las 10 variedades de nueces	167
Tabla 5.12. Contenido en Humedad y Grasa total de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% \pm SD)	169
Tabla 5.13. Contenido en ácidos grasos saturados de las 10 variedades de nueces (% \pm SD).....	172
Tabla 5.14. Contenido en ácidos grasos insaturados de las 10 variedades de nueces (% \pm SD).....	173
Tabla 5.15. Contenido en ácidos grasos saturados de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% \pm SD)	176
Tabla 5.16. Contenido en ácidos grasos insaturados de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% \pm SD)	177
Tabla 5.17. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	182

Tabla 5.18. Contenido en Flavonoides totales de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	184
Tabla 5.19a. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	189
Tabla 5.19b. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	190
Tabla 5.20. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides totales de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	192
Tabla 5.21. Contenido en ácidos fenólicos de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i> (mg/100 g de nuez \pm SD).....	198
Tabla 5.22. Contenido en ácidos hidroxicinámicos de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i>	199
Tabla 5.23. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces tras digestión <i>in vitro</i> (μ M Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD).....	203

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Principales Países Productores de Nueces (%).....	46
Figura 3.2. Principales Países Exportadores de Nueces (T)	47
Figura 3.3. Evolución de la producción de nogal en España (T)	48
Figura 3.4. Consumo de nueces en la Unión Europea (T)	49
Figura 3.5. Ciclo vegetativo anual de Fuchigami para especies de hoja caduca	53
Figura 3.6. Fechas de floración de las variedades objeto de estudio	56
Figura 3.7. Curva de crecimiento del fruto del nogal en función del tiempo.....	57
Figura 3.8. Estructura básica de los compuestos fenólicos.....	69
Figura 3.9. Estructura básica de los flavonoides.....	71
Figura 3.10. Estructuras genéricas de flavonoides mayoritarios.....	72
Figura 3.11. Estructura del ácido benzoico.....	77
Figura 3.12. Estructuras de los ácidos gálico y elágico	78
Figura 3.13. Estructura del ácido cinámico.....	79
Figura 3.14. Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres.....	86
Figura 4.1. Cromatograma de mezcla de patrones de compuestos fenólicos identificados a 280 nm. (1) ácido gálico, (2) galocatequina, (3) catequina, (4) procianidina B ₂ , (5) epigalocatequina galato, (6) epicatequina y (7) epicatequina galato.....	106
Figura 4.2. Cromatograma de mezcla de patrones de compuestos fenólicos identificados a 320 nm. (1) ácido siríngico, (2) ácido clorogénico y (3) ácido <i>p</i> -cumárico.....	107
Figura 4.3. Cromatograma del patrón de ácido elágico identificado a 360 nm.....	110
Figura 4.4. Esquema de la extracción del extracto de antioxidantes	112

Figura 4.5. Curva de caída de FL inducida por APPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C	117
Figura 4.6. Cromatograma de mezcla de patrones de ácidos grasos. (1) Mirístico, (2) Palmítico, (3) Palmitoleico, (4) Esteárico, (5) Oleico, (6) Linoleico, (7) Linolénico y (8) Araquídico.....	122
Figura 4.7. Protocolo del ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i>	124
Figura 5.1. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifican: (1) galocatequina, (2) catequina, (3) procianidina B ₂ , (4) epigalocatequina galato, (5) epicatequina y (6) epicatequina galato a 280 nm.....	133
Figura 5.2. Distribución porcentual del contenido en flavonoides de las nueces.....	135
Figura 5.3. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos flavonoides identificados	136
Figura 5.4. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifica ácido gálico a 280 nm	140
Figura 5.5. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifican: (1) ácido siríngico, (2) ácido clorogénico y (3) ácido <i>p</i> -cumárico a 320 nm.....	141
Figura 5.6. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifica ácido elágico a 360 nm	141
Figura 5.7. Regresión lineal de la suma de compuestos flavonoides identificados frente a los no flavonoides	143
Figura 5.8. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos no flavonoides identificados	144
Figura 5.9. Distribución porcentual del contenido en no flavonoides de las nueces.....	145
Figura 5.10. Distribución porcentual del contenido en compuestos fenólicos de las nueces.....	151
Figura 5.11. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos fenólicos identificados	153

Figura 5.12. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH frente ABTS, DPPH frente a ORAC y ABTS frente a ORAC.....	158
Figura 5.13. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH, ABTS y ORAC frente a Fenoles Totales.....	163
Figura 5.14. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH, ABTS y ORAC frente a compuestos fenólicos flavonoides y no favonoides.....	164
Figura 5.15. Cromatograma de la variedad Algaida en el que se identifican los ácidos grasos: mirístico (TR 13,87), palmítico (TR 17,72), palmitoleico (TR 18,17), esteárico (TR 21,34), oleico (21,67), linoleico (TR 22,50), linolénico (23,53) y araquídico (TR 24,72).....	171
Figura 5.16. Perfil lipídico de las 10 variedades de nueces	174
Figura 5.17. Contenido en Fenoles totales antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	180
Figura 5.18. Contenido en Flavonoides totales antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	183
Figura 5.19. Contenido en Flavonoides antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	185
Figura 5.20. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides totales antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	192
Figura 5.21. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	194
Figura 5.22. Actividad antioxidante antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	201

SIGLAS Y ABREVIATURAS

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AAPH	Radical 2, 2-azobis-[2-metilpropionamida] dihidrocloridro
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Ácidos Grasos
AGE	Ácidos Grasos Esenciales
AGL	Ácidos Grasos Libres
AGMI	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AGS	Ácidos Grasos Saturados
ALA	Ácido α -linolénico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AU	Unidades de Área
AUC	Area Under the Curve
β -PE	Beta-ficoeritrina
BHT	Butil hidroxitolueno
CAE	Código Alimentario Español
CH	El Chaparral
DAD	Diodo Array
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EA	Ácido elágico
ECh	Ésteres de Colesterol
ET	Equivalentes de Trolox
FAMES	Ésteres Metílicos de los Ácidos Grasos
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration

FID	Detector de Ionización de Llama
FL	Fluoresceína
FOSFA	Federation of Oils, Seeds and Fats Associations
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
HHDP	Ácido hexahidroxidifenoico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
mAU	miliunidades de Área
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PDA	Photo Diode Array
PL	Fosfolípidos
RO*	Radical Alcoxilo
ROO*	Radical Peroxilo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SIAM	Sistema de Información Agraria de Murcia
TAG	Triglicéridos
TO	Torre Blanca
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los frutos secos forman parte de la alimentación humana. El cultivo, y por tanto el consumo de los frutos secos se remonta a la prehistoria. Las pocas exigencias de cultivo y de conservación, además de su alto poder energético y nutritivo, les han hecho formar parte de la dieta del hombre desde tiempos inmemoriales. Dentro del grupo de los frutos secos, la nuez ha ocupado un lugar destacado, ya que su cultivo se extiende a todas las latitudes.

La preocupación por el mantenimiento y control de un peso adecuado, y el temor al sobrepeso, ha producido en las últimas décadas un descenso en el consumo de alimentos energéticos y ricos en grasa, como es el caso de los frutos secos. Sin embargo las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años han mostrado lo injustificado de este descenso en el consumo de frutos secos. El descubrimiento de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos sobre el estrés oxidativo y de los ácidos grasos poliinsaturados (omega-3) sobre la salud cardiovascular, ha motivado que de nuevo los frutos secos en general y las nueces en particular sean considerados dentro de la dieta mediterránea como un alimento de consumo diario.

En este sentido son numerosos los estudios que encuentran en las nueces un aliado para el tratamiento de determinadas patologías. El perfil nutricional de las nueces, y sobre todo, su perfil de ácidos grasos, cuyo consumo se ha asociado con la disminución de los marcadores bioquímicos (lipoproteínas, glucosa), la presión arterial y el riesgo cardiovascular, hacen de ellas un ingrediente ideal para lo que se puede considerar una alimentación saludable. Por otra parte su contenido en compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, etc., las incluye dentro del grupo de alimentos con carácter antioxidante, que en los últimos años han sido objeto de numerosas investigaciones por su efecto sobre la prevención y/o tratamiento de enfermedades con una base de estrés oxidativo.

El cultivo del nogal no goza de gran tradición en la Región de Murcia. Sin embargo, en los últimos años ha sufrido una importante expansión en determinadas comarcas de la Región, motivada sobre todo, por representar una

alternativa a otros frutales que en la actualidad sufren una importante crisis de mercado. El alto grado de mecanización y las pocas necesidades de laboreo justifican, en parte, esta expansión, siendo diversas las variedades de nueces que se cultivan.

Sin embargo, es conocido que algunos factores como la variedad o las condiciones edafoclimáticas pueden influir en la composición nutricional de los alimentos. En este sentido, creemos interesante ante una eventual potenciación del cultivo del nogal en la Región de Murcia, conocer la composición nutricional de las distintas variedades cultivadas y, en concreto, la composición en aquellos nutrientes que les confieren un valor añadido por sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es caracterizar los perfiles fenólico y lipídico de 10 genotipos de nueces cultivados en la Región de Murcia y su actividad antioxidante *in vitro*, así como estudiar la influencia de los factores edafoclimáticos sobre estos parámetros.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar el contenido en fenoles totales, así como identificar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en la semilla de los diferentes genotipos de nueces.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos en los diferentes genotipos de nueces.
- Analizar el contenido en humedad y grasa total, así como identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en la semilla de los diferentes genotipos de nueces.
- Establecer la influencia del clima en los contenidos fenólico y lipídico de las semillas de nueces.
- Estudiar la biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. EL CULTIVO DEL NOGAL

El cultivo de los frutos secos es uno de los más antiguos de la humanidad. El hombre primitivo recolectaba los frutos secos y los consumía de manera habitual, sirviendo de suministro estable durante todo el año ya que se trataba de un grupo de alimentos con una gran capacidad para resistir cambios climáticos severos que no requerían unas condiciones de almacenamiento demasiado exigentes (Dreher *et al.*, 1996).

Dentro de los frutos secos las nueces han ocupado y ocupan un lugar muy relevante. El hombre ha utilizado el nogal desde tiempos inmemoriales. Muchas leyendas y supersticiones han estado asociadas con esta especie, que griegos y romanos consideraron un símbolo de fecundidad (Salas-Salvadó *et al.*, 2005). Su origen es controvertido, según unos autores es originario de Persia, y según otros de China o Japón, desde donde fue transportado a Grecia, a Italia y a los demás países de Europa (Prasad, 2003). En su migración hacia Europa, el nogal fue perdiendo algunos caracteres (como la fructificación lateral), debido al proceso de selección y adaptación a condiciones diferentes. Después de las campañas de Alejandro Magno, se introdujeron en Grecia materiales vegetales de Asia que al cruzarse con los ya existentes dieron origen a nuevas fuentes de diversidad (Rosengarten, 2004).

La introducción del nogal en la Europa septentrional y occidental data quizá antes de la época romana y en el continente americano hacia el siglo XVII. Existen evidencias fósiles de la presencia del nogal *Juglans regia*, en la Península Ibérica, que se remontan al Paleolítico.

3.1.1. Antecedentes económicos

3.1.1.1. El mercado mundial de la nuez

El nogal común es un árbol de gran importancia económica, tanto por la producción de los frutos, que se consumen frescos o se les extrae aceite, como por

la calidad de su madera, similar a la del nogal negro, que es utilizada en ebanistería, siendo una de las especies frutales más rentables actualmente.

La producción mundial de nueces se eleva a 2.282.264 toneladas (FAO, 2011a) y su área de cultivo ocupa la mayoría de los continentes, si bien, es en el hemisferio norte donde se encuentra la mayor parte de ella. Dos países, China y Estados Unidos, cuya cosecha supera las 300.000 toneladas (FAO, 2011a), dominan la producción (Figura 3.1), siendo también los principales exportadores (Figura 3.2).

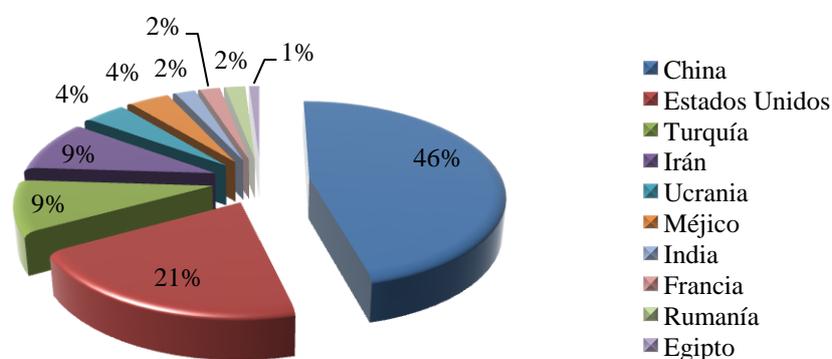


Figura 3.1. Principales Países Productos de Nueces (%) (Fuente: Elaborada a partir de FAO, 2011a)

Estados Unidos, exporta un poco más del 40% de la producción total, la tercera parte con cáscara y el resto en forma de semilla. En su mercado interior, la mayor parte de la producción se consume en grano.

China exporta principalmente la nuez en grano, en un volumen que representa algo más del 11% de su producción (FAO, 2011b). Este país tiene un consumo interior muy importante, ya que se incluye de manera habitual en la merienda y se utiliza como ingrediente en numerosos productos transformados.

Por el contrario, países como Turquía, Irán y Ucrania, donde la producción también es relativamente importante, participan muy poco del comercio exterior.

España, que a escala mundial tiene una producción modesta, 13.299 toneladas (MARM, 2010) es, sin embargo, un país muy activo en el comercio internacional, importando 16.280 toneladas y exportando, como producto

elaborado, 14.924 toneladas (FAO, 2011b). En Murcia la producción de nueces con cáscara en 2009 se elevaba a 292 toneladas, ocupando el décimo puesto en el conjunto de España (MARM, 2010).

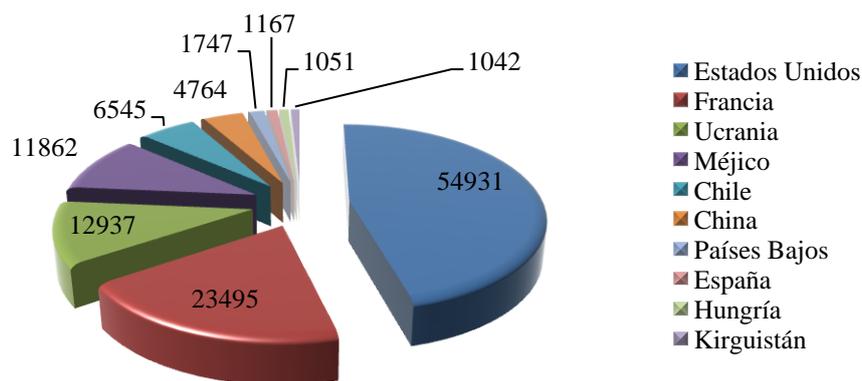


Figura 3.2. Principales Países Exportadores de Nueces (T) (Fuente: Elaborada a partir de FAO, 2011b)

En España existen millones de árboles de semilla, sin injertar, aislados y/o diseminados por todas las regiones. Sin embargo, las plantaciones regulares, con variedades injertadas, datan de fechas recientes. Las primeras se establecieron a finales de la década de 1970, coincidiendo con la especialización de algunos viveros españoles en la multiplicación del nogal (Salas-Salvadó *et al.*, 2005).

En el sur de la península podemos encontrar grandes superficies de cultivo de variedades de California aunque el cultivo de nuez en España es más un cultivo de tipo familiar, dentro de pequeñas estructuras.

En la Figura 3.3 se muestra la evolución de la producción del nogal en toneladas en España desde el año 1999 (MARM, 2010).

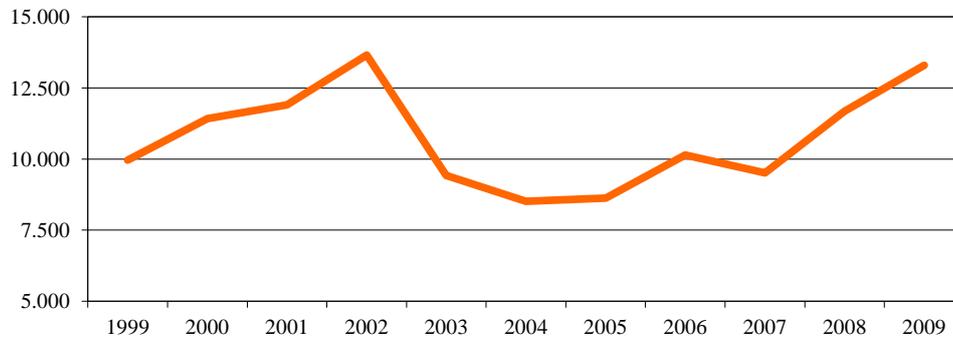


Figura 3.3. Evolución de la producción de nogal en España (T) (Fuente: Elaborada a partir de MARM, 2010)

La mayoría de los países productores de nueces han aumentado su escala operativa para reducir el coste en la adquisición de la materia prima, así como para el procesamiento de la nuez, donde se ha logrado avanzar tanto en la presentación del producto como en la diversificación de usos para lograr un producto diferenciado.

En general, la mejora de competitividad en el cultivo del nogal, se ha reflejado en el aumento de la superficie mundial cultivada.

3.1.1.2. Consumo de la nuez

La nuez, al igual que ocurre con otros frutos secos, forma parte de diferentes productos (pasteles, panes, cereales, etc.). En la mayor parte de los países europeos la nuez se consume entera, siendo el consumo en grano relativamente importante en Alemania y Austria.

El consumo mundial de nueces se sitúa alrededor de 1,85 kg/persona/año, alcanzando en España 7,63 kg/persona/año (FAO, 2011c).

Dentro de la Unión Europea Alemania, Italia y España son los países con un mayor consumo total de nueces con cifras que superan las 300.000 toneladas al año (Figura 3.4) (FAO, 2011c).

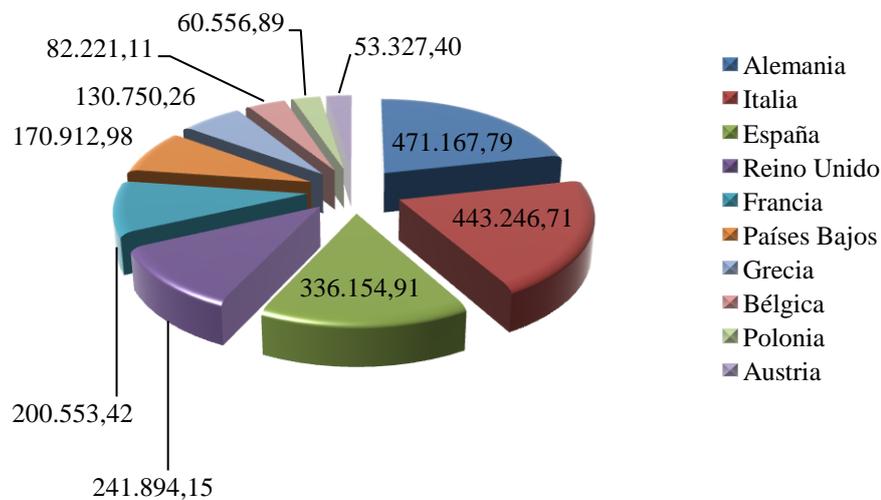


Figura 3.4. Consumo de nueces en la Unión Europea (T) (Fuente: Elaborada a partir de FAO, 2011c)

La nuez se comercializa mayoritariamente en cáscara (más del 80% de la producción). El consumidor prefiere nueces de gran calibre (mayor de 32 mm), sabrosas, bien secadas, con un contenido en humedad del 10%, y sanas. Las exigencias en este producto se centran, sobre todo, en el color del grano, que debe ser claro, y en el sabor (Infoagro, 2011). Las nueces de menor calibre se utilizan para descascarar, destinando el grano principalmente a la industria pastelera.

3.1.2. Clasificación botánica

El nogal común, *Juglans regia* L., pertenece al género *Juglans* de la familia *Juglandaceae*. Esta familia forma por sí sola un orden, el de *Juglandales* o *Fagales* que, aparte del género *Juglans* L., agrupa a los géneros *Alfaroa*, *Annamocarya*,

Carya, *Cyclocarya*, *Engelhardtia*, *Oreomunnea*, *Platycarya*, *Pterilema*, *Pterocarya* y *Rhamphocarya* (Janick & Paull, 2008).

El género *Juglans* L. se compone de una veintena de especies que, en su mayoría, se hibridan entre ellas y que se clasifican en las siguientes 4 secciones: *Trachycaryon* (nogal blanco), *Cardiocaryon* (nogal de Japón), *Rhysocaryon* (nogal negro) y *Dioscaryon* (nogal común). Todas las especies del género *Juglans* L. son diploides con $2n = 2x = 32$ cromosomas (Kadereit *et al.*, 2004).

3.1.3. Morfología del árbol

Árbol caducifolio que puede llegar a alcanzar 20 m de altura. Posee grandes hojas pinnadas (2 a 4 dm) compuestas de 5 ó 9 folíolos ovales u hojuelas de color rojizo al brotar y que después cambian a verde oscuro. Presentan un olor agudo y desagradable y son bastante ricas en taninos, como el resto de la planta. El tronco corto y robusto tiene una corteza de color gris claro, profundamente fisurado en ejemplares añosos; del tronco salen gruesas y vigorosas ramas para formar una copa grande y redondeada. Las raíces se encuentran notablemente extendidas, tanto en sentido horizontal como vertical (Martínez *et al.*, 2010).

Las yemas son de tamaño variable, ovales, redondeadas, con una fina capa de pelo que cubre su superficie y cubiertas exteriormente por dos escamas que envuelven más o menos completamente a las más tiernas. Las yemas terminales o apicales son erguidas, las laterales patentes y todas están sobre una ancha cicatriz foliar elevada (Germain *et al.*, 2001).

Las plantas son monoicas, es decir, presentan flores femeninas y masculinas, las primeras aparecen en las ramas del mismo año, agrupadas en racimos de dos a cinco florecillas pequeñas y de color rojizo, mientras que las masculinas brotan en ramas del año anterior formando amentos colgantes de entre 5-10 cm de color púrpura verdoso (Polito, 1998). Las flores femeninas forman un fruto globular de pericarpio verde semi-carnoso (fruto en drupa, llamada popularmente "nuez", pero botánicamente no lo es) con una semilla corrugada o estriada de color marrón en su interior que los romanos llamaban (*Jovis glans*), "bellotas de Júpiter"; de este término deriva el nombre genérico *Juglans*. En otoño, todo el fruto, incluida la cáscara, caen al madurar.

3.1.4. Morfología del fruto

El fruto del nogal común *Juglans regia* L. se compone de una envoltura, el pericarpio, que rodea a un núcleo grande, la nuez. Esta nuez tiene una cáscara leñosa que esconde una almendra comestible, la semilla.

3.1.4.1. El pericarpio

Esta envoltura carnosa, verde, se origina en la pared externa del ovario. Es relativamente delgada con un grosor medio de 4 mm y la huella de su red vascular más interna corresponde a los surcos visibles sobre toda la cáscara de la nuez. En la madurez, el pericarpio se agrieta, se abre y libera la nuez, que cae al suelo. La lluvia o, en su ausencia, una humedad elevada, acelera esta apertura o dehiscencia. Si la humedad del aire es, por el contrario, muy baja, el pericarpio tiene tendencia a secarse y retener el fruto sobre el árbol incluso si alcanza la madurez fisiológica (Germain *et al.*, 1975).

3.1.4.2. La cáscara

La cáscara está formada por dos válvulas simétricas pegadas. Las alas de sutura están más o menos marcadas. Lo más frecuente es que éstas afecten a la mitad superior del fruto pero, a veces, pueden extenderse hasta la base.

En *Juglans regia* L., la cáscara es más o menos surcada y abollada y generalmente sinuosa a lo largo de las alas de sutura. El interior de la cáscara presenta una superficie rugosa y bastante irregular. Su grosor varía, según las variedades, de 1 a 2,5 mm. La cáscara representa el 40 o 65% del peso total de la nuez seca.

La forma general de la nuez es muy variable dependiendo de las distintas variedades. Ésta puede ser cordiforme, elíptica, oblonga, ovoide, cónica o redonda. Su base y su cumbre presentan diferentes formas, redondeada, puntiaguda, afilada, etc. De igual forma, el punto pistilar del extremo de la nuez es casi inexistente en algunos casos y se encuentra muy desarrollado en otros cultivos (Germain *et al.*, 1975; Muncharaz, 2001).

3.1.4.3. *La semilla*

Se presenta bajo la forma de una almendra cerebriforme, tiene una superficie irregular y llena casi completamente la nuez. Está dividida en dos lóbulos principales por el tabique primario, cada uno de estos lóbulos están a su vez recortados en la parte superior y, sobre todo, en la base por el tabique secundario. Esta semilla representa entre el 35 y el 60% del peso seco de la nuez (Germain *et al.*, 1975).

3.1.5. **Biología y fisiología**

El conocimiento de la biología y de la fisiología del nogal es una herramienta importante tanto para decidir el tipo de plantación como para predecir el comportamiento de los árboles y el empleo de las técnicas agrícolas más adecuadas.

3.1.5.1. *Ciclo anual de crecimiento del nogal*

El nogal como especie caduca, tiene un periodo de reposo y otro de actividad vegetativa, también llamado ciclo vegetativo. Ambas etapas están condicionadas por la temperatura, siendo esta la responsable del desarrollo de las etapas del ciclo vegetativo anual de las plantas de origen de climas templados o templados cálidos (Pallardy, 2008a). El ciclo vegetativo del nogal dura entre 230 y 250 días, dependiendo de la variedad (Gil-Albert, 1995; Razeto, 2006).

Según Fuchigami y Wisniewski (1997), el ciclo puede ser representado mediante una circunferencia, que explica cada etapa comparando los 360 ° de esta figura geométrica (Figura 3.5). Esto permite entender y estimar las diferentes etapas del ciclo vegetativo de un árbol caducifolio como el nogal:

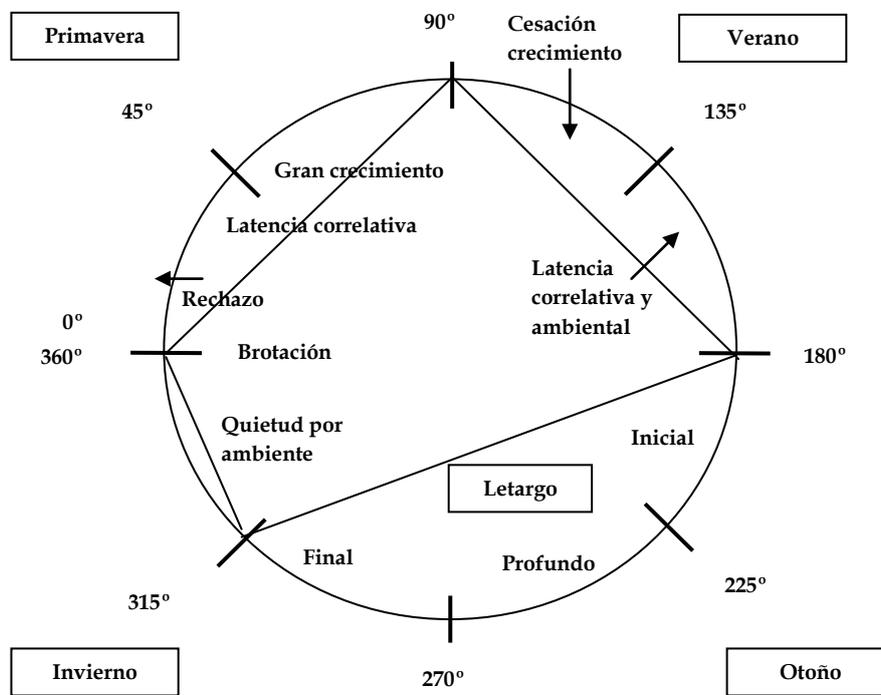


Figura 3.5. Ciclo vegetativo anual de Fuchigami para especies de hoja caduca (Fuente: Elaborada a partir de Fuchigami & Wisniewski, 1997)

- 1^a) 0°, brotación de yemas por calor.
- 2^a) 0° a 90°, crecimiento del brote.
- 3^a) 90° a 180°, maduración vegetativa, inhibición correlativa de yemas axilares, lento crecimiento.
- 4^a) 180°, madurez vegetativa e inicio del letargo de yemas quietas por frío y día corto.
- 5^a) 180° a 270°, profundización del letargo de yemas por frío y día corto.
- 6^a) 270°, letargo máximo de yemas.
- 7^a) 270° a 315°, disipación del letargo de yemas por frío.
- 8^a) 315°, término del letargo de yemas por frío.

9^a) 315° a 360°, quietud de yemas por ambiente frío (Gil & Pszczólkowski, 2007).

3.1.5.2. Latencia invernal y salida de receso

El periodo de reposo, también denominado dormancia o latencia se caracteriza por la supresión temporal del crecimiento visible, esto no significa que exista una inactividad fisiológica, sino que todas las actividades metabólicas del árbol se desaceleran u ocurren a una menor velocidad (Agustí, 2004).

La dormancia es una etapa importante del ciclo anual del nogal, ya que su fin implica un despertar fisiológico de la planta, haciéndola sensible a los estímulos del medio, a esta etapa se le llama ecolatencia (Gil-Albert, 1992).

En la nuez común, *Juglans regia* L., las yemas entran progresivamente en latencia o “descanso fisiológico” en el periodo que va desde mediados de agosto a principios de octubre.

En cultivos de variedades originarias de países con clima continental, con inviernos muy fríos donde las temperaturas mínimas pueden bajar a -20 y -25 °C, los niveles de latencia suelen ser elevados, mientras que los cultivos californianos o del sur de Europa, con inviernos suaves, se caracterizan por una latencia débil.

Bajo climas con inviernos suaves, como California y las zonas costeras del Mediterráneo, las necesidades de frío de las variedades con un alto nivel de latencia son raramente satisfechas, es por esto que la entrada en vegetación de estos cultivos se retrasa mucho (Germain *et al.*, 2001).

3.1.5.3. Brotación y crecimiento de brote

Como árbol caducifolio el nogal tiene inhibidas las yemas hasta que se presentan las condiciones adecuadas para su crecimiento.

Al salir del receso y con el incremento de las temperaturas en primavera, las yemas empiezan a brotar las escamas y se hinchan. Después empieza la elongación del brote y con ello aparecen las hojas. Este crecimiento en una primera etapa es en longitud y luego, en una segunda etapa, de engrosamiento y lignificación del brote de la temporada (Gil-Albert, 1995).

Una característica importante del nogal es que se trata de un árbol con una marcada dominancia apical, es decir, que las yemas terminales o yemas punteras, son las que primero brotan y las que crecen más vigorosamente. Por el contrario, las yemas laterales crecen con menor vigor e incluso su brotación es inhibida (Muncharaz, 2001).

Esta capacidad de brotación lateral se utiliza para clasificar las variedades de nogal, siendo las variedades mejor evaluadas aquellas que presentan un mayor porcentaje de este tipo de brotación. Esto es debido a que una mayor brotación lateral supone una mayor producción de nueces ya que existen más flores femeninas por centro fructífero (Charlot & Germain, 1988).

El largo de los brotes del nogal es variable, aunque el promedio fluctúa entre los 10 y 20 cm. Este crecimiento no es estimable hasta que el brote logra su tamaño final.

Las fechas de brotación del nogal varían considerablemente dependiendo de los genotipos seleccionados. Las variedades originarias de California, la cuenca mediterránea, la Península Ibérica y de Japón, de inviernos suaves, tienen una brotación temprana o muy temprana (mitad de marzo a mitad de abril). Lo mismo sucede en cultivos de las regiones con clima continental frío (Alemania, Europa del Este, Asia Central, Manchuria) (Germain *et al.*, 2001).

3.1.5.4. Floración y fecundación

Como ya se ha dicho, el nogal es una especie monoica auto-compatible, existiendo varias especies inter-compatibles. El nogal está ampliamente especializado en la polinización anemófila; por un lado, las flores femeninas son apétalas y con grandes superficies estigmáticas preparadas para recibir el polen y por otro, el polen proveniente del amento (flor masculina que morfológicamente es adecuada para la anemofilia) es pequeño y ligero para ser arrastrado por el viento (Pallardy, 2008b). Presenta una recepción estigmática corta, entre 5 y 7 días y con viabilidad del polen de 2 a 3 días (Sitte, 2004).

Polito (1998), señala que el nogal presenta dicogamia. Esta desincronización floral puede ser protoginia o protandria y depende exclusivamente del tipo de variedad. Las variedades comerciales más utilizadas hoy en día presentan dicogamia protandria, es decir, las flores masculinas entregan el polen antes de

que las flores pistiladas sean receptoras. Unos pocos cultivares (Chico, Amigo) son protoginos; en este caso, la receptividad de las flores femeninas ocurre antes que la entrega del polen (Figura 3.6).

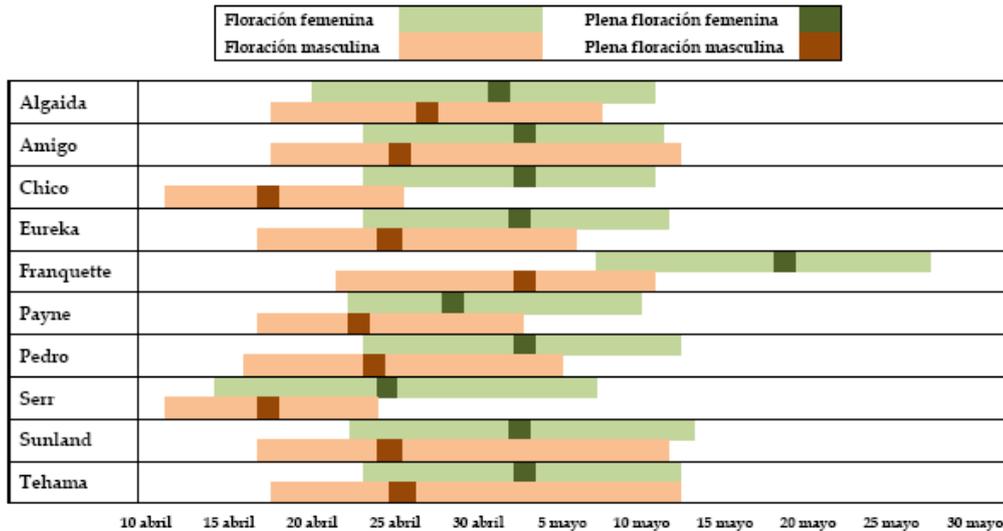


Figura 3.6. Fechas de floración de las variedades objeto de estudio

3.1.5.5. Crecimiento y desarrollo del fruto

El fruto presenta una curva de crecimiento del tipo sigmoidea doble (Figura 3.7), donde se observa un momento en que se detiene el crecimiento, esto se debe a que el fruto está lignificando la cáscara de la nuez, después de esto retoma la ganancia de peso, para luego dar comienzo a una etapa de senescencia.

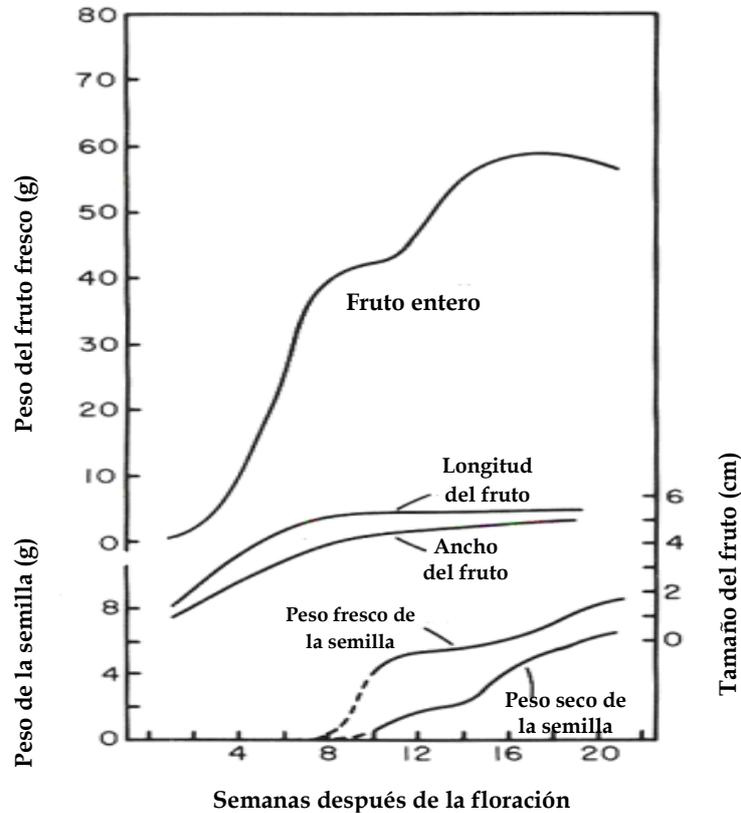


Figura 3.7. Curva de crecimiento del fruto del nogal en función del tiempo
(Fuente: Elaborada a partir de Ramos, 1985)

En la curva se reconocen 3 etapas: una primera etapa llamada crecimiento rápido, una segunda, el endurecimiento del carozo o hueso y una tercera y última etapa de maduración.

El crecimiento rápido del fruto es una etapa en la cual el fruto crece en tamaño. Esta fase se comporta como una sigmoide simple, esto se debe a que el embrión tiene un crecimiento acelerado en las primeras semanas y simultáneamente el pericarpio se agranda por acumulación de compuestos fenológicos. Es en esta etapa donde el fruto consigue su tamaño definitivo. Después de esto, el fruto sufre cambios a nivel interno que no son notorios a simple vista, ya que los tejidos cambian estructuralmente para luego obtener su condición final.

Como segunda etapa, el endocarpio se endurece y se forma la cáscara de la nuez, esta etapa no es diferente a la de la maduración, pero se separa a nivel de literatura ya que coincide con el fin del crecimiento rápido y el inicio de la maduración (Gil, 2000). Paralelamente, y en un proceso más largo, la maduración de la semilla va adquiriendo su configuración definitiva, ganando peso rápidamente y sufriendo una serie de cambios químicos, que le otorgan las características nutricionales y organolépticas a la nuez (Muncharaz, 2001).

La maduración puede definirse como el momento donde la semilla ha alcanzado su completa evolución y donde el pericarpio se fisura.

En España, el periodo de maduración se extiende durante más de un mes y medio, desde el final de agosto para algunos cultivos originarios de Asia Central, hasta el último tercio del mes de octubre e incluso principios de noviembre para árboles con desborre extremadamente tardío.

A modo de resumen, se presentan en la Tabla 3.1 las fechas en la que se producen aproximadamente los estados importantes en el desarrollo del fruto del nogal.

Tabla 3.1. Fecha de los estados importantes en el desarrollo del fruto

Estado de desarrollo	Semanas después de floración
Fecundación	1
Crecimiento total del fruto	8
Inicio de rápido crecimiento de la semilla	9
Tamaño final del fruto	10
Endurecimiento de la cáscara	12-15
Crecimiento rápido de la semilla	15
Peso máximo total	18
Fecha aproximada de cosecha	19-22

Fuente: Elaborada a partir de Pinney *et al.* 1998

3.1.6. Requerimientos edafoclimáticos

El nogal es una especie adaptada a climas templados y continentales. Sin embargo, para la producción de nuez, su hábitat ideal coincide con climas templados, similares al mediterráneo. Las heladas precoces en otoño y las temperaturas excesivamente bajas en invierno pueden causar daños importantes en el árbol, mientras que las heladas tardías de primavera reducen o anulan la producción, además de perjudicar las nuevas brotaciones. La excesiva humedad ambiental favorece la incidencia de enfermedades, soportando bien las altas temperaturas estivales.

Tiene capacidad de adaptación a la sequía y a diferentes tipos de suelos, pero es un cultivo típico de regadío, de suelos profundos, fértiles, textura franca, no excesivamente alcalinos, que se adapta mal a los terrenos compactos (Salas-Salvadó *et al.*, 2005).

3.1.6.1. Temperatura

Se deben evitar lugares cuyas temperaturas primaverales puedan descender por debajo de 1,1 °C, ya que pueden ocasionar daños por heladas en las inflorescencias masculinas, brotes nuevos y pequeños frutos.

El nogal es muy sensible a las heladas de primavera, que mermarán sustancialmente la cosecha, pero también a las heladas precoces de otoño que interfieren muy negativamente en la formación los primeros años; durante este periodo juvenil puede llegar a producirse la muerte de toda la parte aérea del plantón.

Las altas temperaturas, > 38 °C, acompañadas de baja humedad, también tienen efectos negativos sobre el cultivo del nogal. Si esto sucede al comienzo de la estación, las nueces resultarán vacías, pero si es más tarde las semillas pueden arrugarse, oscurecerse o adherirse al interior de la cáscara (Vidal, 1980).

A continuación se resumen los aspectos climáticos a tener en cuenta en el cultivo del nogal (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Aspectos climáticos en el cultivo del nogal

Característica	Comportamiento
Sensibilidad a heladas	Medianamente sensible
Etapas o partes más sensibles a heladas	Flores
Temperatura crítica o de daño por heladas	-2 °C
Temperatura base o mínima de crecimiento	10 °C
Rango de temperatura óptima de crecimiento	21 a 28 °C
Límite máximo de temperatura de crecimiento	38 °C
Suma térmica entre yema hinchando y cosecha	1300 a 1700 días-grados
Requerimientos de horas de frío (< 7 °C)	700 a 1000 h
Requerimientos de fotoperiodo	Día neutro (entre 10 y 14 h de luz)

Fuente: Elaborada a partir de Pinney *et al.* 1998

3.1.6.2. Agua

A pesar de su rusticidad, el nogal es muy sensible a la sequía, siendo impropio para ser cultivado en las tierras de secano y de naturaleza seca.

Para que su cultivo sea posible necesita de precipitaciones mínimas de 700 mm, siendo de 1.000-1.200 mm para explotaciones intensivas.

Si la pluviometría es insuficiente o está irregularmente repartida, habrá que recurrir al riego para conseguir un desarrollo normal de los árboles y una buena producción de nuez (Infoagro, 2011).

3.1.6.3. Suelo

Es un árbol que se adapta muy bien a suelos muy diferentes aunque prefiere suelos profundos, permeables, sueltos y de buena fertilidad. El drenaje vendrá determinado por subsuelos formados por caliza fisurada, cantos rodados, etc.

Para una buena retención de agua se precisan suelos con un contenido en materia orgánica entre el 1,2 y 2% y un 18-25% de arcilla. El nogal se desarrolla en suelos con pH neutro (6,5 - 7,5). Según las características de los suelos se

emplearán diferentes tipos de patrones, destacando *J. nigra* para suelos ácidos y *J. regia* para los más calizos (Infoagro, 2011).

3.1.7. Riego

Llevar a cabo una práctica correcta del riego es fundamental para obtener un desarrollo rápido y homogéneo del árbol y la obtención de una producción importante de nuez de calibre regular. El tamaño de la nuez dependerá de las disponibilidades de agua durante las seis semanas que siguen a la floración (Sellés & Ferreyra, 2001).

Prácticamente todas las nuevas explotaciones cuentan con aportes hídricos. El riego localizado, por goteo, es el más habitual, mientras que el riego por aspersión no se utiliza, pues favorece el desarrollo de bacteriosis.

En producciones intensivas el árbol no debe sufrir escasez de agua durante la formación del fruto ni durante el engrosamiento del mismo. Esto tiene lugar de mayo a julio y el aporte de agua será de 40 a 50 m³/ha y día. Cuando lignifique la cáscara (agosto y septiembre) las necesidades serán de unos 30 a 35 m³/ha y día (Vidal, 1980).

3.1.8. Recolección de las nueces y postcosecha

La recolección es una etapa clave para la obtención de una nuez y una semilla de buena calidad. De hecho, las nueces deben ser recolectadas lo más rápidamente posible ya que si están mucho tiempo en el suelo, se deteriora su calidad. Es necesario evitar el empañamiento de la cáscara y el oscurecimiento de la semilla.

Una nuez fresca de buena calidad presenta en el momento de la recolección las siguientes características:

- Está madura con más de un 50% de frutos con el tabique interno totalmente oscuro.
- Su tamaño es preferiblemente superior a 32 mm.
- Ha de contener una semilla firme y de color clara que se pele fácilmente.

- Con una humedad superior al 30%, el óptimo se sitúa alrededor del 40%.

Las nueces destinadas al mercado en seco o bien a la venta de semilla llegan a la madurez cuando la cáscara se agrieta y se convierte en dehiscente. Las nueces caen en ese momento de forma natural al suelo sobre principios del mes de octubre. Esta caída se favorece por la lluvia y el viento.

Para las variedades más precoces, como Lara y Marbot, la recolección y el periodo de comercialización de las nueces frescas se sitúan como media en la segunda y la tercera semana de septiembre (Germain *et al.*, 2001).

Después de la recolección, el fruto sufre una serie de tratamientos que se pueden resumir en:

- Lavado y destrío del fruto: mediante una descortezadora se separan las cáscaras de la nuez. La nuez se somete a un lavado con agua corriente y seguidamente se realiza un destrío de ramillas, piedras, nueces defectuosas, cortezas, etc.
- Secado: con él se consigue reducir el contenido de humedad del fruto desde un 30-45% hasta un 12-15%. El secado puede ser natural mediante la exposición al sol de las nueces o artificial mediante el empleo de una corriente de aire caliente en secadores.
- Calibrado: su objetivo es conseguir lotes homogéneos de nueces, para ello se emplean calibradoras de cilindro giratorio.
- Blanqueado: las nueces de primera y segunda calidad se someten después del secado a un blanqueamiento superficial mediante un baño en una disolución de hipoclorito sódico. Con ello se consigue aportar a la nuez un color más homogéneo y natural, libre de manchas negruzcas.
- Almacenamiento: una vez secada la nuez puede conservarse en silos durante 5-6 meses a una temperatura de 7 a 10 °C.

- Empaque y venta: la nuez sale al mercado en grandes sacos de 25 ó 50 kg o en fracciones pequeñas de bolsas de medio kg (Infoagro, 2001).

3.1.9. Reglamentación europea

El Reglamento (CE) n° 175/2001 de la Comisión de 26 de enero de 2001 establece las normas de comercialización de las nueces comunes con cáscara.

Por otro lado, la regulación de su comercialización como semilla, viene descrita en el Reglamento (CE) n° 1947/2005 del Consejo de 23 de noviembre de 2005 por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las semillas y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 2358/71 y (CEE) n° 1674/72.

3.2. VALOR NUTRICIONAL DE LA NUEZ

Las frutas secas o de cáscara son aquellas frutas cuya parte comestible posee en su composición menos del 50% de agua (CAE, 2006).

Tradicionalmente las nueces han sido consideradas alimentos de alta densidad energética debido a su elevado contenido graso, de hecho, solo son superadas energéticamente (dentro del grupo de los frutos secos) por los piñones, la macadamia y la pacana (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Contenido energético de los frutos secos/100 g

Fruto seco	Energía (kcal)	Energía (kJ)
Nueces	654	2738
Avellanas	628	2629
Almendras	575	2408
Piñones	673	2816
Anacardos	553	2314
Macadamias	718	3004
Pistachos	562	2352
Nueces de Brasil	656	2743
Pacanas	691	2889
Cacahuetes	567	2374

Fuente: Elaborada a partir de USDA, 2010a

3.2.1. Macronutrientes

El contenido en macronutrientes de las nueces, expresado en g/100 g de nuez, es el siguiente: 15,23 de proteínas, 13,71 de hidratos de carbono y 65,21 de lípidos (USDA, 2010a).

Los lípidos son la fracción mayoritaria en cuanto a macronutrientes de las nueces. Dentro de la fracción lipídica, los constituyentes mayoritarios son triglicéridos, encontrando en menor proporción ácidos grasos libres, diacilglicerol, monoacilglicerol, esteroides, ésteres de esteroles, fosfolípidos y vitaminas liposolubles (Prasad, 2003). El perfil de ácidos grasos de la nuez es especialmente interesante, puesto que se caracteriza por un bajo contenido en ácidos grasos saturados (AGS), y un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), fundamentalmente ácido oleico, y poliinsaturados (AGPI), con la particularidad de contener una alta proporción de ácido α -linolénico y ácido linoleico, ácidos grasos de la serie n-3 y n-6, respectivamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenido en ácidos grasos de la nuez

Ácido graso	g/100 g	%
C 16:0	4,04	6,59
C 18:0	1,659	2,14
C 20:0	0,063	0,08
C 16:1	0,063	0,08
C 18:1	11,6	18,9
C 20:1	0,101	0,165
C 18:2	36,4	59,6
C 18:3	7,45	12,2

Fuente: Elaborada a partir de USDA, 2010a

El contenido hidrocarbonado de las nueces es similar al proteico (Tabla 3.5). Destaca el bajo contenido en hidratos de carbono simples frente a un elevado contenido en fibra, principalmente fibra insoluble, mientras que la cantidad de fibra soluble es relativamente poco importante en relación con la fibra total (Salas-Salvadó *et al.*, 2006).

Tabla 3.5. Contenido en carbohidratos y fibra de la nuez

Compuesto	g/100 g	%
Sucrosa	2,43	93,1
Glucosa (dextrosa)	0,08	3,06
Fructosa	0,09	3,44
Almidón	0,06	2,29
Fibra	6,7	-

Fuente: Elaborada a partir de USDA, 2010a

En cuanto al contenido proteico de las nueces, a pesar de ser elevado respecto a otros alimentos, su valor biológico no es bueno, ya que son deficitarias en algunos aminoácidos esenciales como la treonina, la isoleucina o la metionina

(Tabla 3.6). Esto hace que la calidad de la proteína, sea inferior en las nueces (48%) que en otros grupos de alimentos como las carnes (94%) (Suárez-López *et al.*, 2006). No obstante, cabe destacar que las nueces son ricas en arginina (con más de 2 g/100 g de nuez) y pobres en lisina (menos de 0,5 g/100 g de nuez). Por lo tanto, la relación lisina/arginina, utilizada como indicador del riesgo de desarrollar hipercolesterolemia y arteriosclerosis (Kritchevsky *et al.*, 1982; Sánchez *et al.*, 1988; Rajamohan & Kurup, 1997), es buena en las nueces (Feldman, 2002).

Tabla 3.6. Contenido en aminoácidos de la nuez

Aminoácido	mg/100 g	mg/g N	Aminoácido	mg/100 g	mg/g N
Isoleucina	700	260	Valina	970	360
Leucina	1100	420	Arginina	2300	860
Lisina	490	180	Histidina	410	150
Metionina	240	88	Alanina	730	270
Cisteína	240	90	Ácido aspártico	1600	580
Fenilalanina	730	270	Ácido glutámico	3100	1160
Tirosina	490	180	Glicina	810	300
Treonina	540	200	Prolina	650	240
Triptófano	170	61	Serina	890	330

Fuente: Elaborada a partir de USDA, 2010a

3.2.2. Micronutrientes y otros componentes no nutritivos

Las nueces contienen pequeñas cantidades de diversos compuestos que han suscitado un especial interés por sus potenciales efectos saludables.

Las nueces presentan cantidades considerables de folatos (98 µg/100 g), vitamina del grupo B involucrada en los procesos de detoxificación de la homocisteína, aminoácido rico en sulfuro con propiedades arterioscleróticas que se acumula en plasma cuando el estado en folato no es normal (Moat *et al.*, 2004).

Además, las nueces son una excelente fuente de vitamina E, concretamente α -, β -, y γ - tocoferoles, que actúa como un potente antioxidante capaz de proteger

la función inmune, de inhibir el daño oxidativo celular (Devaraj *et al.*, 2008), y de reducir el riesgo cardiovascular (Costa *et al.*, 2005).

Las nueces contienen una notable cantidad de calcio, magnesio y potasio, y un bajo contenido en sodio (Tabla 3.7), lo que las hace alimentos posiblemente protectores frente a la desmineralización ósea, la hipertensión arterial, la resistencia a la insulina, y otros factores de riesgo cardiovascular (Segura *et al.*, 2006; Bulló *et al.*, 2009).

Tabla 3.7. Contenido en vitaminas y minerales de la nuez

Compuesto	Unidades	Contenido (100 g)	Compuesto	Unidades	Contenido (100 g)
Vitamina C	mg	1,3	δ -tocoferol	mg	1,89
Tiamina	mg	0,341	Vitamina K	μ g	2,7
Riboflavina	mg	0,150	Calcio	mg	98
Niacina	mg	1,125	Hierro	mg	2,91
Ácido pantoténico	mg	0,570	Magnesio	mg	158
Vitamina B ₆	mg	0,537	Fósforo	mg	346
Folatos	μ g	98	Potasio	mg	441
Colina	mg	39,2	Sodio	mg	2
Vitamina A	μ g	12	Zinc	mg	3,09
α -tocoferol	mg	0,7	Cobre	mg	1,586
β -tocoferol	mg	0,15	Manganeso	mg	3,414
γ -tocoferol	mg	20,83	Selenio	μ g	4,9

Fuente: Elaborada a partir de USDA, 2010a

Además de los nutrientes ya mencionados, las nueces contienen numerosos compuestos fitoquímicos, sustancias de origen vegetal con efectos positivos sobre la salud, tales como fitosteroles, carotenoides, compuestos fenólicos y melatonina (Reiter *et al.*, 2005; Normén *et al.*, 2007; García-Parrilla *et al.*, 2009).

3.3. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS NUECES

Las plantas sintetizan un gran número de compuestos orgánicos clasificados como metabolitos primarios y secundarios.

Los metabolitos primarios son compuestos que tienen funciones esenciales relacionadas con la fotosíntesis, la respiración y el crecimiento y desarrollo de la planta. Éstos incluyen los fitosteroles, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos.

Los metabolitos secundarios son compuestos que se producen como resultado del metabolismo secundario de las plantas. Basándose en su origen biosintético, los metabolitos secundarios de las plantas se pueden dividir en tres grandes grupos: compuestos fenólicos, terpenoides y compuestos nitrogenados o alcaloides (Crozier *et al.*, 2006).

La presencia de compuestos fenólicos en las plantas depende de la especie vegetal, variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), condiciones edafoclimáticas del cultivo, así como de aspectos tecnológicos relacionados con el procesado y la conservación de los productos que los contienen (Raffo *et al.*, 2006; Toor & Savage, 2006; Shin *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011 y 2012; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Entre las funciones más importantes que se les atribuye a estos compuestos podemos destacar que parecen tener un papel clave en la protección de las plantas frente a herbívoros e infecciones microbianas, así como en el proceso de atracción de polinizadores (Kant *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios también son de interés debido a su uso como colorantes, fibras, gomas, aceites, ceras, aromatizantes, fármacos, etc. (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2009; He & Giusti, 2010; Boo *et al.*, 2012; Groussin & Antoniotti, 2012).

En los últimos años, diferentes líneas de investigación en el campo de la nutrición humana, han estudiado la importancia de estos compuestos y su efecto positivo a medio y largo plazo. Se ha demostrado su influencia positiva sobre algunos tipos de cáncer y enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares obstructivas y diabetes tipo 2 (Stoclet *et al.*, 2004; Smith-Warner *et al.*, 2006; Leifert & Abeywardena, 2008; Stan *et al.*, 2008; van Breda *et al.*, 2008; Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Cherniack, 2011; Flores *et al.*, 2012).

3.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos y sus fuentes

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos (Figura 3.8). Se han identificado más de 8.000 estructuras fenólicas que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Strack, 1997). Los hay simples, de bajo peso molecular con un único anillo aromático y complejos como los taninos y los derivados polifenólicos.

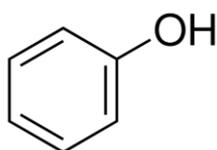


Figura 3.8. Estructura básica de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. Esta última, se debe a la reactividad del grupo fenol (Paredes-López *et al.*, 2010; Terpin *et al.*, 2012).

Dada la gran cantidad de compuestos fenólicos identificados, su clasificación es una tarea compleja. Una de las más utilizadas es la propuesta por Waterhouse (2002), que agrupa a los fenoles en función de su estructura química básica. La clasificación se muestra en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica

	Estructura	Clasificación
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoles Flavonas Flavan-3-oles Proantocianidinas (taninos no hidrolizables) Antocianidinas (Antocianos) Flavanonas Isoflavonas
No Flavonoides	C_6-C_3	Ácidos hidroxicinámicos
	C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzoicos
	(C_6-C_1) (C_6-C_3) } +Azúcar	Taninos hidrolizables
	$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos

Fuente: Elaborada a partir de Waterhouse, 2002

Siguiendo esta clasificación, distinguiremos los compuestos fenólicos en flavonoides y no flavonoides.

3.3.1.1. Flavonoides

Constituyen el grupo de compuestos fenólicos más importante por su gran variabilidad estructural y su presencia en la mayoría de alimentos de origen vegetal (Harborne & Williams, 2000). Los flavonoides se caracterizan por un sistema específico C_{15} ($C_6 - C_3 - C_6$) de tres anillos, dos de ellos aromáticos y un tercero, tipo pirano (Figura 3.9).

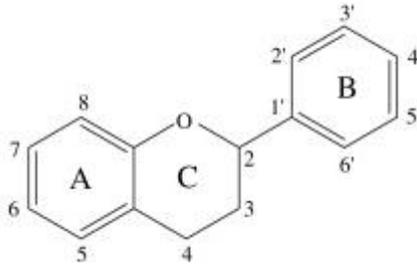


Figura 3.9. Estructura básica de los flavonoides

Están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y la piel de las frutas y tienen un papel importante como metabolitos secundarios. En las plantas están involucrados en procesos tan diversos como la protección UV, la pigmentación, la estimulación de los nódulos fijadores de nitrógeno y resistencia a enfermedades (Koes *et al.*, 1994; Cartea *et al.*, 2011).

Los flavonoides se subdividen principalmente en flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (Figura 3.10). Otros grupos de flavonoides, que cuantitativamente se encuentran en menor número en la dieta, son los dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas. La estructura básica de los flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo generalmente están presentes en las posiciones 4', 5 y 7 y los azúcares son muy comunes en la mayoría de los flavonoides, de forma general como glicósidos. Mientras que los azúcares y los grupos hidroxilo incrementan la solubilidad en agua de los flavonoides, los grupos metilo y las unidades de isopentilo confieren a los flavonoides un carácter lipofílico (Srinivas *et al.*, 2010; Biesaga, 2011).

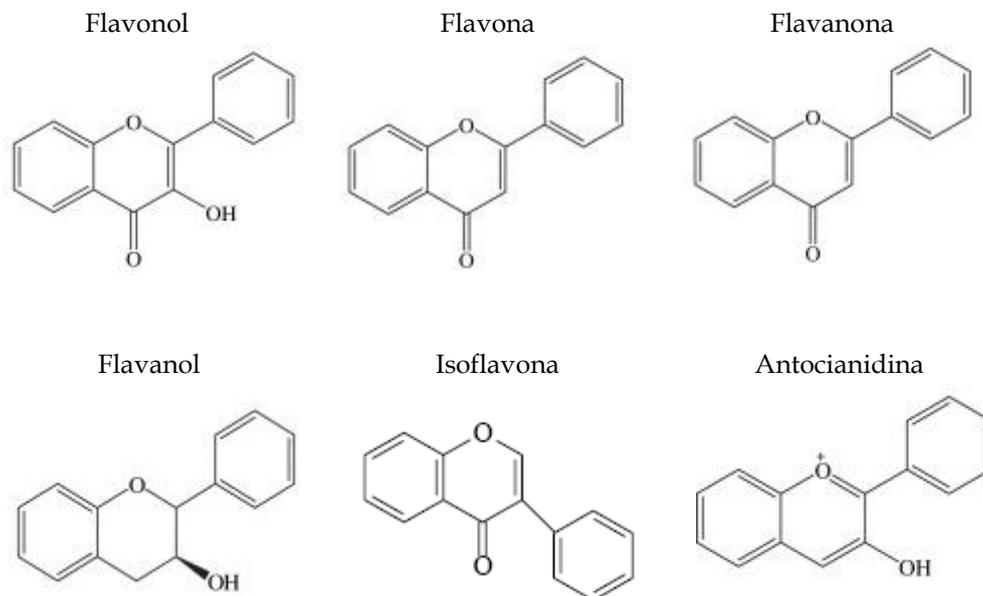


Figura 3.10. Estructuras genéricas de flavonoides mayoritarios

Se encuentran fundamentalmente en el té, vino tinto, frutas y hortalizas verdes (Cook & Samman, 1996; Trichopoulou & Critselis, 2004; Yao *et al.*, 2004; Bhagwat *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2007). Los frutos rojos son ricos en antocianos, los cítricos en flavanonas, la soja en isoflavonas, etc.

Los compuestos fenólicos más importantes en el nogal común (*Juglans regia* L.) son los flavonoides (Claudot *et al.*, 1993; Solar *et al.*, 2006; Cheniany *et al.*, 2012).

En el fruto del nogal, la mayor parte de los compuestos fenólicos se encuentran en la piel de color marrón que cubre la semilla (Anderson *et al.*, 2001; Carlsen *et al.*, 2011); sin la cual el contenido en antioxidantes de la nuez se reduciría en un 90% (Carlsen *et al.*, 2010).

3.3.1.1.1. Flavonoles

Los flavonoles son, posiblemente, el grupo más extendido de los flavonoides en el reino vegetal, donde se encuentran en prácticamente todas las plantas con excepción de hongos y algas.

La biosíntesis de los flavonoles es inducida por la luz solar, ya que son compuestos pantalla, que absorben parte de la radiación solar (360 nm) atenuando el efecto de los rayos ultravioleta en la planta (Bidel *et al.*, 2007); debido a esto, se suelen encontrar en los tejidos externos de muchas frutas y hortalizas (Harbone & Williams, 2000).

Desde el punto de vista químico se caracterizan por tener un grupo hidroxilo en la posición 3 del carbono C y, en la naturaleza se encuentran siempre glicosilados.

En frutas se encuentran alrededor de 50 flavonoles distintos, fundamentalmente los glicósidos de 4 agliconas: kaempferol, quercetina, miricetina e isoramnetina. La quercetina y el kaempferol son los flavonoles más ampliamente distribuidos, encontrándose en el 80% de las frutas (albaricoque, zarzamora, fresa, ciruela, higos, etc.) (de Vries *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2012; Pasini *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2013; Zouari *et al.*, 2013).

En nueces, sin embargo, no se han identificado flavonoles. Sí se han descrito en otras estructuras del nogal. Amaral *et al.* (2004), identificaron quercetina 3-galactósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-xilosido y quercetina 3-ramnósido en hojas.

Claudot *et al.* (1997) y El Euch *et al.* (1998), observaron la presencia de miricetina en brotes de nogal. Štampar *et al.* (2006), la identificaron en el pericarpio. La miricetina se considera uno de los principales marcadores fenólicos de rejuvenecimiento de los nogales (Jay-Allemand *et al.*, 1990).

3.3.1.1.2. Flavonas

Las flavonas tienen una relación estructural muy próxima a los flavonoles. Un amplio abanico de sustituciones puede ocurrir en las flavonas, incluyendo hidroxilación, *o*- y *c*-alquilación, y glicosilación. A pesar de que flavonas, como la luteolina y la apigenina, tengan sustituciones en los anillos A y C, tienen falta de oxigenación en el C₃.

Se encuentran ampliamente distribuidas en frutas y hortalizas, y son muy numerosas, se conocen más de 100, aunque no son los flavonoides mayoritarios. Las fuentes más importantes son el apio, el perejil y el pimiento verde (Justesen *et*

al., 1998; Barros *et al.*, 2012; Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012; Li & Xu, 2012), no encontrándose en el fruto del nogal.

3.3.1.1.3. Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles, también llamados en general catequinas, son el grupo de flavonoides más complejo, que van desde monómeros simples, (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, a proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, también conocidas como taninos condensados.

Estructuralmente poseen el anillo C totalmente saturado y, como su nombre indica, poseen un alcohol en posición 3. Debido a la saturación entre C₂ y C₃ existen estereoisómeros.

Los flavan-3-oles no se encuentran de forma mayoritaria en frutas aunque son en parte responsables de su astringencia. Las frutas con cantidades significativas de catequinas son: albaricoque, melocotón, manzana, cereza, mora y uva. Además de estas frutas, otras fuentes principales de catequinas son el té, el vino y el cacao (Auger *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009a).

Diferentes flavan-3-oles monoméricos, como son la catequina y la epicatequina, han sido identificados y cuantificados en nueces (Gu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006).

En el pericarpio también se han identificado los flavan-3-oles catequina y epicatequina (Štampar *et al.*, 2006).

3.3.1.1.4. Proantocianidinas

Las proantocianidinas o taninos condensados no hidrolizables son productos de condensación de flavan-3-oles, que se unen por medio de enlaces covalentes 4→8 y 4→6. Los dímeros más frecuentemente encontrados son las procianidinas B₁ (epicatequina-catequina), B₂ (epicatequina-epicatequina) y B₄ (catequina-epicatequina). También se han identificado trímeros, de los cuales el más frecuente es la procianidina C₁ (3 epicatequinas) (Passos *et al.*, 2007).

Las proantocianidinas tienen una distribución relativamente limitada, encontrándose principalmente en familias de *Leguminosae*, *Rosaceae* y *Vitaceae* (Aldred *et al.*, 2009).

Gu *et al.* (2004) y Wu *et al.* (2006), identificaron proantocianidinas oligoméricas y poliméricas en nueces.

3.3.1.1.5. Antocianidinas

Las antocianidinas son un grupo de flavonoides muy extendidos en el reino vegetal, principalmente en forma de sus derivados conjugados, antocianinas o antocianos que se encuentran en frutas y tejidos de las flores en los que son responsables de los colores rojo, azul y morado. Así, son de vital importancia para establecer la calidad y aceptabilidad de muchas frutas (Iglesias *et al.*, 2008). Además, también se encuentran en las hojas, tallos, semillas y tejidos de las raíces. Están involucrados en la protección de las plantas frente a un exceso de luz y juegan también un papel importante atrayendo a insectos polinizadores (Grotewold, 2006).

El color de los antocianos viene determinado por el número de grupos hidroxilo y su grado de metilación, la naturaleza y el número de azúcares unidos a la molécula así como su posición, la naturaleza y número de ácidos alifáticos y aromáticos unidos al azúcar, y el medio físico-químico en el que se encuentran (Mazza & Brouillard, 1987; Brouillard & Dangler, 1994; Lewis *et al.*, 1995; Berké & de Freitas, 2005).

Desde el punto de vista estructural los antocianos son flavonoides con el anillo C totalmente insaturado, lo que crea una carga positiva deslocalizada a lo largo de toda la estructura resonante. Las distintas sustituciones en las posiciones 3' y 5' del anillo B dan lugar a las diferentes antocianidinas.

Se han descrito 200 antocianinas hasta la actualidad, de las cuales sólo 70 se encuentran en frutos (Pennington & Fisher, 2010), constituidas por 15 antocianidinas. Las antocianinas más ampliamente distribuidas por la naturaleza son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina.

No existen estudios que indiquen la presencia de antocianidinas en ninguna de las estructuras del nogal.

3.3.1.1.6. Flavanonas

Las flavanonas son flavonas sin la insaturación entre C₂ y C₃ y la presencia de un centro quiral en el C₂. En la mayoría de las flavanonas, el anillo C se une al

anillo B en el C₂ en configuración α . La estructura de las flavanonas es muy reactiva y se ha demostrado que se someten a hidroxilación, glicosilación y *o*-metilación (Wahle *et al.*, 2010).

Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, destacando su presencia en altas concentraciones en frutas cítricas, tales como pomelo, limón y mandarina (Tomás-Barberán & Clifford, 2000). La flavanona glicosilada más común es la hesperetina-7-*o*-rutinosido (hesperidín) que se encuentra en la piel de los cítricos (Roowi & Crozier, 2011).

No existen estudios que indiquen la presencia de flavanonas en ninguna de las estructuras del nogal.

3.3.1.1.7. Isoflavonas

Las isoflavonas se caracterizan por tener el anillo B unido al C₃ en lugar de en el C₂. Se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas, destacando sus altas concentraciones en la soja (USDA, Agricultural Research Service, 2002).

Las isoflavonas son sustancias diferentes a los esteroides endógenos humanos con capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. Las isoflavonas más importantes son la genisteína y daidzeína procedentes de la soja, cuya influencia sobre la aparición de cánceres de próstata y mama ha sido objeto de numerosos estudios (Davis *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009).

No existen estudios que indiquen la presencia de isoflavonas en ninguna de las estructuras del nogal.

3.3.1.2. No Flavonoides

Forman un extenso grupo dentro de los polifenoles, poseen generalmente una estructura química más sencilla que la de los flavonoides. Los principales no flavonoides presentes en la dieta son los ácidos fenólicos C₆ - C₁, sobre todo el ácido gálico, precursor de los taninos hidrolizables, los ácidos hidroxicinámicos C₆ - C₃ y sus derivados conjugados, y los estilbenos C₆ - C₂ - C₆.

3.3.1.2.1. Ácidos hidroxibenzoicos

También conocidos como ácidos fenólicos, poseen una estructura C₆-C₁ derivada del ácido benzoico propiamente dicho (Figura 3.11). Hidroxilaciones y

metilaciones sobre éste dan lugar a los distintos ácidos hidroxibenzoicos. Los más frecuentemente encontrados en la naturaleza son los ácidos gálico, ρ -hidroxibenzoico, vanílico, siríngico y protocatéquico (Schäfers & Herrmann, 1982; Gonçalves *et al.*, 2012).

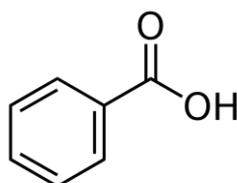


Figura 3.11. Estructura del ácido benzoico

Los ácidos gálico y elágico son constituyentes de los taninos hidrolizables, apareciendo en frutas y hortalizas como la fresa, frambuesa, zarzamora, grosella, granada o calabaza por hidrólisis de los anteriores (Pfundstein *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2011). El ρ -hidroxibenzoico y el vanílico se encuentran en numerosas frutas como la cereza, la uva, el melón o la fresa (Khallouki *et al.*, 2012). El siríngico se encuentra fundamentalmente en uva y, por último, el protocatéquico se encuentra en forma glucosilada en muchos frutos como grosella, zarzamora, frambuesa, fresa, etc. (Mattila & Hellström, 2007).

En el pericarpio de la nuez, junto a diferentes flavonoides, también se han identificado ácidos hidroxibenzoicos, como son los ácidos gálico, elágico, protocatéquico, vanílico y siríngico (Štampar *et al.*, 2006).

Por cromatografía líquida de alto rendimiento se han identificado en nueces ácidos fenólicos como son los ácidos clorogénico, cafeico, ρ -cumárico, ferúlico, 4-hidroxibenzoico, protocatéquico, 2,4 dihidroxibenzoico, vanílico, elágico, sinápico y siríngico (Colaric *et al.*, 2005; Christopoulos & Tsantili, 2012).

3.3.1.2.2. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son complejos polifenólicos que pueden ser degradados al ser sometidos a condiciones de hidrólisis (ácidas, básicas o enzimáticas) dando lugar a ácidos fenólicos y azúcares principalmente.

Normalmente son poliésteres de ácido gálico y/o ácido hexahidroxidifénico y sus derivados esterificados con D-glucosa (Okuda *et al.*, 2000; Landete, 2011).

Dependiendo de los productos de hidrólisis diferenciamos entre:

- **Galotaninos:** su hidrólisis libera ácido gálico (Figura 3.12).
- **Elagitaninos:** su hidrólisis libera ácido elágico procedente de la lactonización del ácido hexahidroxidifénico (Figura 3.12).

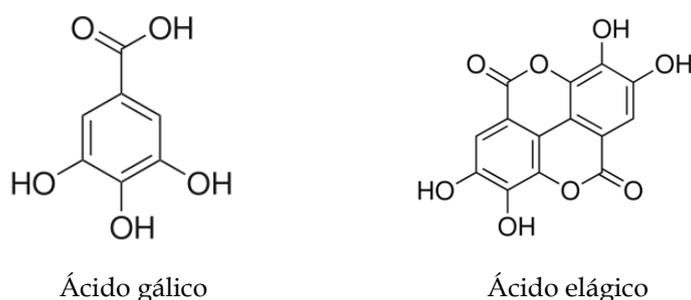


Figura 3.12. Estructuras de los ácidos gálico y elágico

Recientes estudios sobre las semillas de las nueces muestran que éstas contienen principalmente taninos hidrolizables (Fukuda *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2007; Christopoulos & Tsantili, 2012), la mayoría de los cuales se ha demostrado que contribuyen a la actividad antioxidante total del extracto de nuez en diferentes modelos de estimación de antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (Fukuda *et al.*, 2003 y 2004; Li *et al.*, 2006a; Ito *et al.*, 2007).

Anderson *et al.* (2001) también identificaron taninos hidrolizables en extractos de nueces y observaron que inhiben la oxidación de LDL en plasma *in vitro*.

3.3.1.2.3. Ácidos hidroxicinámicos

Son muy abundantes y diversos, y todos provienen del ácido cinámico (Figura 3.13). Básicamente son cuatro: ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Las cumarinas son ácidos hidroxicinámicos ciclados, pero no se incluyen dentro de este grupo.

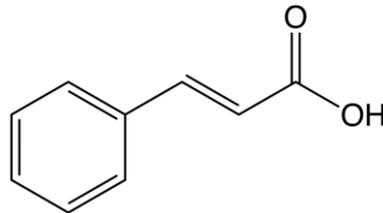


Figura 3.13. Estructura del ácido cinámico

El ácido *p*-cumárico es muy abundante en cítricos, frambuesa y piña; el cafeico y sus derivados son los más abundantes de todos, y se encuentran principalmente en lechuga, alcachofa, manzana y ciruelas; el ferúlico en cítricos y uva; y, por último, el sinápico, se ha encontrado en el brócoli, en algún cítrico, piña y tomate, aunque en forma muy minoritaria (Peleg *et al.*, 1991; Morishita & Ohnishi, 2001; Sato *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Los ácidos hidroxicinámicos no se suelen encontrar en forma libre, sino que se combinan principalmente de dos maneras formando derivados solubles.

- Combinaciones de grupos carboxilos de los ácidos fenólicos con grupos hidroxilos de compuestos orgánicos (ácido quínico, glucosa, etc.) formando ésteres, como por ejemplo el ácido clorogénico que se encuentra en muchas frutas y hortalizas, destacando la lechuga y la alcachofa (Schuster & Herrmann, 1985).
- Combinaciones donde se ven involucrados los grupos fenólicos de la molécula con otras moléculas distintas a las descritas anteriormente dando lugar a hidroxicinámicos conjugados, como por ejemplo el ácido *p*-cumárico-*o*-glucósido descrito en tomate (Fleuriet & Macheix, 1985).

En las hojas de nogal se han identificado diferentes ácidos hidroxicinámicos, como son los ácidos 3-cafeoilquínico, 3-*p*-cumaroilquinico y 4-*p*-cumaroilquinico (Amaral *et al.*, 2004), así como el ácido clorogénico, que fue identificado por Wichtl y Anton (1999).

En el pericarpio se han identificado los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y sinápico (Štampar *et al.*, 2006).

Colaric *et al.* (2005) y Gómez-Caravaca *et al.* (2008), han descrito la presencia de ácido clorogénico en el fruto del nogal.

3.3.1.2.4. Estilbenos

Los estilbenos son moléculas ampliamente distribuidas en las plantas superiores, si bien, sus fuentes en la dieta son muy limitadas, restringiéndose básicamente a las uvas, el vino tinto y los cacahuets (Burns *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009). Los estilbenos más representativos son el resveratrol y su glucósido piceido, el piceatanol, así como dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las viniferinas.

Los estilbenos son fitoalexinas, es decir, metabolitos secundarios cuya concentración en la planta es normalmente baja, que la planta sintetiza expresamente para hacer frente a agresiones externas o situaciones de estrés, como son los ataques de hongos, bacterias y virus patógenos (Albert *et al.*, 2011).

No existen estudios que indiquen la presencia de estilbenos en ninguna de las estructuras del nogal.

Aparte de los compuestos fenólicos ya descritos, en el nogal común (*Juglans regia* L.) también se encuentran cantidades importantes de naftoquinonas (C₆-C₄) (Claudot *et al.*, 1993; Solar *et al.*, 2006; Cheniany *et al.*, 2012).

Entre las naftoquinonas, la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) es de gran interés debido a su reactividad química; se sabe que se somete a reacciones de óxido-reducción con la formación concomitante de radicales libres (Duroux *et al.*, 1998; Saling *et al.*, 2011). Diferentes estudios han observado su presencia en hojas (Girzu *et al.*, 1998; Amaral *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2012), en el pericarpio (Lee & Campbell, 1969; Borazjani *et al.*, 1985; Binder *et al.*, 1989; Mahoney *et al.*, 2000; Mahoney & Molyneux, 2004; Štampar *et al.*, 2006; Solar *et al.*, 2012) y también en la corteza de la raíz interior de las nueces (Hedin *et al.*, 1979; Bolling *et al.*, 2011).

La juglona está involucrada en el mecanismo de defensa frente a patógenos del nogal (Radix *et al.*, 1998; Mahoney *et al.*, 2000; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011).

Destacar que, más allá de los compuestos fenólicos de las nueces descritos en la presente memoria, se han realizado pocas investigaciones sobre la naturaleza de éstos y sobre su contribución a la actividad antioxidante total (Zhang *et al.*, 2009).

3.3.2. Biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos

En la actualidad se sigue tratando de demostrar los numerosos efectos beneficiosos que sobre la salud se han atribuido a estos compuestos, pero para determinar inequívocamente su actividad biológica es fundamental ahondar en el conocimiento de su biodisponibilidad y metabolismo (Kroon *et al.*, 2004).

La biodisponibilidad es la cantidad de una sustancia que tras su ingesta, es absorbida y alcanza la circulación sistémica, momento en el cual puede distribuirse, y alcanzar los tejidos diana donde ejerce su efecto fisiológico (Parada & Aguilera, 2007). Desde el punto de vista de la nutrición, la biodisponibilidad se expresa como la proporción de dosis ingerida que es excretada en orina, comparada con la excretada en heces (Rechner *et al.*, 2002).

Conocer la biodisponibilidad de un compuesto es fundamental para saber cuál va a ser el efecto que puede producir en el organismo, así como para determinar la cantidad necesaria para poder establecer los límites mínimos y máximos entre los que el compuesto puede tener efecto. Por tanto, va a ser esencial establecer el grado de biodisponibilidad de los compuestos para poder conocer su potencial efecto sobre el organismo.

Determinar la biodisponibilidad de un compuesto no es sencillo. El problema que surge a la hora de caracterizar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es la dificultad que existe para determinar con exactitud la cantidad y tipo de fenoles que se ingieren en la dieta (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Fraga *et al.*, 2010), ya que su gran diversidad estructural así como la influencia de los factores genéticos, agronómicos, de procesado y de almacenamiento de los alimentos pueden hacer variar enormemente el contenido fenólico, dificultando su seguimiento (Stahl *et al.*, 2002).

También cabe destacar los efectos de la matriz de los alimentos sobre la biodisponibilidad de los polifenoles. Pueden darse interacciones directas entre los

polifenoles y algunos componentes de los alimentos, como proteínas, polisacáridos y fibra, que podrían afectar al proceso de absorción de estos compuestos (Goldberg *et al.*, 2003).

Los estudios de biodisponibilidad de los fitoquímicos realizados en animales o seres humanos son complejos, costosos y largos. En este sentido, los modelos de digestión *in vitro* permiten la caracterización de los compuestos fenólicos durante la digestión en condiciones fisiológicas, causada por las enzimas digestivas, y obtener información que va más allá de la adquirida por el análisis químico de los alimentos. Así, los modelos de digestión *in vitro* pueden proporcionar datos sobre la biodisponibilidad relativa de los componentes polifenólicos.

Habida cuenta de la importancia que presenta la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios tanto en animales (Yu *et al.*, 2005; Bhatia *et al.*, 2006; Espín *et al.*, 2007; Ratnam *et al.*, 2009; González-Barrio *et al.*, 2011) como en humanos (Cerdá *et al.*, 2005a y b; Kountouri *et al.*, 2007; Saura-Calixto *et al.*, 2007) con dietas suplementadas en nueces. Estos estudios, centrados básicamente en la cuantificación de ácido elágico y sus metabolitos, han demostrado que los principales fenoles de las nueces son poco biodisponibles, alcanzando la máxima concentración en plasma alrededor de 1-2 h tras la ingesta.

Los estudios en los que se ha simulado una digestión *in vitro* han demostrado, en general, que los elagitaninos son bastante estables en las condiciones fisiológicas del estómago. Las condiciones ácidas (HCl, pH 1,8 a 2,0) y las enzimas del estómago no hidrolizan los elagitaninos originales liberando ácido elágico libre, y no se ha observado la degradación de los elagitaninos (Tomás-Barberán *et al.*, 2009a). El estómago parece ser el primer lugar importante para la absorción de ácido elágico libre, pero los elagitaninos no son absorbidos. En las condiciones fisiológicas del intestino delgado, sin embargo, hay una liberación de ácido elágico libre a partir de los elagitaninos. Esta hidrólisis parece ser debida a las condiciones de pH (pH neutro a ligeramente alcalino, 7,0-7,3), y no al efecto de las enzimas pancreáticas y las sales biliares (Larrosa *et al.*, 2006).

3.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS NUECES

Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior, con capacidad de existencia independiente y con propiedades paramagnéticas, lo que le confiere una alta e indiscriminada radiactividad (Halliwell *et al.*, 1995; Kehrler *et al.*, 2010).

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son especies químicas radicales y no radicales que debido a su inestabilidad se comportan como agentes oxidantes.

Pequeñas cantidades de ROS son necesarias para ciertos procesos fisiológicos, como el sistema de señales intracelulares y la inmunidad (Eblin *et al.*, 2008; Langsdorf *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando existe un exceso de radicales libres estos pueden atacar lípidos (tanto ácidos grasos poliinsaturados de membrana como colesterol), proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), ciertos tipos de hidratos de carbono, como interleukinas o neurotransmisores, dando lugar a reacciones en cadena, en las que se generan nuevos radicales libres y toda una serie de nuevos compuestos, como carbonilos, aldehídos, etc.

Las ROS pueden tener en nuestro organismo un origen endógeno, relacionado con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico (Victor *et al.*, 2004; Raedschelders *et al.*, 2012). También pueden provenir de fuentes externas: el tabaco, la contaminación del aire, la radiación ultravioleta y la de alta energía, el ozono o ciertos medicamentos (Singh *et al.*, 2007; Poljšak *et al.*, 2011).

El daño o estrés oxidativo se define como un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, se da una situación en la que aumenta la velocidad de generación de ROS y una disminución en los mecanismos de defensa. En esta situación de estrés oxidativo se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos, ADN y componentes de la matriz celular, desencadenando un daño irreversible que puede llevar incluso a la muerte celular. Por ello, este fenómeno se relaciona con el origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la oxidación de las LDL y la enfermedad cardiovascular (Berliner & Heinecke, 1996; Yoshimoto *et al.*, 2002); el daño oxidativo al ADN y el cáncer (Valko *et al.*, 2006; Eiberger *et al.*, 2008;

Saad *et al.*, 2009; Ziech *et al.*, 2010); la oxidación de las proteínas de las lentes oculares y la alteración de la visión (Taylor & Hobbs, 2001; Davies, 2005).

Un antioxidante puede ser definido como una sustancia que, cuando se encuentra a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, previene o retrasa que un prooxidante oxide el sustrato (Halliwell & Gutterige, 1985). El interés por estos compuestos ha hecho que, entre los años 2000 y 2011, el número de publicaciones sobre antioxidantes y estrés oxidativo haya pasado de 2573 a 10111 (Thomson Reuters, 2012).

El organismo posee defensas antioxidantes entre las que encontramos ciertas enzimas, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa, que neutralizan estas especies reactivas. Los sistemas defensivos no enzimáticos abarcan una serie de compuestos antioxidantes como albúmina, ceruloplasmina, transferrina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las ROS producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares (Frei, 1994; Halliwell, 1996; McCall & Frei, 1999).

La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de enfermedades en cuyo origen puede encontrarse el daño oxidativo (Naves & Moreno, 1998; Le Core *et al.*, 2004; Dani *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2008).

La estructura química de los compuestos fenólicos es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (Rice-Evans *et al.*, 1996; Montoro *et al.*, 2005).

Los mecanismos de acción y particularidades por los que los fenoles presentan actividad antioxidante son diversos. Cada fenol actuará por uno o más mecanismos, según sus propiedades características. La explicación química de estos mecanismos tan sólo se conoce para determinados grupos de fenoles. Algunos de los mecanismos que han sido dilucidados son los siguientes (Cadenas, 1997):

- Prevenir la iniciación de la cadena de reacciones de oxidación mediante combinación con los radicales iniciadores, tales como los radicales hidroxilo

(Aguiló *et al.*, 2012; Riccioni *et al.*, 2012; Sowmya & Sachindra, 2012; Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2013). Los ácidos y alcoholes fenólicos como el ácido cafeico o el hidroxitirosol presentan esta capacidad.

- Descomponer peróxidos al convertirlos en especies no radicales, tales como alcoholes (Popović *et al.*, 2012; Xu & Chang, 2012). Los ejemplos antes mencionados podrían también incluirse en este mecanismo.

- Actuar como secuestradores de radicales libres. Cada uno de los fenoles tienen distinta especificidad por las distintas especies oxidantes que se generan en el organismo.

- De forma indirecta, actuar como agentes quelantes de iones de metales de transición, ya que al unirse a ellos reducen la capacidad de éstos para generar radicales libres, mediante reacciones de Fenton (Razali *et al.*, 2008; Gülçin *et al.*, 2010). Se han encontrado flavonoides con este tipo de actividad.

- Por su solubilidad pueden localizarse sobre las superficies de estructuras celulares, biomoléculas, etc., disminuyendo el consumo de antioxidantes propios de éstas, como pueden ser la vitamina E o los carotenoides, e incluso en algunos casos regenerando estos antioxidantes, una vez oxidados (Trigui *et al.*, 2013).

- Por su capacidad de inducir, inhibir, activar o proteger determinadas enzimas en el organismo (Chiang *et al.*, 2006) o inducir la síntesis de proteínas antioxidantes (Chung *et al.*, 2006). En este sentido, los distintos fenoles muestran alta especificidad, por ejemplo el hidroxitirosol, la oleuropeina, la luteolina y la apigenina inhiben la formación inductores de la agregación plaquetaria mediante la reducción del enzima 5-lipooxigenasa y la araquidonatodeshidrogenasa (Petroni *et al.*, 1995; Parr & Bolwell, 2000; Nijveldt *et al.*, 2001).

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura (Heim *et al.*, 2002; Haenen *et al.*, 2006). De manera general, se puede señalar que la presencia de sustituyentes hidroxilo aumenta la capacidad antioxidante.

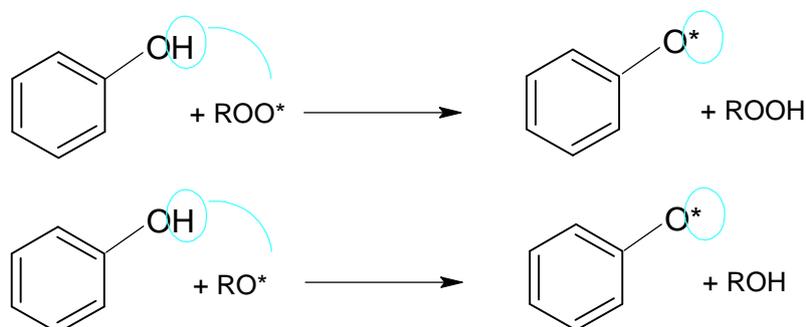


Figura 3.14. Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos con grupos OH y presencia de grupos carbonilos no unidos directamente al anillo bencénico, denominados ácidos de la serie cinámica, como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sinápico y el ácido ρ -cumárico, son más activos que los derivados hidroxilo del ácido benzoico, como el ρ -hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido siríngico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Nenadis *et al.*, 2003; Vafiadis & Bakalbassis, 2003; Chen *et al.*, 2012).

El medio en el que actúan los antioxidantes puede modular su acción; así, se ha observado en ensayos en liposomas que los ácidos dihidroxifenólicos son más antioxidantes que los trihidroxifenólicos, al contrario de lo que ocurre en medio acuoso, debido a sus mayores coeficientes de partición. De la misma forma, en este medio parece ser que el sustituyente del anillo fenólico tiene una importancia menor que en el medio acuoso (Siquet *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010).

A su vez, se debe considerar que estructuras polifenólicas que presentan una mayor actividad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tendrán *in vivo*; así, un reciente estudio demostró que ciertos polifenoles metilados, que *in vitro* presentan una actividad antioxidante muy inferior a la de sus formas no metiladas, mostraban después una mayor capacidad para proteger a cultivos celulares de la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno (Deng *et al.*, 2006). De la misma manera, los compuestos fenólicos más abundantes en los alimentos no son necesariamente los más absorbidos; el ácido gálico, por ejemplo, presente en general en concentraciones mucho más bajas que otros polifenoles, es uno de los que presenta mayores tasas de absorción (Lu *et al.*, 2010).

El alto contenido en compuestos fenólicos de las nueces les otorga, junto a otras propiedades, un alto poder antioxidante (Middleton, 1998; Alasalvar & Shahidi, 2009; Abbasi *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011).

Algunas investigaciones recientes han determinado, a través de distintas metodologías, la actividad antioxidante de diferentes frutos secos, como almendras, nueces de Brasil, avellanas, nueces de macadamia, cacahuets, pecanas, piñones, pistachos y nueces (Lou *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006a; Pellegrini *et al.*, 2006; Chen & Blumberg, 2008; Karamac, 2009; Bolling *et al.*, 2010a; John & Shahidi, 2010; Tomaino *et al.*, 2010; Chandrasekara & Shahidi, 2011; Dinis *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012).

Estos estudios concluyeron que el nogal (*Juglans regia* L.) presenta una mayor actividad antioxidante que cualquier otro fruto seco y que puede ser debida a la presencia de compuestos fenólicos (Fukuda *et al.*, 2003), en especial taninos hidrolizables (Anderson *et al.*, 2001), tocoferoles (Kornsteiner *et al.*, 2006) y, de acuerdo con algunos trabajos recientes, también a la presencia de melatonina, una indolamina que exhibe alta capacidad antioxidante (Reiter *et al.*, 2005; Bonnefont-Rousselot & Collin, 2010).

Una vez conocida esta mayor actividad antioxidante de las nueces respecto a otros frutos, han sido numerosos los trabajos que han estudiado esta propiedad en extractos de diferentes partes de la planta, como son los brotes, las hojas, el pericarpio, la piel de la semilla, o la semilla en su totalidad (Pereira *et al.*, 2007 y 2008; Almeida *et al.*, 2008; Labuckas *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008a; Zhang *et al.*, 2009; Abbasi *et al.*, 2010; Rahimipannah *et al.*, 2010; Abu Taha & Al-wadaan, 2011; Nabavi *et al.*, 2011; Negi *et al.*, 2011; Christopoulos & Tsantili, 2012).

Por otro lado, es conocido que las nueces son ricas en lípidos. Sin embargo, es interesante observar como los frutos secos (nueces, almendras, pistachos, avellanas, nueces de Brasil, piñones, etc.) tienen una vida útil relativamente larga, a pesar de que contienen importantes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, que son muy susceptibles a la oxidación (Simopoulos, 2002a; Assimopoulou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Algunos frutos secos son ricos en vitamina E, que actúa como protector de las grasas y aceites frente a la oxidación; sin embargo, las nueces presentan niveles más bajos de vitamina E que otros frutos secos, como almendras, avellanas y piñones (Yang, 2009; Bolling *et al.*,

2011). Esto sugiere la presencia de otras sustancias antioxidantes que protegen las grasas y aceites presentes en las nueces frente a la oxidación.

Por otro lado, dado que los frutos secos tienen un perfil de ácidos grasos saludable, existe un creciente interés en la evaluación de su papel como parte de una dieta cardiosaludable. En este sentido, Kris-Etherton *et al.* (1999), observaron una disminución significativa en los niveles de colesterol LDL mediante la sustitución de los ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados en la dieta. Esta disminución era mayor cuando la sustitución de la grasa se llevaba a cabo mediante el consumo de frutos secos (nueces, avellanas, nueces de macadamia y almendras), lo que confirmaba los efectos saludables de otros compuestos adicionales, tales como fitoesteroles y fitoquímicos. Desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha evaluado el efecto hipocolesterolemiante y el carácter protector frente al estrés oxidativo de los frutos secos (Chisholm *et al.*, 2005; Kocyigit *et al.*, 2006; Kris-Etherton *et al.*, 2008; Djoussé *et al.*, 2010; López-Uriarte *et al.*, 2010; Sari *et al.*, 2010; Casas-Agustench *et al.*, 2011a, b y c; Franzini *et al.*, 2012).

3.5. ÁCIDOS GRASOS DE LAS NUECES

Los ácidos grasos (AG) son moléculas orgánicas constituidas por una cadena alquílica con un grupo carboxílico terminal. En el organismo humano se encuentran formando parte de la estructura básica de triglicéridos (TAG), fosfolípidos (PL) y ésteres de colesterol (ECh), hallándose en menor grado en forma de ácidos grasos libres (AGL) (Snider *et al.*, 2010).

Debido a que el organismo humano no puede sintetizar de forma endógena todos los AG, cabe distinguir entre ácidos grasos no esenciales y ácidos grasos esenciales (AGE).

Estos últimos, que deben ser aportados a través de la dieta, son el ácido linoleico (18:2 n-6; LA) y el ácido α -linolénico (18:3 n-3; ALA), precursores de las series metabólicas n-6 y n-3 respectivamente (Smit *et al.*, 2004; McNamara & Carlson, 2006).

Aunque la ingesta de grasa total está, sin duda relacionada con riesgos para la salud, hoy en día hay acuerdo general en que la cuestión más importante, en

cuanto a la salud se refiere, no es tanto la cantidad de grasa consumida, sino el tipo de grasa o de ácidos grasos que se consumen. De hecho, la composición de ácidos grasos puede influir en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la regulación de la presión arterial, el metabolismo de la glucosa, el metabolismo lipídico, la agregación plaquetaria, y la deformabilidad de los eritrocitos (Rivellese & Lilli, 2003; Leekumjorn *et al.*, 2009; Russo, 2009).

Las nueces contienen alrededor de un 60% de grasa (Prasad, 2003), pero ésta puede variar desde un 52 hasta un 70% dependiendo del cultivar, la localización y la tasa de riego (Dogan & Akgul, 2005; Martínez *et al.*, 2006). Los componentes principales de las nueces son los triglicéridos. Los ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos, esteroides, ésteres de esteroles, fosfolípidos y vitaminas están presentes en pequeñas cantidades. Los ácidos grasos principales encontrados en la nuez son oleico (15-25%), linoleico (15-25%) y linolénico (15-25%) (Prasad, 2003). También están presentes cantidades menores de otros ácidos grasos, como son los ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico y araquídico (Amaral *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008).

La grasa de las nueces es mayoritariamente insaturada, y los ácidos grasos insaturados se relacionan con efectos beneficiosos sobre los lípidos séricos. En comparación con la mayoría de frutos secos, que contienen principalmente AGMI, las nueces son muy ricas en AGPI de las series n-6 y n-3. Numerosos estudios epidemiológicos y clínicos afirman que los ácidos grasos omega-3 podrían tener un papel importante en la prevención de la enfermedad cardiovascular; y se sugiere que lo hacen a través de diferentes vías de acción, así, podrían actuar como antiarrítmicos, hipolipemiantes y antitrombóticos (Patel, 2005; Freemantle *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2008; Kris-Etherton *et al.*, 2008).

Durante los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios epidemiológicos con el propósito de evaluar el efecto de los frutos secos sobre la enfermedad cardiovascular (Djoussé *et al.*, 2009; Martínez-Lapiscina *et al.*, 2010; Martínez-González *et al.*, 2011). Éstos demostraron que con la inclusión de frutos secos en la dieta se obtenía un beneficio significativo en la protección frente a problemas cardiovasculares. También en estudios llevados a cabo específicamente con nueces, se ha encontrado que el consumo frecuente de cantidades moderadas de nueces modifica favorablemente el perfil lipídico y disminuye los niveles

séricos de colesterol total (Núñez *et al.*, 2004; López-Uriarte *et al.*, 2010; Damasceno *et al.*, 2011).

Las nueces son también ricas en fitosteroles (Lagarda *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2008; Marangoni & Poli, 2010), que, debido a su similitud estructural con el colesterol, inhiben su absorción intestinal reduciendo así el colesterol total en plasma y los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Ferdowsian & Barnard, 2009; Torabian *et al.*, 2009). Se han llevado a cabo estudios epidemiológicos y experimentales que sugieren que los fitosteroles consumidos a través de la dieta pueden ofrecer protección contra diferentes tipos de cáncer como el de colon, mama y cáncer de próstata (Awad *et al.*, 2003; Tapiero *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2006; Llaverias *et al.*, 2012).

Los datos presentes en las tablas de composición de alimentos en general, incluyen sólo los valores medios de la composición de la grasa, pero hay varios factores tales como la variedad, la procedencia geográfica, y las prácticas agrícolas que pueden afectar a los valores de composición (Anttonen & Karjalainen, 2005; Balta *et al.*, 2006; Tsantili *et al.*, 2010).

Aunque ha habido algunos datos publicados sobre la composición lipídica de las nueces que incluyen los valores medios (Zambon *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2001; Feldman, 2002; Tapsell *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006; Banel & Hu, 2009; West *et al.*, 2010), no hay mucha información sobre las variedades cultivadas en España.

3.6. INFLUENCIA DE LOS FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS EN LA COMPOSICIÓN DE LAS NUECES

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en los alimentos está influenciada por varios factores (Moretti *et al.*, 2010), tales como la luz, factores genéticos, condiciones ambientales y de almacenamiento, y varía mucho, incluso entre los cultivares de la misma especie (Bravo, 1998; Areias *et al.*, 2000; Downey *et al.*, 2006; Wahid *et al.*, 2007; Baccouri *et al.*, 2008; Lachman *et al.*, 2008; André *et al.*, 2009; Rastija *et al.*, 2009; Björkman *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Tulipani *et al.*, 2011).

Colaric *et al.* (2005), determinaron los niveles de nueve compuestos fenólicos en el fruto maduro del nogal y observaron diferencias en el contenido fenólico de

los 10 cultivares de nogal estudiados. La influencia de la variedad en el contenido fenólico también se ha confirmado en otros frutos, como por ejemplo, en manzanas (Veberič *et al.*, 2005), fresas (Olsson *et al.*, 2004; Pincemail *et al.*, 2012) y en árboles del género *Prunus* (Veberič & Štampar, 2005; Madrau *et al.*, 2009; Ihns *et al.*, 2011; Orazem *et al.*, 2011).

Por otro lado, en estudios anteriores se ha demostrado la influencia del grado de maduración en el contenido de fenoles; así, Štampar *et al.* (2006), han identificado y cuantificado compuestos fenólicos en las cáscaras de nueces verdes, Jay-Allemand *et al.* (2001), en las hojas jóvenes de la nuez y Solar *et al.* (2006), en los brotes anuales de nuez.

Se han llevado a cabo poco estudios sobre la influencia de los factores edafoclimáticos en nueces. Jakopič *et al.* (2007), evaluaron esta influencia sobre licores de nuez procedentes de las variedades Franquette y Elit en dos fechas diferentes; en éstos se detectaron 10 compuestos fenólicos (ácidos gálico, protocatéquico, elágico, clorogénico (5-caffeoylquinic), siríngico, ρ -cumárico y sinápico, así como (+)-catequina, 1,4-naftoquinona y juglona). Los contenidos de la mayoría de los compuestos fenólicos fueron más altos en el licor preparado a partir de Franquette en junio, que en el preparado con Elit en julio.

Amaral *et al.* (2008), identificaron 9 compuestos fenólicos (ácidos 3-cafeolínico, 3- ρ -cumarolínico y 4- ρ -cumarolínico, quercetin 3-galactósido, quercetin 3-arabinósido, quercetin 3-xilósido, quercetin 3-ramnósido, y derivados de quercetin 3-pentósido y kaempferol 3-pentósido) en las hojas de nogales cultivados a lo largo de tres años en dos localidades de Portugal. No encontraron diferencias significativas en el contenido fenólico de las hojas entre localidades, sí, por el contrario, observaron diferencias entre años; las hojas de nogal del año 2004, caracterizado por ser el menos lluvioso en Portugal desde 1931 (precipitaciones < 401 mm) y del año 2003, caracterizado por ser el año más caluroso en los últimos 70 años (coincidiendo con la ola de calor que asoló Europa), presentaron un menor contenido en compuestos fenólicos que las recogidas en 2002.

Ghasemi *et al.* (2011), estudiaron la influencia de los factores medio ambientales en la actividad antioxidante, el contenido en fenoles totales y en flavonoides en el pericarpio de nueces procedentes de 11 regiones de Irán. El

mayor contenido en fenoles totales y en flavonoides se dio en la región de Ab-ali, caracterizada por ser la región con mayor altitud (2465 m) y con la temperatura media diaria más baja (8,6 °C). En cuanto a la actividad antioxidante, los pericarpios de nuez procedentes de la región de Choghloni (1350 m de altitud y 16,8 °C de temperatura media diaria) presentaron la mayor actividad, mientras que la menor se dio en Iman reza park (250 m de altitud y 17,8 °C de temperatura media diaria).

Al igual que sucede en el perfil fenólico, la composición en ácidos grasos de los alimentos también se puede ver influenciada por diferentes factores, varietales, climáticos o geográficos (Temime *et al.*, 2008; Harrigan *et al.*, 2009; Anastasi *et al.*, 2010; Joët *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2011; Manai-Djebali *et al.*, 2012).

Existen pocos trabajos que expliquen la influencia de los factores edafoclimáticos o las diferencias varietales en el contenido graso de la nuez. En este sentido Dogan y Akgul (2005), encontraron variaciones en el contenido en grasa total en distintas variedades de nogal cultivadas en la región de Adilcevaz, al este de Anatolia, que oscilaban entre el 65 y el 70%. A su vez las variedades presentaban cantidades de ácidos oleico, linoleico y linolénico significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Martínez *et al.* (2006), también encontraron diferencias en los contenidos en ácido oleico y en ácido linolénico de nueces recolectadas en años distintos.

Sí existen trabajos en otros frutos secos. Debido a su contenido mayoritario en lípidos, son muchos los autores que han estudiado el efecto de los factores edafoclimáticos en dicho contenido o en su perfil lipídico. Así, Parcerisa *et al.* (1993), analizaron variedades de avellanas autóctonas españolas, como "Pauetet", "Gironell" y "Negret", y constataron que el origen geográfico y las condiciones climáticas pueden modificar el contenido de la fracción grasa; así, para la variedad "Negret" existían variaciones en el contenido graso de hasta un 8% en función de que su origen geográfico fuese Reus o Falset. La composición en ácidos grasos de avellanas ha sido estudiada por otros autores (Özdemir *et al.*, 2001; Balta *et al.*, 2006; Xu & Hanna, 2010), encontrando diferencias al evaluar diferentes años de cultivo, principalmente en el contenido en palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico.

También los pistachos han sido objeto de numerosas investigaciones al respecto. Satil *et al.* (2003), concluyeron que los pistachos que se cultivaban en regiones cálidas ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) tenían un menor contenido en ácidos grasos saturados, que los que crecían en regiones con temperaturas templadas ($\pm 22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Arena *et al.* (2007), encontraron diferencias en el contenido en ácidos grasos y fitoesteroles de variedades de pistachos cultivadas en diferentes orígenes geográficos (Italia, Turquía, Irán y Grecia). Seferoglu *et al.* (2006), Chahed *et al.* (2008) y Ballistreri *et al.* (2010), obtuvieron resultados similares a los descritos anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado frutos de 10 genotipos diferentes de nueces cultivados todos ellos, bajo las mismas prácticas agrícolas, en dos fincas experimentales del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) ubicadas en dos municipios de la Región de Murcia que presentan unas características de suelo similares y que soportan una distinta climatología.

Las nueces fueron recolectadas en octubre de 2008.

4.1.1. Descripción edafoclimática de las fincas

La finca El Chaparral se encuentra ubicada en el término municipal de Cehegín (Murcia), a una altitud de 432 m, latitud de 38° 6' 39,35" y longitud de 1° 40' 59,06".

El marco de plantación es de 6 x 8 m. El suelo presenta una textura franco-arcilloso según los criterios de clasificación de la USDA (USDA, 1999). Tras llevar a cabo un análisis de suelo en extracto de saturación, el terreno presentaba la siguiente granulometría: 34,38% de arena, 27,84% de limo y 37,78% de arcilla (ver Anexo 1).

La finca Torre Blanca se encuentra localizada en el término municipal de Torre Pacheco (Murcia), a una altitud de 31 m, latitud de 37° 46' 25,89" y longitud de 0° 53' 54,62".

El marco de plantación es de 6 x 8 m. El suelo presenta una textura franco-arcilloso según los criterios de clasificación de la USDA. Tras el análisis de suelo en extracto de saturación, el terreno presentaba la siguiente granulometría: 31,77% de arena, 32,53% de limo y 35,7% de arcilla (ver Anexo 2).

El clima del término municipal de Cehegín es un continental mediterráneo, teniendo como principales características la escasez de sus precipitaciones y la apreciable oscilación térmica anual. Pese a su cercanía al mar Mediterráneo (80 km en línea recta desde el punto del litoral más cercano) Cehegín disfruta de inviernos fríos y veranos muy calurosos.

Los datos meteorológicos recogidos en la finca El Chaparral desde el año 1993 por parte del Sistema de Información Agraria de Murcia (SIAM) y que permiten caracterizar el clima, indican que la plantación está sometida a una temperatura media anual de 15,38 °C, con máximas anuales que han alcanzado una media de 28,14 °C, 220 h anuales por debajo de 0 °C, una humedad relativa media de 61,53% y precipitaciones del orden de 344,07 mm/año. Para la recogida de estos datos la plantación dispone de un termo-higrómetro de la marca Vaisala, modelo B3210002 y un pluviómetro marca Thies-Clima, modelo 5.4031.30.006.

El clima del término municipal de Torre Pacheco se define como mediterráneo árido o subárido, de abrigo topográfico o estepario. Su posición cerca del mar suaviza las temperaturas. Las precipitaciones difícilmente superan los 300 mm anuales, encontrándonos ante una de las zonas más áridas del país, y cuando ocurren son de carácter torrencial. Los máximos pluviométricos se producen en otoño y primavera, siendo los meses más lluviosos octubre y abril. Durante los meses estivales las precipitaciones son muy escasas, que sumado a las altas temperaturas le confieren un marcado índice de aridez.

Los datos meteorológicos recogidos en la finca Torre Blanca desde el año 1997 por parte del SIAM indican que la plantación está sometida a una temperatura media anual de 17,05 °C, con máximas anuales que han alcanzado una media de 27,5 °C, 6,92 h anuales por debajo de 0 °C, una humedad relativa media de 76,35% y precipitaciones del orden de 271,07 mm/año. Para la recogida de estos datos la plantación dispone de un termo-higrómetro de la marca Vaisala, modelo HMP45AC y un pluviómetro marca Thies-Clima, modelo 5.4032.30.007.

Al comparar el clima en las dos fincas (Tabla 4.1), se ha observado que El Chaparral presenta un número de horas anuales por debajo de 0 °C significativamente superior ($p \leq 0,05$) al que se registra en la finca Torre Blanca, 220 h frente a 6,92 h. A su vez, también son significativas las diferencias apreciadas en cuanto a las precipitaciones, mayores en El Chaparral, y en cuanto a

la humedad relativa y la temperatura media, mayores, en este caso, en Torre Blanca. No existe, sin embargo, diferencia significativa en la temperatura máxima soportada en ambas fincas.

Tabla 4.1. Características climatológicas de las fincas El Chaparral y Torre Blanca

Valor estadístico	Fincas	
	El Chaparral	Torre Blanca
Horas por debajo de 0 °C	220,06 *	6,92
Humedad relativa (%)	61,53 *	76,35
Precipitaciones anuales (mm)	344,07 *	271,07
Temperatura media anual (°C)	15,38 *	17,05
Temperatura máxima alcanzada (°C)	28,14	27,57

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) entre las fincas

4.1.2. Muestras de nueces

Las muestras se obtuvieron de las siguientes variedades cultivadas en ambas fincas: Algaida, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama. En las Tablas 4.2 a 4.11 se recogen algunas de sus principales características.

Tabla 4.2. Características de la variedad Algaida

Variedad	Algaida	
Origen	Murcia (España)	
Parenterales	Polinización libre	
Tipo de floración	-	
Forma	Corta	
Color de semilla	Oscura	
Peso Total (g)	10,87 ± 0,61	
Peso cáscara (g)	6,62 ± 0,57	
Peso semilla (g)	4,13 ± 0,33	

Tabla 4.3. Características de la variedad Amigo

Variedad	Amigo	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Sharkey x Marchetti	
Tipo de floración	Protogino	
Forma	Corta	
Color de semilla	Oscura	
Peso Total (g)	12,22 ± 0,8	
Peso cáscara (g)	6,41 ± 0,34	
Peso semilla (g)	5,74 ± 0,62	

Tabla 4.4. Características de la variedad Chico

Variedad	Chico	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Sharkey x Marchetti	
Tipo de floración	Protogino	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	11,08 ± 1,23	
Peso cáscara (g)	6,19 ± 0,49	
Peso semilla (g)	6,64 ± 0,89	

Tabla 4.5. Características de la variedad Eureka

Variedad	Eureka	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Kaghazi (Irán)	
Tipo de floración	-	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	15,73 ± 1,24	
Peso cáscara (g)	8,75 ± 0,83	
Peso semilla (g)	7,53 ± 0,68	

Tabla 4.6. Características de la variedad Franquette

Variedad	Franquette	
Origen	Francia	
Parenterales	-	
Tipo de floración	Tardía	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	12,89 ± 2,28	
Peso cáscara (g)	7,66 ± 0,49	
Peso semilla (g)	5,26 ± 0,41	

Tabla 4.7. Características de la variedad Payne

Variedad	Payne	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	-	
Tipo de floración	-	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	13,54 ± 0,59	
Peso cáscara (g)	6,70 ± 0,52	
Peso semilla (g)	6,58 ± 0,49	

Tabla 4.8. Características de la variedad Pedro

Variedad	Pedro	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Conway-Mayette x Payne	
Tipo de floración	-	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	12,24 ± 1,74	
Peso cáscara (g)	5,44 ± 0,57	
Peso semilla (g)	6,58 ± 0,87	

Tabla 4.9. Características de la variedad Serr

Variedad	Serr	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Payne x PI 159-568	
Tipo de floración	Protandro	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	13,21 ± 0,88	
Peso cáscara (g)	7,26 ± 0,36	
Peso semilla (g)	6,43 ± 0,56	

Tabla 4.10. Características de la variedad Sunland

Variedad	Sunland	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Lompoc x PI 159568	
Tipo de floración	Ramas laterales	
Forma	Larga	
Color de semilla	Dorada	
Peso Total (g)	16,28 ± 1,26	
Peso cáscara (g)	7,15 ± 0,76	
Peso semilla (g)	9,18 ± 0,58	

Tabla 4.11. Características de la variedad Tehama

Variedad	Tehama	
Origen	California (EE.UU.)	
Parenterales	Waterloo x Payne	
Tipo de floración	-	
Forma	Larga	
Color de semilla	Clara	
Peso Total (g)	17,04 ± 1,57	
Peso cáscara (g)	8,73 ± 0,72	
Peso semilla (g)	7,84 ± 0,88	

Para cada variedad se recolectaron 2 kg de nueces en cada una de las fincas. Las nueces, libres de mesocarpio, se obtuvieron en su estado óptimo de madurez, descartándose aquéllas que presentaban defectos como grietas o síntomas visuales de contaminación microbiológica.

De cada lote, se seleccionaron 50 frutos al azar, se pelaron y las semillas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

4.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Los fenoles totales han sido medidos a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).

4.2.1. Fundamento

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos de ácidos fosfowolfrámico o fosfotungsténico ($\text{H}_3\text{HW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungsténico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunentiitto, 1985). La coloración azul producida se ve a una absorbancia máxima de 765nm.

4.2.2. Preparación de la muestra y reactivos

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 5 g de nueces en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 2 min con 20 ml de una disolución metanol + ácido fórmico al 3%. Los extractos se centrifugaron a 4000 g durante 10 min en una centrífuga Haraeus Biofuge stratos. El sobrenadante, extracto metanólico, se separó del precipitado y se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 4 y se recogió en frascos opacos. El precipitado fue sometido a un

nuevo proceso de extracción en idénticas condiciones, y su extracto metanólico se unió al obtenido tras la primera extracción.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó disolviendo 700 ml de agua destilada en 100 g de wolframato de sodio, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 25 g de molibdeno de sodio, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se añadieron 50 ml de ácido fosfórico al 85% ($r_{20} = 1,71$ g/ml) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado ($r_{20} = 1,19$ g/ml). Se llevó a ebullición, permaneció así durante 10 h y se añadieron a continuación 150 g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo, y se mantuvo en ebullición durante otros 15 min. Se dejó enfriar y se completó hasta 1 l con agua destilada.

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20%, pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, al cual se añadieron 15 ml de agua grado HPLC y se disolvió completamente utilizando ultrasonidos, finalmente se enrasó hasta 25 ml con agua.

Se realizó una recta de calibrado de la que se obtuvo la ecuación $y = 0,181x - 0,035$ ($r^2 = 0,994$). La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro, modelo Varian Cary 50 Bio.

4.2.3. Medidas analíticas

Las determinaciones se llevaron a cabo en el extracto metanólico de las muestras, utilizando para ello el espectrofotómetro.

A 1 ml del extracto metanólico de nuez se le adicionó 50 ml de agua destilada, 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 ml de solución carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se esperó 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 765 nm con relación a un blanco.

4.2.4. Cuantificación y expresión de resultados

Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por 100 g de nuez.

4.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se han llevado a cabo mediante HPLC. Se han identificado compuestos fenólicos cuyo contenido en nueces ha sido descrito en la literatura y algunos otros, como 6 flavan-3-oles, que han sido cuantificados en otros frutos secos (Harnly *et al.*, 2006) después de extracción directa (Anderson *et al.*, 2001).

4.3.1. Preparación de la muestra

Para la preparación de las muestras se homogeneizaron 3 g de nueces en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 1 min con 20 ml de una disolución MeOH:H₂O (80:20). Los extractos se centrifugaron a 5000 g durante 10 min en una centrífuga Haraeus Biofuge stratos. El metanol se evaporó y la fase acuosa se extrajo con hexano (1:1) y se filtró a través de un cartucho de extracción en fase sólida "Sep-Pak" (Millipore, EE.UU.). Los cartuchos fueron activados previamente con 10 ml de metanol (MeOH), 10 ml de agua desionizada y finalmente con 10 ml de aire. Después de eluir el volumen de la muestra, el cartucho se lavó con 10 ml de agua. El volumen remanente en el cartucho se eluyó con 2 ml de MeOH. La fracción metanólica se filtró a través de un filtro Millex-HV₁₃ 0,45 µm (Millipore, EE.UU.) y se analizó mediante HPLC-DAD (Cerdá *et al.*, 2005b; Salcedo *et al.*, 2010).

4.3.2. Medidas analíticas

El cromatógrafo utilizado fue el modelo HPLC Shimadzu LC-10AD con un detector diodo array SPD-M10A (Agilent Technologies España).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna en fase reserva C₁₈ Lichrospher RP-18 de 25 cm de longitud, 0,4 cm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 1 cm de longitud.

Se utilizaron dos disolventes como fases móviles: el disolvente A que consistía en agua con ácido fórmico al 1% (99:1, v/v) y el disolvente B, metanol al 100%.

La elución se realizó con una velocidad de flujo de 1 ml/min y un gradiente cuyas condiciones iniciales eran un 5% de B, que se incrementaba hasta un 15% de B a los 3 min, 20% de B a los 5 min, 25% de B a los 12 min, 30% de B a los 15 min, 40% de B a los 20 min, 45% de B a los 30 min, 50% de B en 40 min y alcanzaba un 70% de B a los 45 min, volviendo a las condiciones iniciales donde se mantuvieron 10 min para reacondicionar la columna entre análisis. El volumen de inyección fue de 20 μ l (Marks *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007).

Los espectros ultravioleta de los diferentes compuestos se registraron entre 240 y 400 nm. La detección se llevó a cabo a 280 y 320 nm.

4.3.3. Cuantificación y expresión de resultados

La identificación de los picos se confirmó comparando sus tiempos de retención con los de sus estándares puros. Se cuantificaron comparando el área del pico en los cromatogramas de las muestras con los de sus estándares (Figuras 4.1 y 4.2).

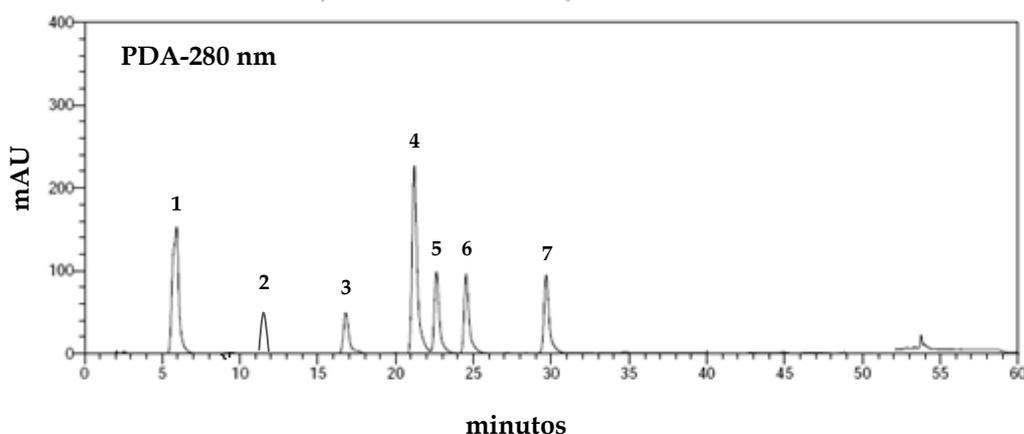


Figura 4.1. Cromatograma de mezcla de patrones de compuestos fenólicos identificados a 280 nm. (1) ácido gálico, (2) galocatequina, (3) catequina, (4) procianidina B₂, (5) epigallocatequina galato, (6) epicatequina y (7) epicatequina galato

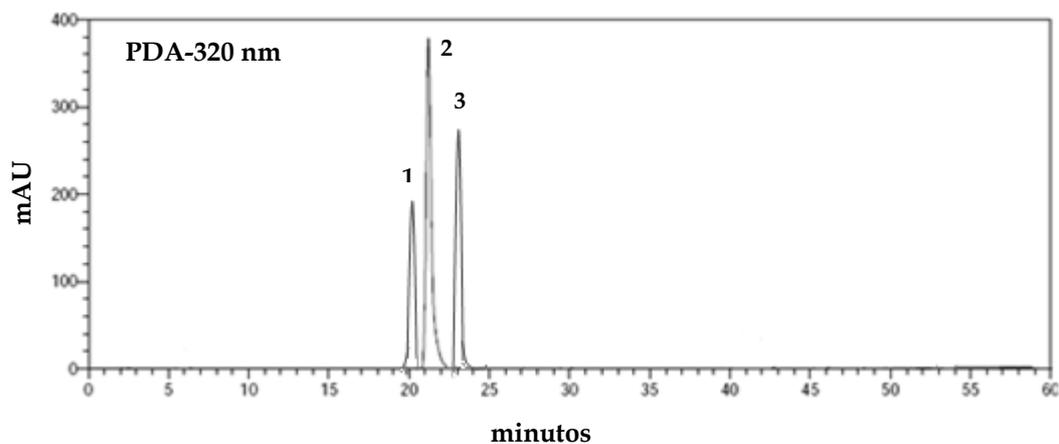


Figura 4.2. Cromatograma de mezcla de patrones de compuestos fenólicos identificados a 320 nm. (1) ácido siríntrico, (2) ácido clorogénico y (3) ácido ρ -cumárico

Para la cuantificación se elaboraron rectas de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos identificados de las que se obtuvieron las siguientes ecuaciones (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Ecuaciones de las rectas de calibrado para la cuantificación de compuestos fenólicos

Compuesto fenólico	Ecuación de la recta	r^2
Ácido gálico	$y = 0,4930x - 0,0031$	0,9999
Ácido clorogénico	$y = 5,9001x - 0,0559$	0,9999
Ácido siríntrico	$y = 3,9457x - 0,0182$	0,9995
Ácido ρ -cumárico	$y = 3,9974x + 0,0504$	0,9996
Catequina	$y = 4,9305x - 0,0305$	0,9999
Epicatequina	$y = 1,3511x - 0,0104$	0,9998
Epicatequina galato	$y = 3,6650x - 0,0211$	0,9998
Galocatequina	$y = 0,5395x - 0,0471$	0,9997
Epigalocatequina galato	$y = 2,7683x - 0,0225$	0,9998
Procianidina B ₂	$y = 0,4216x - 0,2262$	0,9998

El ácido gálico, galocatequina, catequina, procianidina B₂, epigalocatequina galato, epicatequina y epicatequina galato fueron cuantificados a 280 nm (longitud de onda a la cual presentan su absorbancia máxima), y el ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido siríngico a 320 nm (García-Alonso *et al.*, 2003).

Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C, expresando el resultado como valores medios \pm desviación estándar de mg o μ g de compuesto fenólico/100 g de nuez.

4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ELAGITANINOS

4.4.1. Fundamento

La detección y cuantificación de elagitaninos se basa en el hecho de que, cuando estos compuestos están expuestos a ácidos o bases, los enlaces éster son hidrolizados y el ácido hexahidroxidifenoico (HHDP) se transforma espontáneamente en un compuesto insoluble en agua, el ácido elágico (EA) (Clifford & Scalbert, 2000).

Con el fin de evaluar el contenido en elagitaninos de las nueces se procedió a una hidrólisis ácida, para cuantificar ácido elágico libre, que es el método más aceptado para la evaluación indirecta del contenido en elagitaninos (Häkkinen *et al.*, 2000).

El empleo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa para la identificación y cuantificación de ácido elágico (EA) está ampliamente descrita en la literatura (Dhingra & Davis, 1988; Amakura *et al.*, 2000; Bala *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2008).

4.4.2. Preparación de la muestra

La hidrólisis se llevó a cabo según el procedimiento de Häkkinen *et al.* (2000), modificado (Cerdá *et al.*, 2005b). Se homogeneizó 1 g de nueces con 5 ml de

ácido clorhídrico 2 M. La mezcla se puso en una estufa a 85 °C durante 20 h. A continuación, la solución se extrajo con 8 ml de éter.

Este proceso se repitió tres veces. La fase orgánica se llevó a sequedad y el residuo se re-disolvió en 1 ml de MeOH, y se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 µm (Millipore, EE.UU.). El filtrado se recogió en frascos de topacio y se analizó mediante HPLC-DAD.

4.4.3. Medidas analíticas

El cromatógrafo utilizado fue el modelo HPLC Shimadzu LC-10AD con un detector diodo array SPD-M10A (Agilent Technologies España).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna en fase reserva C₁₈ Lichrospher RP-18 de 25 cm de longitud, 0,4 cm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 1 cm de longitud.

Se utilizaron dos disolventes como fases móviles: el disolvente A que consistía en agua con ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) y el disolvente B, metanol al 100%.

La elución se realizó con una velocidad de flujo de 1 ml/min y un gradiente cuyas condiciones iniciales eran un 10% de B, que se incrementaba hasta un 40% de B en 15 min, alcanzaba un 95% de B a los 40 min, volviendo a las condiciones iniciales donde se mantuvieron 10 min para reacondicionar la columna entre análisis.

4.4.4. Cuantificación y expresión de resultados

La identificación de EA se llevó a cabo a través de comparaciones cromatográficas con un estándar puro de EA (Sigma, Madrid, España) (Figura 4.3).

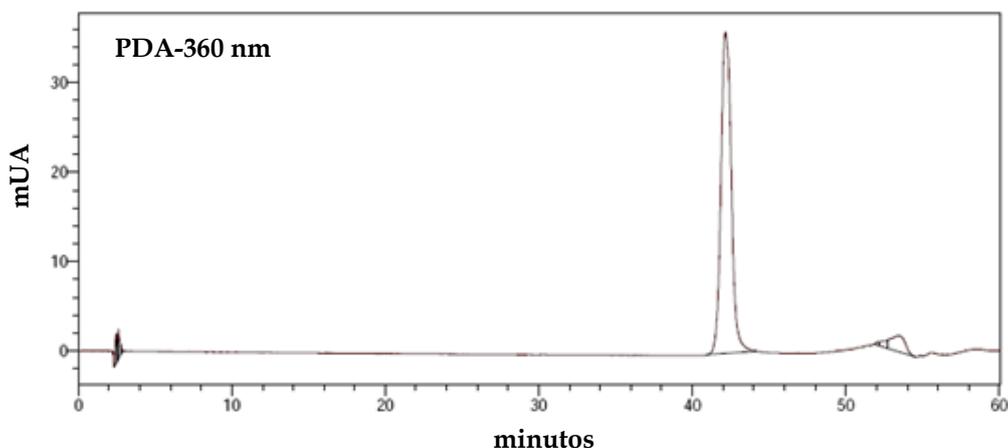


Figura 4.3. Cromatograma del patrón de ácido elágico identificado a 360 nm

Para ello se realizó una recta de calibrado de EA utilizando 8 concentraciones de dicho ácido comprendidas entre 0,625 y 100 mg/l, resultando la siguiente ecuación $y = 0,9571x - 0,0035$ ($r^2 = 0,999$).

Los elagitaninos se cuantificaron como EA libre a 360 nm después de la hidrólisis descrita anteriormente.

Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C, expresando el resultado como valores medios \pm desviación estándar de mg de EA/100 g de nuez.

4.5. MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para los objetivos planteados se emplearon 3 ensayos, dos ensayos enfocados a evaluar la capacidad de captar radicales libres por antioxidantes hidrosolubles (método del ABTS; Espín & Wichers, 2000) y liposolubles (método del DPPH; Cerdá *et al.*, 2004), y el método ORAC basado en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (Stockham *et al.*, 2011).

En los métodos detallados a continuación se realizaron rectas de calibrado con el reactivo Trolox (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), un derivado soluble de la vitamina E, por lo que la actividad antioxidante fue expresada como la Capacidad

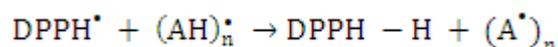
Antioxidante Equivalente de Trolox (ET) en micromolar (μM), siguiendo la nomenclatura Rice-Evans y Miller (1994). Los ensayos se repitieron tres veces.

4.5.1. Ensayo del DPPH

4.5.1.1. Fundamento

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \cdot) es un radical libre comercialmente disponible, insoluble en agua. Se suele utilizar para comprobar la capacidad antirradical de moléculas lipofílicas en medios no acuosos (Arnao *et al.*, 2001). El método del DPPH \cdot (disuelto en metanol), evalúa la capacidad de la molécula problema para reducir el radical libre de alta absorbancia a 515 nm, la cual disminuye paulatinamente al aparecer el radical reducido en el medio, de color amarillo y baja absorbancia a 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997).

La reacción puede ser resumida como:



El nuevo radical formado (A \cdot) puede seguir principalmente interaccionando radical-radical para originar moléculas estables A-A o DPPH-A aunque estas reacciones están muy dificultadas (Jaleel, 2008).

4.5.1.2. Preparación de la muestra y reactivos

La preparación de la muestra se llevó a cabo siguiendo la descrita por Pérez-Jiménez *et al.* (2008), con algunas modificaciones (Figura 4.4).

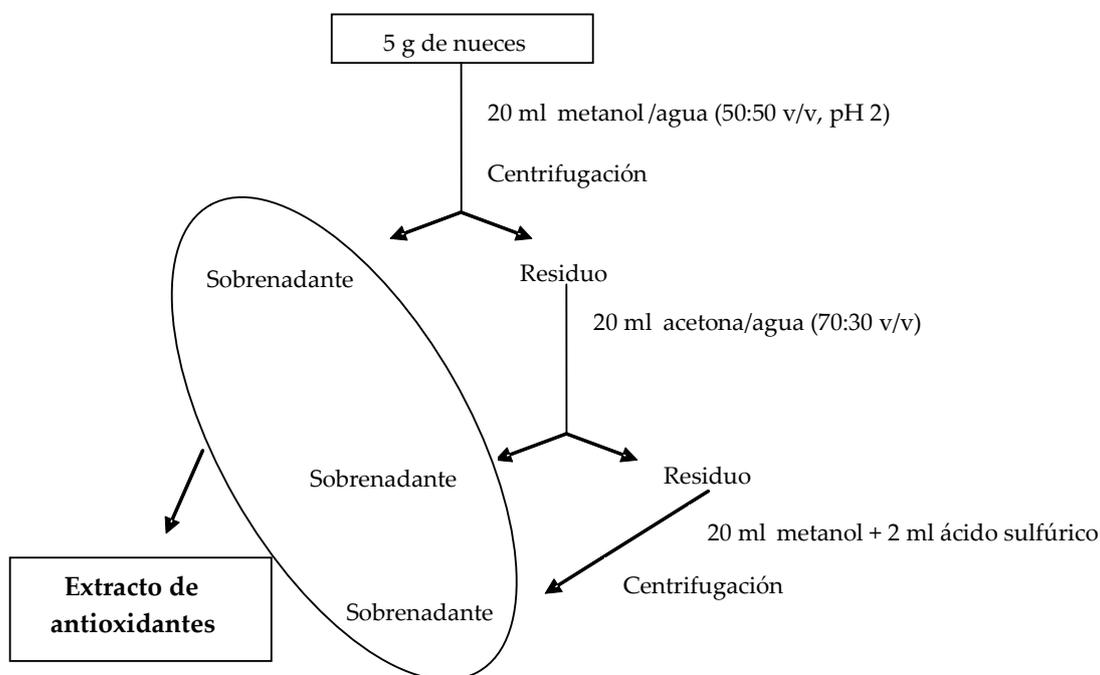


Figura 4.4. Esquema de la extracción del extracto de antioxidantes

La disolución stock de DPPH se preparó con 0,036 g del radical DPPH + 80 ml de metanol (Merck, Darmstadt, Germany); se agitó y se guardó a 4 °C, protegido de la luz. La disolución es estable en estas condiciones durante 3 días.

4.5.1.3. Medidas analíticas

Las determinaciones se llevaron a cabo en el extracto metanólico de las muestras, utilizando para ello un espectrofotómetro Shimadzu® UV-1700. La medida del blanco se realizó con 900 µl de metanol. Posteriormente, a este blanco se añadió 100 µl del radical DPPH*, y se realizó la primera lectura de absorbancia, absorbancia inicial (A_i). En este momento se adicionaron 20 µl de muestra y se observó la variación de absorbancia durante 60 min, realizando lecturas a intervalos de 1 min. El dato de absorbancia más bajo reflejado durante este periodo de tiempo es tomado como absorbancia final (A_f).

4.5.1.4. Cuantificación y expresión de resultados

La capacidad antioxidante de la muestra se expresa referida a la capacidad antioxidante del Trolox. Para ello se realizó una recta de calibrado, resultando la siguiente ecuación $y = 31,921x + 0,0002$ ($r^2 = 0,9937$). La absorbancia se leyó a 515 nm.

Sustituyendo en la ecuación el valor de absorbancia (y) se obtiene el valor de concentración de una disolución de Trolox (μM) a la que es equivalente la actividad antioxidante.

El análisis de la actividad antioxidante de las muestras de nueces se ha realizado por triplicado, y los resultados de la capacidad antioxidante se expresan como valores medios \pm desviación estándar de μM de Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez.

4.5.2. Ensayo del ABTS^{•+}

4.5.2.1. Fundamento

El método del ABTS^{•+} evalúa la capacidad de captar radicales libres de moléculas antioxidantes con distinta hidrofobicidad, en cualquier etapa del proceso oxidativo (Miller *et al.*, 1993; Re *et al.*, 1999; Espín *et al.*, 2000a y b; Villano *et al.*, 2004).

El radical ABTS^{•+} se genera a partir del precursor ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). El catión ABTS^{•+} tiene un color verde oscuro con un coeficiente de extinción molar de $31300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 414 nm. Existen diferentes formas de generar el radical. En el estudio se utilizó dióxido de manganeso activado (MnO_2), como se describe en Miller y Rice-Evans (1997) y en Espín y Wichers (2000).

4.5.2.2. Preparación de la muestra y reactivos

La preparación de las muestras de nueces se llevó a cabo a través del modo descrito para el método DPPH en el apartado 4.5.1.2.

Se preparó una disolución stock a partir de 55 mg de ABTS (Sigma, Madrid, España) en 10 ml de agua bidestilada. A continuación, a 1 ml de dicho stock se le

añadieron 8 ml de agua desionizada y 1 ml de tampón acetato 0,1 M pH 5, seguidamente MnO₂ (Sigma, Madrid, España) y se agitó. Esta disolución se filtró para eliminar el exceso de MnO₂ a través de filtros Millex[®]-HV, 13 mm de 45 µm. A continuación se determinó el volumen de stock que debemos adicionar para conseguir 1 de absorbancia a 414 nm. El resto de volumen en cubeta se completó con agua destilada.

EL stock de ABTS debe ser preparado diariamente y la temperatura debe controlarse rigurosamente, debiendo escoger como estándar 25 °C.

4.5.2.3. *Medidas analíticas*

El radical ABTS^{•+} generado posee un color verde oscuro, que al ser reducido, vira a incoloro. La medida se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu[®] UV-1700 a una longitud de onda (λ) de 414 nm. Se utilizaron cubetas de plástico de 1 ml y el tiempo de reacción fijado fue de 60 min, utilizando 10 µl de una disolución 1:2 del extracto metanólico de las muestras.

4.5.2.4. *Cuantificación y expresión de resultados*

Se realizó una recta de calibrado con 6 concentraciones diferentes de Trolox, resultando la ecuación $y = 0,3959x + 0,0834$ ($r^2 = 0,9971$).

Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C, expresando el resultado como valores medios \pm desviación estándar de µM de Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez, de acuerdo a la nomenclatura de Rice-Evans y Miller (1994).

4.5.3. **Ensayo del ORAC**

Es el único método que combina en un solo valor el tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo y proporciona una orientación aproximada de la capacidad antioxidante de los alimentos en el organismo.

4.5.3.1. *Fundamento*

Con este ensayo se mide la degradación oxidativa de la fluoresceína al ser atacada por el AAPH (Ou *et al.*, 2001). Este método se basa en la diferente emisión

fluorescente de la β -PE en el proceso de oxidación inducido por el radical AAPH (Prior *et al.*, 2005).

El método ORAC cuantifica la capacidad antioxidante como el área de protección neta en la curva de disminución de fluorescencia en presencia de un antioxidante. Por tanto, surge el concepto de “integración” al considerar esta área neta reflejando a la vez el tiempo (rapidez) y la extensión (cantidad) en la capacidad antioxidante (disminución de la emisión fluorescente).

4.5.3.2. Preparación de la muestra y reactivos

La preparación de las muestras de nueces se llevó a cabo a través del modo descrito para el método DPPH en el apartado 4.5.1.2.

La solución stock de FL (4 μ M) se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4 y se conservó a -20 °C durante un máximo de cuatro semanas. La solución de FL se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4, mediante una dilución de la disolución stock, a una concentración final de 6 nM.

La concentración de la disolución stock de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C) utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0,25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4. La concentración del extracto metanólico de nueces fue de 15 μ M, diluido en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4.

El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4.

4.5.3.3. Medidas analíticas

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de microplacas Synergy HT multi-detec microplate reader de Biotek Instruments, Inc (Winooski, VT, USA), utilizando placas de 96 pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo transparente de Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark). La fluorescencia de las muestras se leyó por el fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos *et al.*, 2004, con ligeras modificaciones (Lucas-Abellán *et al.*, 2008). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4, en un volumen final de 200 μ l, compuesto por: 100 μ l de solución de FL (con una concentración final de 3 nM), 0-70 μ l de extracto metanólico de nueces, 30 μ l de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μ l, tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4.

La mezcla de reactivos en ausencia del radical AAPH, se incubó durante 30 min a 37 °C, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. Seguidamente, la microplaca se colocó en el lector y la fluorescencia fue registrada cada 1' y 14'' durante 2 h. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. En cada ensayo se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico.

Se realizó una recta de calibrado con 8 concentraciones diferentes de Trolox, resultando la ecuación $y = 1,427x + 0,04$ ($r^2 = 0,9959$).

4.5.3.4. Cuantificación y expresión de resultados

La capacidad de inhibición de la desaparición de FL, se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de caída de la FL (Area Under the Curve, AUC). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y, al menos, se realizaron tres ensayos independientes para cada muestra. Con el fin de evitar el efecto de la temperatura, sólo se utilizaron los 60 pocillos centrales de la microplacas, dejando los exteriores con 200 μ l de agua destilada.

Los resultados fueron expresados como valores medios \pm desviación estándar de μ M de Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez, de acuerdo a la nomenclatura de Rice-Evans y Miller (1994).

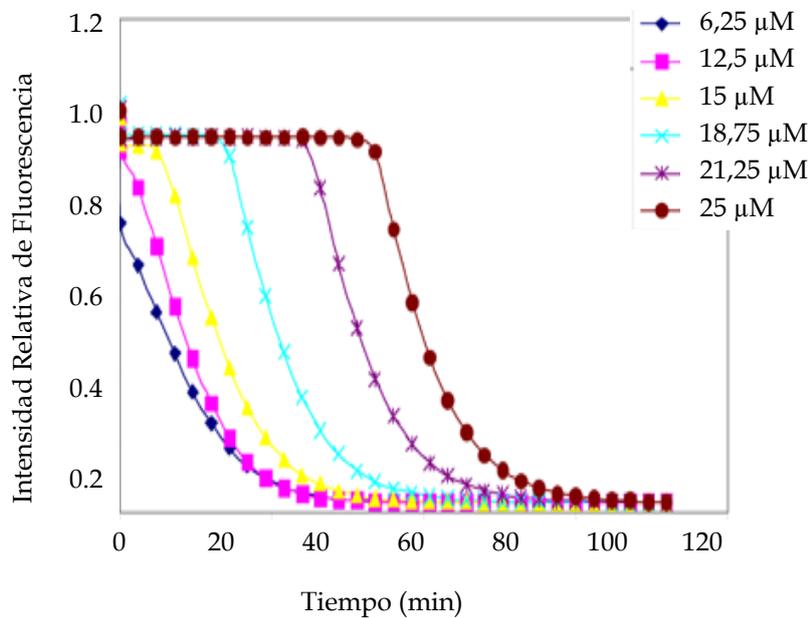


Figura 4.5. Curva de caída de FL inducida por APPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C

El área bajo la curva de caída de FL (AUC) fue calculada mediante la ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{120} f_i / f_0$$

Donde f_0 es la fluorescencia inicial leída a tiempo 0 y f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo final. El AUC correspondiente a la muestra (Net AUC), se calculó restando el correspondiente AUC del blanco. Los datos fueron procesados con el programa SigmaPlot 9.0 (Jandel Científico, Alemania).

4.6. MEDIDA DEL CONTENIDO EN HUMEDAD

La humedad ha sido medida de acuerdo con Método Oficial AOAC 925.40 (Association of Official Analytical Chemist, AOAC, 2005a).

4.6.1. Fundamento

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua. (Kirk *et al.*, 1996).

En el método de secado al horno la muestra se calienta bajo condiciones específicas y la pérdida de peso de la muestra se utiliza para calcular el contenido de humedad de la misma. El valor del contenido de humedad obtenido es altamente dependiente del tipo de horno que se va a utilizar, las condiciones del horno y el tiempo, así como la temperatura de secado. Estos métodos de secado son simples y muchos hornos permiten el análisis simultáneo de grandes números de muestras. El tiempo requerido para el análisis puede ser de unos cuantos minutos hasta más de 24 horas.

4.6.2. Preparación de la muestra y medidas analíticas

Para la preparación de las muestras, las nueces se molieron en un mortero hasta alcanzar un polvo muy fino.

De este polvo fino, se pesaron 5 g de muestra y se desecaron en una estufa a 105 °C durante 24h. Pasado ese tiempo se dejaron enfriar en el desecador y se volvieron a pesar. El contenido en humedad de la muestra se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{P_i}$$

Donde:

P_i= peso inicial

P_f= peso final

4.6.3. Cuantificación y expresión de resultados

Las determinaciones de humedad se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de humedad.

4.7. MEDIDA DEL CONTENIDO EN GRASA TOTAL

La determinación cuantitativa de la grasa total de las muestras se realizó mediante extracción en un equipo Soxtec (Avanti 2055) de acuerdo con Método Oficial AOAC 948.22 (AOAC, 2005b).

4.7.1. Fundamento

El método descrito por Soxhlet en 1879 es el ejemplo más comúnmente usado de un método semi-continuo aplicado a la extracción de los lípidos de los alimentos. De acuerdo con el procedimiento de Soxhlet, aceite y grasa de material sólido se extraen por el lavado repetido (percolación) con un disolvente orgánico, por lo general hexano o éter de petróleo, a reflujo en un material de vidrio especial.

4.7.2. Preparación de la muestra y medidas analíticas

Se pesaron 5 g de nueces desecadas (utilizadas en la determinación de humedad) con una precisión de 0,0001 g y se introdujeron en un cartucho de extracción.

Se puso el cartucho en el interior de la taza durante 30 minutos a 80 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se cambió la posición del cartucho fuera de la taza y se continuó con el proceso de extracción durante 45 minutos a 100 °C. Por último, se cerró el circuito del solvente durante un minuto, se subieron las palancas del circuito de aire, y se conectó el motor auxiliar del mismo durante 10 minutos.

Se secó la taza de extracción en una estufa a 103 °C durante 30 minutos, se enfrió después hasta temperatura ambiente en un desecador y por último, se pesó la taza con el extracto de grasa. El contenido en grasa se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\%Grasa = \frac{(M2 - M1) \times 100}{M0}$$

Donde:

M0 = peso de la muestra

M1 = peso de la taza de extracción.

M2 = peso de la taza de extracción con el extracto graso

4.7.3. Cuantificación y expresión de resultados

Las determinaciones de grasa total se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de grasa.

4.8. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La extracción de grasa para el análisis del perfil de ácidos grasos se realizó mediante el método de Folch cloroformo/metanol (Folch *et al.*, 1957). Se trata del método oficial de análisis para alimentos 983.23 (AOAC, 2010).

Se llevaron a cabo dos etapas de extracción, ya que así la cantidad de aceite extraída coincide con la que se hubiese conseguido mediante el método FOSFA descrito por The Federation of Oils, Seeds and Fats Associations, que consiste en una triple extracción gravimétrica con etapas de molienda entre cada extracción (FOSFA, 1998), tal como afirman Barthet *et al.* (2002), en un estudio en el que comparaban diferentes métodos de medida del contenido en aceite de semillas oleaginosas. Se utilizó esta técnica porque se aplica especialmente a muestras de alimentos para extraer lípidos y para su posterior identificación por cromatografía de gases.

4.8.1. Fundamento

El método de de Folch se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones tales que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra. Al añadir alícuotas de cloroformo y agua se logra la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase no acuosa, mientras que el material no lipídico se encuentra en la fase acuosa.

El método de identificación por cromatografía de gases se basa en la separación y posterior determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos según la diferente migración de los mismos a través de una columna capilar, utilizando como fase móvil un gas portador, que transporta la muestra y sus componentes a través de la columna cromatográfica hasta el detector.

4.8.2. Preparación de la muestra y reactivos

Para la extracción de ácidos grasos se pesaron 5 g de muestra, a los que se le añadieron 90 ml de Cloroformo-Metanol y se homogeneizaron en el ultraturrax (24.000 rpm). Posteriormente, el homogeneizado se filtró y se llevó a un embudo de decantación al que se le añadieron 60 ml de NaCl. Se homogeneizó por agitación y se dejó decantar durante 24 h. La fase con el solvente y la grasa se filtró y se eliminó el disolvente por medio de un rotavapor a vacío recogiendo la grasa obtenida en hexano para su almacenamiento (-80 °C) hasta posterior análisis. Esta fase de extracción se llevó a cabo por duplicado.

Después de la extracción se eliminó el disolvente por evaporación a vacío y se sometió a los ácidos grasos a una *trans*-esterificación ácida mediante la adición de 1 ml de ácido sulfúrico en metanol al 5% y la incubación a 80 °C/30 min (Sandler & Karo, 1992). Se dejó enfriar y se le añadió 1 ml de hexano y 1 ml de una solución sobresaturada de NaCl, obteniéndose una separación en tres fases.

Se recogió el sobrenadante (fase superior) con los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) y se llevó de nuevo a sequedad. La fracción obtenida de grasa se llevó a 1 ml con hexano para el análisis cromatográfico.

Se prepararon soluciones por separado de los ácidos grasos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquídico (C20:0) que fueron inyectadas para examinar la relación lineal entre cantidad de ácido graso y área de los picos obtenidos. También se preparó una solución con una mezcla de los diferentes patrones (Figura 4.6).

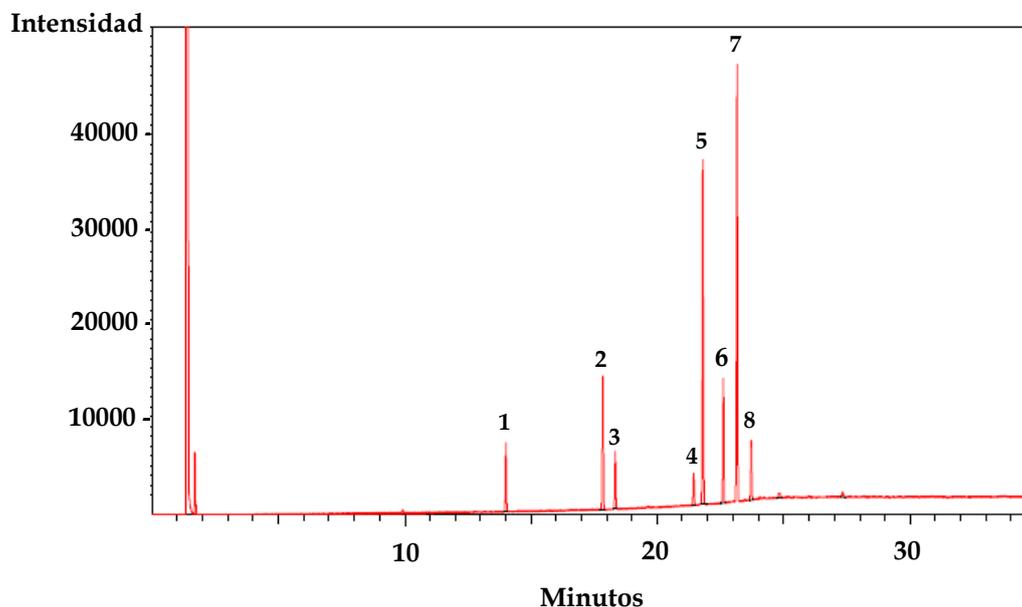


Figura 4.6. Cromatograma de mezcla de patrones de ácidos grasos. (1) Mirístico, (2) Palmítico, (3) Palmitoleico, (4) Esteárico, (5) Oleico, (6) Linoleico, (7) Linolénico y (8) Araquídico

4.8.3. Medidas analíticas

La separación y determinación de los FAMES se realizó con un cromatógrafo de gases Shimadzu, GC 2010 equipado con inyector on column y columna capilar (Supelco, Omega Wax) de sílice fundido (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μm de espesor de película) con fase estacionaria polar constituida por polietilenglicol, mantenida a una temperatura de 225 $^{\circ}\text{C}$. Para la detección de los compuestos se empleó un detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector y del detector fue de 230 $^{\circ}\text{C}$. El flujo del gas portador (He) fue de 1.8 ml min^{-1} .

4.8.4. Cuantificación y expresión de resultados

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención con los de los correspondientes patrones,

analizados en las mismas condiciones cromatográficas. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Los resultados del perfil lipídico se expresan como valores medios del porcentaje de ácidos grasos \pm desviación estándar respecto al conjunto de ácidos grasos identificados.

4.9. BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los ensayos de biodisponibilidad se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Miller *et al.* (1981), modificado por Vaquero *et al.* (1994).

4.9.1. Fundamento

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* se simulan la digestión gastrointestinal y el proceso de absorción intestinal mediante el uso de enzimas digestivas. La técnica consta de dos fases: una digestión gástrica y otra digestión intestinal, las cuales tuvieron una duración de dos y tres horas, respectivamente.

4.9.2. Preparación de la muestra y reactivos

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 12 g de nueces, previamente machacadas en un mortero, en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm con 60 ml de agua destilada hasta una completa homogeneización.

La solución de pepsina se preparó a partir de 4 g de pepsina (Sigma-Aldrich) a la que se añadieron 25 ml de agua destilada y se llevaron a agitación.

La solución de pancreatina se preparó con 0,42 g de NaHCO₃, junto a 1,25 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) y 0,2 g de pancreatina (Sigma-Aldrich), mezcla que se disolvió en 50 ml de agua destilada.

4.9.3. Procedimiento

En la Figura 4.7 se expone un esquema del procedimiento llevado a cabo.

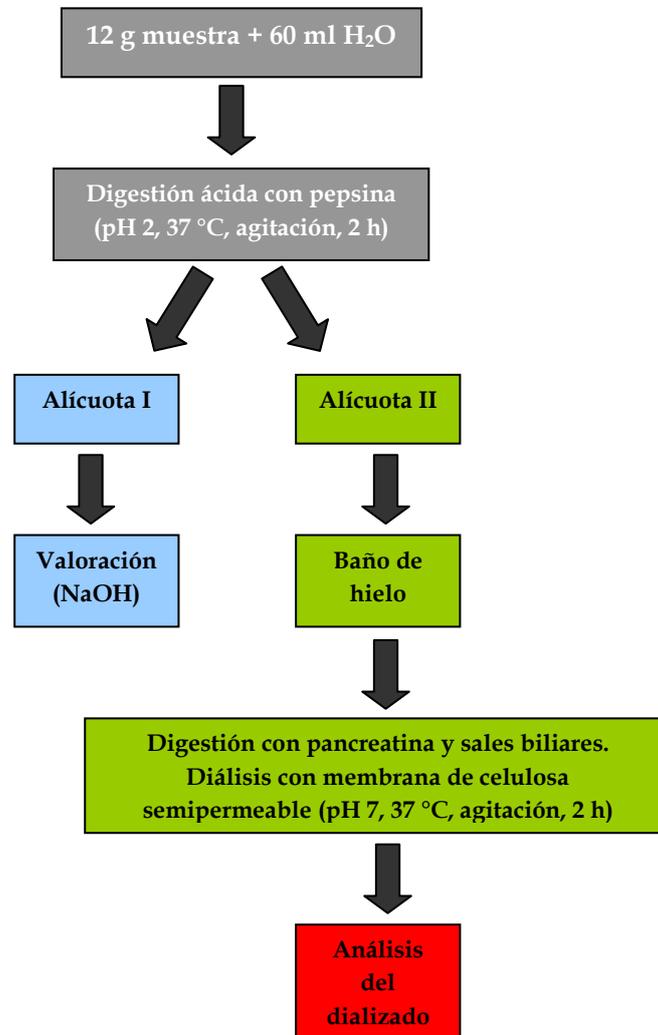


Figura 4.7. Protocolo del ensayo de biodisponibilidad *in vitro*

En primer lugar, se midió el pH de la muestra y se valoró con HCl 0,6 N hasta pH 2. A continuación se añadieron 6 ml de la solución de pepsina y se realizó la digestión ácida durante 2 h, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó cada media hora el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, a una alícuota (alícuota I) de la muestra (\pm 40 ml) se le añadió 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, y se valoró con NaOH

hasta pH 7. Otra alícuota (alícuota II), de ± 40 ml, permaneció en un baño de hielo con la digestión ácida detenida.

En tercer lugar, la alícuota II se sometió a una segunda digestión y a diálisis, a 37 °C, durante 2 h en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introdujo una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) tubular sellada, con un volumen de 10 ml de una solución preparada con una cantidad de NaHCO₃ equivalente a la acidez valorada en la alícuota I y diluida hasta 25 ml con agua destilada. Media hora después, se añadieron los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recogió el dializado, se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 μ m (Millipore, EE.UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

Se realizaron tres ensayos de biodisponibilidad de cada muestra y los resultados se expresan como medias \pm SD.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics (versión 19.0.).

Para describir las características de la muestra, el análisis estadístico realizado constó de una parte descriptiva y otra inferencial.

Análisis descriptivo: se calcularon las frecuencias y los porcentajes para las variables cualitativas, y las medias, desviaciones estándar, o típicas, valores máximos y mínimos para las mediciones cuantitativas. Cuando las variables analizadas tenían desviaciones elevadas, se incluyó el cálculo de otras medidas de tendencia central, como medianas o modas. La realización de estos análisis se llevó a cabo de toda la muestra y, además diferenciando por fincas de cultivo y variedad de nueces. Se incluyó el cálculo de intervalos de confianza del 95% para medias.

Análisis bivariante: se compararon las puntuaciones de cada variable dependiente con las variables independientes mediante métodos estadísticos paramétricos, y no paramétricos cuando no se cumplían los criterios de aplicación de dichos análisis. Todos los resultados se consideraron significativos estadísticamente si la $\rho < 0,05$.

- **En el caso de que las variables siguieran las distribución normal:**

Si una variable era de tipo cuantitativo y la otra categórica (por ejemplo Fenoles Totales y Finca de cultivo), para la comparación de las medias con una variable dicotómica se utilizó la prueba estadística *t de Student*. En los casos en que la variable cualitativa tenía más de 2 categorías por ejemplo la variedad de nuez, se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Previamente, se comprobó el supuesto de normalidad de la forma que se ha mencionado anteriormente. En las variables en las que se obtuvieron diferencias significativas ($\rho < 0,05$) se aplicó el Test de Tukey HSD (Honest Significant Difference) para determinar la existencia de diferencias entre las medias, estableciéndose un nivel de confianza del 95%.

- **En el caso de que las variables no siguieran la distribución normal:**

Si una variable era cuantitativa y la otra cualitativa, el test que se aplicó fue el test de la U de Mann-Whitney cuando la variable cualitativa tenía 2 niveles, y el test de Kruskal-Wallis si la medición cualitativa estaba formada por 3 ó más niveles.

Para estudiar la relación entre las variables cualitativas se ha realizado un estudio de correlación calculando los coeficientes de Pearson y de Kendall para poder contrastar la asociación tanto lineal como no lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS NUECES

5.1.1. Contenido en fenoles totales de las nueces

El contenido en fenoles totales ha sido ampliamente estudiado en el nogal (Li *et al.*, 2006a; Almeida *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008; Samaranayaka *et al.*, 2008; Abe *et al.*, 2010). Muchos estudios refieren el contenido en compuestos fenólicos de las hojas del nogal (Jay-Allemand *et al.*, 2001; Amaral *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2010; Sharafati-Chaleshtori *et al.*, 2011; Chrzanowski *et al.*, 2012) y en el pericarpio (Radix *et al.*, 1994; Štampar *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008a; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011), aunque no tantos en la semilla entera.

En este sentido Labuckas *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2009), Ogunmoyole *et al.* (2011), Stonehouse (2011) y Christopoulos y Tsantili (2012), sí cuantificaron el contenido en semilla, obteniendo resultados ligeramente superiores a los resultados medios obtenidos en nuestro estudio ($953,36 \pm 206,93$ mg ác. gálico/100 g de nuez) (Tabla 5.1).

Gunduc y El (2003), obtuvieron por el contrario resultados más bajos (705,2 mg ác. gálico/100 g de nuez) que los encontrados en nuestro trabajo.

Tabla 5.1. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces

Variedad	mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD ¹
Algaida	1008,92 \pm 55,51 b, c, d, h, j
Amigo	743,74 \pm 23,85 a, d, f, i, j
Chico	762,40 \pm 71,98 a, d, i, j
Eureka	1302,88 \pm 139,56 a, b, c, e, f, g, h, i
Franquette	869,34 \pm 23,82 d, j
Payne	940,78 \pm 160,81 b, d, j
Pedro	846,88 \pm 120,42 d, j
Serr	753,13 \pm 98,58 a, d, i, j
Sunland	1008,62 \pm 114,28 b, c, d, h, j
Tehama	1296,93 \pm 83,11 a, b, c, e, f, g, h, i
	953,36 \pm 206,93

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

Atendiendo a la Tabla 5.1, cabe subrayar la riqueza en compuestos fenólicos de las variedades Eureka y Tehama (1302,88 \pm 139,56 y 1296,93 \pm 83,11 mg ác. gálico/100 g de nuez, respectivamente), significativamente más altas ($\rho \leq 0,05$) que el resto de genotipos estudiados. Estas dos variedades presentan un contenido en fenoles similar al obtenido por los autores anteriormente citados (Labuckas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ogunmoyole *et al.*, 2011; Stonehouse, 2011) y al obtenido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1556 mg ác. gálico/100 g de nuez) (USDA, 2010b). En sentido contrario, son las variedades Amigo, Serr y Chico las que presentan un menor contenido en fenoles totales.

Al comparar el contenido en fenoles totales de los 10 genotipos de nueces, teniendo en cuenta la variable finca; El Chaparral o Torre Blanca (Tabla 5.2), podemos observar como los genotipos Eureka y Tehama son los que presentan el

mayor contenido en fenoles totales en ambas fincas, existiendo diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de genotipos estudiados.

Tabla 5.2. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces en función de la finca (mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD)

Variedad	Fincas	
	El Chaparral	Torre Blanca
Algaida	1058,46 \pm 15,44*	959,38 \pm 10,13
Amigo	727,13 \pm 7,52	760,34 \pm 23,22
Chico	826,94 \pm 15,36*	697,85 \pm 14,77
Eureka	1423,94 \pm 65,64*	1181,82 \pm 20,43
Franquette	857,06 \pm 27,76	881,62 \pm 13,97
Payne	1085,77 \pm 38,66*	795,78 \pm 9,47
Pedro	942,36 \pm 88,95*	751,40 \pm 31,51
Serr	842,38 \pm 11,99*	663,88 \pm 15,94
Sunland	1110,76 \pm 28,23*	906,48 \pm 23,56
Tehama	1366,60 \pm 46,50*	1227,26 \pm 23,37
	1024,14 \pm 226,61*	882,58 \pm 187,28

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

La variedad Amigo en El Chaparral y la variedad Serr en Torre Blanca son las que presentan menor contenido en fenoles totales de manera significativa ($\rho \leq 0,05$).

El contenido en fenoles totales de las variedades cultivadas en El Chaparral es significativamente más alto que el obtenido por las mismas variedades en la finca Torre Blanca, 1024,14 \pm 22,66 mg de ác. gálico/100 g de nuez frente a 882,58 \pm 18,72 mg ác. gálico/100 g de nuez, siendo los valores obtenidos en El Chaparral similares a los obtenidos en otros estudios (Kornsteiner *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Arcan & Yemencioğlu, 2009; Yang *et al.*, 2009; Bakkalbaşı *et al.*, 2012). Estas diferencias encontradas entre las dos fincas pueden ser debidas a la mejor adaptación de los genotipos a las condiciones geográficas y climatológicas reinantes en El Chaparral que se caracterizaban por una altitud superior a la de

Torre Blanca, 432 m frente a 31 m, y una temperatura anual media más suave, 15,38 °C, por los 17,05 °C alcanzados como media en Torre Blanca. Resultados similares, en los que se apreciaban diferencias en el contenido en compuestos fenólicos de nueces, posiblemente debidas a la diferente altitud y temperatura han sido publicados por otros estudios, como el de Ghasemi *et al.* (2011), en el que se observaba como el contenido en fenoles totales del pericarpio de la nuez era superior, $108,11 \pm 4,6$ mg ác. gálico/g de extracto, en una región de Irán (Ab-ali) situada a mayor altitud y, por tanto, con temperaturas medias más suaves que en otras regiones (Galikesh y Chogholondi) situadas más cercanas al nivel del mar, que presentaban un contenido en fenoles de $16,88 \pm 0,9$ y $15,15 \pm 0,4$ mg ác. gálico/g de extracto, respectivamente.

Amaral *et al.* (2008), estudiaron la influencia de la localización geográfica y del clima en el perfil fenólico de las hojas del nogal cultivado en Portugal, observando que el contenido en fenoles de las hojas era inferior cuando la pluviometría era escasa y las temperaturas altas en las fechas previas a la recolección.

Si atendemos al comportamiento de cada uno de las variedades, observamos como Amigo y Franquette son las que sufren menos variación en el contenido en fenoles en función de la finca, mientras que Payne y Serr son las más afectadas, al ver reducido su contenido en fenoles en un 26,70 y 21,19%, respectivamente en Torre Blanca.

5.1.2. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en las nueces

Mediante HPLC se han identificado y cuantificado 11 compuestos fenólicos en las variedades objeto de estudio, comparando sus tiempos de retención con los de sus estándares puros y el área del pico en los cromatogramas de las muestras con los de dichos estándares.

El contenido mayoritario de polifenoles en semillas de nueces corresponde a ácidos fenólicos e hidroxicinámicos.

5.1.2.1. Contenido en compuestos flavonoides

Diferentes estudios han indicado la presencia de flavonoides en la semilla de nueces. Sin embargo, son pocos los que los han caracterizado. Gu *et al.* (2004), Gómez-Caravaca *et al.* (2008 y 2010) y Papoutsis *et al.* (2008), cuantificaron el contenido en flavan-3-oles monoméricos (catequina y su isómero epicatequina) y en proantocianidinas oligoméricas (procianidina B₂). Es por este motivo por el que se ha caracterizado el contenido en flavonoides.

En el presente trabajo se han identificado 6 flavan-3-oles (galocatequina, catequina, procianidina B₂, epigalocatequina galato, epicatequina y epicatequina galato) en los genotipos de nueces estudiados. Estos compuestos podrían ser responsables, junto a los taninos, de la astringencia de la nuez (Prasad, 2003; Lesschaeve & Noble, 2005). A modo de ejemplo, la Figura 5.1 muestra el cromatograma recogido a 280 nm para la variedad Tehama.

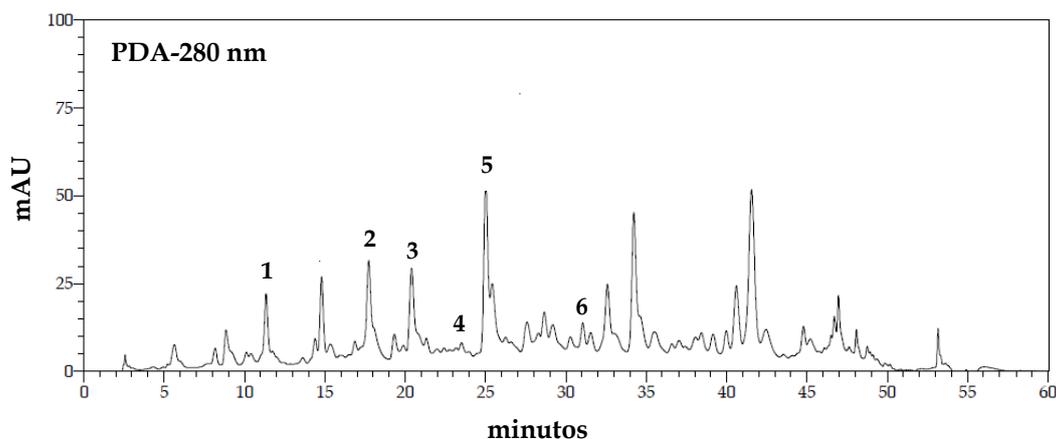


Figura 5.1. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifican: (1) galocatequina, (2) catequina, (3) procianidina B₂, (4) epigalocatequina galato, (5) epicatequina y (6) epicatequina galato a 280 nm

El contenido en diferentes flavonoides identificados en la semilla de los genotipos de nueces Algaida, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama se recoge en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces

Variedad	Flavan-3-oles ¹							
	Catequina**	Epicatequina*	Epicatequina galato*	Galocatequina*	Epigalocatequina galato*	Procianidina B ₂ **	Suma de Flavonoides**	
Algaida	17,85 ± 1,86 c, e, g, h	365,66 ± 19,19	160,52 ± 11,00 d, j	166,65 ± 23,49	83,33 ± 8,80 c, d, h, i	19,83 ± 3,89 d, i	38,47 ± 1,38 c, d, e, g, h, i, j	
Amigo	20,01 ± 2,43 d, e, g, h	366,83 ± 33,83	179,58 ± 8,27 c, g, h	155,62 ± 24,87	65,31 ± 9,58 c	17,34 ± 1,95	38,13 ± 0,66 c, d, e, g, h, i, j	
Chico	14,86 ± 2,29	353,06 ± 35,34	148,25 ± 11,71 b, d, i, j	164,61 ± 32,35	31,31 ± 1,85 a, b, e, f, g, j	14,61 ± 0,99	30,18 ± 2,34 a, b, f	
Eureka	12,32 ± 0,91 b, i	390,55 ± 8,30	183,74 ± 5,03 a, c, f, g, h	139,05 ± 7,99 e, f	42,02 ± 5,18 a, e, f, g	13,18 ± 1,91 a, g	26,27 ± 0,98 a, b, f, g, i, j	
Franquette	10,92 ± 0,06 a, b, f, i	351,51 ± 29,13	170,49 ± 17,98 g, h	183,58 ± 10,94 d	80,87 ± 19,14 c, d, h, i	14,10 ± 2,74 g	25,81 ± 2,82 a, b, f, g, i, j	
Payne	16,92 ± 1,94 c	375,16 ± 8,90	157,15 ± 9,67 d, i, j	177,14 ± 9,83 d	87,48 ± 8,93 c, d, h, i, j	19,18 ± 1,68 i	36,91 ± 0,28 c, d, e, g, h, i, j	
Pedro	11,89 ± 1,23 a, b, i	362,48 ± 11,41	139,40 ± 19,59 b, d, e, i, j	167,51 ± 20,42	77,05 ± 6,89 c, d, h, i	20,77 ± 2,75 d, e, i	33,42 ± 3,68 a, b, d, e, h	
Serr	11,48 ± 1,50 a, b, i	350,15 ± 26,36	144,68 ± 10,46 b, d, e, i, j	157,35 ± 11,59	48,98 ± 6,62 a, e, f, g	14,21 ± 1,71	26,40 ± 0,98 a, b, f, g, i, j	
Sunland	19,91 ± 1,07 d, e, g, h	369,71 ± 40,37	181,87 ± 10,49 c, f, g, h	164,35 ± 1,16	40,97 ± 9,35 a, e, f, g	11,01 ± 1,75 a, f, g	31,68 ± 0,72 a, b, d, e, f, h	
Tehama	15,05 ± 1,87	374,34 ± 46,40	190,71 ± 4,40 a, c, f, g, h	161,16 ± 22,90	59,46 ± 6,81 c, f	15,19 ± 2,54	31,03 ± 0,66 a, b, d, e, f, h	
	15,12 ± 3,44	365,95 ± 12,52	165,64 ± 18,15	163,70 ± 12,11	61,68 ± 20,15	15,94 ± 3,19	31,83 ± 5,15	

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a: ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

(*) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de nuez \pm SD

(**) = Resultados expresados en $\text{mg}/100 \text{ g}$ de nuez \pm SD

En ella podemos observar como Algaida, Amigo y Payne presentan el mayor contenido en flavonoides de todas las variedades estudiadas, presentando diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a Chico, Eureka, Franquette, Pedro, Serr, Sunland y Tehama. En sentido contrario, destacar como las variedades Eureka, Franquette y Serr son las que presentan un menor contenido total en flavonoides.

Jakopič *et al.* (2009a), en un estudio en el que evaluaban diferentes disolventes para la extracción de compuestos fenólicos presentes en la nuez, obtuvieron resultados similares a los nuestros en cuanto al contenido en catequina ($\pm 0,2$ mg/g de nuez) cuando utilizaban metanol para su obtención.

En todos los casos catequina y procianidina B₂ constituyen los flavonoides mayoritarios, suponiendo el 47,50% y el 50,07%, respectivamente, de todos los flavonoides identificados (Figura 5.2). El 2,5% restante corresponden a cantidades casi trazas de epicatequina, epicatequina galato, galocatequina y epigalocatequina galato.

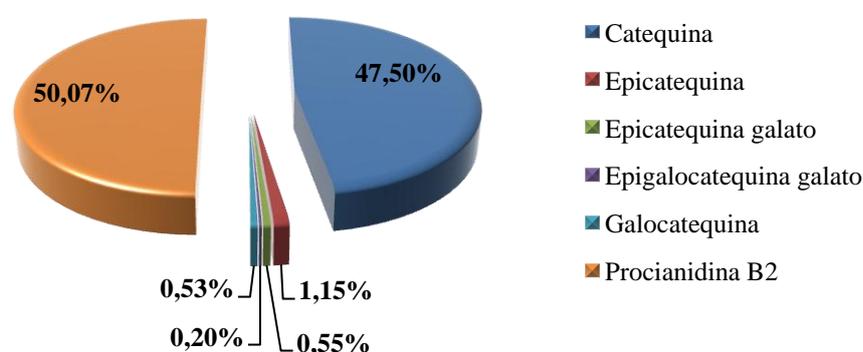


Figura 5.2. Distribución porcentual del contenido en flavonoides de las nueces

Si bien el contenido del resto de flavan-3-oles es minoritario, hay que destacar que Eureka es la variedad que presenta una mayor cantidad de epicatequina ($390,55 \pm 8,30$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez), Tehama es la variedad que presenta una mayor cantidad de epicatequina galato ($190,71 \pm 4,40$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez), siendo en este caso su contenido significativamente mayor al de las variedades Algaida, Chico, Payne, Pedro y Serr.

Franquette es la variedad que presenta un mayor contenido en galocatequina ($183,58 \pm 10,94 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de nuez), mientras que epigalocatequina galato aparece en mayor cantidad en Payne ($87,48 \pm 8,93 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de nuez).

El hecho de que el contenido en flavonoides en las nueces no sea mayoritario quizás explique la poca linealidad que presentan los resultados de éstos con los obtenidos para las mismas variedades de Fenoles Totales descritos con anterioridad ($R = 0,166$) (Figura 5.3).

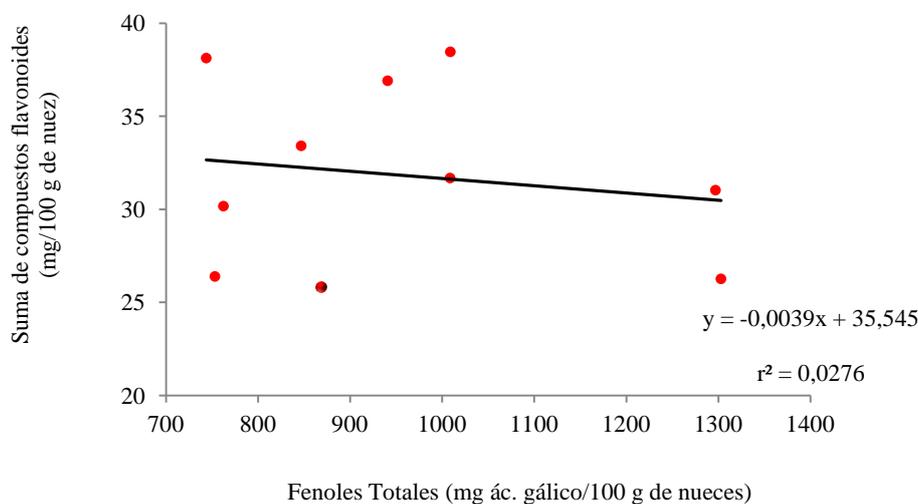


Figura 5.3. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos flavonoides identificados

Al comparar el contenido en flavonoides de las variedades de nueces, teniendo en cuenta el factor finca (Tablas 5.4a y 5.4b), podemos observar como los genotipos Algaida y Amigo son los que presentan el mayor contenido en flavonoides en ambas fincas, encontrando diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de genotipos estudiados, excepto con Payne.

Tabla 5.4a. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces en función de la finca

Variedad	Finca			Finca			Finca		
	CH	TO	TO	CH	TO	TO	CH	TO	TO
	Catequina***	Catequina***	Catequina***	Epicatequina**	Epicatequina**	Epicatequina galato**	Epicatequina galato**	Epicatequina galato**	Galocatequina**
Algaida	13,09 ± 0,06*	22,62 ± 0,32	350,86 ± 10,24	380,47 ± 12,60	169,48 ± 0,50*	151,57 ± 7,88	188,07 ± 0,74*	145,23 ± 1,50	Galocatequina**
Amigo	22,24 ± 0,22*	17,79 ± 0,10	386,13 ± 11,73*	347,53 ± 40,09	173,14 ± 6,47*	186,01 ± 2,24	178,32 ± 1,20*	132,92 ± 1,13	Galocatequina**
Chico	15,26 ± 3,56	14,46 ± 0,08	321,77 ± 5,08*	384,37 ± 12,55	158,82 ± 1,88*	137,68 ± 2,03	194,13 ± 1,30*	135,10 ± 0,88	Galocatequina**
Eureka	11,48 ± 0,07*	13,15 ± 0,06	389,33 ± 5,57	391,76 ± 11,70	185,52 ± 1,76	181,97 ± 7,13	132,02 ± 2,13*	146,09 ± 2,60	Galocatequina**
Franquette	10,98 ± 0,14	10,86 ± 0,18	374,86 ± 19,35*	328,16 ± 10,55	154,43 ± 2,59*	186,55 ± 5,29	179,02 ± 12,70	188,16 ± 8,64	Galocatequina**
Payne	11,87 ± 0,24*	21,98 ± 0,32	381,43 ± 1,44	368,90 ± 8,66	148,64 ± 2,59*	165,67 ± 3,18	185,80 ± 2,16*	168,49 ± 3,54	Galocatequina**
Pedro	14,20 ± 3,16*	9,57 ± 0,25	360,50 ± 11,62	364,46 ± 13,37	157,04 ± 2,55*	121,77 ± 4,52	149,60 ± 5,02*	185,43 ± 7,42	Galocatequina**
Serr	12,71 ± 1,04*	10,24 ± 0,04	365,43 ± 32,15	334,86 ± 1,35	135,53 ± 2,59*	153,84 ± 3,96	167,59 ± 0,56*	147,10 ± 4,60	Galocatequina**
Sunland	18,93 ± 0,37*	20,90 ± 0,10	402,73 ± 1,25*	336,70 ± 28,35	173,19 ± 1,71*	190,56 ± 6,77	165,36 ± 0,02	163,34 ± 0,59	Galocatequina**
Tehama	17,91 ± 0,04*	12,19 ± 0,05	414,50 ± 3,68*	334,23 ± 23,09	192,25 ± 1,03	189,17 ± 6,33	140,28 ± 0,83*	182,04 ± 1,53	Galocatequina**
	14,87 ± 3,71	15,37 ± 4,86	374,75 ± 26,70*	357,14 ± 23,68	164,80 ± 16,77	166,48 ± 23,89	168,01 ± 20,77	159,39 ± 20,47	

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

(**) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de nuez $\pm \text{SD}$

(***) = Resultados expresados en $\text{mg}/100 \text{ g}$ de nuez $\pm \text{SD}$

Tabla 5.4b. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces en función de la finca

Variedad	Finca		Finca		Finca		Finca	
	CH	TO	CH	TO	CH	TO	CH	TO
	Epigallocatequina Galato**	Epigallocatequina Galato**	Procianidina B ₂ ***	Suma de Flavonoides**	Suma de Flavonoides**			
Algaida	76,56 ± 4,05*	90,10 ± 6,28	23,37 ± 0,41*	16,28 ± 0,28	16,28 ± 0,28	37,25 ± 0,49*	39,67 ± 0,37	
Amigo	92,12 ± 2,56*	38,50 ± 5,04	15,58 ± 0,08*	19,11 ± 0,43	19,11 ± 0,43	38,65 ± 0,06*	37,60 ± 0,53	
Chico	32,93 ± 0,44*	29,69 ± 0,71*	13,72 ± 0,24*	15,49 ± 0,22	15,49 ± 0,22	29,69 ± 3,60	30,65 ± 0,15	
Eureka	27,33 ± 10,05*	56,70 ± 3,17	14,89 ± 0,49*	11,48 ± 0,40	11,48 ± 0,40	27,11 ± 0,40*	25,41 ± 0,33	
Franquette	98,20 ± 2,37*	63,54 ± 3,17	16,60 ± 0,11*	11,60 ± 0,26	11,60 ± 0,26	28,38 ± 0,08*	23,23 ± 0,27	
Payne	79,46 ± 0,99*	95,50 ± 2,37	24,31 ± 0,16*	14,05 ± 0,18	14,05 ± 0,18	36,99 ± 0,41	36,83 ± 0,14	
Pedro	82,63 ± 1,67*	71,48 ± 4,79	15,52 ± 0,33*	26,03 ± 0,29	26,03 ± 0,29	30,48 ± 2,81*	36,34 ± 0,50	
Serr	54,89 ± 2,20*	43,08 ± 0,48	17,66 ± 0,23*	10,76 ± 0,28	10,76 ± 0,28	31,10 ± 0,98*	21,69 ± 0,98	
Sunland	49,36 ± 1,69*	32,59 ± 2,28	12,60 ± 0,07*	9,42 ± 0,26	9,42 ± 0,26	32,32 ± 0,06*	31,04 ± 0,26	
Tehama	44,84 ± 0,65*	74,08 ± 0,17	12,88 ± 0,03*	17,50 ± 0,39	17,50 ± 0,39	31,59 ± 0,06*	30,47 ± 0,39	
	63,83 ± 24,43	59,52 ± 22,78	16,71 ± 3,94	15,17 ± 4,78	15,17 ± 4,78	32,36 ± 4,02	31,29 ± 6,10	

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)(**) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100$ g de nuez \pm SD(***) = Resultados expresados en $\text{mg}/100$ g de nuez \pm SD

Las variedades Eureka en El Chaparral, y Serr en Torre Blanca son las que presentan un menor contenido en flavonoides, siendo el contenido de esta última combinación genotipo-finca (Serr-Torre Blanca) significativamente ($\rho \leq 0,05$) más bajo que el de cualquier otra combinación.

Si comparamos el contenido medio de flavonoides totales de las variedades cultivadas en ambas fincas (Tablas 5.4a y 5.4b), observamos que ambos valores son similares $32,36 \pm 4,02$ mg/100 g de nuez en la finca El Chaparral frente a $31,29 \pm 6,10$ mg/100 g de nuez en la finca Torre Blanca. Por tanto, se podría considerar que las diferentes condiciones climáticas reinantes en una u otra finca no han afectado de manera general al contenido en flavonoides totales.

Tampoco se observa esta influencia de manera particular en ninguno de los flavonoides cuantificados, ya que tanto los contenidos en catequina, como en epicatequina, epicatequina galato, galocatequina, epigalocatequina galato y procianidina B₂, no presentan diferencias significativas entre fincas.

Si analizamos el comportamiento de las diferentes variedades en una u otra finca, hay que destacar como Serr presenta un contenido significativamente superior en la suma total y en cada uno de los flavonoides identificados en la finca El Chaparral, respecto a la finca Torre Blanca, excepto en epicatequina galato, si bien este falvan-3-ol aparece como se ha indicado en cantidades casi traza en la semilla del nogal.

También la variedad Franquette presenta un contenido significativamente mayor en la finca El Chaparral que en la finca Torre Blanca ($\rho \leq 0,05$).

Existen trabajos en los que se estudia la influencia de los factores medioambientales en el contenido en flavonoides de otras estructuras del nogal, así, en la cubierta verde que rodea al fruto Ghasemi *et al.* (2011), observaron que, al igual que sucedía en fenoles totales, una mayor altitud y, por tanto, unas temperaturas más suaves se correlacionaban fuertemente con un mayor contenido en flavonoides. En nuestro estudio esta observación vemos que sólo se cumple en las semillas de las variedades Serr y Franquette.

Amaral *et al.* (2008), también atribuyeron las diferencias significativas encontradas en la composición en distintos flavonoides de las hojas de nogal a las distintas condiciones climáticas que sufrieron los cultivos.

De manera similar, aunque en la castaña, Dinis *et al.* (2012), encontraron que existía una correlación negativa entre altas temperaturas y contenido en flavonoides ($-r^2 = 0,71$).

5.1.2.2. Contenido en compuestos fenólicos no flavonoides

Se han identificado un gran número de compuestos fenólicos no flavonoides en las semillas del nogal. Los componentes mayoritarios corresponden a ácidos fenólicos (gálico, elágico, vanílico y siríngico) y derivados glicosidos de éstos, y a ácidos hidroxicinámicos (ρ -cumárico, sinápico, cafeico y ferúlico) y un derivado soluble de éstos, como es el ácido clorogénico (Fukuda *et al.*, 2003; Colaric *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006a; Gómez-Caravaca *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008; Shimoda *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Bolling *et al.*, 2011; Rorabaugh *et al.*, 2011; Bakar *et al.*, 2012; Christopoulos & Tsantili, 2012; Solar *et al.*, 2012).

En las variedades objeto de estudio se han identificado 3 ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico y ácido siríngico) y 2 ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico y ácido ρ -cumárico). Las Figuras 5.4, 5.5 y 5.6 muestran los cromatogramas recogidos a 280, 320 y 360 nm para la variedad Tehama en las que se identifican los diferentes compuestos fenólicos.

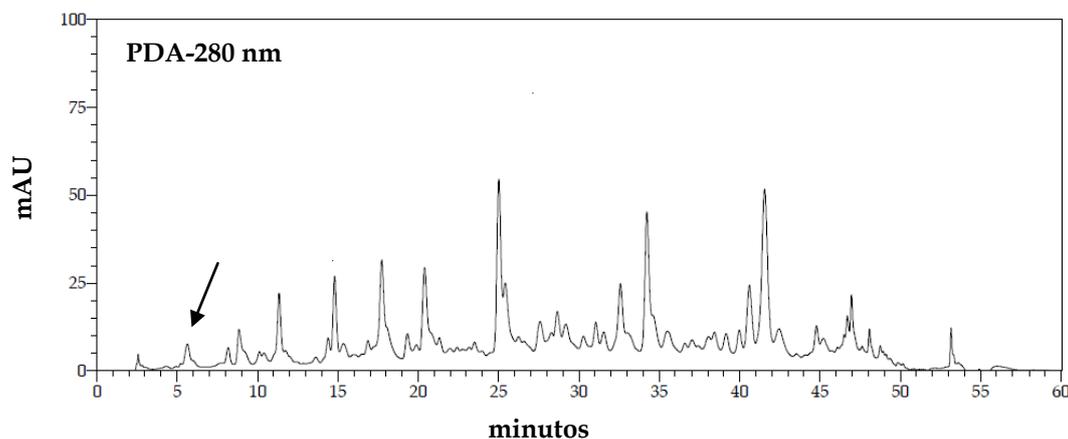


Figura 5.4. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifica ácido gálico a 280 nm

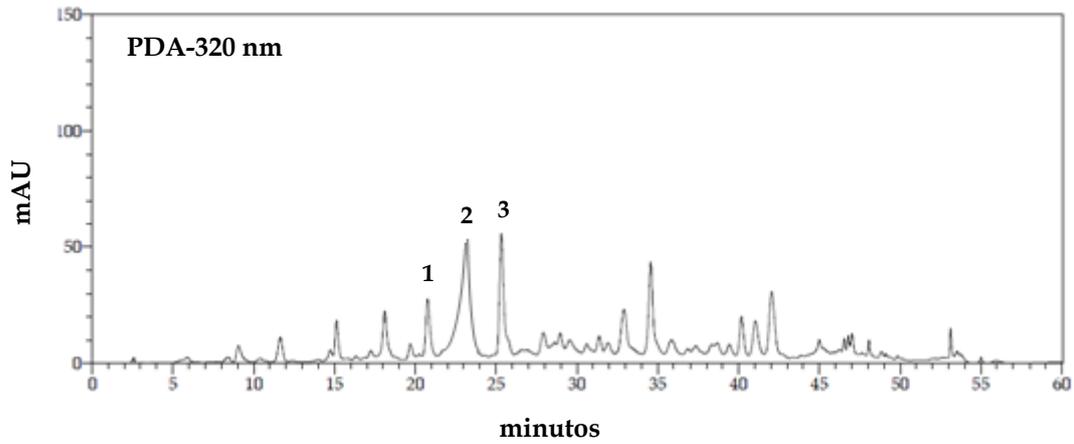


Figura 5.5. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifican: (1) ácido siríngico, (2) ácido clorogénico y (3) ácido ρ -cumárico a 320 nm

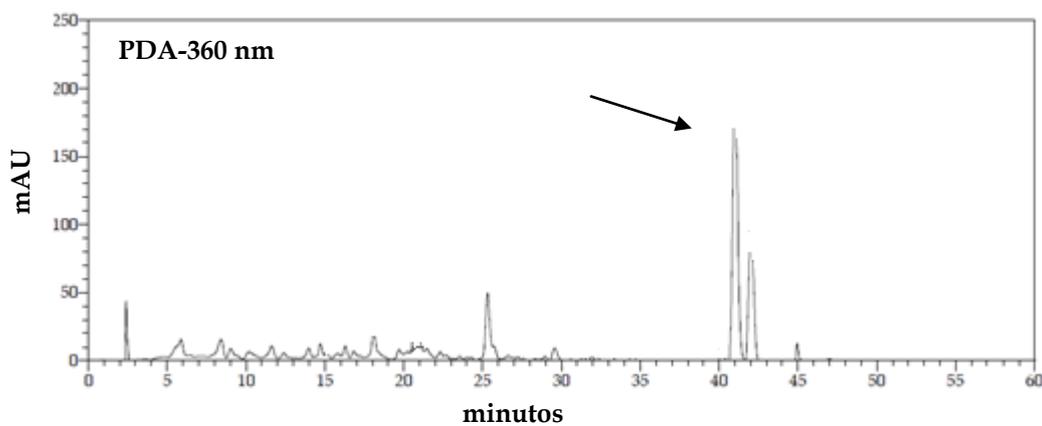


Figura 5.6. Cromatograma de la variedad Tehama en el que se identifica ácido elágico a 360 nm

El contenido en compuestos fenólicos no flavonoides identificados en la semilla de los genotipos de nueces Algaída, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama se recoge en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Contenido en No Flavonoides de las 10 variedades de nueces

Variedad	Ácidos fenólicos ¹			Ácidos hidroxinámicos ¹			Suma de No Flavonoides**
	Ácido gálico**	Ácido elálgico**	Ácido siríngico**	Ácido clorogénico**	Ácido p-cumárico*		
Algaida	16,39 ± 1,38	50,77 ± 9,05 ^{b, c, d, h, j}	38,01 ± 1,91 ^{b, c, e, f, h}	7,01 ± 0,75 ^{c, i, j}	214,10 ± 7,49 ^{b, c, e, g, h, i, j}	112,40 ± 14,54 ^{b, c, e, h}	
Amigo	11,72 ± 0,83 ^j	23,76 ± 1,23 ^{a, d, e, f, i, j}	21,30 ± 1,22 ^{a, d, g, i, j}	4,32 ± 0,95 ^f	167,60 ± 2,82 ^{a, d, i, j}	61,29 ± 2,42 ^{a, d, f, g, i, j}	
Chico	16,15 ± 1,12	33,31 ± 4,62 ^{a, d, f, i, j}	27,73 ± 11,33 ^{a, d, i, j}	2,42 ± 0,73 ^{a, f, g, h}	154,99 ± 20,52 ^{a, d, i, j}	79,78 ± 10,68 ^{a, d, i, j}	
Eureka	16,52 ± 1,76	70,47 ± 1,90 ^{a, b, c, e, f, g, h}	44,59 ± 5,72 ^{b, c, e, g, h}	4,97 ± 2,37 ^f	219,73 ± 16,93 ^{b, c, e, g, h, j}	136,78 ± 14,66 ^{b, c, e, f, g, h}	
Franquette	15,04 ± 1,38 ^j	44,69 ± 10,05 ^{b, d, h, j}	20,77 ± 0,59 ^{a, d, g, i, j}	4,80 ± 1,28 ^f	173,67 ± 51,13 ^{d, i, j}	85,50 ± 16,63 ^{a, d, i, j}	
Payne	11,58 ± 0,80 ^j	52,57 ± 14,89 ^{b, c, d, h, j}	27,82 ± 7,15 ^{a, d, i, j}	7,82 ± 1,62 ^{b, c, d, e, i, j}	179,78 ± 8,43 ^{i, j}	99,99 ± 22,86 ^{b, d, h, j}	
Pedro	13,33 ± 0,87 ⁱ	36,68 ± 5,10 ^{d, i, j}	33,44 ± 1,57 ^{b, d, e, h}	5,29 ± 1,07 ^e	146,50 ± 13,25 ^{a, d, i, j}	88,91 ± 6,91 ^{b, d, h, i, j}	
Serr	17,54 ± 1,94	21,73 ± 2,16 ^{a, d, e, f, i, j}	18,74 ± 0,78 ^{a, d, f, g, i, j}	5,61 ± 2,05 ^{c, j}	153,30 ± 18,33 ^{a, d, i, j}	63,79 ± 1,06 ^{a, d, f, g, i, j}	
Sunland	13,77 ± 1,33 ^j	56,31 ± 11,83 ^{b, c, g, h}	41,16 ± 1,05 ^{b, c, e, f, h}	3,75 ± 1,09 ^{a, f}	260,65 ± 18,04 ^{a, b, c, e, f, g, h}	115,26 ± 10,16 ^{b, c, e, g, h}	
Tehama	21,92 ± 1,67 ^{b, e, f, g, i}	69,18 ± 10,49 ^{a, b, c, e, f, g, h}	38,55 ± 0,95 ^{b, c, e, f, h}	2,75 ± 0,66 ^{a, f, h}	273,21 ± 27,92 ^{a, b, c, d, e, f, g, h}	132,69 ± 13,18 ^{b, c, e, f, g, h}	
	15,40 ± 3,07	45,95 ± 17,13	31,21 ± 9,24	4,87 ± 1,70	194,35 ± 43,04	97,64 ± 27,97	

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

(*) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100$ g de nuez \pm SD

(**) = Resultados expresados en $\text{mg}/100$ g de nuez \pm SD

Aunque el estudio de los mismos se abordará de forma separada, sí es importante destacar atendiendo a la Tabla 5.5 que las variedades Eureka y Tehama son las que presentan un mayor contenido en compuestos no flavonoides de todas las analizadas, siendo las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente al resto de genotipos, salvo para las variedades Algaida y Sunland.

Igualmente hay que destacar como son Amigo y Serr las variedades que contienen menos compuestos no flavonoides, cuando, recordemos, Amigo era la segunda con un mayor contenido en flavonoides de las 10 variedades. Este hecho da una idea de la pobre correlación existente ($R = 0,08$) entre el contenido en flavonoides y en no flavonoides en las muestras analizadas (Figura 5.7).

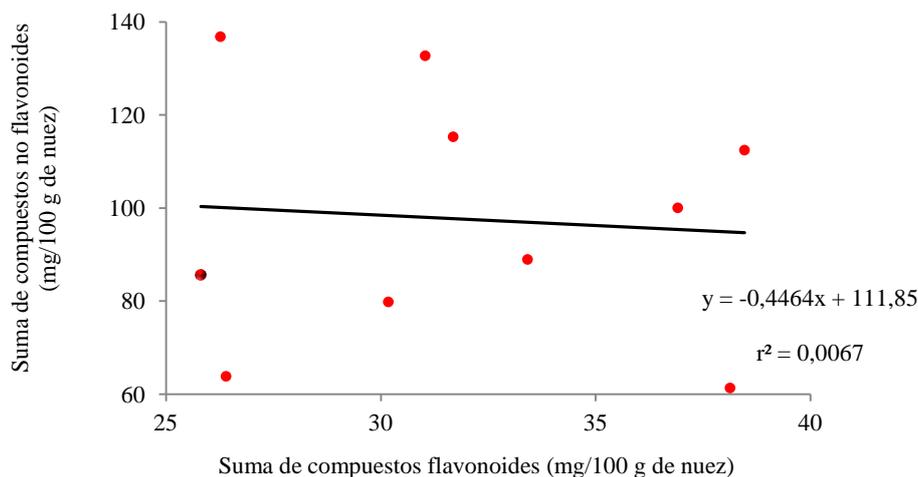


Figura 5.7. Regresión lineal de la suma de compuestos flavonoides identificados frente a los no flavonoides

Por el contrario, si encontramos una fuerte correlación ($R = 0,95$) entre compuestos fenólicos no flavonoides y fenoles totales (Figura 5.8). En este sentido son muchos los estudios que en diferentes matrices alimentarias permiten establecer una relación directa entre una medida y otra (Luthria *et al.*, 2006; Gruz *et al.*, 2011; Pérez-Jiménez & Lluís Torres, 2011).

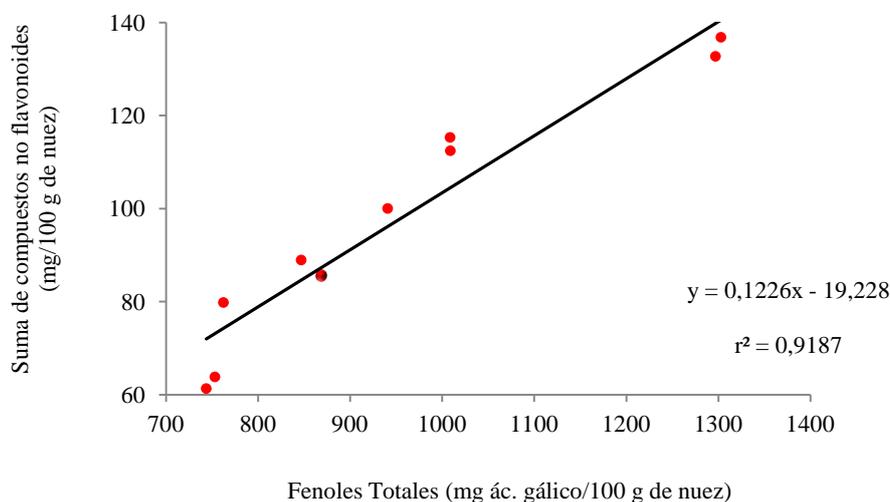


Figura 5.8. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos no flavonoides identificados

El contenido medio en compuestos no flavonoides de las 10 variedades es de $97,64 \pm 27,97$ mg/100 g de nuez. Este valor es ligeramente superior al obtenido por Colaric *et al.* (2005), quienes en un estudio en el que cuantificaban, al igual que en el presente trabajo, diferentes ácidos hidroxibenzoicos (elágico y siríngico) y ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, cafeico, p -cumárico, ferúlico y sinápico), junto a juglona, indicaron que la variedad Fernor alcanzaba $85,59 \pm 4,47$ mg/100 g de nuez al sumar todos los compuestos. Destacar el hecho de que en dicho estudio también se analizaba la variedad Franquette, la cual alcanzó un contenido en fenoles de $74,27 \pm 8,57$ mg/100 g de nuez, ligeramente inferior al alcanzado por esta variedad en nuestro estudio ($85,50 \pm 16,63$ mg/100 g de nuez).

5.1.2.2.1. Contenido en ácidos fenólicos

Como se comentó anteriormente, los ácidos hidroxibenzoicos constituyen los compuestos fenólicos mayoritarios en las nueces. Los elagitaninos, cuantificados en nuestro estudio como ácido elágico, tras la hidrólisis de los primeros, suponen el 35,50% de todos los polifenoles que componen las nueces (Figura 5.10), y el 47,07% de entre los no flavonoides (Figura 5.9).

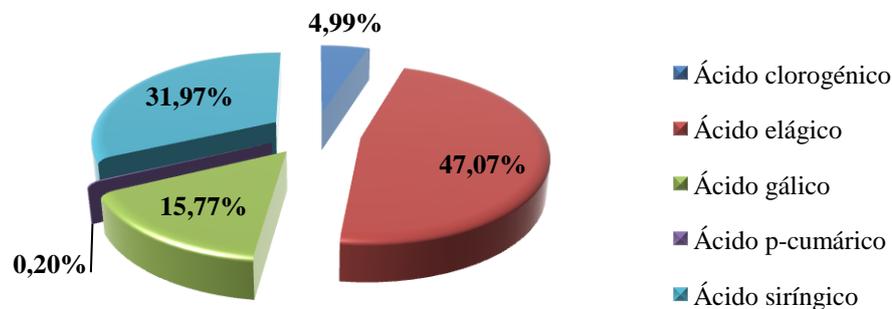


Figura 5.9. Distribución porcentual del contenido en no flavonoides de las nueces

Diversos estudios señalan a las nueces como fuente principal de elagitaninos (Daniel *et al.*, 1989; Clifford & Scalbert, 2000; Cerdá *et al.*, 2005b; Abe *et al.*, 2010; González-Sarrias *et al.*, 2010; Larrosa *et al.*, 2010; Landete, 2011; Arapitsas, 2012; Christopoulos & Tsantili, 2012). Fukuda *et al.* (2004), encontraron un 15,8% de proporción de ácido elágico en una fracción fenólica extraída en nueces. Entre los diferentes genotipos de nueces analizados son nuevamente Eureka y Tehama los que presentan un contenido significativamente mayor de ácido elágico que el resto de genotipos, exceptuando a Sunland (Tabla 4.6). Estos valores son similares a los obtenidos por Daniel *et al.* (1989), quienes cifraron en 59 mg/100 g de nuez el contenido en ácido elágico, tras llevar a cabo una extracción con acetona/agua e hidrolizar los elagitaninos con ácido trifluoroacético. Christopoulos y Tsantili (2012), también obtuvieron resultados similares a los de nuestro estudio, al cuantificar en 68,1 mg/100 g de nuez el contenido en ácido elágico en un estudio en el que analizaban la estabilidad de la nuez conservada a bajas temperaturas.

Sin embargo, son ligeramente inferiores a los obtenidos por Li *et al.* (2006a), en un estudio comparativo de la nuez común (*Juglans regia* L.) frente a la nuez de Japón (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*), en el que cifraba en 93 mg/100 g de nuez el contenido en ácido elágico de la primera.

En el lado opuesto, Serr y Amigo son las variedades que contienen menos ácido elágico en su semilla (Tabla 5.5).

Tal y como se observa en la Figura 5.9, el ácido siríntrico contribuye en casi un 32% al contenido de compuestos no flavonoides de las nueces, confirmándose como el segundo compuesto mayoritario en éstas. El contenido medio en este ácido es de 31,21 mg/100 g de nuez; cifra ésta muy parecida a la descrita por Colaric *et al.* (2005), quienes en un estudio en el que también analizaban 10 variedades de nueces, obtuvieron un contenido medio en siríntrico de 33,82 mg/100 g de nuez y por Christopoulos *et al.* (2010), que encontraron una concentración media de 31,02 mg/100 g de nuez. Christopoulos y Tsantili (2012), por el contrario, obtuvieron valores más bajos (16,5 mg/100 g de nuez).

Al igual que sucede con el contenido en ácido elátrico, son las variedades Eureka, Sunland y Tehama, respectivamente, las que de manera significativa ($p \leq 0,05$) presentan contenidos más altos en ácido siríntrico, siendo las variedades Serr, Franquette y Amigo las que presentan un menor contenido (Tabla 5.5). Por último, el 15,77% de los compuestos no flavonoides cuantificados corresponde al ácido gálico, que se encuentra en una cantidad de $15,40 \pm 3,07$ mg/100 g de nuez. Tehama, Serr y Eureka son las variedades que contienen más ácido gálico en la semilla frente a Payne y Amigo que son las variedades que presentan un menor contenido (Tabla 5.5).

Al analizar la influencia de las condiciones climáticas sobre el contenido en ácidos fenólicos (Tabla 5.6), hay que destacar que el ácido elátrico es el polifenol más afectado por el factor finca, ya que en Torre Blanca presenta un contenido alrededor de un 25% menor que en El Chaparral ($39,49 \pm 14,91$ frente a $52,40 \pm 18,99$ mg/100 g de nuez), siendo el único que presenta diferencias significativas entre fincas cuando se comparan las medias de todas las variedades.

Un trabajo llevado a cabo en castaña demostró que un ecosistema con temperaturas más elevadas podría provocar pérdidas en la semilla de hasta un 47,9% en el contenido en ácido elátrico libre, y de hasta un 86% en ácido gálico (Dinis *et al.*, 2012). También se observó que en fincas situadas a mayor altitud el contenido en ácido elátrico y ácido gálico de la semilla era mayor.

Tabla 5.6. Contenido en ácidos fenólicos de las 10 variedades de nueces en función de la finca (mg/100 g de nuez ± SD)

Variedad	Finca		Finca		Finca	
	CH	TO	CH	TO	CH	TO
	Ácido gálico	Ácido gálico	Ácido elágico	Ácido elágico	Ácido siríngico	Ácido siríngico
Algaida	20,30 ± 0,33*	12,32 ± 0,11	59,03 ± 0,10*	42,50 ± 0,22	39,76 ± 0,03*	36,25 ± 0,01
Amigo	10,96 ± 0,16*	12,49 ± 0,04	24,46 ± 0,36	23,06 ± 1,48	20,18 ± 0,07*	22,42 ± 0,56
Chico	13,30 ± 0,11*	19,09 ± 0,16	37,50 ± 0,19*	29,12 ± 0,83	17,33 ± 0,18*	38,12 ± 0,77
Eureka	20,57 ± 0,27*	12,48 ± 0,11	72,14 ± 0,66*	68,79 ± 0,44	49,82 ± 0,09*	39,37 ± 0,07
Franquette	19,39 ± 0,05*	10,70 ± 0,10	53,86 ± 0,92*	35,53 ± 0,11	21,31 ± 0,12*	20,23 ± 0,06
Payne	10,85 ± 0,06*	12,31 ± 0,14	66,16 ± 0,87*	38,98 ± 0,57	34,35 ± 0,01*	21,29 ± 0,15
Pedro	12,57 ± 0,16*	14,09 ± 0,39	41,31 ± 0,35*	32,05 ± 0,80	34,85 ± 0,57*	32,04 ± 0,12
Serr	12,12 ± 0,36*	22,96 ± 0,42	23,70 ± 0,19*	19,76 ± 0,12	19,46 ± 0,02*	18,02 ± 0,03
Sunland	11,26 ± 0,12*	16,28 ± 0,09	67,08 ± 1,50*	45,54 ± 0,14	41,16 ± 0,05*	39,43 ± 0,09
Tehama	24,67 ± 0,16*	19,17 ± 0,17	78,76 ± 0,20*	59,60 ± 0,46	37,68 ± 0,96*	39,37 ± 0,02
	15,60 ± 4,91	15,19 ± 3,85	52,40 ± 18,99*	39,49 ± 14,91	31,59 ± 10,82	30,83 ± 8,95

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

Resultados similares a los de Dinis *et al.* (2012), hemos encontrado en nuestro estudio, pero únicamente respecto al ácido elágico, pues tanto el ácido gálico como el ácido siríngico no se ven afectados por las diferencias entre ambas fincas.

Por tanto, podríamos decir que el factor clima no afecta de manera general al contenido en ácidos fenólicos, ya que sólo el contenido en ácido elágico se ve afectado; ahora bien, si analizamos el comportamiento de las diferentes variedades en una u otra finca, observamos como las variedades Algaida, Eureka y Franquette en la finca El Chaparral presentan de manera significativa ($p \leq 0,05$) mayores contenidos en cada uno de los ácidos fenólicos cuantificados (Tabla 5.6), por lo que se podría indicar que estas variedades tienen una menor capacidad de adaptación a las condiciones medioambientales que el resto, las cuales tienen un comportamiento irregular en cuanto al contenido de los diferentes ácidos en las dos fincas estudiadas.

Éste es el caso de la variedad Sunland, que en la finca El Chaparral presenta un contenido significativamente ($p \leq 0,05$) más alto en ácido elágico que en la finca Torre Blanca, significativamente más bajo en ácido gálico y no presenta diferencias en el contenido en ácido siríngico.

Por último destacar que las combinaciones genotipo/finca Eureka/El Chaparral y Tehama/El Chaparral, son las que presentan un mayor contenido en ácidos fenólicos totales, con 142,53 y 141,11 mg/100 g de nuez, respectivamente, presentando diferencias significativas frente al resto de combinaciones.

5.1.2.2.2. Contenido en ácidos hidroxicinámicos

Aunque en cantidades inferiores a los ácidos fenólicos, los ácidos hidroxicinámicos también están presentes en las nueces. Como indica la Figura 5.9, el ácido clorogénico supone aproximadamente el 5% de los compuestos no flavonoides presentes en las nueces, mientras que el ácido p -cumárico tiene poco peso en el contenido final, pues apenas constituye el 0,20% de todos los compuestos no flavonoides identificados.

Son varios los trabajos que indican la presencia de ácidos hidroxicinámicos en nueces. Gómez-Caravaca *et al.* (2008), encontraron que el contenido en ácido clorogénico en nueces era de 5,7 mg/kg de peso seco de nuez, cantidades muy

por debajo de los obtenidos en nuestro estudio ($4,87 \pm 1,70$ mg/100 g de nuez) (Tabla 5.5). Colaric *et al.* (2005), en su artículo previamente citado también cuantifica ácido clorogénico en el fruto del nogal (1,81 mg/100 g de nuez), así como ácido *p*-cumárico (136 μ g /100 g de nuez), cifra ésta inferior a la obtenida en nuestro caso ($194,35 \pm 27,97$ μ g/100 g de nuez).

Entre los diferentes genotipos de nueces analizados, Payne con una media de $7,82 \pm 1,62$ mg/100 g de nuez y Algaida con una media de $7,01 \pm 0,75$ mg/100 g de nuez, son los que presentan un mayor contenido en ácido clorogénico (Tabla 5.5).

Por el contrario, Tehama, una de las variedades con mayor contenido en ácidos hidroxibenzoicos, es en este caso, la que menor contenido medio en clorogénico presenta.

En cuanto al ácido *p*-cumárico, aunque tiene un contenido casi residual, subrayar que tanto Tehama, como Sunland son las variedades que contienen una mayor cantidad, presentando diferencias significativas frente al resto de variedades ($p \leq 0,05$).

En el otro extremo, Pedro y Serr son las variedades que contienen menor cantidad de ácido *p*-cumárico en su semilla (Tabla 5.5).

Al analizar el contenido en ácidos hidroxicinámicos de las nueces considerando la variable finca (Tabla 5.7), hay que destacar que el ácido clorogénico es el que presenta mayor variación entre fincas. Así, el contenido medio de ácido clorogénico en la finca Torre Blanca es un 25,6% menor que en El Chaparral ($4,17 \pm 1,71$ frente a $5,61 \pm 2,20$ mg/100 g de nuez).

Estas diferencias atribuidas en principio a las distintas condiciones climáticas que soportan en una u otra finca, temperaturas más suaves y mayores precipitaciones en El Chaparral, ya han sido publicadas en recientes estudios como posible causa de cambios en el perfil fenólico de distintas matrices alimentarias (Häkkinen & Törrönen, 2000; Awad *et al.*, 2001; Lata, 2007; Jakopič *et al.*, 2009b).

Tabla 5.7. Contenido en ácidos hidroxicinnámicos de las 10 variedades de nueces en función de la finca

Variedad	Finca		Finca		Finca	
	CH	TO	CH	TO	CH	TO
	Ácido clorogénico***	Ácido clorogénico***	Ácido ρ -cumárico**	Ácido ρ -cumárico**	Suma de No Flavonoides**	Suma de No Flavonoides**
Algaida	6,36 ± 0,36*	7,65 ± 0,34	207,30 ± 0,96*	220,90 ± 0,75	125,68 ± 0,37*	99,12 ± 0,29
Amigo	3,46 ± 0,09*	5,18 ± 0,17	165,33 ± 0,89*	169,86 ± 1,93	59,24 ± 0,25*	63,34 ± 1,42
Chico	1,76 ± 0,16*	3,08 ± 0,00	136,59 ± 0,27*	173,40 ± 6,07	70,04 ± 0,15*	89,51 ± 0,96
Eureka	7,39 ± 0,15*	2,54 ± 0,05	228,86 ± 21,36	210,59 ± 3,14	150,17 ± 0,88*	123,40 ± 0,29
Franquette	5,97 ± 0,09*	3,63 ± 0,03	127,01 ± 0,13*	220,33 ± 2,16	100,67 ± 1,06*	70,33 ± 0,08
Payne	9,29 ± 0,02*	6,36 ± 0,34	187,06 ± 0,04*	172,49 ± 4,32	120,85 ± 0,96	79,13 ± 0,27
Pedro	6,25 ± 0,32*	4,33 ± 0,08	154,01 ± 0,43	139,03 ± 16,42	95,15 ± 21,19*	82,66 ± 0,97
Serr	7,48 ± 0,44*	3,75 ± 0,06	145,00 ± 5,16	161,60 ± 0,34	62,91 ± 0,64*	64,67 ± 0,33
Sunland	4,75 ± 0,05*	2,75 ± 0,11	244,40 ± 0,27*	276,90 ± 4,66	124,50 ± 1,62*	106,03 ± 0,20
Tehama	3,34 ± 0,21*	2,16 ± 0,08	253,78 ± 25,95	292,63 ± 12,00	144,72 ± 0,17*	120,65 ± 0,33
	5,61 ± 2,20*	4,17 ± 1,71	184,93 ± 46,06	203,77 ± 49,01	105,39 ± 31,97*	89,88 ± 21,11

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)(**) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100$ g de nuez \pm SD(***) = Resultados expresados en $\text{mg}/100$ g de nuez \pm SD

Si evaluamos el comportamiento de las distintas variedades en una u otra finca, observamos como Eureka, Payne y Pedro presentan de manera significativa un mayor contenido en ambos ácidos hidroxicinámicos cuando son cultivados en la finca El Chaparral, de lo que se extrae que son variedades que se adaptan mejor a climas suaves y precipitaciones medias. Mientras que Algaida, Amigo y Chico, alcanzan un mayor contenido en ácido clorogénico y en ácido p -cumárico en Torre Blanca.

Por último destacar que la combinación genotipo/finca Payne/El Chaparral es la que presenta un mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos totales, con 9,47 mg/100 g de nuez, presentando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente al resto de combinaciones.

5.1.2.3. Total de compuestos fenólicos identificados y cuantificados

Un análisis conjunto del contenido en compuestos fenólicos de las 10 variedades de nueces nos permite, por un lado, constatar en qué grado participa cada uno de los compuestos de forma particular en el total de polifenoles identificados y cuantificados (Figura 5.10).

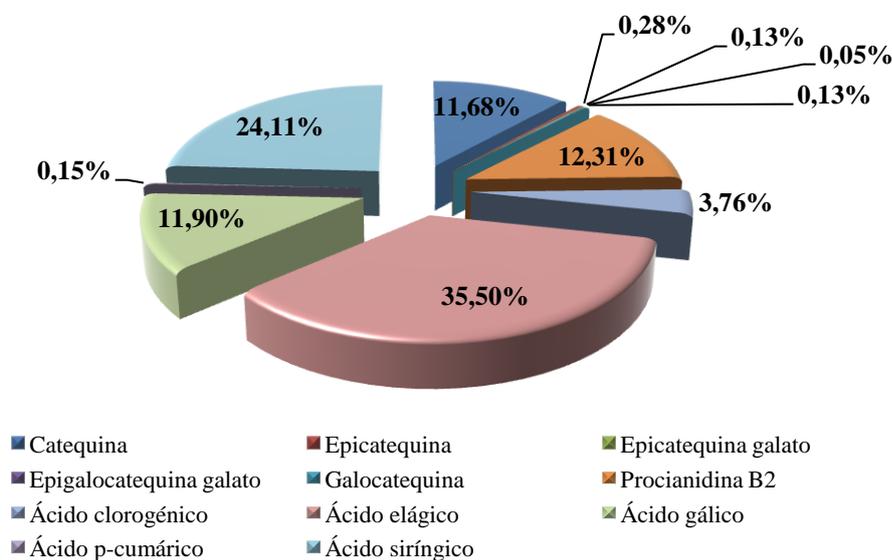


Figura 5.10. Distribución porcentual del contenido en compuestos fenólicos de las nueces

Y, por otro lado, caracterizar el contenido medio en estos compuestos de las nueces y jerarquizar a las variedades en base a su mayor riqueza en polifenoles (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Contenido en compuestos fenólicos de las 10 variedades de nueces

Variedad	Suma de compuestos fenólicos (mg/100 g de nuez \pm SD)¹
Algaida	150,80 \pm 13,30 ^{b, c, e, g, h}
Amigo	99,42 \pm 2,04 ^{a, d, f, i, j}
Chico	109,95 \pm 11,42 ^{a, d, f, i, j}
Eureka	163,00 \pm 15,66 ^{b, c, e, f, g, h}
Franquette	111,31 \pm 19,45 ^{a, d, i, j}
Payne	136,90 \pm 22,95 ^{b, c, d, h, j}
Pedro	122,32 \pm 14,37 ^{a, d, h, j}
Serr	90,24 \pm 4,32 ^{a, d, f, g, i, j}
Sunland	146,95 \pm 10,87 ^{b, c, e, h}
Tehama	163,72 \pm 13,80 ^{b, c, e, f, g, h}
	129,46 \pm 26,49

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

En este sentido cabe destacar las variedades Tehama y Eureka como aquellas que presentan un mayor contenido fenólico de manera significativa ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de genotipos estudiados, excepto frente a Sunland.

Por el contrario, Serr y Amigo presentan el menor contenido en compuestos fenólicos con cantidades inferiores a 100 mg/100 g de nuez.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en Fenoles totales medidos a través de Folin-Ciocalteu (apartado 5.1.1.), podemos destacar como Eureka y Tehama coinciden en ser las variedades con mayor contenido en Fenoles totales y en la suma de compuestos fenólicos cuantificados, mientras que Amigo y Serr las que menor contenido en una y otra medida obtienen. Esto explica la fuerte correlación existente entre Fenoles totales y la suma de compuestos

fenólicos cuantificados en el presente trabajo ($R = 0,92$) y que se muestra en la Figura 5.11.

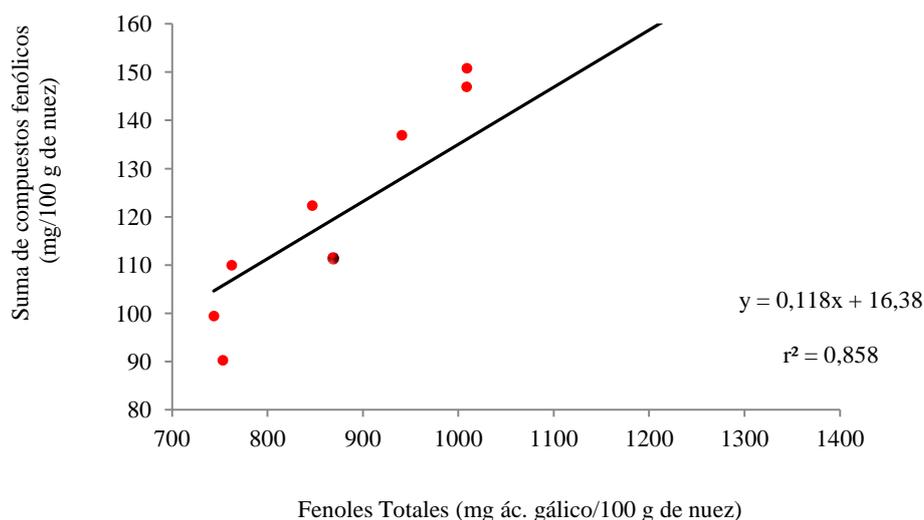


Figura 5.11. Regresión lineal de Fenoles Totales frente a la suma de compuestos fenólicos identificados

5.1.3. Actividad antioxidante de las nueces

5.1.3.1. Medidas de DPPH, ABTS y ORAC en nueces

El creciente interés en el estudio de los compuestos fenólicos de los alimentos y su contribución a la actividad antioxidante que éstos presentan (Shahidi *et al.*, 1992; Robards *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000), ha hecho que aumenten en los últimos años de manera exponencial los trabajos en los que se mide esta actividad y su potencial efecto protector frente a diferentes enfermedades (de Beer *et al.*, 2005; Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2010; Ranilla *et al.*, 2010; Jagtap *et al.*, 2011; Sagdic *et al.*, 2011; Vadivel & Biesalski, 2011; Kunyanga *et al.*, 2012).

Numerosas investigaciones se han centrado en analizar la actividad antioxidante de las nueces tanto en semilla (Labuckas *et al.*, 2008; Samaranyaka *et al.*, 2008; Arcan & Yemenicioğlu, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Christopoulos & Tsantili,

2012), como en otras partes de la planta del nogal (Pereira *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008a; Rahimipannah *et al.*, 2010; Fernández-Agulló *et al.*, 2013).

A la hora de abordar el estudio de la actividad antioxidante de un alimento es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno ofrece una información diferente (Frankel & Meyer, 2000; Aruoma, 2003; Prior *et al.*, 2005; Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Esta es la razón por la que se ha estudiado la actividad antioxidante de las nueces por los métodos DPPH, ABTS y ORAC, cuyos resultados se recogen en la Tabla 5.9.

Atendiendo a esta Tabla, subrayar que fue el método ORAC el que reprodujo mayores valores de actividad antioxidante en las nueces analizadas, presentando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a los métodos DPPH y ABTS.

Tabla 5.9. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces (μM Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD^{1,2})

Variedad	Método		
	DPPH	ABTS	ORAC
Algaida	155,77 \pm 17,18	166,56 \pm 6,76 d,h	207,89 \pm 17,28 b,c,d,j
Amigo	130,58 \pm 15,45 d,j	137,41 \pm 22,09 d,j	165,08 \pm 14,76 a,d,i,j
Chico	160,28 \pm 38,43	147,95 \pm 16,27 d,h,j	164,76 \pm 21,37 a,d,i,j
Eureka	218,39 \pm 53,77 b,e,g,h	219,39 \pm 41,54 a,b,c,e,f,g,h,i	270,91 \pm 21,08 a,b,c,d,f,g,h
Franquette	124,87 \pm 27,23 d,j	132,94 \pm 22,23 d,j	177,08 \pm 21,92 d,i,j
Payne	160,42 \pm 28,08	158,10 \pm 12,25 d,h	190,37 \pm 6,57 d,j
Pedro	134,21 \pm 32,05 d,j	139,29 \pm 33,96 d,j	202,72 \pm 16,04 d,j
Serr	137,05 \pm 35,96 d,j	103,30 \pm 3,87 a,c,d,f,i,j	187,42 \pm 19,29 d,j
Sunland	162,93 \pm 24,46	162,87 \pm 5,71 d,h	229,17 \pm 23,52 b,c,e
Tehama	208,54 \pm 59,93 b,e,g,h	193,78 \pm 26,77 b,c,e,g,h	265,43 \pm 23,15 a,b,c,e,f,g,h
	159,30 \pm 31,76 C	156,16 \pm 32,67 C	206,08 \pm 38,14 A,B

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

²Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : A, DPPH; B, ABTS; C, ORAC

Como se ha adelantado, son muchos los trabajos que han difundido resultados sobre actividad antioxidante en nueces, si bien, algunos han utilizado métodos diferentes a los empleados en nuestro caso (Yang *et al.*, 2009; Carlsen *et al.*, 2010; Jalili *et al.*, 2011 y 2012), o bien, los datos han sido expresados en diferentes unidades, lo que hace difícil la comparación entre unos y otros (Villano *et al.*, 2005).

Wu *et al.* (2004), llevaron a cabo un estudio en el que evaluaban la capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica mediante el método ORAC en alimentos de consumo habitual en Estados Unidos, obteniendo valores, expresados en las mismas unidades que en esta memoria, ligeramente inferiores a los obtenidos en nuestras variedades (135,41 $\mu\text{M ET/g}$ de nuez). Esta diferencia puede ser debida al tratamiento previo de la muestra, pues conseguían el extracto después de una extracción con hexano/diclorometano, seguida de una segunda con acetona/agua/ácido acético. Subrayar que en este estudio, las nueces, junto a las pecanas, fueron las que presentaron una mayor actividad antioxidante *in vitro* de todos los frutos secos analizados.

Numerosos trabajos han determinado la actividad antioxidante en nueces a través del método DPPH, muchos de los cuales han mostrado los resultados en valores de EC_{50} o cantidad de extracto necesario para reducir al 50% el DPPH inicial (Arranz *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2010). Otros los han expresado como ppm de Equivalentes de BHT, (Butil hidroxitolueno) (Labuckas *et al.*, 2008; Abbasi *et al.*, 2010), μg de ácido gálico/mg o como μg de Equivalentes de α -Tocoferol/100 mg (Salcedo *et al.*, 2010).

Abe *et al.* (2010), en un estudio en Brasil en el que comparaban el contenido en fenoles y la capacidad antioxidante de diferentes frutos secos sí expresaron los resultados de igual forma que en nuestro estudio, y obtuvieron valores similares de DPPH a los difundidos aquí ($120 \pm 10 \mu\text{M ET/g}$ de nuez). En este caso, las nueces resultaron ser los frutos secos con mayor capacidad antioxidante.

Christopoulos y Tsantili (2012), obtuvieron resultados ligeramente superiores a los nuestros al estudiar el efecto de la conservación a bajas temperaturas de la semilla de la nuez.

Vijaya Kumar Reddy *et al.* (2010), llevaron a cabo un estudio similar en frutas frescas y frutos secos consumidos en la India, obteniendo resultados mucho

más bajos a los presentados en esta Tesis ($61,49 \pm 4,56 \mu\text{M ET/g}$ de nuez). Estas diferencias pueden deberse a los distintos métodos de extracción utilizados, ya que, mientras en nuestro estudio se emplearon 3 pasos de extracción consecutivos (metanol/agua, acetona/agua y metanol/ácido sulfúrico), en este trabajo únicamente se empleó agua destilada.

Arcan y Yemenicioğlu (2009), obtuvieron resultados de actividad antioxidante superiores a los nuestros al estudiar la actividad antioxidante en nueces frescas o desecadas con o sin la piel que cubre la semilla a través del método ABTS ($11.076 \mu\text{M de ET/100 g}$ de materia seca).

Pellegrini *et al.* (2006), realizaron un trabajo en el que empleaban diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante *in vitro* en distintas matrices alimenticias consumidas en Italia. En él obtuvieron resultados de ABTS similares a los obtenidos en nuestras variedades, $137,0 \mu\text{M ET/g}$ de nuez. Un estudio muy parecido fue el que realizaron Tosum *et al.* (2011), en Turquía, quienes obtuvieron valores de ABTS comprendidos entre 97 y $171 \mu\text{M ET/g}$ de nuez en el análisis de 13 variedades autóctonas de nogal.

Si analizamos la actividad antioxidante de las diferentes variedades de nogal estudiadas, subrayar como Eureka y Tehama son las que presentan mayor actividad de todas las variedades con independencia del método por el que hayan sido medidas. Ambas variedades presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en ABTS respecto al resto de variedades.

En sentido contrario, Franquette y Amigo son las que presentan una menor actividad antioxidante al ser analizadas a través de DPPH. Serr y, nuevamente, Franquette son las que menores valores medios dan cuando el radical utilizado es el ABTS, siendo, por último Chico y Amigo los genotipos con menores valores medios de ORAC de los 10 analizados.

Estos datos explican la fuerte correlación existente entre los resultados obtenidos por los diferentes métodos de análisis (Figura 5.12).

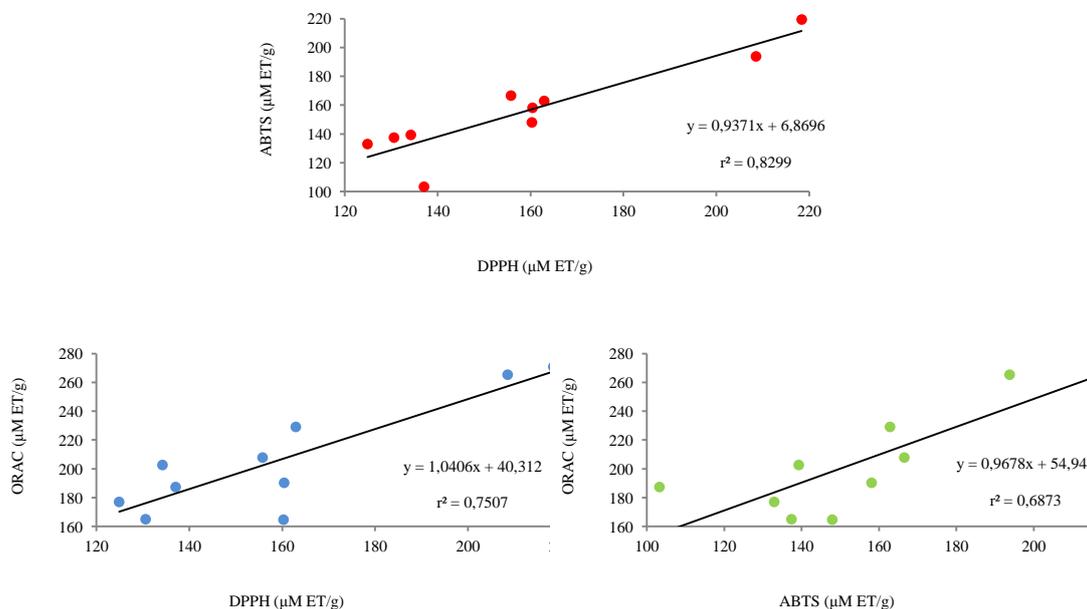


Figura 5.12. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH frente ABTS, DPPH frente a ORAC y ABTS frente a ORAC

Son muchos los trabajos en los que se ha medido la actividad antioxidante de algún alimento a través de diferentes métodos (Thaipong *et al.*, 2006; Vasco *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008 y 2010; Dudonné *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Babbar *et al.*, 2011; Floegel *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). Es el caso de Vijaya Kumar Reddy *et al.* (2010), quienes obtuvieron una relación fuerte entre DPPH y FRAP ($R = 0,81$; $\rho \leq 0,05$) en el análisis de diferentes frutos secos.

Tsantili *et al.* (2011), también encontraron una alta correlación entre estos mismos métodos en un estudio en el que medían la actividad antioxidante en pistachos para examinar la influencia que en ella tenía las condiciones de almacenamiento.

Atendiendo nuevamente a los resultados expuestos en la Tabla 5.9, hay que destacar que el método ORAC resultó ser el más preciso a la hora de medir la actividad antioxidante en el 60% de las variedades, con coeficientes de variación (CV) siempre por debajo del 12,97%. En las otras 4 variedades fue el método ABTS el que reprodujo resultados de forma más precisa ($CV \leq 24,38\%$). El método DPPH no fue en ningún caso el más preciso ($CV \leq 26,23\%$).

Si analizamos cómo han podido influir las condiciones climáticas en el poder antioxidante *in vitro* en las diferentes variedades (Tabla 5.10), observamos como todas las variedades presentaron valores de DPPH significativamente más altos ($p \leq 0,05$) al ser cultivadas en la finca El Chaparral, destacando la pérdida de un 41,2% y un 32,6% de capacidad antioxidante que sufren la variedades Tehama y Eureka, respectivamente, al ser cultivadas en Torre Blanca.

Precisamente son Tehama y Eureka en El Chaparral las que presentan una mayor actividad antioxidante mediante el método DPPH de todas las variedades, mientras que Franquette y Serr en Torre Blanca las que valores más bajos alcanzan.

La actividad antioxidante de las nueces determinada a través del método ABTS también es significativamente mayor en El Chaparral que en Torre Blanca (valores medios de $166,34 \pm 41,78$ y $145,98 \pm 30,07 \mu\text{M ET/g}$ de nuez, respectivamente), si bien, el comportamiento ya no es generalizado en todas las variedades.

Así, las variedades Algaida, Payne, Sunland y Chico (esta última de forma significativa) obtienen mayores valores de actividad antioxidante por ABTS cuando provienen de la finca Torre Blanca. El resto de variedades presentan valores más altos en El Chaparral, destacando de nuevo Eureka por ser la variedad que más se ve influenciada por el factor finca, pues en El Chaparral alcanza valores medios de $256,60 \pm 7,10$ frente a $182,19 \pm 10,63 \mu\text{M ET/g}$ de nuez obtenidos en Torre Blanca.

Tabla 5.10. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces en función de la finca (μM Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD^{1/2})

Variedad	DPPH		ABTS		ORAC	
	El Chaparral	Torre Blanca	El Chaparral	Torre Blanca	El Chaparral	Torre Blanca
Algaida	169,95 \pm 8,74*	141,59 \pm 7,67	166,25 \pm 7,71	166,87 \pm 7,38	219,26 \pm 15,92	196,52 \pm 10,28
Amigo	143,31 \pm 6,87*	117,85 \pm 7,97	156,95 \pm 3,34*	117,86 \pm 7,96	176,20 \pm 11,48*	153,97 \pm 6,51
Chico	192,15 \pm 20,44*	128,40 \pm 15,06	133,97 \pm 5,81*	161,94 \pm 6,45	182,77 \pm 11,26*	146,76 \pm 6,57
Eureka	261,02 \pm 9,37*	175,77 \pm 9,48	256,60 \pm 7,10*	182,19 \pm 10,63	285,36 \pm 16,89	256,46 \pm 14,11
Franquette	146,22 \pm 4,98*	103,52 \pm 1,90	146,40 \pm 7,06	119,48 \pm 12,00	157,70 \pm 5,70*	196,46 \pm 6,50
Payne	184,96 \pm 12,55*	135,87 \pm 5,58	152,51 \pm 1,34	163,70 \pm 16,72	191,79 \pm 8,35	188,95 \pm 5,66
Pedro	162,21 \pm 9,06*	106,21 \pm 11,58	169,75 \pm 3,30*	108,83 \pm 9,48	211,54 \pm 11,55	193,90 \pm 16,62
Serr	169,69 \pm 3,98*	104,41 \pm 4,59	105,02 \pm 4,75	101,57 \pm 2,42	221,08 \pm 21,01*	153,77 \pm 4,50
Sunland	185,06 \pm 0,86*	140,80 \pm 5,21	158,18 \pm 3,93*	167,56 \pm 0,45	248,17 \pm 13,80*	210,17 \pm 10,47
Tehama	262,76 \pm 10,67*	154,33 \pm 6,89	217,79 \pm 5,61*	169,77 \pm 5,62	268,43 \pm 15,35	262,43 \pm 7,98
	187,73 \pm 43,24*	130,88 \pm 23,83	166,34 \pm 41,78*	145,98 \pm 30,07	216,23 \pm 42,26	195,94 \pm 39,28

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

Subrayar a su vez como Pedro y, al igual que sucedía bajo el método DPPH, Serr en Torre Blanca son las que presentan menores valores medios de ABTS.

Analizando los resultados medios obtenidos de ORAC en una u otra finca, observamos como es el único método bajo el que no se producen diferencias significativas en la actividad antioxidante motivadas por el factor clima, pues las nueces en el Chaparral alcanzan valores medio ligeramente mayores a los obtenidos en Torre Blanca.

Sí aparecen diferencias si estudiamos el comportamiento de las distintas variedades de forma individual, así, Amigo, Chico, Serr y Sunland tienen mayor actividad antioxidante *in vitro* cuando son cultivadas en El Chaparral, mientras que Franquette alcanza un mayor potencial antioxidante en Torre Blanca.

Destacar, al igual que ha sucedido en las medidas de DPPH y ABTS, como Eureka y Tehama cultivados en El Chaparral son los genotipos que mayores valores medio de ORAC alcanzan, mientras que, nuevamente, Chico y Serr en Torre Blanca los que menos actividad antioxidante presentan.

De todos estos resultados se deduce que la actividad antioxidante de las nueces sí se ve condicionada por factores medioambientales tales como la temperatura o las precipitaciones, destacando a la variedad Eureka como aquella que más se ve influenciada por éstos, pues en Torre Blanca presenta valores medios de actividad antioxidante más bajos que en El Chaparral cualquiera que sea el método de medida empleado.

Por el contrario, Payne muestra una mayor capacidad de adaptación a las condiciones meteorológicas, pues presenta valores medios muy próximos de actividad antioxidante en ambas fincas, independientemente del método utilizado.

Existen pocos trabajos en la literatura científica que analicen la relación entre climatología y actividad antioxidante en alimentos. En este sentido, Ghasemi *et al.* (2011), realizaron un estudio parecido al presentado en esta memoria, en el que evaluaban la influencia de factores medioambientales en la actividad antioxidante de los extractos del pericarpio de nueces cultivadas en diferentes orígenes. Los resultados que obtuvieron fueron similares a los obtenidos en nuestro caso, pues pudieron concluir que la actividad antioxidante se veía afectada por factores como la altitud, la humedad relativa, la temperatura

entre otros. En concreto, las nueces presentaron mayores valores de DPPH (EC_{50} $122 \pm 4,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) en la región iraní de Chogholondi (1350 m de altitud, temperatura media de $16,8 \text{ }^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 47%), mientras que los valores más bajos (EC_{50} $302 \pm 13 \mu\text{g ml}^{-1}$) se obtuvieron en las nueces cultivadas en Imam Reza Park (250 m de altitud, temperatura media de $17,8 \text{ }^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 70%).

Dinis *et al.* (2012), observaron como la altitud y temperaturas más suaves influían positivamente en la actividad antioxidante (medidas a través de DPPH, ABTS y FRAP) de castañas cultivadas en diferentes regiones portuguesas.

Bolling *et al.* (2010b), pudieron comprobar cómo la actividad antioxidante medida en las semillas de almendros de California variaba de un año a otro y, si bien no recogieron datos sobre la climatología sufrida en ese periodo, sí achacaron a este factor las diferencias encontradas, pues el resto de factores (muestreo, técnicas de cultivo, almacenamiento postcosecha, etc.) no se modificaron en los distintos años. Barreira *et al.* (2008), en un estudio en Portugal en el que comparan 10 variedades de almendras también justifican en parte las diferencias encontradas en el contenido en polifenoles y en la actividad antioxidante entre las variedades por factores tales como la climatología y las condiciones agrícolas.

5.1.3.2. Relación entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante en nueces

La relación entre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los alimentos ha sido ampliamente documentada. La mayoría de los trabajos concluyen la existencia de una fuerte correlación entre ambas medidas (Saxena *et al.*, 2007; Mulero *et al.*, 2009 y 2011; Shen *et al.*, 2009; Tabart *et al.*, 2009; Beserra Almeida *et al.*, 2011; Chaieb *et al.*, 2011; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2011; Zilic *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2012; Terpinc *et al.*, 2012); pocos son los que observan una débil relación (Jayasekera *et al.*, 2011; Sulaiman *et al.*, 2011; Tlili *et al.*, 2011).

En frutos secos también ha sido estudiada esta relación (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007; Barreira *et al.*, 2008; Neri *et al.*, 2010; Tsantili *et al.*, 2011) y de forma particular en nueces (Pereira *et al.*, 2008; Arcan & Yemenicioğlu, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Salcedo *et al.*, 2010; Fernández-Agulló *et al.*, 2013).

En nuestro trabajo encontramos, al igual que en los ya citados, una fuerte correlación entre actividad antioxidante (cualquiera que sea el método de medida) y fenoles totales (Figura 5.13), destacando la que se produce al utilizar el método ORAC ($R = 0,952$; $\rho \leq 0,05$).

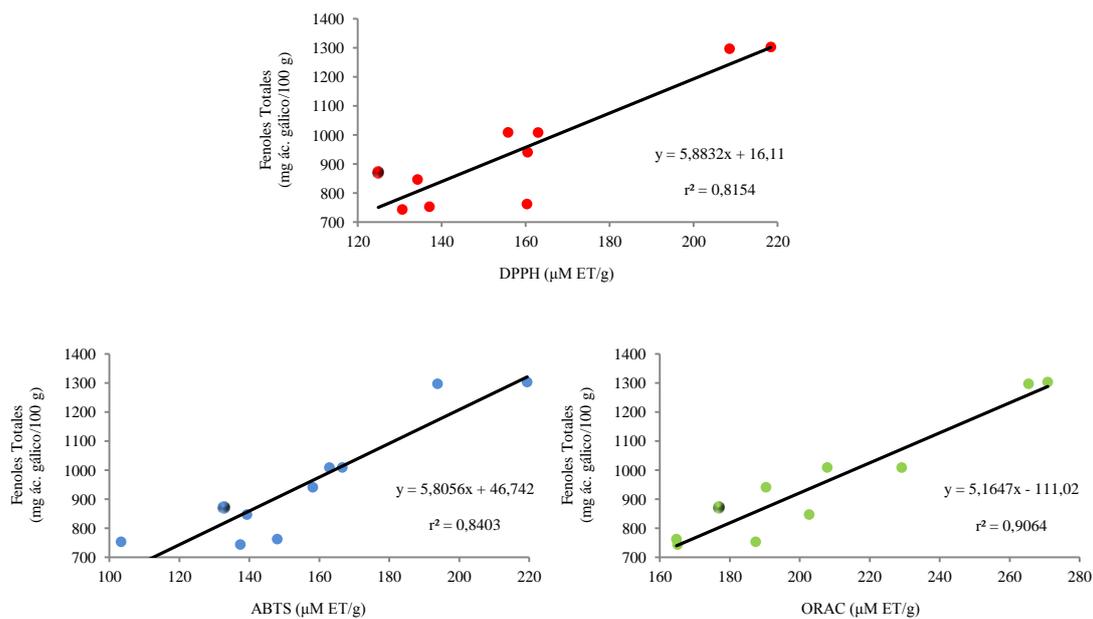


Figura 5.13. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH, ABTS y ORAC frente a Fenoles Totales

Si analizamos de forma separada cómo contribuyen a la actividad antioxidante los compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides cuantificados en las nueces (Figura 5.14), observamos como los segundos (ácidos fenólicos e hidroxicinámicos, mayoritariamente) presentan una mayor correlación con la actividad antioxidante ($R = 0,855$ en DPPH, $R = 0,914$ en ABTS y $R = 0,908$ en ORAC; $\rho \leq 0,05$).

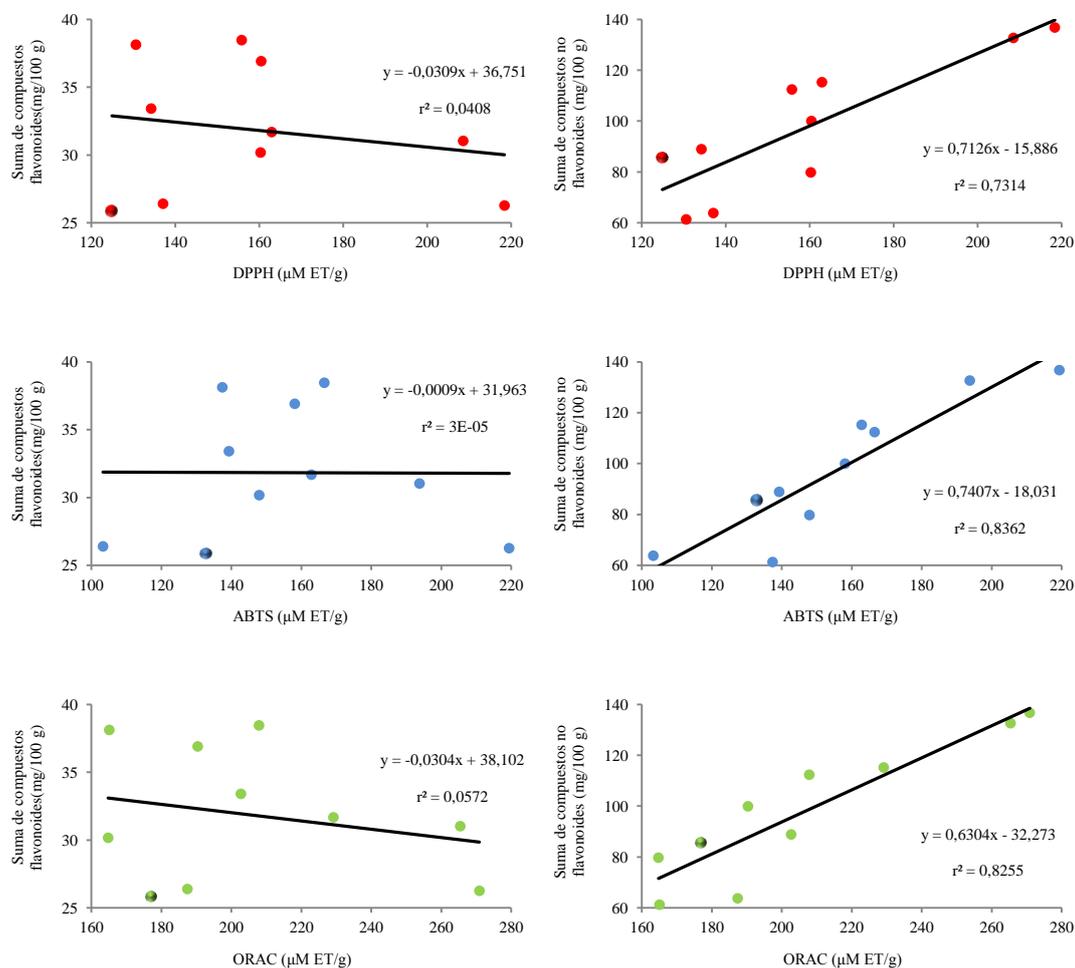


Figura 5.14. Regresiones lineales de la actividad antioxidante de las nueces medidas por DPPH, ABTS y ORAC frente a compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides

Estos resultados se pueden explicar al analizar el perfil fenólico de las nueces. Como se expuso en el apartado 5.1.2. de la presente memoria, la mayor parte de compuestos fenólicos cuantificados en las variedades seleccionadas correspondían a compuestos no flavonoides, éstos constituían el 75,42% de todos los compuestos identificados.

Otros estudios también apoyan los resultados obtenidos (Meda *et al.*, 2005; Andarwulan *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2012). Así, Dinis *et al.* (2012), al analizar la

actividad antioxidante del fruto del castaño en función de su origen geográfico, obtuvieron unas fuertes correlaciones entre la actividad antioxidante medida por diferentes métodos (ABTS, DPPH y FRAP) y el contenido en fenoles totales ($r^2 = 0,84, 0,46$ y $0,79$, para cada método, respectivamente; $\rho \leq 0,01$); sin embargo, al estudiar las correlaciones entre estos métodos y el contenido en flavonoides, éstas resultaron ser mucho menores ($r^2 = 0,18, 0,40$ y $0,28$, para cada método, respectivamente; $\rho \leq 0,01$).

Tsantili *et al.* (2011), en el estudio antes mencionado también encontró una fuerte, aunque menor correlación entre el contenido en flavonoides y la actividad antioxidante (DPPH y FRAP) en pistachos ($R = 0,959$ y $R = 0,963$, respectivamente; $\rho \leq 0,001$) que la existente entre ésta y el contenido en fenoles totales ($R = 0,991$ y $R = 0,992$; $\rho \leq 0,001$).

Por otro lado, los elagitaninos (cuantificados aquí como ácido elágico) son los compuestos fenólicos mayoritarios en las nueces estudiadas, y son muchos los estudios que afirman la gran actividad antioxidante que poseen (Zafrilla *et al.*, 2001; Vattem & Shetty, 2003; Cerdá *et al.*, 2005b; Seeram *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Soong & Barlow, 2006; Papoutsi *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2008; Landete, 2011). Este hecho también puede explicar la mayor correlación entre compuestos no flavonoides y actividad antioxidante encontrada.

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO GRASO DE LAS NUECES

El contenido en aceite de las nueces ha sido ampliamente estudiado dado el carácter saludable que se le atribuye. Son numerosos los estudios que relacionan el perfil graso de las nueces con sus efectos saludables, así se ha demostrado que una ingesta moderada de nueces mejora el perfil lipídico en sangre (Chisholm *et al.*, 1998; Almario *et al.*, 2001; Marangoni *et al.*, 2007; Sabaté *et al.*, 2010; Fitschen *et al.*, 2011), ayuda en la lucha contra el síndrome metabólico (Lavedrine *et al.*, 1999; Casas-Agustench *et al.*, 2011b; Stonehouse, 2011; Aronis *et al.*, 2012), mejora la función endotelial (Ros *et al.*, 2004; Jiménez-Gómez *et al.*, 2009; López-Uriarte *et al.*, 2010) y, en estudios llevados a cabo en ratones, parece contribuir en la prevención de algún tipo de cáncer (Hardman & Ion, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2012; Nagel *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se ha caracterizado el perfil de ácidos grasos de las 10 variedades de nogal así como su contenido en humedad y grasa total.

5.2.1. Humedad y Grasa total de las nueces

El contenido en humedad y grasa total de los genotipos de nueces Algaida, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama se recoge en la Tabla 5.11.

Todas las variedades presentan un contenido en humedad similar, oscilando los valores entre un 3,31%, de la variedad Amigo, y un 4,20% de la variedad Pedro.

Estos valores son similares a los obtenidos en otros estudios (Amaral *et al.*, 2003; Venkatachalam & Sathe, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Abe *et al.*, 2010) y ligeramente más bajos a los obtenidos por Savage *et al.* (1999), en un estudio en el que evaluaba la estabilidad del aceite obtenido en diferentes variedades de nuez, diferencia posiblemente debida a que en este último trabajo se empleó un método de secado (secador de aire forzado a 30 °C) diferente al empleado en nuestro estudio. También Arcan y Yemenicioglu (2009), obtuvieron un porcentaje en humedad en nueces superior al nuestro (4,9%).

Tabla 5.11. Contenido en Humedad y Grasa total de las 10 variedades de nueces ¹

Variedad	% de humedad \pm SD	% de grasa total \pm SD
Algaida	3,40 \pm 0,13	63,69 \pm 0,94 c, d, e, g, h, i, j
Amigo	3,31 \pm 0,53 d, f, g	65,85 \pm 1,60 e, h
Chico	3,42 \pm 0,30	67,21 \pm 1,71 a
Eureka	4,18 \pm 0,64 b	68,25 \pm 1,93 a, f
Franquette	3,63 \pm 0,20	70,28 \pm 2,48 a, b, f
Payne	4,15 \pm 0,31 b	64,05 \pm 0,84 d, e, g, h, i, j
Pedro	4,20 \pm 0,64 b	69,18 \pm 1,45 a, f
Serr	3,51 \pm 0,33	70,37 \pm 1,04 a, b, f
Sunland	4,12 \pm 0,60	67,65 \pm 3,17 a, f
Tehama	3,40 \pm 0,14	68,90 \pm 1,14 a, f
	3,73 \pm 0,37	67,54 \pm 2,37

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

Muradoglu *et al.* (2010), por el contrario, obtuvieron porcentajes más bajos de humedad en variedades de nueces procedentes del este de Turquía (1,5%). De la misma forma que Salcedo *et al.* (2010), quienes obtuvieron un porcentaje en humedad del 2,23%.

El contenido medio en grasa total de las 10 variedades estudiadas (Tabla 5.11) es similar al publicado por otros trabajos (García *et al.*, 1994; Savage *et al.*, 1999; Sze-Tao & Sathe, 2000; Amaral *et al.*, 2003; Caglarirmak, 2003; Prasad, 2003; Ozkan & Koyuncu, 2005; Vanhanen & Savage, 2006; Miraliakbari & Shahidi, 2008; Ozkan *et al.*, 2010; Salcedo *et al.*, 2010; Gecgel *et al.*, 2011; Bakkalbaşı *et al.*, 2012).

Dogan y Akgul (2005), obtuvieron un contenido en aceite que oscilaba entre un 65,00 \pm 0,06 y 70,00 \pm 0,58 % al analizar la composición en ácidos grasos de cuatro variedades de nogal en Turquía. Igualmente, Zwarts *et al.* (1999), estudiaron el contenido graso de 10 variedades de nueces cultivadas en Nueva

Zelanda, obteniendo valores en consonancia con los presentados en este trabajo (62,4-68,7%).

Toselli *et al.* (2005), compararon la composición de las nueces en función del tipo de cultivo, tradicional o ecológico en Italia, obteniendo contenidos en grasa total similares a los obtenidos para las variedades Franquette, Pedro y Serr (contenidos entre el 68,1% y el 70,4%).

Li *et al.* (2006b), sin embargo, obtuvieron valores en el contenido en aceite superiores a los de nuestro estudio (75,4%). Pereira *et al.* (2008), también obtuvieron resultados ligeramente mayores (70,78%) en nueces cultivadas en Portugal, si bien, destacar como la variedad Franquette, que también fue analizada en este estudio, sí presentó un contenido en aceite muy parecido al que presenta esta misma variedad en nuestro trabajo ($72,14 \pm 0,27\%$ en Portugal frente a un $70,28 \pm 2,48\%$ en nuestro caso). Martínez y Maestri (2008), en Argentina obtuvieron igualmente mayores contenidos en aceite (próximos al 74%), siendo de nuevo interesante resaltar que en este trabajo también se analizaron las variedades Franquette y Serr, que en nuestro estudio fueron las variedades que mayor porcentaje en grasa presentaban. En sentido contrario, Muradoglu *et al.* (2010), al igual que sucedía con el porcentaje en humedad, obtuvieron contenidos menores de grasa ($58,2 \pm 4,5\%$).

Por último, es importante subrayar las diferencias encontradas entre variedades. Como se muestra en la Tabla 5.12, el contenido en grasa de los 10 genotipos analizados varía desde el $63,69 \pm 0,94\%$ que presenta la variedad Algaida al $70,37 \pm 1,04\%$ de Serr.

Al comparar el contenido en humedad y grasa total de los 10 genotipos de nueces, teniendo en cuenta la variable finca (Tabla 5.12), podemos observar como ocho de los genotipos, salvo Pedro y Tehama, presentan un mayor porcentaje de humedad en la finca El Chaparral que en Torre Blanca; siendo esta diferencia significativa ($\rho \leq 0,05$) en las variedades Amigo, Eureka, Franquette, Payne, Serr y Sunland.

Tabla 5.12. Contenido en Humedad y Grasa total de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% \pm SD)

Variedad	Humedad		Grasa total	
	El Chaparral	Torre Blanca	El Chaparral	Torre Blanca
Algaida	3,49 \pm 0,07	3,32 \pm 0,14	63,13 \pm 0,51	64,26 \pm 1,00
Amigo	3,79 \pm 0,08*	2,84 \pm 0,16	64,76 \pm 1,49	66,95 \pm 0,77
Chico	3,68 \pm 0,14*	3,16 \pm 0,13	66,31 \pm 0,60	68,11 \pm 2,13
Eureka	4,76 \pm 0,08*	3,60 \pm 0,08	69,89 \pm 1,09*	66,61 \pm 0,35
Franquette	3,81 \pm 0,07*	3,45 \pm 0,07	68,11 \pm 1,01*	72,47 \pm 0,47
Payne	4,41 \pm 0,10*	3,89 \pm 0,19	63,38 \pm 0,66*	64,71 \pm 0,10
Pedro	3,62 \pm 0,07*	4,79 \pm 0,11	68,26 \pm 1,48	70,12 \pm 0,73
Serr	3,81 \pm 0,03*	3,21 \pm 0,14	71,07 \pm 0,95	69,68 \pm 0,58
Sunland	4,67 \pm 0,05*	3,57 \pm 0,15	64,78 \pm 0,07*	70,53 \pm 0,59
Tehama	3,36 \pm 0,21	3,44 \pm 0,06	68,92 \pm 0,89	68,90 \pm 1,58
	3,94 \pm 0,48*	3,53 \pm 0,51	66,86 \pm 2,80	68,23 \pm 2,66

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

El contenido medio en humedad de las variedades cultivadas en El Chaparral es significativamente superior que el alcanzado en Torre Blanca (Tabla 5.12).

Esto puede explicar que el contenido en grasa sea ligeramente más alto en Torre Blanca que en El Chaparral. En este sentido, las variedades Franquette, Payne y Sunland en Torre Blanca presentan un contenido de grasa significativamente ($\rho \leq 0,05$) mayor que el obtenido al ser cultivadas en El Chaparral y, a su vez, un porcentaje de humedad significativamente menor.

Franquette en Torre Blanca es la variedad que presenta un mayor contenido en grasa de todas las analizadas, mientras que es Algaida en El Chaparral, la que menor contenido graso tiene.

Gharibzahedi *et al.* (2012), compararon las características geométricas y la composición química de nueces cultivadas en áreas geográficas con diferentes

altitudes y que presentaban climas distintos, obteniendo resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Así, en la región iraní de Chaboksar, caracterizada por tener un clima semiárido (similar al encontrado en Torre Pacheco), las nueces contenían un 67,35% de grasa y un porcentaje en humedad del 3,33%, mientras que en Karaj (situada a mayor altitud y con precipitaciones del orden de 320 mm) el contenido en grasa era de un 62,3% y el porcentaje en humedad del 4,64% encontrándose, por tanto, diferencias significativas motivadas por las condiciones edafoclimáticas ($\rho \leq 0,05$).

Bakkalbaşı *et al.* (2012), también encontraron diferencias en el contenido en aceite de 5 variedades de nueces al comparar los resultados obtenidos en 2004 y en 2005.

Ali *et al.* (2010), al estudiar la composición nutricional de 6 variedades de nogal cultivadas en tres localidades de Pakistán con diferentes altitudes, obtuvieron variaciones en el contenido tanto de humedad (oscilaban entre 2,76 y 4,2%), como de grasa total (63,54 a 69,92%).

Lavedrine *et al.* (1997), investigaron el efecto del área geográfica (USA y Francia) y, por tanto, de las condiciones edafoclimáticas en la composición de las variedades Franquette y Hartley y, si bien no cuantificaron el contenido en aceite, sí observaron diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) en el contenido en sustancias de carácter lipídico, como la vitamina E.

Diversos estudios en otros frutos secos han concluido que el área geográfica afecta a su contenido en grasa (Parcerisa *et al.*, 1993 y 1998; Koyuncu *et al.*, 1997a; Balta *et al.*, 2006; Köksal *et al.*, 2006; Seferoglu *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008b, Alasalvar *et al.*, 2009).

5.2.2. Perfil de ácidos grasos de las nueces

La caracterización lipídica de las nueces ha sido objeto de numerosas investigaciones (Zwarts *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Miraliakbari & Shahidi, 2008; Pereira *et al.*, 2008; Gecgel *et al.*, 2011; Li & Hu, 2011; Moser, 2012). Éstas han coincidido en afirmar que el contenido en ácidos grasos de las nueces corresponde a ácidos grasos insaturados, siendo residual el contenido en saturados.

Mediante cromatografía de gases se han identificado y cuantificado 8 ácidos grasos en las variedades objeto de estudio, comparando sus tiempos de retención con los de sus estándares puros y el área del pico en los cromatogramas de las muestras con los de dichos estándares. A modo de ejemplo, la Figura 5.15 muestra el cromatograma de la variedad Algaida en Torre Blanca.

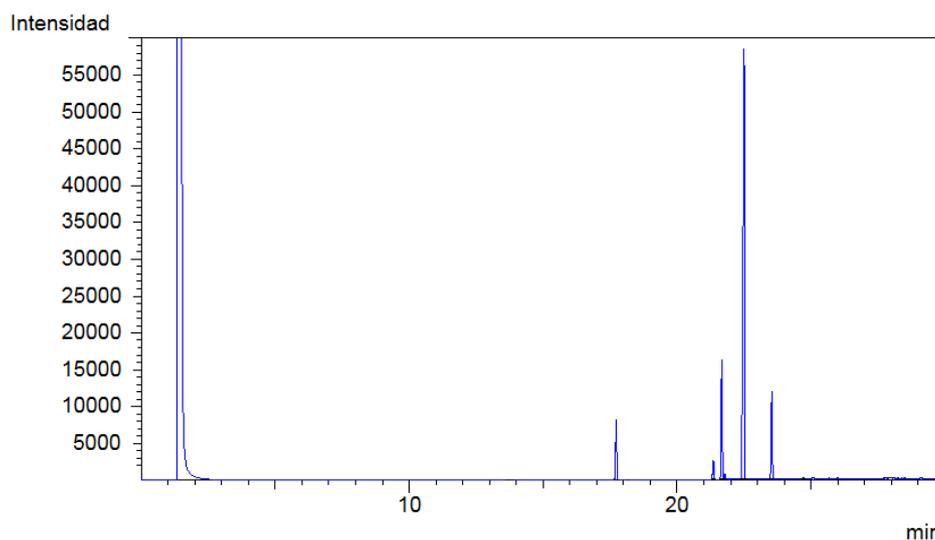


Figura 5.15. Cromatograma de la variedad Algaida en el que se identifican los ácidos grasos: mirístico (TR 13,87), palmítico (TR 17,72), palmitoleico (TR 18,17), esteárico (TR 21,34), oleico (21,67), linoleico (TR 22,50), linolénico (23,53) y araquídico (TR 24,72)

La Tablas 5.13 y 5.14 muestran el contenido en ácidos grasos saturados e insaturados de las 10 variedades de nueces. En ellas cabe destacar como el ácido graso mayoritario en las 10 variedades de nueces es el ácido linoleico, seguido del oleico y del linolénico. Siendo los ácidos mirístico, araquídico y palmitoleico los minoritarios, encontrándose en cantidades casi trazas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Savage *et al.*, 1999; Sze-Tao & Sathe, 2000; Amaral *et al.*, 2003; Caglarirmak, 2003; Crews *et al.*, 2005; Dogan & Akgul, 2005; Ozkan & Koyuncu, 2005; Li *et al.*, 2006b y 2007; Venkatachalam & Sathe, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Muradoglu *et al.*, 2010; Gecgel *et al.*, 2011; Rabrenovic *et al.*, 2011; Bakkalbaşı *et al.*, 2012; Ozrenk *et al.*, 2012).

Tabla 5.13. Contenido en ácidos grasos saturados de las 10 variedades de nueces (% \pm SD) ¹

Variedad	Mirístico	Palmítico	Estearico	Araquídico	AGS
Algaida	0,04 \pm 0,02	6,75 \pm 0,35	1,96 \pm 0,60	0,09 \pm 0,02	8,87 \pm 0,89
Amigo	0,07 \pm 0,06	6,62 \pm 1,26	1,89 \pm 0,29	0,09 \pm 0,02	8,69 \pm 1,52
Chico	0,06 \pm 0,02	7,12 \pm 0,97	2,21 \pm 0,36	0,11 \pm 0,02	9,51 \pm 1,14
Eureka	0,05 \pm 0,01	7,13 \pm 0,89	2,18 \pm 0,46	0,07 \pm 0,03	9,45 \pm 1,13
Franquette	0,05 \pm 0,01	7,76 \pm 0,43	1,99 \pm 0,32	0,09 \pm 0,02	9,91 \pm 0,77
Payne	0,02 \pm 0,02	7,28 \pm 0,93	2,37 \pm 0,28	0,10 \pm 0,08	9,79 \pm 0,68
Pedro	0,06 \pm 0,05	7,36 \pm 0,80	2,36 \pm 0,17	0,08 \pm 0,01	9,90 \pm 0,86
Serr	0,05 \pm 0,02	7,39 \pm 0,88	2,32 \pm 0,21	0,09 \pm 0,01	9,88 \pm 0,79
Sunland	0,05 \pm 0,02	7,59 \pm 0,42	2,11 \pm 0,16	0,07 \pm 0,01	9,85 \pm 0,29
Tehama	0,05 \pm 0,01	7,68 \pm 0,32	2,04 \pm 0,21	0,07 \pm 0,01	9,85 \pm 0,33
	0,05 \pm 0,01	7,27 \pm 0,37	2,14 \pm 0,17	0,09 \pm 0,01	9,57 \pm 0,94

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

Tabla 5.14. Contenido en ácidos grasos insaturados de las 10 variedades de nueces (% ± SD) ¹

Variedad	Palmitoleico	Oleico	Linoleico	Linolénico	AGMI	AGPI	ω6/ω3
Algaida	0,05 ± 0,03	16,39 ± 2,28	63,79 ± 3,79	10,88 ± 2,24	16,45 ± 2,31	74,68 ± 1,61	6,12 ± 1,50
Amigo	0,05 ± 0,02	15,54 ± 3,86	63,63 ± 3,90	12,08 ± 1,07	15,60 ± 3,84	75,72 ± 2,93	5,32 ± 0,78
Chico	0,06 ± 0,01	14,55 ± 2,94	62,70 ± 2,94	13,15 ± 1,39 ⁱ	14,62 ± 2,94	75,87 ± 2,57 ^d	4,82 ± 0,63
Eureka	0,08 ± 0,02	18,07 ± 1,15	61,57 ± 0,71	10,82 ± 1,42	18,16 ± 1,14	72,40 ± 1,12 ^c	5,78 ± 0,82
Franquette	0,07 ± 0,02	17,25 ± 0,90	61,96 ± 1,23	10,80 ± 1,00	17,33 ± 0,92	72,77 ± 0,73	5,78 ± 0,65
Payne	0,07 ± 0,02	16,23 ± 1,84	62,06 ± 1,89	11,83 ± 1,83	16,32 ± 1,82	73,90 ± 1,21	5,37 ± 0,96
Pedro	0,04 ± 0,02	16,98 ± 0,72	60,76 ± 1,43	12,31 ± 1,31	17,03 ± 0,74	73,07 ± 0,93	4,99 ± 0,62
Serr	0,05 ± 0,01	14,79 ± 1,89	62,84 ± 1,93	12,43 ± 1,10	14,85 ± 1,88	75,27 ± 1,92	5,10 ± 0,57
Sunland	0,08 ± 0,01	15,63 ± 1,09	64,33 ± 1,50	10,09 ± 0,18 ^c	15,72 ± 1,09	74,43 ± 1,37	6,38 ± 0,25
Tehama	0,06 ± 0,02	14,43 ± 2,14	63,95 ± 3,46	11,69 ± 1,21	14,49 ± 2,14	75,65 ± 2,27	5,54 ± 0,87
	0,06 ± 0,01	15,99 ± 1,22	62,76 ± 1,16	11,61 ± 0,93	16,06 ± 2,26	74,38 ± 2,07	5,52 ± 0,90

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

Destacar que no encontramos diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) en el contenido de ácidos grasos saturados en ninguna de las variedades estudiadas y que únicamente Chico y Sunland presentan diferencias significativas en el contenido de ácido linolénico (Tabla 5.14). No presentan diferencias en la suma de ácidos grasos saturados (AGS), así como tampoco en la de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y en la relación $\omega 6/\omega 3$.

Por último destacar que el perfil de ácidos grasos que presentan las 10 variedades de nueces (Figura 5.16) permite caracterizarlas como saludables, dado el gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados que presentan y los beneficios que el consumo de éstos provoca (Lavie *et al.*, 2009; Russo, 2009; Kim *et al.*, 2010; Kouba & Mourot, 2011; Das, 2012), observando como la relación $\omega 6/\omega 3$ ($5,52 \pm 0,90$), que muchos autores consideran más importante que la cantidad en sí de ácidos grasos, es la recomendada para una dieta cardiosaludable (Simopoulos, 2002b; Sartorelli *et al.*, 2010; Noori *et al.*, 2011; Mirmiran *et al.*, 2012).

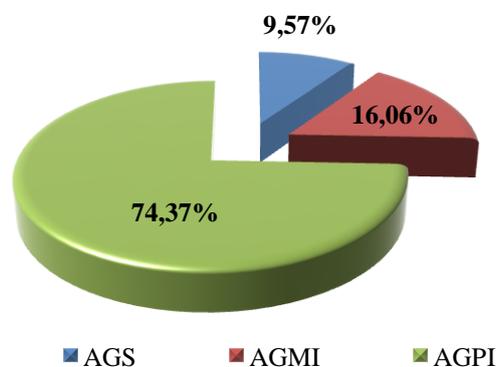


Figura 5.16. Perfil lipídico de las 10 variedades de nueces

El alto contenido en ácidos grasos insaturados, por otro lado, aumenta la susceptibilidad de las nueces frente a la oxidación y la aparición de sabores desagradables, con la consiguiente pérdida de calidad organoléptica (Maskan & Karataş, 1999; Kaijser *et al.*, 2000; Marsili, 2002; Faruk Gamli & Hayoğlu, 2007; Tura *et al.*, 2007; Wall, 2010).

Si analizamos la influencia del clima en la composición en ácidos grasos de las nueces (Tablas 5.15 y 5.16), observamos que, el contenido en los ácidos grasos saturados mirístico, palmítico y araquídico no sufre variación independientemente de la finca en la que se cultiven las nueces. Por el contrario, las nueces cultivadas en Torre Blanca sí presentan un contenido en ácido esteárico significativamente mayor ($\rho \leq 0,05$) que en El Chaparral.

Si el análisis se lleva a cabo atendiendo a cada una de las variedades, se observa que en general no se producen diferencias significativas en ácidos grasos saturados, exceptuando Pedro y Serr, que sí presentan diferencias con significancia estadística en el contenido en esteárico, con mayores cantidades en Torre Blanca que en El Chaparral.

De los resultados se podría concluir que el contenido en ácidos grasos saturados no se ve afectado por las condiciones climáticas.

Por el contrario, la cantidad en ácidos grasos insaturados de las nueces sí ha sufrido modificaciones en función de la finca en la que han sido cultivadas. Así, las variedades cultivadas en El Chaparral presentan contenidos en ácido oleico y linolénico significativamente mayores ($\rho \leq 0,05$) que en Torre Blanca.

Las nueces en Torre Blanca, sin embargo, presentan un mayor contenido en ácido linoleico que en El Chaparral, no existiendo diferencias en cuanto al contenido en palmitoleico.

Atendiendo al comportamiento de cada uno de los genotipos vemos como Amigo, Chico y Tehama presentan un 32,54%, 28,11% y 23,37% respectivamente menor en el contenido en ácido oleico cuando son cultivadas en Torre Blanca. No existiendo cambios significativos en el resto de variedades.

El contenido en ácido palmitoleico coincide es residual en todas las variedades y no encontramos diferencias entre las mismas.

En cuanto al contenido en ácidos grasos poliinsaturados, son 5 los genotipos (Algaida, Amigo, Eureka, Payne y Tehama) que presentan un contenido significativamente mayor de ácido linolénico en El Chaparral, destacando el descenso de hasta un 26,61% que se produce en Algaida al ser cultivado en Torre Blanca.

Tabla 5.15. Contenido en ácidos grasos saturados de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% ± SD)

Variedad	Fincas																				
	El Chaparral		Torre Blanca		El Chaparral		Torre Blanca		El Chaparral		Torre Blanca		El Chaparral		Torre Blanca		El Chaparral		Torre Blanca		
	Mirístico	Mirístico	Mirístico	Mirístico	Palmítico	Palmítico	Palmítico	Palmítico	Esteárico	Esteárico	Esteárico	Esteárico	Araquídico								
Algaida	0,06 ± 0,01*	0,02 ± 0,01	6,51 ± 0,36	7,00 ± 0,03	1,81 ± 0,82	2,11 ± 0,36	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,02	1,78 ± 0,40	2,01 ± 0,10	0,11 ± 0,02*	0,07 ± 0,01	2,00 ± 0,26	2,42 ± 0,34	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,01	1,92 ± 0,33	2,45 ± 0,47	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,02	
Amigo	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,09	6,30 ± 1,91	6,94 ± 0,26	1,86 ± 0,39	2,12 ± 0,25	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	2,33 ± 0,43	2,41 ± 0,10	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	2,22 ± 0,06*	2,51 ± 0,10	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	1,86 ± 0,39	2,12 ± 0,25	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,01	
Chico	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,01	7,25 ± 1,51	6,98 ± 0,18	7,25 ± 1,45	7,65 ± 0,12	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	2,16 ± 0,06*	2,49 ± 0,16	0,08 ± 0,01*	0,11 ± 0,01	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	2,04 ± 0,20	2,19 ± 0,08	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	
Eureka	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	7,47 ± 1,25	6,78 ± 0,25	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	1,98 ± 0,26	2,10 ± 0,18	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
Franquette	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,04	7,64 ± 0,53	7,87 ± 0,40	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	2,01 ± 0,18*	2,28 ± 0,19	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	
Payne	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45	7,31 ± 0,24	7,25 ± 1,45
Pedro	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,08	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16	7,65 ± 0,12	7,08 ± 1,16
Serr	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,02	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03	6,87 ± 0,22	7,92 ± 1,03
Sunland	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,02	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58	7,58 ± 0,34	7,61 ± 0,58
Tehama	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18	7,47 ± 0,29	7,89 ± 0,18
	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	7,29 ± 0,54	7,24 ± 0,37	7,29 ± 0,54										

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las capacidades intergrupo (diferentes fincas)

Tabla 5.16. Contenido en ácidos grasos insaturados de las 10 variedades de nueces en función de la finca (% ± SD)

Variedad	Fincas			Fincas			Fincas			Fincas		
	El Chaparral	Torre Blanca	Palmitoleico	El Chaparral	Torre Blanca	Oleico	El Chaparral	Torre Blanca	Linoleico	El Chaparral	Torre Blanca	Linoleico
	0,05 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	17,62 ± 2,83	15,16 ± 0,70	17,62 ± 2,83	61,26 ± 3,61	66,32 ± 1,91	12,55 ± 1,90*	12,55 ± 1,90*	9,21 ± 0,77	
Algaída	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	18,56 ± 2,98*	12,52 ± 1,00	18,56 ± 2,98*	60,11 ± 0,27*	67,15 ± 0,86	13,02 ± 0,39*	13,02 ± 0,39*	11,13 ± 0,21	
Amigo	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	16,93 ± 1,90*	12,17 ± 1,04	16,93 ± 1,90*	60,35 ± 2,24*	65,06 ± 0,19	13,19 ± 2,09	13,19 ± 2,09	13,12 ± 0,69	
Chico	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	17,15 ± 0,88	18,99 ± 0,03	17,15 ± 0,88	61,12 ± 0,77	62,01 ± 0,27	12,09 ± 0,15*	12,09 ± 0,15*	9,56 ± 0,50	
Eureka	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	17,73 ± 1,09	16,76 ± 0,41	17,73 ± 1,09	60,90 ± 0,57*	63,01 ± 0,40	11,61 ± 0,39*	11,61 ± 0,39*	10,00 ± 0,66	
Franquette	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	15,82 ± 2,74	16,65 ± 0,70	15,82 ± 2,74	60,89 ± 2,09	63,23 ± 0,70	13,48 ± 0,39*	13,48 ± 0,39*	10,18 ± 0,37	
Payne	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	16,75 ± 0,82	17,21 ± 0,70	16,75 ± 0,82	61,22 ± 1,73	60,29 ± 1,22	12,53 ± 2,00	12,53 ± 2,00	12,08 ± 0,39	
Pedro	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	16,11 ± 1,90	13,47 ± 0,26	16,11 ± 1,90	61,68 ± 2,29	63,99 ± 0,23	11,90 ± 1,48	11,90 ± 1,48	12,95 ± 0,07	
Serr	0,09 ± 0,01*	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	15,10 ± 1,30	16,16 ± 0,69	15,10 ± 1,30	64,92 ± 1,97	63,75 ± 0,87	10,09 ± 0,29	10,09 ± 0,29	10,08 ± 0,04	
Sunland	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	16,34 ± 0,72*	12,52 ± 0,18	16,34 ± 0,72*	60,79 ± 0,35*	67,10 ± 0,07	12,79 ± 0,11*	12,79 ± 0,11*	10,59 ± 0,20	
Tehama	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	16,81 ± 1,01*	15,16 ± 2,36	16,81 ± 1,01*	61,32 ± 1,34*	64,19 ± 2,23	12,32 ± 0,97*	12,32 ± 0,97*	10,89 ± 1,38	

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las capacidades intergrupo (diferentes fincas)

El ácido linoleico, por el contrario, está presente en mayores cantidad en 8 de las variedades de nogal cultivadas en Torre Blanca, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($\rho \leq 0,05$) entre ambas fincas para las variedades Amigo, Chico, Franquette y Tehama. Destaca la pérdida de linoleico que se produce en las variedades Amigo y Tehama en El Chaparral (10,48 y 9,40%, respectivamente).

Por último indicar que la variedad Amigo es la que presenta mayor variabilidad en el contenido en ácidos grasos en función de la finca en la que es cultivada, mientras que Sunland tiene una mejor capacidad de adaptación a las condiciones edafoclimáticas, pues únicamente presenta diferencias significativas en el contenido en ácido palmitoleico que, como se ha visto, está presente en cantidades traza sea cual sea variedad y la finca en la que se cultive.

Apenas existen en la literatura científica estudios en los que se ha investigado la influencia que el área geográfica tiene sobre el contenido en ácidos grasos de las nueces. Greve *et al.* (1992), sí estudiaron el contenido en AGPI de las variedades Hartley, Franquette y Ashley en tres localidades diferentes de California (Davis, Sutter County y Stanislaus County), obteniendo resultados similares a los presentados aquí, pues se produjeron diferencias significativas en el contenido en estos ácidos en función de la localidad en la que se cultivaban; así, Franquette presentaba un contenido en AGPI de un $75,0 \pm 0,4\%$ en las zonas con mayores precipitaciones.

En ese mismo estudio compararon el contenido en AGPI de nueces de orígenes distintos (California, Washington, China y Francia), encontrando igualmente diferencias en función de la procedencia; así, las nueces originarias de Francia contenían un 64,8% de AGPI, mientras que en California alcanzaban el 74,9%.

Estudios de similares características sí se han llevado a cabo en otros frutos secos. Así, Holaday y Pearson (1974) y Brown *et al.* (1975), observaron que la composición en ácidos grasos mayoritarios de los cacahuets (palmítico, oleico y linoleico) sí se veía afectada por la diferente localización del cultivo, no ocurría así con los ácidos grasos minoritarios. Abdallah *et al.* (1998), obtuvieron resultados similares en almendras cultivadas en distintas regiones de California.

En Túnez, Chahed *et al.* (2008), observaron como el pistacho presentaba diferente composición en ácidos grasos en función de la región donde era cultivado. Así, los pistachos cultivados en clima húmedo presentaban un mayor contenido en palmítico, palmitoleico y linoleico que aquellos cultivados en climas subárido y árido, mientras que el contenido en linolénico era mayor en éstas.

Beyhan *et al.* (2011), estudiaron el efecto que la altitud tenía sobre la composición en ácidos grasos de avellanas y pudieron observar como la altitud estaba correlacionada con un aumento en el contenido de AGPI y AGMI, mientras que los AGS decrecían a mayor altitud. Estudios similares en avellanas han concluido la influencia de las condiciones medioambientales en su perfil lipídico (Parcerisa *et al.*, 1993; Koyuncu *et al.*, 1997b; Karadeniz & Kúp, 1997; Koyuncu, 2004; Alasalvar *et al.*, 2006 y 2009; Amaral *et al.*, 2006; Matthäus & Özcan, 2012).

Borges *et al.* (2007), igualmente encontraron diferencias en la composición en ácidos grasos de 17 variedades de castañas originarias de Portugal, motivadas tanto por el genotipo, como por el área geográfica.

5.3. BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE LAS NUECES

La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de las nueces no ha sido objeto de estudios *in vitro*; por el contrario, sí existen en la bibliografía científica trabajos en los que se ha estudiado su biodisponibilidad en humanos (Cerdá *et al.*, 2005a y b; Tomás-Barberán *et al.*, 2009a y b; González-Sarrias *et al.*, 2010).

5.3.1. Biodisponibilidad *in vitro* de fenoles totales de las nueces

El contenido en fenoles totales de las nueces tras someterlas a una digestión *in vitro* descendió una media de un 74,1% respecto a su contenido antes de la misma ($953,36 \pm 206,93$ frente a $242,27 \pm 68,67$ mg ácido gálico/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) (Figura 5.17).

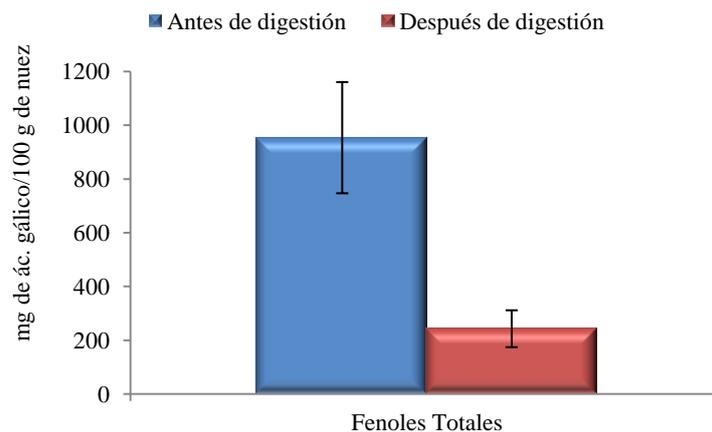


Figura 5.17. Contenido en Fenoles totales antes y después de la digestión *in vitro*

No en nueces, pero sí en otras matrices alimentarias se han llevado cabo estudios con resultados en consonancia con los presentados en esta memoria. Así, Pérez-Vicente *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares a los nuestros al determinar la biodisponibilidad *in vitro* de fenoles totales en zumo de granada. El zumo después de la digestión presentaba únicamente el 29% de fenoles respecto al zumo inicial. Igualmente, Bouayed *et al.* (2012), obtuvieron pérdidas de hasta el 75% en el contenido en fenoles de la manzana, las mismas que McDougall *et al.*

(2007), en col lombarda y Tarko *et al.* (2009a), en diferentes frutas, mientras que Fazzari *et al.* (2008), encontraron pérdidas de entre el 70 y el 74% en cerezas.

Otros autores obtuvieron resultados en los que observaban una menor biodisponibilidad de fenoles en diferentes alimentos (Dinnella *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2012). Es el caso de McDougall *et al.* (2005a y b), quienes obtuvieron una biodisponibilidad del 10,3% de fenoles totales en frambuesas y del 7,2% en vino tinto.

En sentido contrario, Tagliazucchi *et al.* (2010), obtuvieron una pérdida de fenoles únicamente del 37% después de someter a uva a una digestión simulada. En este último caso en el que la biodisponibilidad de fenoles es mayor hay que subrayar, por un lado, que sometieron a la uva a una etapa adicional en la que se simulaba la masticación y, por otro lado, que el método de medida empleado no fue el de Folin-Ciocalteu, sino que utilizaron un método enzimático. De igual forma, Bouayed *et al.* (2011), publicaron un porcentaje de recuperación de fenoles de entre el 44,6% y el 62,7% en diferentes variedades de manzanas. Mientras que Cilla *et al.* (2011), obtuvieron valores de recuperación de fenoles en diferentes zumos de frutas de entre el 74 y el 96%.

Existen también trabajos en los que se ha mantenido el contenido en fenoles (Vallejo *et al.*, 2004), e incluso algunos en los que se han encontrado mayores contenidos en fenoles totales después de la digestión *in vitro* (Noguer *et al.*, 2008; Tarko *et al.*, 2009b; Wootton-Beard *et al.*, 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012).

Si analizamos el comportamiento de las diferentes variedades tras su digestión *in vitro* de forma individual (Tabla 5.17), podemos destacar que los dializados de Algaida y Amigo son los que presentan una mayor biodisponibilidad en fenoles totales. Por el contrario, Eureka, que antes de la digestión era la variedad con un mayor contenido en fenoles (apartado 5.1.1.), es la variedad que mayor pérdida de estos compuestos presenta.

Tras la digestión *in vitro*, el dializado de la variedad Algaida es el que presenta un mayor contenido en fenoles totales de manera significativa ($p \leq 0,05$) frente al resto de variedades.

Chico, que ya antes de la digestión *in vitro* resultaba ser una de las variedades con menor riqueza en compuestos fenólicos (apartado 5.1.1.), es el

genotipo que, de manera significativa ($\rho \leq 0,05$), presenta menor contenido en fenoles en su dializado.

Tabla 5.17. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro* ¹

Variedad	mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD ¹	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	373,30 \pm 20,53 b, c, d, e, f, g, h, i, j	63
Amigo	282,62 \pm 8,82 a, c, d, e, f, g	62
Chico	144,85 \pm 13,67 a, b, d, e, f, g, h, i, j	81
Eureka	208,46 \pm 22,32 a, b, c, i, j	84
Franquette	199,94 \pm 5,47 a, b, c, i, j	77
Payne	197,56 \pm 33,77 a, b, c, i, j	79
Pedro	211,72 \pm 30,10 a, b, c, i, j	75
Serr	203,34 \pm 26,61 a, b, c, i, j	73
Sunland	302,58 \pm 34,28 a, c, d, e, f, g, h	70
Tehama	298,29 \pm 19,11 a, c, d, e, f, g, h	77

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

5.3.2. Biodisponibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos de las nueces

Se han identificado y cuantificado los mismos compuestos fenólicos antes y después de la digestión *in vitro* a la que han sido sometida las nueces. Es importante destacar este hecho, ya que han sido muchos los trabajos en los que tras la simulación del proceso digestivo, o bien no han detectado un compuesto fenólico, o bien han identificado algún metabolito de éste con estructura diferente (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Cilla *et al.*, 2009; Gumienna *et al.*, 2011; Bouayed *et al.*, 2012).

5.3.2.1. Biodisponibilidad *in vitro* de compuestos flavonoides

Tras someter a las nueces a una digestión *in vitro* el contenido en flavonoides descendió un 66,5% respecto a su contenido inicial ($31,83 \pm 5,15$ frente

a $10,73 \pm 3,09$ mg/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) (Figura 5.18).

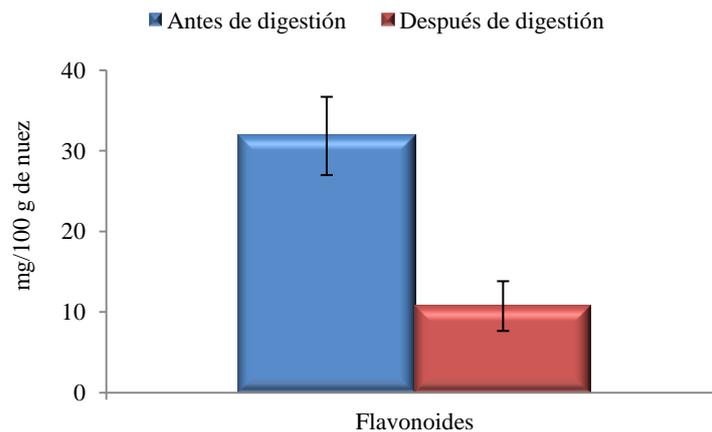


Figura 5.18. Contenido en Flavonoides totales antes y después de la digestión *in vitro*

Todas las variedades no han tenido un mismo comportamiento tras someterlas a la digestión *in vitro* (Tabla 5.18).

Así, las variedades Eureka y Pedro presentan una menor biodisponibilidad en flavonoides que el resto de variedades, mientras que Algaida es la que presenta una pérdida menor.

Tras la digestión *in vitro*, el dializado de la variedad Algaida es el que presenta un mayor contenido en flavonoides totales de manera significativa ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de variedades, excepto frente a Amigo. Destacar que Algaida también presentaba el mayor contenido en flavonoides al analizar la nuez en fresco (apartado 5.1.2.1.).

En sentido contrario, Eureka, que ya era una de las variedades que menor contenido en flavonoides presentaba antes de la digestión (apartado 5.1.2.1.), es la variedad cuyo dializado contiene menos flavonoides totales de manera significativa frente al resto de dializados ($\rho \leq 0,05$).

Tabla 5.18. Contenido en Flavonoides totales de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro* ¹

Variedad	mg/100 g de nuez ± SD	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	19,88 ± 2,33 c, d, e, f, g, h, i, j	48
Amigo	19,07 ± 1,20 c, d, e, f, g, h, i, j	50
Chico	10,36 ± 0,99 a, b, d, g	66
Eureka	5,47 ± 0,43 a, b, c, e, f, g, h, i, j	79
Franquette	9,20 ± 0,78 a, b, d, f	64
Payne	11,60 ± 1,22 a, b, d, e, g	69
Pedro	7,93 ± 0,79 a, b, c, d, f, h, i	76
Serr	11,00 ± 2,00 a, b, d, e, g	58
Sunland	11,08 ± 0,25 a, b, d, g	65
Tehama	9,65 ± 0,44 a, b, d	69

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

Si atendemos al comportamiento de cada uno de los flavonoides identificados de forma individual (Figura 5.19), observamos como todos los compuestos sufrieron pérdidas después de la digestión *in vitro* en un rango que varió desde el 58,7% de media que presentó la galocatequina ($163,70 \pm 12,11$ frente a $67,49 \pm 18,50$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) al 76,5% de media que se produjo en epicatequina galato ($165,64 \pm 18,15$ frente a $38,59 \pm 15,14$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez de media).

La catequina presentó una biodisponibilidad *in vitro* del 39,1% ($15,12 \pm 3,44$ frente a $5,89 \pm 1,88$ mg/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente), la epigalocatequina galato del 37,5% ($61,68 \pm 20,15$ frente a $23,61 \pm 6,48$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez de media), la procianidina B₂ del 29,3% ($15,94 \pm 3,19$ frente a $4,62 \pm 1,57$ mg/100 g de nuez de media), mientras que la epicatequina escasamente del 23,1% ($365,95 \pm 12,52$ frente a $87,05 \pm 21,69$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez de media).

En todos los casos las diferencias entre los flavan-3-oles cuantificados antes y después de la digestión *in vitro* son estadísticamente significativas ($\rho \leq 0,05$).

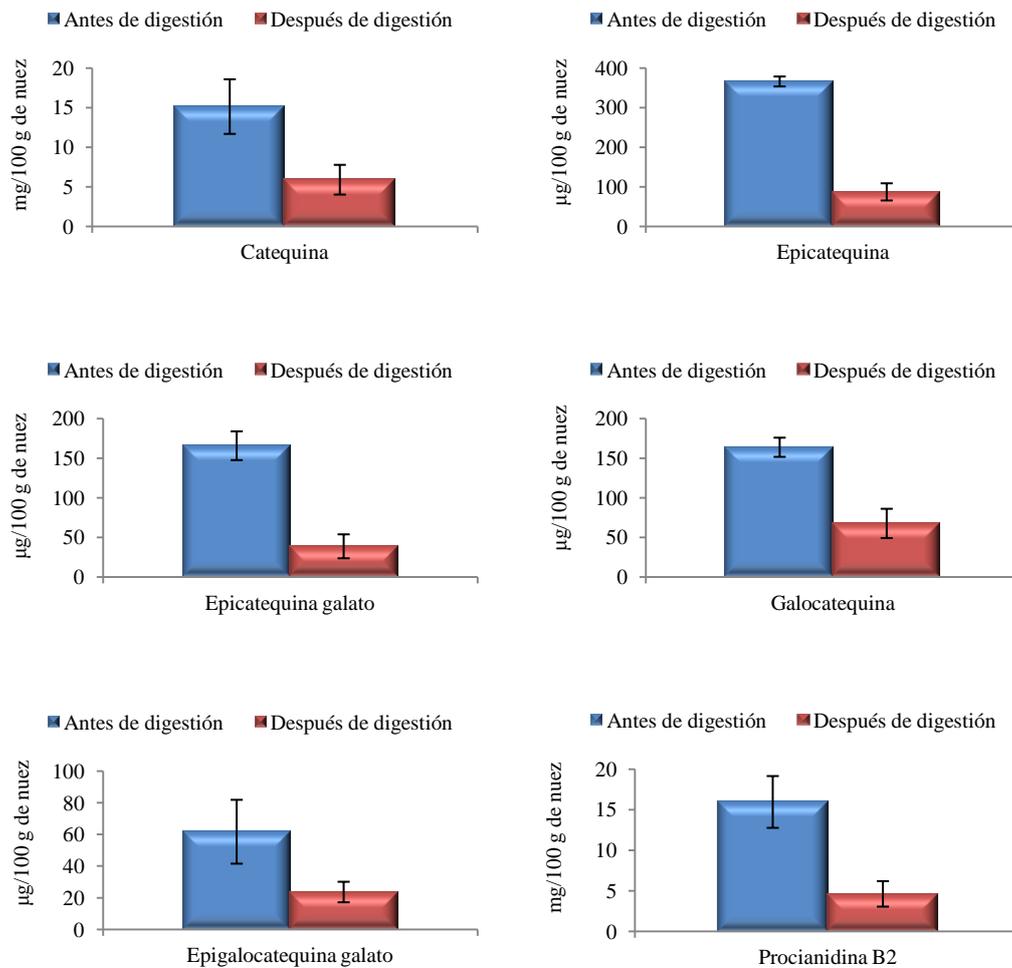


Figura 5.19. Contenido en Flavonoides antes y después de la digestión *in vitro*

Diferentes estudios han obtenido resultados similares a los nuestros en otras matrices alimentarias. Cilla *et al.* (2009), en un estudio en el que comparaban la biodisponibilidad *in vitro* de los polifenoles de diferentes zumos encontraron pérdidas entre el 64,5 y el 70,1% en el contenido en flavan-3-oles.

Record y Lane (2001) y Green *et al.* (2007), también publicaron resultados similares a los presentados en esta memoria, con pérdidas de alrededor del 80% en el contenido en distintas catequinas en diferentes preparados de té.

Laurent *et al.* (2007), obtuvieron datos en consonancia con estos trabajos y, por tanto, con nuestros resultados, ya que tanto catequina, como epicatequina y procianidina B₂ descendían tras la digestión *in vitro* de piel procedente de uva en un 44%, un 85% y un 100%, respectivamente.

Bermúdez-Soto *et al.* (2007), obtuvieron pérdidas de un 19,3% en el contenido en flavan-3-oles de bayas de Aronia tras la digestión *in vitro* y de un 58% en la biodisponibilidad del patrón de catequina.

Bouayed *et al.* (2011), obtuvieron una recuperación del 44% en el contenido en flavonoides tras someter a diferentes variedades de manzana a una digestión *in vitro*, justificando las pérdidas por la inestabilidad que presentan las antocianinas en el medio alcalino del intestino. Mientras que Tagliazucchi *et al.* (2010), observaron una biodisponibilidad de los flavonoides de la uva del 56,1%.

Neilson *et al.* (2007), estudiaron la biodisponibilidad *in vitro* de diferentes catequinas, obteniendo pérdidas entre el 71-91% en epigalocatequina galato, entre el 72-100% en epigalocatequina y entre el 60-61% en epicatequina galato. Sin embargo, catequina y epicatequina obtuvieron pérdidas de tan sólo un 8%.

Un estudio llevado a cabo por Mullen *et al.* (2008), puede ayudar a justificar en el alto contenido en grasa de las nueces la escasa biodisponibilidad que han presentado los diferentes flavonoides en nuestro trabajo; en dicho estudio observaron como a las dos horas de su consumo, la excreción de metabolitos de antocianinas procedentes de fresas era menor cuando éstas se consumían junto a nata que cuando se comían solas, justificando sus resultados en que el contenido graso de la nata retrasaba el tránsito intestinal de las antocianinas.

En sentido contrario, Ortega *et al.* (2009), no solo no encontraron pérdidas, sino que el contenido en catequina y epicatequina era mayor en la fracción biodisponible del cacao, planteando la hipótesis del papel protector que la grasa podía tener al formar estructuras micelares durante la digestión enzimática.

La poca biodisponibilidad *in vitro* que presentan los flavonoides, principalmente procianidina B₂, puede deberse igualmente a su naturaleza polimérica y su alto peso molecular, que hacen difícil su absorción a través de la

barrera intestinal (Spencer *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2004 y 2005; Serrano *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012). Así, Deprez *et al.* (2001), observaron como las proantocianidinas poliméricas, por su alto peso molecular, se absorbían 10 veces menos que las monoméricas y diméricas en un estudio en el que se realizó una digestión *in vitro* con células Caco-2. Baba *et al.* (2002), Donovan *et al.* (2002), Nakamura y Tonogai (2003) y Tsang *et al.* (2005), obtuvieron resultados similares en los que el grado de polimerización de las procianidinas hacía que no fueran absorbidas por ratones alimentados con extractos de uva.

Zhu *et al.* (1997), atribuyeron al pH alcalino del intestino delgado la degradación de las catequinas procedentes del té (epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina y epigallocatequina galato) y, en consecuencia, su pobre absorción. Así mismo, Chen *et al.* (2001), en un estudio en el que evaluaban la estabilidad de las catequinas del té en medios ácidos y alcalinos, observaron una fuerte degradación de éstas, lo que permitiría explicar la pobre absorción encontrada en nuestro estudio.

Spencer *et al.* (2000) y Zhu *et al.* (2002), observaron como las procianidinas del cacao se hidrolizaban a diferentes monómeros y dímeros o se isomerizaban como consecuencia de las condiciones ácidas que se dan en el estómago (pH 2) o, incluso, por las condiciones alcalinas a nivel intestinal (pH 6). Esto podría explicar las pérdidas del 66,4% que se han producido en el contenido en procianidina B₂ después de someter a las nueces a la digestión *in vitro*.

Los estudios llevados a cabo por Kahle *et al.* (2007 y 2011), también apoyan nuestros resultados, pues observaron cómo, tras una digestión simulada de manzanas, el medio ácido del estómago degradaba la mayoría de las catequinas, mientras que en presencia de los jugos duodenales se isomerizaban. Ríos *et al.* (2002), por el contrario, no encontraron diferencias en el perfil fenólico del cacao tras soportar las condiciones ácidas del estómago.

Rzeppa *et al.* (2012), han observado una pobre excreción vía urinaria de procianidinas (del orden del 0,02%) administradas a través de la dieta a cerdos, caracterizados por tener un tracto gastrointestinal similar al de humanos.

Si analizamos cómo ha afectado el proceso de digestión *in vitro* al contenido en cada uno de los flavan-3-oles en las diferentes variedades (Tablas 5.19a y 5.19b), podemos destacar que cada compuesto presenta una mayor o menor

biodisponibilidad *in vitro* en función de la variedad. Así, el dializado de Serr es el que presenta menores pérdidas en catequina, el de la variedad Pedro en epicatequina, Algaida presenta menores pérdidas en epicatequina galato y procianidina B₂ y Amigo en galocatequina y en epigalocatequina galato.

Tabla 5.19a. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro*

Variedad	Flavan-3-oles ¹					
	Catequina**	Pérdida tras la digestión (%)	Epicatequina*	Pérdida tras la digestión (%)	Epicatequina galato*	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	7,51 ± 0,05 d,e,g,j	58	84,10 ± 4,41 c,d,e,f,g,h,i,j	77	57,79 ± 3,96 b,c,d,e,g,h,i,j	64
Amigo	8,20 ± 0,06 c,d,e,f,g,h,j	59	91,71 ± 7,78 c,d,e,f,g,h,i,j	75	61,06 ± 2,97 a,c,d,e,f,g,h,i,j	66
Chico	6,54 ± 1,01 b,d,e,g	56	45,89 ± 4,59 a,b,e,f,g,h,i	87	45,95 ± 3,63 a,b,d,e,f,g,h,i,j	69
Eureka	1,47 ± 0,11 a,b,d,e,f,g,h,i,j	88	54,67 ± 1,16 a,b,e,g,i,j	86	40,42 ± 1,10 a,b,c,e,f,g,h,i,j	78
Franquette	5,13 ± 0,03 a,b,c,d,f,i	53	133,57 ± 11,07 a,b,c,d,f,g,h,j	62	28,98 ± 3,05 a,b,c,d,f,g,i	83
Payne	6,58 ± 0,21 b,d,e,g	61	67,53 ± 1,60 a,b,c,e,f,g,i,j	82	53,43 ± 3,29 b,c,d,e,g,h,i,j	66
Pedro	4,75 ± 1,29 a,b,c,d,f,h,i	60	148,61 ± 4,67 a,b,c,d,e,f,h,j	59	20,91 ± 2,93 a,b,c,d,e,f,h	85
Serr	6,31 ± 0,82 b,d,e,g	45	66,52 ± 5,00 a,b,c,e,f,g,i,j	81	28,93 ± 2,09 a,b,c,d,f,g,i	80
Sunland	6,97 ± 0,37 d,e,g,j	65	144,189 ± 15,74 a,b,c,d,f,h,j	61	23,64 ± 1,36 a,b,c,d,e,f,h	87
Tehama	5,41 ± 1,12 a,b,d,j	64	33,69 ± 4,17 a,b,d,e,f,g,h,i	91	24,79 ± 0,57 a,b,c,d,e,f,h	87

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

(*) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de nuez $\pm \text{SD}$

(**) = Resultados expresados en $\text{mg}/100 \text{ g}$ de nuez $\pm \text{SD}$

Tabla 5.19b. Contenido en Flavonoides de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro*

Variedad	Flavan-3-oles ¹					
	Galocatequina*	Pérdida tras la digestión (%)	Epigalocatequina galato*	Pérdida tras la digestión (%)	Procianidina B ₂ **	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	71,66 ± 12,44 ^{b,c,d,e,f,h,j}	57	42,49 ± 5,72 ^{c,d,e,f,g,h,i,j}	49	8,13 ± 2,37 ^{c,d,e,f,g,h,i,j}	59
Amigo	98,04 ± 13,18 ^{a,c,d,f,h,j}	37	34,61 ± 19,22 ^{c,d,g,h,i,j}	47	6,59 ± 1,19 ^{c,d,e,f,g,h,i,j}	62
Chico	69,13 ± 13,58 ^h	58	12,21 ± 0,72 ^{a,b,e,f}	61	3,65 ± 0,24 ^{a,b}	75
Eureka	57,01 ± 3,27 ^{a,b,i}	59	15,54 ± 6,44 ^{a,b,f}	63	3,82 ± 0,55 ^{a,b}	71
Franquette	71,59 ± 4,26 ^{a,h}	61	29,11 ± 6,89 ^{a,c,i,j}	64	3,80 ± 0,74 ^{a,b}	73
Payne	62,00 ± 3,44 ^{a,b,h}	65	35,86 ± 3,66 ^{a,c,d,h,i,j}	59	4,79 ± 1,40 ^{a,b}	75
Pedro	72,03 ± 8,78 ^h	57	23,88 ± 2,13 ^{a,b}	69	2,90 ± 0,80 ^{a,b}	86
Serr	26,74 ± 1,97 ^{a,b,c,d,e,f,g,i,j}	83	20,57 ± 2,78 ^{a,b,f}	58	4,54 ± 1,21 ^{a,b}	68
Sunland	83,82 ± 0,59 ^{d,f,h,j}	49	11,06 ± 2,52 ^{a,b,e,f}	73	3,85 ± 0,61 ^{a,b}	65
Tehama	62,85 ± 8,93 ^{a,b,h}	61	10,70 ± 2,89 ^{a,b,e,f}	82	4,10 ± 0,68 ^{a,b}	73

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

(*) = Resultados expresados en µg/100 g de nuez ± SD

(**) = Resultados expresados en mg/100 g de nuez ± SD

Por el contrario, el dializado de Eureka es el que presenta una menor biodisponibilidad de catequina (12%). Epicatequina, epicatequina galato y epigalocatequina galato son menos biodisponibles en la variedad Tehama, mientras que galocatequina presenta menor biodisponibilidad en la variedad Serr y procianidina B₂ en Pedro.

Tras la digestión la variedad Amigo sigue siendo la que mayor contenido en catequina presenta de todas las variedades, el dializado de Pedro es el más rico en epicatequina, nuevamente Amigo es el genotipo cuyo dializado tiene más cantidad de epicatequina galato y de galocatequina, mientras que epigalocatequina galato y procianidina B₂ se encuentran en mayor proporción en el dializado de Algaida de manera significativa ($\rho \leq 0,05$).

En sentido contrario, el dializado de Eureka presenta los contenidos más bajos en catequina, el de la variedad Tehama en epicatequina y en epigalocatequina galato, el de Pedro en epicatequina galato y en procianidina B₂, mientras que las menores cantidades de galocatequina se encuentran en Serr de forma significativa ($\rho \leq 0,05$).

5.3.2.2. Biodisponibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos no flavonoides

Después de la digestión *in vitro* el contenido en compuestos fenólicos no flavonoides descendió un 78,8% respecto a su contenido inicial ($97,64 \pm 27,97$ frente a $19,92 \pm 5,98$ mg/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) (Figura 5.20).

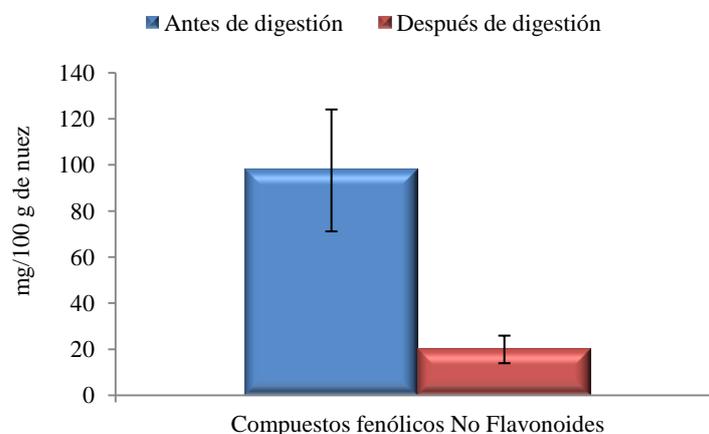


Figura 5.20. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides totales antes y después de la digestión *in vitro*

Al igual que ocurre con el contenido en flavonoides totales, no todas las variedades han tenido un mismo comportamiento tras someterlas a la digestión *in vitro* (Tabla 5.20).

Tabla 5.20. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides totales de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro*¹

Variedad	mg/100 g de nuez \pm SD	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	32,68 \pm 6,33 ^{b, c, e, f, g, h, i, j}	71
Amigo	19,56 \pm 0,69 ^{a, d, f, g, i, j}	68
Chico	22,44 \pm 2,45 ^{a, d, i, j}	72
Eureka	25,97 \pm 3,00 ^{b, c, e, f, g, h, j}	81
Franquette	14,42 \pm 2,57 ^{a, d, i, j}	83
Payne	16,40 \pm 3,38 ^{a, b, d, h}	84
Pedro	17,34 \pm 1,27 ^{a, b, d, h, i}	80
Serr	12,93 \pm 0,48 ^{a, b, c, d, f, g, i}	80
Sunland	21,44 \pm 1,15 ^{a, b, c, e, g, h, j}	81
Tehama	15,97 \pm 1,59 ^{a, b, c, d, i}	88

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

Así, la variedad Tehama presenta una menor biodisponibilidad en compuestos fenólicos no flavonoides que el resto de variedades, mientras que Amigo es la que presenta una pérdida menor en estos compuestos tras su dializado.

Tras la digestión *in vitro*, el dializado de la variedad Algaida es el que presenta un mayor contenido en compuestos fenólicos no flavonoides totales de manera significativa ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de variedades, excepto frente a Eureka.

Serr, que antes de su digestión ya se caracterizaba por su escaso contenido en estos compuestos, es la variedad cuyo dializado presenta menor cantidad de compuestos fenólicos no flavonoides.

Si atendemos al comportamiento de cada uno de los compuestos fenólicos no flavonoides identificados de forma individual (Figura 5.21), observamos como todos sufrieron pérdidas después de la digestión *in vitro* en un rango que varió desde el 70,6% de media que presentó el ácido clorogénico ($4,87 \pm 1,70$ frente a $1,43 \pm 0,59$ mg/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) al 81,4% de media que presentó el ácido elágico ($45,95 \pm 17,13$ frente a $7,98 \pm 2,52$ mg/100 g de nuez de media).

Los ácidos gálico, *p*-cumárico y siríngico presentaron una biodisponibilidad *in vitro* muy parecida, del 27,4% en el primero de ellos ($15,40 \pm 3,07$ frente a $4,15 \pm 1,16$ mg/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente), del 23,1% en el caso del ácido *p*-cumárico ($194,35 \pm 43,04$ frente a $45,86 \pm 22,02$ μ g/100 g de nuez de media) y del 22,5% en el ácido siríngico ($31,21 \pm 9,24$ frente a $6,32 \pm 1,77$ mg/100 g de nuez de media).

En todos los casos las diferencias entre los ácidos fenólicos e hidroxicinámicos cuantificados antes y después de la digestión *in vitro* son estadísticamente significativas ($\rho \leq 0,05$).

Hay que subrayar que tanto el ácido elágico, como el ácido siríngico son los compuestos fenólicos mayoritarios en el dializado de las nueces, tal y como sucedía antes de someter a éstas a la digestión *in vitro*.

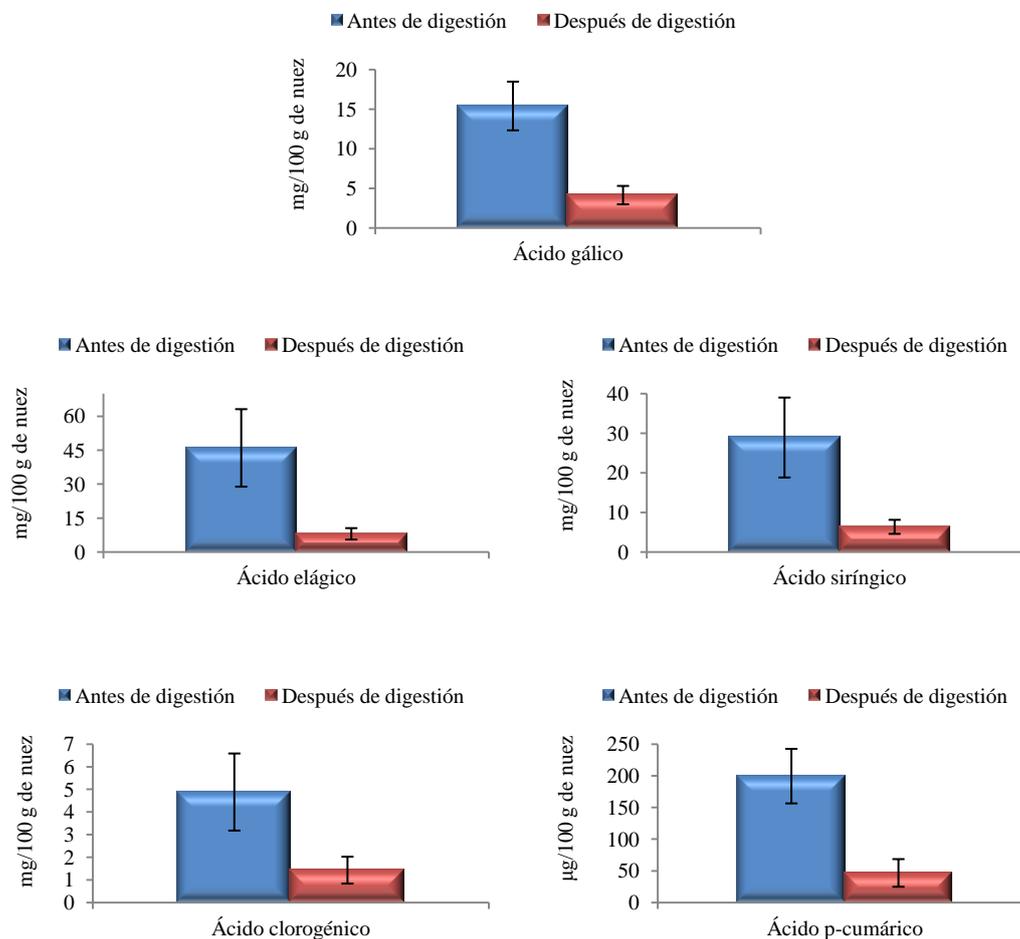


Figura 5.21. Contenido en compuestos fenólicos No Flavonoides antes y después de la digestión *in vitro*

Resultados similares a los presentados en esta memoria obtuvieron Gil-Izquierdo *et al.* (2002), quienes observaron que el ácido elágico tan sólo era biodisponible un 6,17 y un 5,89% en fresa y mermelada de fresa, respectivamente, en ensayos *in vitro*.

Bouayed *et al.* (2012), también observaron pérdidas de entre el 72,5 y el 88,2% en el contenido en ácido clorogénico y entre el 31,5 y el 46,1% en el contenido en ácido p -cumárico en manzana sometidas a digestión *in vitro*, posiblemente debidas a su degradación provocada por los ácidos biliares y la

pancreatina. Liang *et al.* (2012), obtuvieron pérdidas próximas al 90% en el contenido en ácidos fenólicos en moreras.

Del mismo modo, Cerezo *et al.* (2010), cuantificaron pérdidas significativamente estadísticas ($p \leq 0,01$) en el contenido en ácidos hidroxibenzoico, elágico y p -cumárico de muestras de fresas. A su vez, Cilla *et al.* (2009), encontraron pérdidas de alrededor del 52% en el contenido en ácido clorogénico de zumos hechos a base de concentrados de uva, naranja y albaricoque; si bien, las pérdidas en el contenido ácidos hidroxicinámicos totales bajaron al rango 36-45%. Tagliazucchi *et al.* (2010), observaron una biodisponibilidad *in vitro* de compuestos no flavonoides en uva del 67,7%.

Por el contrario, diferentes estudios han observado un incremento en el contenido en diferentes compuestos no flavonoides (ácidos clorogénico, vanílico, cafeico, siríngico, ferúlico y cumárico) después de someter a distintos alimentos a una digestión *in vitro* (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2009).

A pesar de la escasez de estudios sobre la biodisponibilidad de los ácidos hidroxicinámicos, es conocido que cuando se ingieren en su forma libre son fácilmente absorbibles en el intestino delgado y se conjugan (principalmente se glucuronizan) de la misma forma que los flavonoides (Clifford, 2000; Cremin *et al.*, 2001).

La escasa biodisponibilidad del ácido clorogénico obtenida (29,4%) está en consonancia con los estudios llevados a cabo *in vivo* por Williamson y Stalmach (2012), quienes observaron cómo este ácido presentaba una alta absorción tras su metabolización por las bacterias colónicas, pero muy baja en su forma intacta. Otros estudios *in vivo* en los que se evaluaba la absorción y el metabolismo del ácido clorogénico demostraron su pobre absorción en su forma original (Azuma *et al.*, 2000; Olthof *et al.*, 2001; Gonthier *et al.*, 2003).

Nardini *et al.* (2002), en un estudio en el que analizaban la absorción *in vivo* de ácidos fenólicos presentes en el café, observaron como el ácido clorogénico no era absorbido en plasma en su forma original o lo era en cantidades traza, inferiores a los límites de detección del método empleado. Tampoco obtuvieron cantidades detectables de ácido p -cumárico. Sí encontraron, por el contrario, cantidades considerables de ácido cafeico en plasma, lo que podría deberse a la

hidrólisis que el ácido clorogénico sufre en el tracto gastrointestinal por la acción de esterasas citosólicas en la mucosa intestinal.

Los resultados obtenidos en la presente tesis podrían igualmente justificarse por los efectos de la matriz alimentaria (la nuez) sobre la biodisponibilidad de los polifenoles. En la literatura científica se pueden encontrar numerosos estudios en los que se demuestra la existencia de interacciones directas entre los polifenoles y algunos componentes de los alimentos que afectan de forma positiva o negativa en la absorción de los primeros (Wegrzyn *et al.*, 2008; Couzinet-Mossion *et al.*, 2010; Freeman *et al.*, 2010; Hidalgo *et al.*, 2010; Ferruzzi *et al.*, 2012; Ioannou *et al.*, 2012; Sivam *et al.*, 2012).

En este sentido Pérez-Jiménez *et al.* (2009b), observaron como la fibra no afectaba a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, pero sí retrasaba su absorción. Estos resultados podrían justificar la escasa biodisponibilidad que han presentado los compuestos fenólicos, ya que el proceso de digestión *in vitro* duró escasamente dos horas y, por otro lado, las nueces son una importante fuente de fibra, con un contenido de 6,7 g/100 g (USDA, 2010a). Existen más estudios en la literatura científica recogidos recientemente por Palafox-Carlos *et al.* (2011), que coinciden en afirmar el papel que juega la fibra en la ralentización del proceso de absorción de los compuestos fenólicos.

McDougall *et al.* (2005a) justificaron parte de los resultados obtenidos en un estudio en el que analizaban la biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de la frambuesa, en los complejos insolubles que se formaban entre los elagitaninos (principales polifenoles de la frambuesa) y las proteínas en la mezcla de enzimas pancreáticas. Estos resultados se encuentran en consonancia con los nuestros; los elagitaninos, compuestos fenólicos mayoritarios en las nueces analizadas (apartado 5.1.2.2.), presentaron pérdidas del 81,4% tras someter a éstas a la digestión *in vitro* (Figura 5.21).

Además, los efectos indirectos que los alimentos pueden provocar sobre diversos parámetros de la fisiología intestinal (pH, fermentaciones intestinales, la excreción biliar, el tiempo de tránsito, etc.) pueden tener consecuencias sobre la absorción de los polifenoles (Manach *et al.*, 2004).

Si bien, sería necesario llevar a cabo investigaciones más profundas que confirmasen el efecto que estos factores pudieran tener sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en las nueces.

Si analizamos cómo ha afectado el proceso de digestión *in vitro* al contenido en cada uno de los compuestos fenólicos no flavonoides en los distintos genotipos de nueces (Tablas 5.21 y 5.22), podemos destacar que tanto los ácidos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos presentan distinta biodisponibilidad *in vitro* en función de la variedad.

Tabla 5.21. Contenido en ácidos fenólicos de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro* (mg/100 g de nuez \pm SD)¹

Variedad	Ácido gálico	Pérdida tras la digestión (%)	Ácido elálgico	Pérdida tras la digestión (%)	Ácido siríngico	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	6,88 \pm 2,10 ^{b, d, e, f, g, h, i, j}	58	16,24 \pm 4,07 ^{b, c, d, e, f, g, h, i, j}	68	7,60 \pm 0,38 ^{b, d, e, h, i}	80
Amigo	5,74 \pm 0,41 ^{a, e, f, g, i, j}	51	9,03 \pm 0,55 ^{a, d, e, f, g, h, i, j}	62	3,40 \pm 0,19 ^{a, c, f, g, h, i, j}	84
Chico	6,46 \pm 1,25 ^{e, f, g, h, i, j}	60	9,66 \pm 1,34 ^{a, d, e, f, g, h, i, j}	71	5,82 \pm 2,39 ^{b, g, i, j}	79
Eureka	5,62 \pm 1,50 ^{a, e, f, g, i, j}	66	14,79 \pm 0,39 ^{a, b, c, e, f, g, h, i, j}	79	4,45 \pm 0,57 ^{a, g, i, j}	90
Franquette	2,85 \pm 0,90 ^{a, b, c, d}	81	4,91 \pm 1,10 ^{a, b, c, d}	89	4,98 \pm 0,14 ^{a, g, i, j}	76
Payne	2,54 \pm 0,17 ^{a, b, c, d}	78	5,25 \pm 1,48 ^{a, b, c, d}	90	6,12 \pm 1,57 ^{b, g, i, j}	78
Pedro	2,26 \pm 0,14 ^{a, b, c, d}	83	4,40 \pm 0,61 ^{a, b, c, d, j}	88	8,69 \pm 0,41 ^{b, c, d, e, f, h, i}	74
Serr	3,86 \pm 1,30 ^{a, c}	78	2,82 \pm 0,28 ^{a, b, c, d, j}	87	5,24 \pm 0,22 ^{a, b, g, i, j}	72
Sunland	1,92 \pm 0,38 ^{a, b, c, d}	86	5,06 \pm 1,06 ^{a, b, c, d}	91	12,76 \pm 0,01 ^{a, b, c, d, e, f, g, h, j}	69
Tehama	3,28 \pm 0,45 ^{a, b, c, d}	85	7,60 \pm 1,15 ^{a, b, d, g, h}	89	9,25 \pm 0,22 ^{b, c, d, e, f, h, j}	73

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

Tabla 5.22. Contenido en ácidos hidroxicinámicos de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro*¹

Variedad	Ácido clorogénico**	Pérdida tras la digestión (%)	Ácido ρ -cumárico*	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	1,89 ± 0,23 ^{b, c, d, h, j}	73	55,66 ± 1,94 ^{c, d, e, g, i, j}	74
Amigo	1,34 ± 0,29 ^{a, c, f}	69	36,87 ± 0,73 ^{d, g}	78
Chico	0,46 ± 0,13 ^{a, b, e, f, g, i}	81	35,64 ± 4,72 ^{a, d, f}	77
Eureka	0,99 ± 0,53 ^{a, f, g}	80	103,27 ± 7,95 ^{a, b, c, e, f, g, h, i, j}	53
Franquette	1,63 ± 0,43 ^{c, f}	66	32,99 ± 9,71 ^{a, d, f}	81
Payne	2,42 ± 0,50 ^{b, c, d, e, h, i, j}	69	48,54 ± 2,27 ^{c, d, e, g}	73
Pedro	1,95 ± 0,39 ^{c, d, h, j}	63	23,44 ± 2,12 ^{a, b, d, f, h, i, j}	84
Serr	0,95 ± 0,35 ^{a, f, g}	83	44,72 ± 14,48 ^{d, g}	78
Sunland	1,65 ± 0,48 ^{c, f}	56	36,49 ± 2,52 ^{a, d, f}	86
Tehama	0,93 ± 0,22 ^{a, f, g}	66	40,98 ± 4,18 ^{a, d, g}	85

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

(*) = Resultados expresados en $\mu\text{g}/100$ g de nuez \pm SD

(**) = Resultados expresados en $\text{mg}/100$ g de nuez \pm SD

Así, los ácidos gálico y elágico son más biodisponibles en la variedad Amigo (49 y 38% de media, respectivamente), el ácido siríngico y el ácido clorogénico en la variedad Sunland (31% y 44% de biodisponibilidad media, respectivamente), mientras que la biodisponibilidad *in vitro* del ácido ρ -cumárico es mayor en Eureka (47%).

En sentido contrario, Sunland presenta la menor biodisponibilidad *in vitro* en dos de los compuestos fenólicos mayoritarios en nueces; los ácidos gálico y elágico son escasamente biodisponibles en un 14 y un 9%, respectivamente ($13,77 \pm 1,33$ frente a $1,92 \pm 0,38$ mg de ác. gálico/100 g de nuez de media y $56,31 \pm 11,83$ frente a $5,06 \pm 1,06$ mg de ác. elágico/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente). Sunland también es la variedad que presenta menor biodisponibilidad *in vitro* en ácido ρ -cumárico ($260,65 \pm 18,04$ frente a $36,49 \pm 2,52$ $\mu\text{g}/100$ g de nuez de media, en la nuez y en el dializado, respectivamente).

El ácido siríngico es menos biodisponible cuando está presente en la variedad Eureka (10%), mientras que el ácido clorogénico presenta menor biodisponibilidad en Serr (17%).

5.3.3. Actividad antioxidante del dializado de las nueces

Tras someter a las nueces a una digestión *in vitro* se ha medido la actividad antioxidante del dializado a través de los métodos DPPH, ABTS y ORAC.

En la Figura 5.22 podemos observar la pérdida de actividad antioxidante que se ha producido en las nueces después de la digestión *in vitro*. En ella vemos como a través del método ABTS se produce un descenso en la actividad antioxidante del 77,3% ($156,16 \pm 32,67$ frente a $35,90 \pm 18,80$ μM Equivalentes de Trolox/g de nuez, antes y después de la digestión respectivamente).

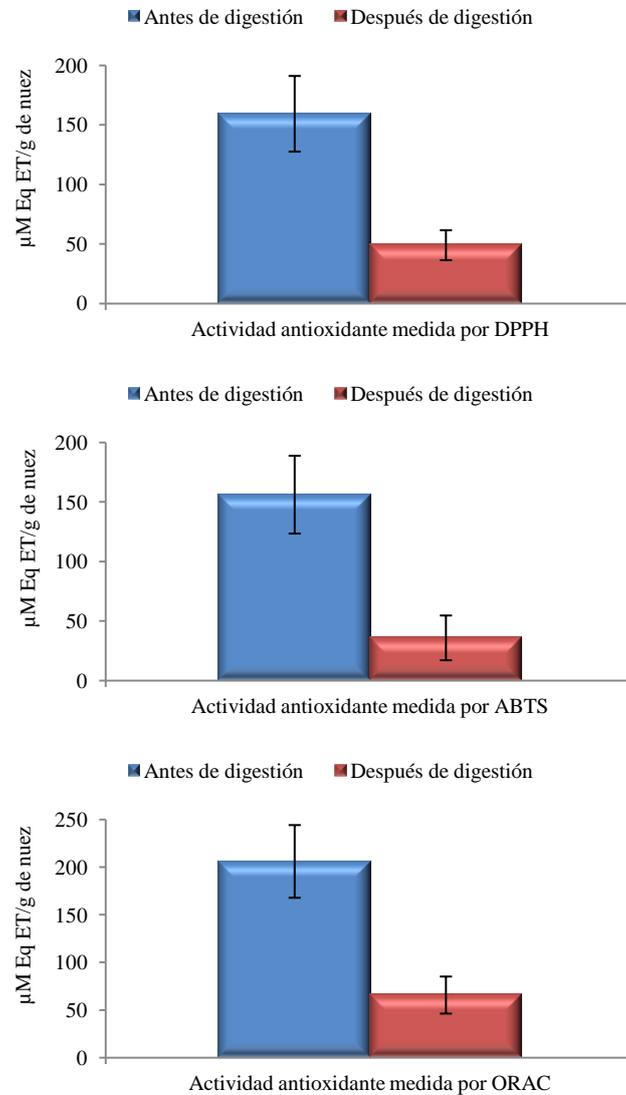


Figura 5.22. Actividad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro*

La menor caída se produce al determinar la actividad antioxidante del dializado de las nueces a través del método ORAC (67,7%). El DPPH de los dializados presentó un caída del 69,2% respecto a la medida antes de la digestión *in vitro* de las nueces.

En todos los casos las diferencias entre la actividad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro* son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Como pudimos observar en el apartado 5.1.3.1. de la presente memoria, la actividad antioxidante, medida por los métodos DPPH, ABTS y ORAC, y el contenido en fenoles totales tenían una fuerte correlación (con $R > 0,9$ en todos los casos, $\rho \leq 0,05$). Esto nos permite entender la caída de actividad antioxidante producida tras someter a las nueces a la digestión simulada, ya que, como hemos observado (Figura 5.17), los fenoles totales tras la digestión han presentado una biodisponibilidad del 25,9%.

Son diversos los trabajos publicados en consonancia con nuestros resultados. Así, Perales *et al.* (2008), obtuvieron valores de ABTS y ORAC en diferentes zumos de frutas infantiles significativamente ($\rho \leq 0,05$) menores después de someterlos a una digestión gastrointestinal *in vitro* (alrededor del 19% de la actividad antioxidante inicial).

En un estudio llevado a cabo en fresas, Cerezo *et al.* (2010), obtuvieron valores de actividad antioxidante significativamente más bajos después de someterlas a digestión. En concreto, mediante el método ORAC alcanzaba alrededor del 50% respecto al extracto de fresas sin digerir, siendo mayor la pérdida si el método empleado era el FRAP (alrededor del 60%).

Tavares *et al.* (2012), determinaron la pérdida de un 84% en la actividad antioxidante de moras medida por el método ORAC.

Record y Lane (2001), obtuvieron pérdidas más moderadas en la actividad antioxidante de extractos de té verde y negro (alrededor del 25%).

Sin embargo, otros autores han publicado resultados en los que aumentaba la actividad antioxidante de diferentes alimentos como zumos, pan y mijo, tras someter a éstos a una digestión simulada (Gawlik-Dziki *et al.*, 2009; Cilla *et al.*, 2011; Wootton-Beard *et al.*, 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012).

Si analizamos cómo ha afectado el proceso de digestión *in vitro* al potencial efecto antioxidante de los distintos genotipos de nueces (Tabla 5.23), podemos destacar como el dializado de la variedad Amigo es el que presenta mayores pérdidas de DPPH ($130,58 \pm 15,45$ frente a $27,42 \pm 3,24$ μM Equivalentes de Trolox/g de nuez en la nuez entera y en el dializado, respectivamente).

Tabla 5.23. Actividad Antioxidante de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro* (μM Equivalentes de Trolox (ET)/g de nuez \pm SD)¹

Variedad	DPPH	Pérdida tras la digestión (%)	ABTS	Pérdida tras la digestión (%)	ORAC	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	35,82 \pm 3,60 d, j	77	43,30 \pm 1,96 c, d, e, f, g, h, i, j	74	70,68 \pm 6,39 b, d, e, f, g, i, j	66
Amigo	27,42 \pm 3,24 c, d, h, j	79	39,84 \pm 6,40 c, d, e, g, h, i, j	71	61,08 \pm 5,46 a, d	63
Chico	51,28 \pm 12,29 b	68	60,66 \pm 6,67 a, b, d, e, f, g, h, i, j	59	72,49 \pm 9,40 d, e, g, i, j	56
Eureka	63,33 \pm 15,59 a, b	71	74,59 \pm 14,12 a, b, c, e, f, g, h, i, j	66	116,49 \pm 9,06 a, b, c, e, f, g, h, i, j	57
Franquette	42,45 \pm 9,25 i	66	22,60 \pm 3,78 a, b, c, d	83	51,35 \pm 6,35 a, c, d	71
Payne	49,73 \pm 8,70	69	30,04 \pm 2,32 a, c, d	81	62,82 \pm 2,16 a, d	67
Pedro	49,65 \pm 11,85	63	20,89 \pm 5,09 a, b, c, d	85	50,68 \pm 4,01 a, c, d	75
Serr	54,82 \pm 14,38 b	60	20,66 \pm 0,77 a, b, c, d	80	63,72 \pm 13,35 d	66
Sunland	43,99 \pm 6,60 j	73	21,17 \pm 0,74 a, b, c, d	87	50,41 \pm 5,17 a, c, d	78
Tehama	70,90 \pm 20,37 a, b, e, i	66	25,19 \pm 3,48 a, b, c, d	87	58,39 \pm 5,09 a, c, d	78

¹Presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a : a, Algaida; b, Amigo; c, Chico; d, Eureka; e, Franquette; f, Payne; g, Pedro; h, Serr; i, Sunland; j, Tehama

Sunland y Tehama presentan las mayores pérdidas cuando el método empleado es el ABTS, mientras que al utilizar el método ORAC es nuevamente el dializado de Tehama el que tiene una mayor caída ($265,43 \pm 23,15$ frente a $58,39 \pm 5,09$ μM Equivalentes de Trolox/g de nuez en la nuez entera y en el dializado, respectivamente). Precisamente son Sunland y Tehama las variedades que han presentado una menor biodisponibilidad de compuestos fenólicos mayoritarios en nueces, lo que explicaría la mayor caída producida de actividad antioxidante.

Al analizar los resultados obtenidos tanto en fenoles totales, como en los diferentes compuestos fenólicos cuantificados y la actividad antioxidante se observa una importante pérdida (del orden del 58-81%) en todos los casos al someter a las nueces a una digestión *in vitro*. Estos resultados pondrían en entredicho los efectos saludables derivados del contenido fenólico de las nueces, pues *in vitro* demuestran tener una escasa absorción. Sin embargo la extrapolación de resultados *in vitro* no ha sido muy estudiada. Es por ello por lo que sería necesario llevar a cabo estudios *in vivo* que confirmasen o no esta escasa capacidad de absorción de los polifenoles presentes en las nueces.

En este sentido existen numerosos estudios *in vivo* que han demostrado que se producen pérdidas tanto en el contenido en fenoles, como en la actividad antioxidante, debidas a la degradación o metabolización que sufren los compuestos fenólicos en el intestino. Así, Lotito y Frei (2004), observaron como la actividad antioxidante de un extracto de manzana era mucho mayor que cuando se analizaba el poder antioxidante en plasma tras la ingesta de la fruta, y justificaban esta pérdida por la baja absorción de los compuestos fenólicos y por su metabolización por la microflora del colon a compuestos con menor capacidad antioxidante.

Cherubini *et al.* (1999) y Caccetta *et al.* (2000), llevaron a cabo estudios similares con extractos de té y con vino tinto, respectivamente, y obtuvieron resultados similares. Observaron que a pesar de la alta actividad antioxidante que presentaban los extractos de té y vino *in vitro*, en plasma no tenían efecto protector frente a la peroxidación lipídica, dada su baja absorción.

Cerdá *et al.* (2003), detectaron solamente entre el 3 y el 6% del elagitanino punicalagina, bien en su forma original, o bien bajo la forma de algún metabolito, en la orina o los excrementos de ratones tras administrarles una dieta enriquecida en este compuesto fenólico. Y concluyeron que la punicalagina había sido metabolizada a compuestos no detectables mediante HPLC.

Así mismo, Cerdá *et al.* (2004), observaron como el ácido elágico y la punicalagina, presentes en el zumo de granada, no se encontraban en el plasma de individuos sanos después de la ingesta de 1 litro de zumo cada unos de los 5 días del ensayo (equivalente a 4,4 g de punicalagina al día) y, sí por el contrario, detectaron la presencia de sus metabolitos, como los derivados de la urolitina B, con escasa actividad antioxidante *in vivo*. Este mismo grupo de investigación llevó a cabo un ensayo similar en el que administraban diferentes matrices alimentarias ricas en elagitaninos a 40 voluntarios sanos, entre ellas las nueces, obteniendo resultados similares, ya que, si bien aquellos voluntarios que tomaron nueces fueron los que presentaron una mayor excreción de elagitaninos (derivados de urolitina B), la cantidad excretada y, por tanto, absorbida era mucho menor a la ingerida (Cerdá *et al.*, 2005b).

Lee *et al.* (2002), al estudiar la farmacocinética de de diferentes catequinas procedentes de té verde, observaron que sólo entre el 3 y el 10% aparecían en orina bajo su estructura original.

En sentido contrario, Nielsen *et al.* (2002), obtuvieron una correlación positiva entre la ingesta y la excreción por orina de diferentes flavonoides presentes en frutas y verduras ($R = 0,35$; $\rho \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Caracterización del perfil fenólico de 10 genotipos de nueces cultivados en la Región de Murcia y su actividad antioxidante *in vitro*, e influencia de los factores edafoclimáticos en estos parámetros.

1. Todas las variedades de nogal estudiadas presentan un alto contenido en compuestos fenólicos, destacando los genotipos Eureka y Tehama. Los ácidos fenólicos son el grupo mayoritario en las nueces, destacando los ácidos elágico y siríngico. Son Eureka y Tehama las variedades que presentan un mayor contenido en estos dos compuestos. Los flavonoides catequina y procianidina B₂ son los mayoritarios en el fruto, constituyendo casi el 98% de todos los identificados. Las variedades Algaida, Amigo y Payne son las que presentan un mayor contenido en estos compuestos.
2. Todas las variedades de nogal presentan una alta actividad antioxidante *in vitro* cualquiera que sea el método de análisis utilizado. El método ORAC fue el que reprodujo mayores valores de actividad antioxidante y el más preciso. Eureka y Tehama son las variedades que presentan una mayor actividad antioxidante con todos los métodos empleados. Existe una fuerte relación entre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro*, siendo alta para los ácidos fenólicos y baja para los flavan-3-oles.
3. Las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas más suaves y mayores precipitaciones afectan positivamente al contenido en compuestos fenólicos y a la capacidad antioxidante en las nueces.

Caracterización del perfil lipídico de 10 genotipos de nueces cultivados en la Región de Murcia, y la influencia de los factores edafoclimáticos en ésta.

4. Existe un alto contenido de grasa en todas las variedades de nueces estudiadas, no existiendo diferencias entre las mismas. Los ácidos grasos

poliinsaturados son los componentes lipídicos mayoritarios, destacando el contenido de ácido linoleico en todas las variedades estudiadas.

5. Las condiciones climatológicas no afectan de forma general al contenido en ácidos grasos de las nueces.

Biodisponibilidad de los componentes de la fracción fenólica de las nueces en un modelo de digestión *in vitro*.

6. Encontramos una baja biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos en las variedades de nueces estudiadas. Los genotipos Algaida y Amigo presentan la mayor biodisponibilidad de compuestos fenólicos, mientras que Eureka y Tehama presentan la menor biodisponibilidad. Asimismo, la actividad antioxidante de las variedades tras la digestión *in vitro* es mucho menor que en la muestra de partida. Los compuestos no flavonoides presentes en las nueces son menos biodisponibles que los flavan-3-oles, destacando la pérdida en elagitaninos que se produce tras someter a las nueces a la digestión *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi MA, Raza A, Riaz T, Shahzadi T, Rehman A, Jahangir M, Shahwar D, Siddiqui SZ, Chaudhary AR, Ahmad N. Investigation on the volatile constituents of *Juglans regia* and their *in vitro* antioxidant potential. Proc Pak Acad Sci 2010;47(3):137-141.
- Abdallah A, Ahumada MH, Gradziel TM. Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. J Am Soc Hort Sci 1998;123(6):1029-1033.
- Abe LT, Lajolo FM, Genovese MI. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. Ciencia Tecnol Aliment 2010;30:254-259.
- Abu Taha N, Al-wadaan MA. Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review. Afr J Microbiol Res 2011;5(32):5796-5805.
- Aguiló JI, Iturralde M, Monleón I, Iñarrea P, Pardo J, Martínez-Lorenzo MJ, *et al.* Cytotoxicity of quinone drugs on highly proliferative human leukemia T cells: Reactive Oxygen Species generation and inactive shortened SOD1 isoform implications. Chem Biol Interact 2012;(En prensa).
- Agustí M. Fruticultura. 2ª ed. Madrid. España: Mundi-Prensa Libros; 2004.
- Alasalvar C, Amaral JS, Satir G, Shahidi F. Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). Food Chem 2009;113(4):919-925.
- Alasalvar C, Amaral JS, Shahidi F. Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). J Agric Food Chem 2006;54(26):10177-83.
- Alasalvar C, Shahidi F. Natural antioxidants in tree nuts. Eur J Lipid Sci Technol 2009;111(11):1056-1062.
- Albert S, Horbach R, Deising HB, Siewert B, Csuk R. Synthesis and antimicrobial activity of (E) stilbene derivatives. Bioorg Med Chem 2011;19(17):5155-5166.

- Aldred EM, Buck C, Vall K. Phenols. Pharmacology (First edition) Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009. p. 149-166.
- Ali M, Ullah A, Ullah H, Khan F, Ibrahim S, Ali L, *et al.* Fruit properties and nutritional composition of some walnut cultivars grown in Pakistan. *Pakistan J Nutr* 2010;9(3):240-244.
- Almario R, Vonghavaravat V, Wong R, Kasim-Karakas S. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 2001;74(1):72-79.
- Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Fernanda Bahia M. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem* 2008;106(3):1014-1020.
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A* 2000;896(1-2):87-93.
- Amaral J, Casal S, Pereira J, Seabra R, Oliveira B. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal RID D-6603-2011. *J Agric Food Chem* 2003;51(26):7698-7702.
- Amaral J, Seabra R, Andrade P, Valentao P, Pereira J, Ferreres F. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chem* 2004;88(3):373-379.
- Amaral JS, Cunha SC, Santos A, Alves MR, Seabra RM, Oliveira BP. Influence of cultivar and environmental conditions on the triacylglycerol profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem* 2006;54(2):449-56.
- Amaral JS, Valentao P, Andrade PB, Martins RC, Seabra RM. Do cultivar, geographical location and crop season influence phenolic profile of walnut leaves? *Molecules* 2008;13(6):1321-1332.
- Anastasi U, Santonoceto C, Giuffrè AM, Sortino O, Gresta F, Abbate V. Yield performance and grain lipid composition of standard and oleic sunflower as affected by water supply. *Field Crops Res* 2010;119(1):145-153.

- Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem* 2010;121(4):1231-1235.
- Anderson K, Teuber S, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse A, Steinberg F. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation. *J Nutr* 2001;131(11):2837-2842.
- André CM, Oufir M, Hoffmann L, Hausman J, Rogez H, Larondelle Y, *et al.* Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and *in vitro* antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J Food Compos Anal* 2009;22(6):517-524.
- Anttonen MJ, Karjalainen RO. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J Food Compos Anal* 2005;18(8):759-769.
- AOAC International. Fat (crude) in nuts and nut products. Method 948.22. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD; 2005b.
- AOAC International. Moisture in nuts and nut products. Method 925.40. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD; 2005a.
- AOAC International. Official methods of analysis. 18^a Ed, 5^a Rev. 2010. 66: 927.
- Arapitsas P. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem* 2012;(En prensa).
- Arcan I, Yemenicioğlu A. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *J Food Compos Anal* 2009;22(3):184-188.
- Areias F, Valentao P, Andrade P, Ferreres F, Seabra R. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. *J Agric Food Chem* 2000;48(12):6081-6084.
- Arena E, Campisi S, Fallico B, Maccarone E. Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chem* 2007;104(1):403-408.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 2001;73(2):239-244.

- Aronis KN, Vamvini MT, Chamberland JP, Sweeney LL, Brennan AM, Magkos F, *et al.* Short-term walnut consumption increases circulating total adiponectin and apolipoprotein A concentrations, but does not affect markers of inflammation or vascular injury in obese humans with the metabolic syndrome: data from a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Metab Clin Exp* 2012;61(4):577-582.
- Arranz S, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *Eur Food Res Technol* 2008;227(2):425-431.
- Aruoma O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutag* 2003;523:9-20.
- Assimopoulou AN, Zlatanov SN, Papageorgiou VP. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chem* 2005;92(4):721-727.
- Auger C, Al-Awwadi N, Bornet A, Rouanet J, Gasc F, Cros G, *et al.* Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Res Int* 2004;37(3):233-245.
- Awad AB, Williams H, Fink CS. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Nutr Biochem* 2003;14(2):111-119.
- Awad MA, Wagenmakers PS, de Jager A. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of "Jonagold" apples. *Sci Hort* 2001;88(4):289-298.
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5496-5500.
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B₂ [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):142-148.
- Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res Int* 2011;44(1):391-396.

- Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G, *et al.* Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem* 2008;109(4):743-754.
- Bakar NBA, Makahleh A, Saad B. In-vial liquid-liquid microextraction-capillary electrophoresis method for the determination of phenolic acids in vegetable oils. *Anal Chim Acta* 2012;(En prensa).
- Bakkalbaşı E, Yılmaz ÖM, Javidipour I, Artık N. Effects of packaging materials, storage conditions and variety on oxidative stability of shelled walnuts. *LWT - Food Sci Technol* 2012;46(1):203-209.
- Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar M. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal* 2006;40(1):206-210.
- Ballistreri G, Arena E, Fallico B. Characterization of triacylglycerols in *Pistacia vera* L. oils from different geographic origins. *Ital J Food Sci* 2010;22(1):69-75.
- Balta MF, Yarılgac T, Askin MA, Kucuk M, Balta F, Ozrenk K. Determination of fatty acid compositions, oil contents and some quality traits of hazelnut genetic resources grown in eastern Anatolia of Turkey. *J Food Compos Anal* 2006;19(6-7):681-686.
- Banel DK, Hu FB. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009;90(1):56-63.
- Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars. *Food Chem Toxicol* 2008;46(6):2230-2235.
- Barros HRdM, Ferreira, Tânia Aparecida Pinto de Castro, Genovese MI. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chem* 2012;134(4):1892-1898.
- Barros L, Dueñas M, Alves CT, Silva S, Henriques M, Santos-Buelga C, *et al.* Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind Crop Prod* 2013;41(0):41-45.

- Barthet VJ, Cornick T, Daun JK. Comparison of methods to measure the oil contents in oilseeds. *J Oleo Sci* 2002;51:589-597.
- Berké B, de Freitas VAP. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem* 2005;90(3):453-460.
- Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Bio Med* 1996;20(5):707-727.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chem* 2007;102(3):865-874.
- Beserra Almeida MM, Machado de Sousa PH, Campos Arriaga AM, do Prado GM, de Carvalho Magalhaes CE, Maia GA, *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int* 2011;44(7):2155-2159.
- Beyhan O, Elmastaş M, Genc N, Akşit H. Effect of altitude on fatty acid composition in Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties. *Afr J Biotechnol* 2011;10(71):16064-16068.
- Bhagwat S, Haytowitz D, Harnly J, Holden J. Update of the USDA database for the flavonoid content of selected foods. *J Nutr* 2005;135(12):3050S-3050S.
- Bhatia K, Rahman S, Ali M, Raisuddin S. *In vitro* antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. *Redox Rep* 2006;11(6):273-279.
- Bidel LPR, Meyer S, Goulas Y, Cadot Y, Cerovic ZG. Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: *In vivo* qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *J Photoch Photobio B* 2007;88(2-3):163-179.
- Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J Chromatogr A* 2011;1218(18):2505-2512.
- Binder RG, Benson ME, Flath RA. Eight 1,4-naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochemistry* 1989;28(10):2799-2801.
- Björkman M, Klingen I, Birch ANE, Bones AM, Bruce TJA, Johansen TJ, *et al.* Phytochemicals of *Brassicaceae* in plant protection and human health -

- Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 2011;72(7):538-556.
- Bolling BW, Chen C-O, McKay DL, Blumberg JB. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr Res Rev* 2011;24(2):244-275.
- Bolling BW, Dolnikowski G, Blumberg JB, Chen C-O. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chem* 2010b;122(3):819-825.
- Bolling BW, McKay DL, Blumberg JB. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010a;19(1):117-123.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *Food Sci Technol-Leb* 1997;30(6):609-615.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 2010;278(1):55-67.
- Boo H, Hwang S, Bae C, Park S, Heo B, Gorinstein S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind Crop Prod* 2012;40(0):129-135.
- Borazjani A, Graves C, Hedin P. Occurrence of juglone in various tissues of pecan and related species. *Phytopathology* 1985;75(12):1419-1421.
- Borges OP, Soeiro Carvalho J, Reis Correia P, Paula Silva A. Lipid and fatty acid profiles of *Castanea sativa* Mill. Chestnuts of 17 native Portuguese cultivars. *J Food Compos Anal* 2007;20(2):80-89.
- Bouayed J, Deusser H, Hoffmann L, Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chem* 2012;131(4):1466-1472.
- Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem* 2011;128(1):14-21.

- Boulekbache-Makhlouf L, Slimani S, Madani K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Ind Crop Prod* 2013;41(0):85-89.
- Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *J Food Compos Anal* 2010;23(6):554-560.
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol-Leb* 1995;28(1):25-30.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-333.
- Brouillard R, Dangles O. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chem* 1994;51(4):365-371.
- Brown DF, Cater CM, Mattil KF, Darroch JG. Effect of variety, growing location and their interaction on the fatty acid composition of peanuts. *J Food Sci* 1975;40(5):1055-1060.
- Bulló M, Amigó-Correig P, Márquez-Sandoval F, Babio N, Martínez-González MA, Estruch R, *et al.* Mediterranean diet and high dietary acid load associated with mixed nuts: effect on bone metabolism in elderly subjects. *J Am Geriatr Soc* 2009;57(10):1789-1798.
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean M, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 2002;50(11):3337-3340.
- Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 2000;71(1):67-74.
- Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997;6(4):391-397.
- CAE (Código Alimentario Español) Legislación Alimentaria "Código Alimentario Español y Disposiciones complementarias". 7^a ed. P. Deleuze Isasi. Editorial Tecnos, Madrid. 2006.
- Caglarirmak N. Biochemical and physical properties of some walnut genotypes (*Juglans regia* L.). *Nahrung-Food* 2003;47(1):28-32.

- Carlsen MH, Halvorsen BL, Blomhoff R. Antioxidants in nuts and seeds. Nuts and seeds in health and disease prevention San Diego: Academic Press; 2011. p. 55-64.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Sampson L, *et al.* The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010;9:3.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* 2011;16(1):251-280.
- Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jeronimo C, *et al.* Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem Toxicol* 2010;48(1):441-447.
- Casas-Agustench P, Bulló M, Ros E, Basora J, Salas-Salvadó J. Cross-sectional association of nut intake with adiposity in a Mediterranean population. *Nutr Metab Cardiovas* 2011a;21(7):518-525.
- Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Bulló M, Ros E, Cabré-Vila JJ, Salas-Salvadó J. Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovas* 2011b;21(2):126-135.
- Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Ros E, Bulló M, Salas-Salvadó J. Nuts, hypertension and endothelial function. *Nutr Metab Cardiovas* 2011c;21(1):21-33.
- Cerdá B, Espín J, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán F. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 2004;43(4):205-220.
- Cerdá B, Llorach R, Cerón J, Espín J, Tomás-Barberán F. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr* 2003;42(1):18-28.
- Cerdá B, Periago P, Espín J, Tomás-Barberán F. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem* 2005a;53(14):5571-5576.

- Cerdá B, Tomás-Barberán F, Espín J. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005b;53(2):227-235.
- Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in *Camarosa* strawberry. *Food Chem* 2010;123(3):574-582.
- Chahed T, Bellila A, Dhifi W, Hamrouni I, M'Hamdi B, Kchouk ME, *et al.* Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: Geographic situation and variety effects. *Grasas Aceites* 2008;59(1):51-56.
- Chaieb N, Luis González J, López-Mesas M, Bouslama M, Valiente M. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Res Int* 2011;44(4):970-977.
- Chandrasekara A, Shahidi F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *J Funct Food* 2012;4(1):226-237.
- Chandrasekara N, Shahidi F. Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting. *Food Chem* 2011;129(4):1388-1396.
- Charlot G, Germain E. Le noyer nouvelles techniques. France, Edition CTIFL. 1988. 208 p.
- Chen CO, Blumberg JB. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17:329-332.
- Chen Y, Yang Z, Wen C, Chang Y, Wang B, Hsiao C, *et al.* Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of *Zebrafish larvae*. *Food Chem* 2012;134(2):717-724.
- Chen Z, Zhu Q, Tsang D, Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem* 2001;49(1):477-482.
- Cheniany M, Ebrahimzadeh H, Masoudi-nejad A. Expression of chalcone synthase influences flavonoid content and frequency of rhizogenesis in microshoots of *Juglans regia* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2012;109(1):51-59.

- Cherniack EP. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* 2011;27(6):617-623.
- Cherubini A, Beal MF, Frei B. Black tea increases the resistance of human plasma to lipid peroxidation *in vitro*, but not *ex vivo*. *Free Radic Biol Med* 1999;27(3-4):381-387.
- Chiang A, Wu H, Yeh H, Chu C, Lin H, Lee W. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids* 2006;41(8):797-803.
- Chisholm A, Mann J, Skeaff M, Frampton C, Sutherland W, Duncan A, *et al.* A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(1):12-16.
- Chisholm A, Mc Auley K, Mann J, Williams S, Skeaff M. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. *Nutr Metab Cardiovas* 2005;15(4):284-292.
- Christopoulos MV, Tsantili E, Papageorgiou V, Komaitis M, Rouskas D. Effects of package atmosphere and temperature on phenolics, total antioxidant capacity and colour in kernels of "Franquette" walnuts during 8-month storage. *Acta Hort* 2010;858:75-81.
- Christopoulos MV, Tsantili E. Storage of fresh walnuts (*Juglans regia* L.) - Low temperature and phenolic compounds. *Postharvest Biol Technol* 2012;73(0):80-88.
- Chrzanowski G, Leszczyński B, Czerniewicz P, Sytykiewicz H, Matok H, Krzyżanowski R, *et al.* Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. *Crop Prot* 2012;35(0):71-77.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr* 2007;137(5):1244-1252.
- Chung MJ, Walker PA, Hogstrand C. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquat Toxicol* 2006;80(4):321-328.
- Cilla A, González-Sarrias A, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Barberá R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro*

- gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chem* 2009;114(3):813-820.
- Cilla A, Perales S, Jesus Lagarda M, Barberá R, Clemente G, Farre R. Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *J Food Compos Anal* 2011;24(1):87-94.
- Claudot AC, Ernst D, Sandermann H, Drouet A. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* 1997;203(3):275-282.
- Claudot AC, Jay-Allemand C, Magel EA, Drouet A. Phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and polyphenolic compounds in adult and rejuvenated hybrid walnut tree. *Trees-Struct Funct* 1993;7(2):92-97.
- Clifford M, Scalbert A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):1118-1125.
- Clifford M. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):1033-1043.
- Colaric M, Veberič R, Solar A, Hudina M, Štampar F. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *J Agric Food Chem* 2005;53(16):6390-6396.
- Cook N, Samman S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996;7(2):66-76.
- Costa VAV, Vianna LM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Alpha-tocopherol supplementation favorable effects on blood pressure, blood viscosity and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 2005;16(4):251-256.
- Couzinet-Mossion A, Balayssac S, Gilard V, Malet-Martino M, Potin-Gautier M, Behra P. Interaction mechanisms between caffeine and polyphenols in infusions of *Camellia sinensis* leaves. *Food Chem* 2010;119(1):173-181.
- Cremin P, Kasim-Karakas S, Waterhouse A. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 2001;49(4):1747-1750.

- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W. Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *J Agric Food Chem* 2005;53(12):4853-60.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (Secondary metabolites). En: Buchannan BB, Grisse W, Jones RL., editor. *Biochemistry and molecular biology of Plant American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD; 2000. p. 1250-1318.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009;26(8):1001-1043.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*: Blackwell Publishing Ltd; 2006; 2007. p. 1-24.
- Cui C, Cai J, Jiang Z, Zhang S. Isolation and identification of allelochemicals in rhizosphere and adjacent soil under walnut (*Juglans regia* L.) trees. *Allelopathy J* 2012;29(1):25-36.
- Damasceno NRT, Pérez-Heras A, Serra M, Cofan M, Sala-Vila A, Salas-Salvadó J, *et al.* Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovas* 2011;21:S14-S20.
- Dani C, Oliboni LS, Vanderlinde R, Bonatto D, Salvador M, Henriques JAP. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food Chem Toxicol* 2007;45(12):2574-2580.
- Daniel EM, Krupnick AS, Heur Y, Blinzler JA, Nims RW, Stoner GD. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J Food Compos Anal* 1989;2(4):338-349.
- Das UN. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in the pathobiology of schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;(En prensa).
- Dávalos A, Gómez-Cordoves C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem* 2004;52(1):48-54.

- Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *BBA-Proteins Proteomics* 2005;1703(2):93-109.
- Davis DD, Díaz-Cruz ES, Landini S, Kim Y, Brueggemeier RW. Evaluation of synthetic isoflavones on cell proliferation, estrogen receptor binding affinity, and apoptosis in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;108(1-2):23-31.
- Davis P, Valacchi G, Pagnin E, Shao QM, Gross HB, Calo L, *et al.* Walnuts reduce aortic ET-1 mRNA levels in hamsters fed a high-fat, atherogenic diet. *J Nutr* 2006;136(2):428-432.
- Davis PA, Vasu VT, Gohil K, Kim H, Khan IH, Cross CE, Yokoyama W. A high-fat diet containing whole walnuts (*Juglans regia*) reduces tumour size and growth along with plasma insulin-like growth factor 1 in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Br J Nutr* 2012;16:1-9.
- de Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: *In vitro* inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chem* 2005;90(4):569-577.
- de Souza VR, Pimenta Pereira PA, Queiroz F, Borges SV, Souza Carneiro JdD. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chem* 2012;134(1):381-386.
- de Vries J, Hollman P, Meyboom S, Buysman M, Zock P, van Staveren W, *et al.* Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr* 1998;68(1):60-65.
- Delgado T, Malheiro R, Pereira JA, Ramalhosa E. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. *Ind Crop Prod* 2010;32(3):621-626.
- Deng D, Zhang J, Cooney JM, Skinner MA, Adaim A, Jensen DJ, *et al.* Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *FEBS Lett* 2006;580(22):5247-5250.

- Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal* 2001;3(6):957-67.
- Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(6):1203-1208.
- Dewick PM. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 3rd ed. Chichester West Sussex, UK: John Wiley and Sons; 2009.
- Dhingra B, Davis A. Determination of free ellagic acid by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *J Chromatogr* 1988;447(1):284-286.
- Dinis L, Oliveira MM, Almeida J, Costa R, Gomes-Laranjo J, Peixoto F. Antioxidant activities of chestnut nut of *Castanea sativa* Mill. (cultivar "Judia") as function of origin ecosystem. *Food Chem* 2012;132(1):1-8.
- Dinnella C, Minichino P, D'Andrea AM, Monteleone E. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* 2007;55(21):8423-8429.
- Djoussé L, Gaziano JM, Kase CS, Kurth T. Nut consumption and risk of stroke in US male physicians. *Clin Nutr* 2010;29(5):605-609.
- Djoussé L, Rudich T, Gaziano JM. Nut consumption and risk of hypertension in US male physicians. *Clin Nutr* 2009;28(1):10-14.
- Dogan M, Akgul A. Fatty acid composition of some walnut (*Juglans regia* L.) cultivars from east Anatolia. *Grasas Aceites* 2005;56(4):328-331.
- Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr* 2002;87(4):299-306.
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am J Enol Vitic* 2006;57(3):257-268.
- Dreher ML, Maher CV, Kearnney P. The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. *Nutr Rev* 1996;54(8):241-5.

- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem* 2009;57(5):1768-1774.
- Duroux L, Delmotte F, Lancelin J, Keravis G, Jay-Allemand C. Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. *Biochem J* 1998;333:275-283.
- Eblin KE, Hau AM, Jensen TJ, Futscher BW, Gandolfi AJ. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: Acute studies. *Toxicology* 2008;250(1):47-54.
- Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R, Dherin C, Radicella JP, Epe B. Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair* 2008;7(6):912-921.
- El Euch C, Jay-Allemand C, Pastuglia M, Doumas P, Charpentier J, Capelli P, *et al.* Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability. *Plant Mol Biol* 1998;38(3):467-479.
- Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the Bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem* 2007;55(25):10476-10485.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, García-Viguera C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *J Agric Food Chem* 2000b;48(5):1588-1592.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 2000a;48(3):648-656.
- Espín JC, Wichers HJ. Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J Food Biochem* 2000;24(3):225-250.

- Faruk Gamlı Ö, Hayoğlu İ. The effect of the different packaging and storage conditions on the quality of pistachio nut paste. *J Food Eng* 2007;78(2):443-448.
- Fazzari M, Fukumoto L, Mazza G, Livrea MA, Tesoriere L, Di Marco L. *In vitro* bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J Agric Food Chem* 2008;56(10):3561-3568.
- Feldman EB. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J Nutr* 2002;132(5):1062S-1101S.
- Ferdowsian HR, Barnard ND. Effects of plant-based diets on plasma lipids. *Am J Cardiol* 2009;104(7):947-956.
- Fernandes I, Nave F, Gonçalves R, de Freitas V, Mateus N. On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chem* 2012;135(2):812-818.
- Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andrade PB, González-Álvarez J, *et al.* Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind Crop Prod* 2013;42(0):126-132.
- Ferruzzi MG, Bordenave N, Hamaker BR. Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol-protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. *Physiol Behav* 2012;(En prensa).
- Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem* 2011;127(2):807-821.
- Fitschen PJ, Rolfhus KR, Winfrey MR, Allen BK, Manzy M, Maher MA. Cardiovascular effects of consumption of Black versus English walnuts. *J Med Food* 2011;14(9):890-898.
- Fleuriet A, Macheix J. Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation. *Phytochemistry* 1985;24(5):929-932.

- Floegel A, Kim D, Chung S, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal* 2011;24(7):1043-1048.
- Flores G, Dastmalchi K, Paulino S, Whalen K, Dabo AJ, Reynertson KA, *et al.* Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. *Food Chem* 2012;134(3):1256-1262.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226(1):497-509.
- Food and Agriculture Organization. 2011a. Estadísticas producción de cultivos 2011. Datos 2009; Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Fecha de acceso: 08/09, 2011.
- Food and Agriculture Organization. 2011b. Estadísticas de exportaciones e importaciones de productos 2011. Datos 2008. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Fecha de acceso: 08/09, 2011.
- Food and Agriculture Organization. 2011c. Estadísticas de suministro alimentario de cultivos primarios equivalentes 2011. Datos 2007. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/609/DesktopDefault.aspx?PageID=609#ancor>. Fecha de acceso: 08/09, 2011.
- FOSFA. International Official Method. Determination of oil content in oilseeds-solvent extraction. Reference method, FOSFA International Manual 1998 1998;45-50:283-288.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 2010;31(6):435-445.
- Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 2000;80(13):1925-1941.
- Franzini L, Ardigò D, Valtueña S, Pellegrini N, Del Rio D, Bianchi MA, *et al.* Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. *Nutr Metab Cardiovas* 2012;22(1):50-57.

- Freeman BL, Eggett DL, Parker TL. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in Navel oranges. *J Food Sci* 2010;75(6):C570-C576.
- Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J, Tremblay S, Blachere J, Begin ME, *et al.* Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostag Leukotr Ess* 2006;75(3):213-220.
- Frei B. Reactive Oxygen Species and antioxidant vitamins - Mechanisms of action. *Am J Med* 1994;97:S5-S13.
- Fuchigami L, Wisniewski M. Quantifying bud dormancy: Physiological approaches. *Sci Hort* 1997;32(4):618-623.
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 2003;63(7):795-801.
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *Biofactors* 2004;21(1-4):251-253.
- García JM, Agar LT, Streif J. Lipid characterization in kernels from different walnut cultivars. *Turk J Agric For* 1994;18(1):195-198.
- García-Alonso F, Periago M, Vidal-Guevara M, Cantos E, Ros G, Ferreres F, *et al.* Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *J Food Sci* 2003;68(4):1525-1530.
- García-Parrilla MC, Cantos E, Troncoso AM. Analysis of melatonin in foods. *J Food Compos Anal* 2009;22(3):177-183.
- Gawlik-Dziki U, Dziki D, Baraniak B, Lin R. The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Sci Technol* 2009;42(1):137-143.
- Gecgel U, Gumus T, Tasan M, Daglioglu O, Arici M. Determination of fatty acid composition of γ -irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios. *Radiat Phys Chem* 2011;80(4):578-581.
- Germain E, Jalinat J, Marchou M. Divers aspects de la biologie florale du noyer. (*Juglans regia* L.). *Bulletin Technique d'information. INVUFLEC.* 1975;282:13-14.
- Germain E, Prunet JP, Garcin A. Le Noyer. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris. France. 2001:277.

- Gharibzahedi SMT, Mousavi SM, Hamed M, Khodaiyan F. Comparative analysis of new Persian walnut cultivars: nut/kernel geometrical, gravimetric, frictional and mechanical attributes and kernel chemical composition. *Sci Hort* 2012;135(0):202-209.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, *et al.* Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J Med Plants Res* 2011;5(7):1128-1133.
- Gil F, Pszczółkowski PT. *Viticultura, fundamentos para optimizar producción y calidad*. 1ª ed. Santiago de Chile, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile; 2007.
- Gil F. *Fruticultura. La producción de fruta: Fruta de climas templado y subtropical y uva de vino*. 1ª ed. Santiago de Chile, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile; 2000.
- Gil M, Tomás-Barberán F, Hess-Pierce B, Holcroft D, Kader A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000;48(10):4581-4589.
- Gil-Albert F. *La ecología del árbol frutal*. 3ª ed. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 1992.
- Gil-Albert F. *Morfología y fisiología del árbol frutal*. 4ª ed. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 1995.
- Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomás-Barberán F. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur Food Res Technol* 2002;214(2):155-159.
- Gironés-Vilaplana A, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Moreno DA, García-Viguera C. Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food Chem* 2012;134(4):2090-2096.
- Girzu M, Carnat A, Privat A, Fialip J, Carnat A, Lamaison J. Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. *Pharm Biol* 1998;36(4):280-286.

- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003;36(1):79-87.
- Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Caboni MF. Chromatographic techniques for the determination of alkyl-phenols, tocopherols and other minor polar compounds in raw and roasted cold pressed cashew nut oils. *J Chromatogr A* 2010;1217(47):7411-7417.
- Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Segura-Carretero A, Caboni MF, Fernández-Gutiérrez A. Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008;1209(1-2):238-245.
- Gonçalves J, Silva CL, Castilho PC, Câmara JS. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchem J* 2012;(En prensa).
- Gonthier M, Verny M, Besson C, Remesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 2003;133(6):1853-1859.
- González-Barrio R, Truchado P, Ito H, Espín JC, Tomás-Barberán FA. UV and MS identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *J Agric Food Chem* 2011;59(4):1152-1162.
- González-Sarrias A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera NV, Gil-Izquierdo A, *et al.* Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(3):311-322.
- Green RJ, Murphy AS, Schulz B, Watkins BA, Ferruzzi MG. Common tea formulations modulate *in vitro* digestive recovery of green tea catechins. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(9):1152-62.

- Greve L, McGranahan G, Hasey J, Snyder R, Kelly K, Goldhamer D, *et al.* Variation in polyunsaturated fatty acids composition of Persian walnut. *J Am Soc Hort Sci* 1992;117(3):528-532.
- Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 2006;57:761-780.
- Groussin A, Antoniotti S. Valuable chemicals by the enzymatic modification of molecules of natural origin: Terpenoids, steroids, phenolics and related compounds. *Bioresource Technol* 2012;115(0):237-243.
- Gruz J, Ayaz FA, Torun H, Strnad M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chem* 2011;124(1):271-277.
- Gu L, Kelm M, Hammerstone J, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, *et al.* Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 2004;134(3):613-617.
- Gülçin İ, Bursal E, Şehitoğlu MH, Bilsel M, Gören AC. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 2010;48(8-9):2227-2238.
- Gumienna M, Lasik M, Czarnecki Z. Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *Int J Food Sci Nutr* 2011;62(3):226-233.
- Gunduc N, El S. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *J Food Sci* 2003;68(8):2591-2595.
- Haenen GRMM, Arts MJTJ, Bast A, Coleman MD. Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* - A critical appraisal illustrated with the flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006;21(2):191-198.
- Häkkinen S, Kärenlampi S, Mykkänen H, Heinonen I, Törrönen A. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur Food Res Technol* 2000;212(1):75-80.

- Häkkinen SH, Törrönen AR. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res Int* 2000;33(6):517-524.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *J Free Radic Biol Med* 1985;1(4):331-332.
- Halliwell B, Murcia M, Chirico S, Aruoma O. Free-radicals and antioxidants in food and *in-vivo* - what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(1-2):7-20.
- Halliwell B. Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. *Advances in Pharmacology* 1996;38:3-20.
- Han DH, Lee MJ, Kim JH. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Res* 2006;26(5A):3601-3606.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55(6):481-504.
- Hardman WE, Ion G. Suppression of implanted MDA-MB 231 human breast cancer growth in nude mice by dietary walnut. *Nutr Cancer* 2008;60(5):666-674.
- Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, *et al.* Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem* 2006;54(26):9966-9977.
- Harrigan GG, Stork LG, Riordan SG, Reynolds TL, Taylor JP, Masucci JD, *et al.* Impact of environmental and genetic factors on expression of maize gene classes: Relevance to grain composition. *J Food Compos Anal* 2009;22(2):158-164.
- Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 2008;197(1):12-24.
- He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010;1:163-187.
- Hedin P, Langhans V, Graves C. Identification of juglone in pecan as a possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. *J Agric Food Chem* 1979;27(1):92-94.

- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):572-584.
- Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-Teresa S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem* 2010;121(3):691-696.
- Holaday CE, Pearson JL. Effects of genotype and production area on the fatty acid composition, total oil and total protein in peanuts. *J Food Sci* 1974;39(6):1206-1209.
- Iglesias I, Echeverría G, Soria Y. Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight "Gala" apple strains. *Sci Hort* 2008;119(1):32-40.
- Ihns R, Diamante LM, Savage GP, Vanhanen L. Effect of temperature on the drying characteristics, colour, antioxidant and beta-carotene contents of two apricot varieties. *Int J Food Sci Technol* 2011;46(2):275-283.
- Infoagro. El Cultivo de la Nuez. 2011; Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/frutos_secos/nogal.htm. Fecha de acceso: 11/08/2011.
- Ioannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J Food Eng* 2012;111(2):208-217.
- Ito H, Okuda T, Fukuda T, Hatano T, Yoshida T. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *J Agric Food Chem* 2007;55(3):672-679.
- Jagtap UB, Waghmare SR, Lokhande VH, Suprasanna P, Bapat VA. Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) wine and its protective role against radiation induced DNA damage. *Ind Crop Prod* 2011;34(3):1595-1601.
- Jakopič J, Colaric M, Veberič R, Hudina M, Solar A, Štampar F. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chem* 2007;104(1):100-105.
- Jakopič J, Štampar F, Veberič R. The influence of exposure to light on the phenolic content of "Fuji" apple. *Sci Hort* 2009b;123(2):234-239.

- Jakopič J, Veberič R, Štampar F. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agric Slov* 2009a;93(1):11-15.
- Jaleel A. Ageing and health: Free radicals and oxidative stress. *Jcsp-Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 2008;18(8):465-466.
- Jalili A, Alipour S, Sadegzadeh A. Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from *Juglans regia* hulls and shells *Int Res J Biochem Bioinform* 2011;1(11):282-289.
- Jalili A, Heydari R, Sadegzadeh A, Alipour S. Reducing power and radical scavenging activities of phenolic extracts from *Juglans regia* hulls and shells. *Afr J Biotechnol* 2012;11(37):9040-9047.
- Janick J, Paull RE. The Encyclopedia of fruits and nuts. 2008th ed. Wallingford. Oxford. Inglaterra: CABI International; 2008.
- Jay-Allemand C, Charpentier JP, Bruant B, Burtin P, Fady B, Lefevre F, *et al.* Genetic of phenolic compounds in walnut: qualitative and quantitative variations among cultivars. *Acta Hort* 2001;544:73-81.
- Jay-Allemand C, Keravis G, Lancellin JM, Macheix JJ. Naphthoquinones and flavonols associated walnut rejuvenation and involved in different physiological processes. *Plant Physiol.*, 93 (Suppl.) 1990. p. 147.
- Jayasekera S, Molan AL, Garg M, Moughan PJ. Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea. *Food Chem* 2011;125(2):536-541.
- Jeong J, Jung H, Lee S, Lee H, Hwang KT, Kim T. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem* 2010;123(2):338-344.
- Jia XM, Ebine N, Wang YW, Awad AB, Jones PJH. Effects of different phytosterol analogs on colonic mucosal cell proliferation in hamsters. *J Nutr Biochem* 2006;17(6):396-401.
- Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marín C, Pérez-Martínez P, Ruano J, *et al.* Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 2009;204(2):e70-6.

- Jin P, Wang SY, Gao H, Chen H, Zheng Y, Wang CY. Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. *Food Chem* 2012;132(1):399-405.
- Jin P, Wang SY, Wang CY, Zheng Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. *Food Chem* 2011;124(1):262-270.
- Joët T, Laffargue A, Descroix F, Doulebeau S, Bertrand B, Kochko Ad, *et al.* Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chem* 2010;118(3):693-701.
- John JA, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J Funct Food* 2010;2(3):196-209.
- Julkunentiitto R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows - Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 1985;33(2):213-217.
- Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998;799(1-2):101-110.
- Kadereit JW, Weiler EA, Sitte P. Strasburger. *Tratado de Botánica*. 35ª ed. Barcelona. Omega Ediciones. 2004.
- Kahle K, Huemmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T, Richling E. Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J Agric Food Chem* 2007;5(26):10605-14.
- Kahle K, Kempf M, Schreier P, Scheppach W, Schrenk D, Kautenburger T, *et al.* Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr* 2011;50(7):507-22.
- Kaijser A, Dutta P, Savage G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chem* 2000;71(1):67-70.
- Kant MR, Bleeker PM, Wijk MV, Schuurink RC, Haring MA. Chapter 14 Plant volatiles in defence. *Advances in botanical research*: Academic Press; 2009. p. 613-666.

- Karadeniz T, Küp M. The effects on quality hazelnut of direction. *Acta Hort* 1997;445:285-294.
- Karamac M. *In-vitro* study on the efficacy of tannin fractions of edible nuts as antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009;111(11):1063-1071.
- Kehrer JP, Robertson JD, Smith CV. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. En: Charlene A. McQueen, editor. *Comprehensive Toxicology Oxford: Elsevier*; 2010. p. 277-307.
- Khallouki F, Haubner R, Erben G, Ulrich CM, Owen RW. Phytochemical composition and antioxidant capacity of various botanical parts of the fruits of *Prunus x domestica* L. from the Lorraine region of Europe. *Food Chem* 2012;133(3):697-706.
- Kim W, Khan NA, McMurray DN, Prior IA, Wang N, Chapkin RS. Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res* 2010;49(3):250-261.
- Kirk RS, Egan H, Sawyer R. *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. 2^a ed. Mexico: CONTINENTAL; 1996.
- Kocyigit A, Koçlu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr Metabol Cardiovas* 2006;16(3):202-209.
- Koes R, Quattrocchio F, Mol J. The flavonoid biosynthetic-pathway in plants - function and evolution. *Bioessays* 1994;16(2):123-132.
- Köksal Aİ, Artik N, Şimşek A, Güneş N. Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chem* 2006;99(3):509-515.
- Kong KW, Mat-Junit S, Aminudin N, Ismail A, Abdul-Aziz A. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chem* 2012;134(1):324-332.
- Kornsteiner M, Wagner K, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem* 2006;98(2):381-387.

- Kouba M, Mourot J. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 2011;93(1):13-17.
- Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, Andrikopoulos NK. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine* 2007;14(10):659-667.
- Koyuncu MA, Balta F, Koyuncu F, Balta F. Main composition of the fruits of the hazelnuts Tombul and Palaz cultivars preselected in Carsamba and Terme (Samsun) districts. *Acta Hort* 1997a;445:119-122.
- Koyuncu MA, Koyuncu F, Bostan S, Islam A. Change of fat content and fatty acid composition during the fruit development period in the hazelnuts Tombul and Palaz cultivars grown in Ordu. *Acta Hort* 1997b;445:229-236.
- Koyuncu MA. Change of fat content and fatty acid composition of Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during storage. *J Food Qual* 2004;27(4):304-309.
- Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabaté J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: Multiple potential mechanisms. *J Nutr* 2008;138(9):1746S-1751S.
- Kris-Etherton PM, Yu-Poth S, Sabaté J, Ratcliffe HE, Zhao G, Etherton TD. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am J Clin Nutr* 1999;70(3):504s-511s.
- Kritchevsky D, Tepper S, Czarnecki S, Klurfeld D. Atherogenicity of animal and vegetable protein - influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis* 1982;41(2-3):429-431.
- Kroon P, Clifford M, Crozier A, Day A, Donovan J, Manach C, *et al.* How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? RID. *Am J Clin Nutr* 2004;80(1):15-21.
- Kunyanga CN, Imungi JK, Okoth MW, Biesalski HK, Vadivel V. Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT - Food Sci Technol* 2012;45(2):269-276.

- Labuckas DO, Maestri DM, Perello M, Martínez ML, Lamarque AL. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem* 2008;107(2):607-612.
- Lachman J, Hamouz K, Orsak M, Pivec V, Dvorak P. The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Sci Hort* 2008;117(2):109-114.
- Lagarda MJ, García-Llatas G, Farre R. Analysis of phytosterols in foods. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41(5):1486-1496.
- Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int* 2011;44(5):1150-1160.
- Langsdorf EF, Mao X, Chang SL. A role for reactive oxygen species in endotoxin-induced elevation of MOR expression in the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* 2011;236(1-2):57-64.
- Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med* 2010;31(6):513-539.
- Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006;17(9):611-625.
- Lata B. Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: Year and cultivar variation. *J Agric Food Chem* 2007;55(3):663-671.
- Laurent C, Besançon P, Caporiccio B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem* 2007;100(4):1704-1712.
- Lavedrine F, Ravel A, Poupard A, Alary J. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chem* 1997;58(1-2):135-140.
- Lavedrine F, Zmirou D, Ravel A, Balducci F, Alary J. Blood cholesterol and walnut consumption: A cross-sectional survey in France. *Prev Med* 1999;28(4):333-339.

- Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(7):585-594.
- Le Core L, Fustier P, Chalabi N, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with BRCA 1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin Chim Acta* 2004;344:115-121.
- Lee KC, Campbell RW. Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. *Sci Hort* 1969;4:297-298.
- Lee M, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans. *Cancer Epidem Biomar* 2002;11(10):1025-1032.
- Lee SS, Lee SM, Kim M, Chun J, Cheong YK, Lee J. Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food Res Int* 2004;37(3):247-251.
- Leekumjorn S, Cho HJ, Wu Y, Wright NT, Sum AK, Chan C. The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *BBA-Biomembranes* 2009;1788(7):1508-1516.
- Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res* 2008;28(11):729-737.
- Lesschaeve I, Noble AC. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr* 2005;81(1):330S-335S.
- Lewis CE, Walker JRL, Lancaster JE. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chem* 1995;54(3):315-319.
- Li D, Hu X. Chapter 4 - Fatty acid content of commonly available nuts and seeds. En: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson y Vinood B. Patel, Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, Vinood B. Patel, editors. *Nuts and seeds in health and disease prevention* San Diego: Academic Press; 2011. p. 35-42.
- Li D, Yao T, Siriamornpun S. Alpha-linolenic acid content of commonly available nuts in Hangzhou. *Int J Vitam Nutr Res* 2006b;76(1):18-21.
- Li J, Xu H. Bioactive compounds from the bark of *Eucalyptus exserta* F. Muell. *Ind Crop Prod* 2012;40(0):302-306.

- Li L, Tsao R, Yang R, Kramer JK, Hernández M. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J Agric Food Chem* 2007;55(4):1164-9.
- Li L, Tsao R, Yang R, Liu C, Zhu H, Young JC. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J Agric Food Chem* 2006a;54(21):8033-8040.
- Li Z, Pan Q, Jin Z, Mu L, Duan C. Comparison on phenolic compounds in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. *Food Chem* 2011;125(1):77-83.
- Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y, *et al.* *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res Int* 2012;46(1):76-82.
- Llaverias G, Escolà-Gil JC, Lerma E, Julve J, Pons C, Cabré A, *et al.* Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *J Nutr Biochem* 2012;(En prensa).
- López-Uriarte P, Nogués R, Sáez G, Bulló M, Romeu M, Masana L, *et al.* Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2010;29(3):373-380.
- Lotito S, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radic Biol Med* 2004;36(2):201-211.
- Lou H, Yuan H, Ma B, Ren D, Ji M, Oka S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry* 2004;65(16):2391-2399.
- Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, *et al.* Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2010;641(2-3):102-107.

- Lucas-Abellán C, Mercader-Ros MT, Zafrilla MP, Fortea MI, Gabaldón JA, Núñez-Delicado E. ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J Agric Food Chem* 2008;56(6):2254-2259.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *J Food Compos Anal* 2006;19(8):771-777.
- Ma X, Wei Q, Zhang S, Shi L, Zhao Z. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyrolytic acid. *J Anal Appl Pyrolysis* 2011;91(2):338-343.
- Madrau MA, Piscopo A, Sanguinetti AM, Del Caro A, Poiana M, Romeo FV, *et al.* Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *Eur Food Res Technol* 2009;228(3):441-448.
- Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 2004;55(3):171-178.
- Mahoney N, Molyneux R, Campbell B. Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *J Agric Food Chem* 2000;48(9):4418-4421.
- Mahoney N, Molyneux R. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *J Agric Food Chem* 2004;52(7):1882-1889.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(1):230S-242S.
- Manai-Djebali H, Krichène D, Ouni Y, Gallardo L, Sánchez J, Osorio E, *et al.* Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *J Food Compos Anal* 2012;(En prensa).

- Marangoni F, Colombo C, Martiello A, Poli A, Paoletti R, Gatti C. Levels of the n-3 fatty acid eicosapentaenoic acid in addition to those of alpha linolenic acid are significantly raised in blood lipids by the intake of four walnuts a day in humans. *Nutr Metab Cardiovas* 2007;17(6):457-461.
- Marangoni F, Poli A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res* 2010;61(3):193-199.
- Marks SC, Mullen W, Crozier A. Flavonoid and hydroxycinnamate profiles of English apple ciders. *J Agric Food Chem* 2007;55(21):8723-8730.
- Marsili R. Flavours and off-flavours in dairy foods. En: Editor-in-Chief: Hubert Roginski, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences* Oxford: Elsevier; 2002. p. 1069-1081.
- Martínez ML, Labuckas DO, Lamarque AL, Maestri DM. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *J Sci Food Agric* 2010;90(12):1959-1967.
- Martínez ML, Maestri DM. Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008;110(12):1183-1189.
- Martínez ML, Mattea MA, Maestri DM. Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *J Am Oil Chem Soc* 2006;83(9):791-796.
- Martínez-González MA, García-López M, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Martínez-Lapiscina EH, Delgado-Rodríguez M, *et al.* Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: A Spanish cohort. *Nutr Metab Cardiovas* 2011;21(4):237-244.
- Martínez-Lapiscina EH, Pimenta AM, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Martínez JA, Martínez-González MA. Nut consumption and incidence of hypertension: The SUN prospective cohort. *Nutr Metab Cardiovas* 2010;20(5):359-365.
- Maskan M, Karataş Ş. Storage stability of whole-split pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) at various conditions. *Food Chem* 1999;66(2):227-233.
- Matthäus B, Özcan MM. The comparison of properties of the oil and kernels of various hazelnuts from Germany and Turkey. *Eur J Lipid Sci Technol* 2012;(En prensa).

- Mattila P, Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J Food Compos Anal* 2007;20(3-4):152-160.
- Mazza G, Brouillard R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem* 1987;25(3):207-225.
- McCall M, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 1999;26(7-8):1034-1053.
- McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *J Agric Food Chem* 2005a;53(15):5896-5904.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2005b;66(21):2540-2548.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2007;68(9):1285-1294.
- McNamara RK, Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostag Leukotr Ess* 2006;75(4-5):329-349.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 2005;91(3):571-577.
- Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:175-182.
- Mikulic-Petkovsek M, Slatnar A, Veberič R, Štampar F, Solar A. Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 2011;76(3-4):159-165.
- Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2248-2256.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84(4):407-412.

- Miller NJ, Rice-Evans C. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radic Res* 1997;26(3):195-199.
- Min B, Gu L, McClung AM, Bergman CJ, Chen M. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chem* 2012;133(3):715-722.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Anuario de estadística 2010. Datos 2009. Disponible en: <http://www.marm.es/es/estadística/temas/anuario-de-estadística/2010/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=10&seccion=3> Fecha de acceso: 12/08/2011.
- Miraliakbari H, Shahidi F. Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents. *J Food Lipids* 2008;15(1):81-96.
- Mirmiran P, Hosseinpour-Niazi S, Naderi Z, Bahadoran Z, Sadeghi M, Azizi F. Association between interaction and ratio of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acid and the metabolic syndrome in adults. *Nutrition* 2012;(En prensa).
- Moat SJ, Lang D, McDowell IFW, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, *et al.* Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2004;15(2):64-79.
- Montoro P, Bracca A, Pizzaa C, De Tommasi N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem* 2005;92(2):349-355.
- Moretti CL, Mattos LM, Calbo AG, Sargent SA. Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. *Food Res Int* 2010;43(7):1824-1832.
- Morishita H, Ohnishi M. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. En: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*: Elsevier; 2001. p. 919-953.
- Moser BR. Preparation of fatty acid methyl esters from hazelnut, high-oleic peanut and walnut oils and evaluation as biodiesel. *Fuel* 2012;92(1):231-238.

- Mulero J, Pardo F, Zafrilla P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *Eur Food Res Technol* 2009;229(5):807-812.
- Mulero J, Zafrilla P, Cayuela JM, Martínez-Cachá A, Pardo F. Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques. *J Food Sci* 2011;76(3):C436-C440.
- Mullen W, Edwards CA, Serafini M, Crozier A. Bioavailability of pelargonidin-3-*o*-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J. Agric. Food Chem* 2008,56(3):713-719.
- Muncharaz M. El nogal. Técnicas de cultivo para la producción frutal. 1ª ed. Madrid. Mundi-Prensa Libros; 2001.
- Muñoz S, Merlos M, Zambon D, Rodríguez C, Sabaté J, Ros E, *et al.* Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2001;42(12):2069-2076.
- Muradoglu F, Oguz HI, Yildiz K, Yilmaz H. Some chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) selections from Eastern Turkey. *Afr J Agric Res* 2010;5(17):2379-2385.
- Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Rad SK. Biological activities of *Juglans regia* flowers. *Rev Bras Farmacogn* 2011;21(3):465-470.
- Nagel JM, Brinkoetter M, Magkos F, Liu X, Chamberland JP, Shah S, *et al.* Dietary walnuts inhibit colorectal cancer growth in mice by suppressing angiogenesis. *Nutrition* 2012;28(1):67-75.
- Nakamura Y, Tonogai Y. Metabolism of grape seed polyphenol in the rat. *J Agric Food Chem* 2003;51(24):7215-7225.
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 2002;50(20):5735-5741.
- Naves MMV, Moreno FS. Beta-carotene and cancer chemoprevention: From epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutr Res* 1998;18(10):1807-1824.

- Negi AS, Luqman S, Srivastava S, Krishna V, Gupta N, Darokar MP. Antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* fruit extracts. *Pharm Biol* 2011;49(6):669-673.
- Neilson AP, Hopf AS, Cooper BR, Pereira MA, Bomser JA, Ferruzzi MG. Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* 2007;55(22):8941-9.
- Nenadis N, Boyle S, Bakalbassis E, Tsimidou M. An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids-and related monophenols. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80(5):451-458.
- Neri L, Dimitri G, Sacchetti G. Chemical composition and antioxidant activity of cured chestnuts from three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *J Food Compos Anal* 2010;23(1):23-29.
- Nielsen SE, Freese R, Kleemola P, Mutanen M. Flavonoids in human urine as biomarkers for intake of fruits and vegetables. *Cancer Epidem Biomar* 2002;11(5):459-466.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74(4):418-425.
- Noguer M, Cerezo AB, Rentzsch M, Winterhalter P, Troncoso AM, Carmen García-Parrilla M. Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *J Agric Food Chem* 2008;56(19):8879-8884.
- Noori N, Dukkipati R, Kovesdy CP, Sim JJ, Feroze U, Murali SB, *et al.* Dietary omega-3 fatty acid, ratio of omega-6 to omega-3 intake, inflammation, and survival in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2011;58(2):248-256.
- Normén L, Ellegård L, Brants H, Dutta P, Andersson H. A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J Food Compos Anal* 2007;20(3-4):193-201.
- Núñez I, Gilabert R, Pérez-Heras A, Serra M, Casals E, Deulofeu R, *et al.* A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: A randomized crossover trial. *Atherosclerosis Supp* 2004;5(1):139-140.

- Ogunmoyole T, Kade IJ, Korodele B. *In vitro* antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of walnut (*Juglans regia*). J Med Plants Res 2011;5(31):6839-6848.
- Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. Phytochemistry 2000;55(6):513-529.
- Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food Chem Toxicol 2008a;46(7):2326-2331.
- Oliveira I, Sousa A, Morais JS, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, *et al.* Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. Food Chem Toxicol 2008b;46(5):1801-1807.
- Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MGL. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. Food Res Int 2012;48(1):170-179.
- Olsson M, Ekvall J, Gustavsson K, Nilsson J, Pillai D, Sjöholm I, *et al.* Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. J Agric Food Chem 2004;52(9):2490-2498.
- Olthof M, Hollman P, Katan M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. J Nutr 2001;131(1):66-71.
- Orazem P, Štampar F, Hudina M. Quality analysis of "Redhaven" peach fruit grafted on 11 rootstocks of different genetic origin in a replant soil. Food Chem 2011;124(4):1691-1698.
- Ortega N, Reguant J, Romero M, Macia A, Motilva M. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. J Agric Food Chem 2009;57(13):5743-5749.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem 2001;49(10):4619-4626.
- Özdemir M, Açıkturk F, Kaplan M, Yıldız M, Löker M, Gürçan T, *et al.* Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid

- composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability. *Food Chem* 2001;73(4):411-415.
- Ozkan G, Koyunku MA. Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L) genotypes grown in Turkey. *Grasas Aceites* 2005;56(2):141-146.
- Ozkan M, İman C, Arslan D. Physicochemical properties, fatty acid and mineral content of some walnuts (*Juglans regia* L.) types. *Agric Sci* 2010;1(2):62-67.
- Ozrenk K, Javidipour I, Yarilgac T, Balta F, Gündogdu M. Fatty acids, tocopherols, selenium and total carotene of pistachios (*P. vera* L.) from Diyarbakir (Southeastern Turkey) and walnuts (*J. regia* L.) from Erzincan (Eastern Turkey). *Food Sci Technol Int* 2012;18(1):55-62.
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci* 2011;76(1):R6-R15.
- Pallardy DSG. Reproductive growth. *Physiology of woody plants* (Third edition) San Diego: Academic Press; 2008b. p. 87-106.
- Pallardy DSG. Vegetative growth. *Physiology of woody plants* (Third edition) San Diego: Academic Press; 2008a. p. 39-86.
- Papoutsis Z, Kassi E, Chinou I, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Moutsatsou P. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *Br J Nutr* 2008;99(4):715-722.
- Parada J, Aguilera JM. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* 2007;72(2):21-32.
- Parcerisa J, Boatella J, Codony R, Farrà A, García J, López A, *et al.* Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: I. Fatty acid composition. *Food Chem* 1993;48(4):411-414.
- Parcerisa J, Richardson DG, Rafecas M, Codony R, Boatella J. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *J Chromatogr A* 1998;805(1-2):259-268.

- Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life-a review. *Plant Food Hum Nutr* 2010;65(3):299-308.
- Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):985-1012.
- Pasini F, Verardo V, Caboni MF, D'Antuono LF. Determination of glucosinolates and phenolic compounds in rocket salad by HPLC-DAD-MS: Evaluation of *Eruca sativa* Mill. and *Diplotaxis tenuifolia* L. genetic resources. *Food Chem* 2012;133(3):1025-1033.
- Passos CP, Cardoso SM, Domingues MRM, Domingues P, Silva CM, Coimbra MA. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chem* 2007;105(4):1457-1467.
- Patel G. Essential fats in walnuts are good for the heart and diabetes. *J Am Diet Assoc* 2005;105(7):1096-1097.
- Peleg H, Naim M, Rouseff RL, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and Grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 1991;57(3):417-426.
- Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(11):1030-1038.
- Pennington JAT, Fisher RA. Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *J Food Compos Anal* 2010;23(5):411-418.
- Perales S, Barbera R, Lagarda MJ, Farre R. Antioxidant capacity of infant fruit beverages; influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Nutr Hosp* 2008;23(6):547-553.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol* 2008;46(6):2103-2111.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira ICFR, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity

- and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol* 2007;45(11):2287-2295.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Saura-Calixto F. Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Res Int* 2009a;42(10):1381-1388.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goñi I, *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 2008;41(3):274-285.
- Pérez-Jiménez J, Lluís Torres J. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J Agric Food Chem* 2011;59(24):12713-12724.
- Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum. Nutr* 2009b;64(2):102-107.
- Pérez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2002;50(8):2308-2312.
- Peterson GL. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Anal Biochem* 1979;100(2):201-220.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995;78(2):151-160.
- Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry* 2010;71(10):1132-1148.
- Pincemail J, Kevers C, Tabart J, Defraigne J, Dommès J. Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents

- and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria x ananassa*). J Food Sci 2012;77(2):C205-C210.
- Pinney K, Labavitch J, Polito V. Fruit growth and development. En: Walnut Production Manual Publicación 3373. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland, California. 1998. pp: 139-143.
- Pinto MdS, Lajolo FM, Genovese MI. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). Food Chem 2008;107(4):1629-1635.
- Polito V. Floral Biology: Flower structure, development and pollination. En: Walnut Production Manual. Publicación 3373. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland, California. 1998. pp: 127 -132.
- Poljšak B, Jamnik P, Raspor P, Pesti M. Oxidation-Antioxidation-Reduction processes in the cell: Impacts of environmental pollution. En: Editor-in-Chief: Jerome O. Nriagu, editor. Encyclopedia of Environmental Health Burlington: Elsevier; 2011. p. 300-306.
- Popović BM, Štajner D, Slavko K, Sandra B. Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) - Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. Food Chem 2012;134(2):734-741.
- Prasad R. Walnuts and Pecans. En: Benjamin Caballero, editor. Encyclopedia of food sciences and nutrition Oxford: Academic Press; 2003. p. 6071-6079.
- Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005;53(10):4290-4302.
- Rabrenovic B, Dimic E, Maksimovic M, Sobajic S, Gajic-Krstajic L. Determination of fatty acid and tocopherol compositions and the oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Serbia. Czech J Food Sci 2011;29(1):74-78.
- Radix P, Bastien C, Jay-Allemand C, Charlot G, Seigle-Murandi F. The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of

- differences in the expression of walnut blight. *Agronomie* 1998;18(10):627-637.
- Radix P, Seigle-Murandi F, Charlot G. Walnut blight: development of fruit infection in two orchards. *Crop Prot* 1994;13(8):629-631.
- Raedschelders K, Ansley DM, Chen DDY. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2012;133(2):230-255.
- Raffo A, Malfa GL, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *J Food Compos Anal* 2006;19(1):11-19.
- Rahimipanah M, Hamed M, Mirzapour M. Antioxidant activity and phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract. *Afr J Food Sci Technol* 2010;1(4):105-111.
- Rajamohan T, Kurup PA. Lysine: arginine ratio of a protein influences cholesterol metabolism. Part 1--Studies on sesame protein having low lysine: arginine ratio. *Indian J Exp Biol* 1997;35(11):1218-1223.
- Ramos DE. Walnut orchard management. *Ilustrada ed.* California. United States: Cooperative Extension, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources; 1985.
- Ranilla LG, Kwon Y, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol* 2010;101(12):4676-4689.
- Rastija V, Srećnik G, Marica-Medić-Šarić. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chem* 2009;115(1):54-60.
- Ratnam DV, Chandraiah G, Meena AK, Ramarao P, Kumar MNVR. The co-encapsulated antioxidant nanoparticles of ellagic acid and coenzyme Q(10) ameliorates hyperlipidemia in high fat diet fed rats. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9(11):6741-6746.

- Razali N, Razab R, Junit SM, Aziz AA. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). Food Chem 2008;111(1):38-44.
- Razeto B. Para entender la fruticultura. Ediciones Bruno Razeto. Santiago, Chile. Cuarta edición; 2006.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26(9-10):1231-1237.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. Free Radic Biol Med 2002;33(2):220-235.
- Record IR, Lane JM. Simulated intestinal digestion of green and black teas. Food Chem 2001;73(4):481-486.
- Reis B, Martins M, Barreto B, Milhazes N, Garrido EM, Silva P, *et al.* Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. J Agric Food Chem 2010;58(11):6986-6993.
- Reiter RJ, Manchester LC, Tan D. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. Nutrition 2005;21(9):920-924.
- Riccioni G, Speranza L, Pesce M, Cusenza S, D'Orazio N, Glade MJ. Novel phytonutrient contributors to antioxidant protection against cardiovascular disease. Nutrition 2012;28(6):605-610.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 1996;20(7):933-956.
- Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body-fluids. Oxygen radicals in biological systems, Pt D 1994;234:279-293.
- Ríos L, Bennett R, Lazarus S, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Am J Clin Nutr 2002;76(5):1106-1110.
- Rivellese AA, Lilli S. Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. Biomed Pharmacother 2003;57(2):84-87.

- Robards K, Prenzler P, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 1999;66(4):401-436.
- Roowi S, Crozier A. Flavonoids in tropical citrus species. *J Agric Food Chem* 2011;59(22):12217-12225.
- Rorabaugh J, Singh A, Sherrell I, Freeman M, Vorsa N, Fitschen P, *et al.* English and black walnut phenolic antioxidant activity *in vitro* and following human nut consumption. *Food Nutr Sci* 2011;2(3):193-200.
- Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, *et al.* A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects. *Circulation* 2004;109(13):1609-1614.
- Rosengarten F. Chapter 12. Walnuts. *The book of edible nuts*. Nueva York: Courier Dover Publications; 2004. p. 11-12.
- Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009;77(6):937-946.
- Rzeppa S, Bittner K, Doell S, Daenicke S, Humpf H. Urinary excretion and metabolism of procyanidins in pigs. *Mol Nutr Food Res* 2012;56(4):653-665.
- Saad AA, Youssef MI, El-Shennawy LK. Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: The protective effect of grape seed proanthocyanidin extract. *Food Chem Toxicol* 2009;47(7):1499-1506.
- Sabaté J, Oda K, Ros E. Nut consumption and blood lipid levels a pooled analysis of 25 intervention trials. *Arch Intern Med* 2010;170(9):821-827.
- Sagdic O, Ozturk I, Ozkan G, Yetim H, Ekici L, Yilmaz MT. RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chem* 2011;126(4):1749-1758.
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr* 2006;96(1):S45-S51.

- Salas-Salvadó J, Ros Rahola E, Sabaté Casellas J. Frutos secos, salud y culturas mediterráneas. 2005th ed. Barcelona: Editorial Glosa, S.L.; 2005.
- Salcedo CL, López de Mishima BA, Nazareno MA. Walnuts and almonds as model systems of foods constituted by oxidisable, pro-oxidant and antioxidant factors. *Food Res Int* 2010;43(4):1187-1197.
- Saling SC, Comar JF, Mito MS, Peralta RM, Bracht A. Actions of juglone on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;257(3):319-327.
- Samaranayaka AGP, John JA, Shahidi F. Antioxidant activity of English walnut (*Juglans regia* L.). *J Food Lipids* 2008;15(3):384-397.
- Sánchez A, Rubano D, Shavlik G, Hubbard R, Horning M. Cholesterolemic effects of the lysine arginine ratio in rabbits after initial early growth. *Arch Latinoam Nutr* 1988;38(2):229-238.
- Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Ferreres F, Moreno DA. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chem* 2012;134(2):775-782.
- Sandler S, Karo W. Sourcebook of advanced organic laboratory preparations. San Diego: Academic Press; 1992.
- Sari I, Baltaci Y, Bagci C, Davutoglu V, Erel O, Celik H, *et al.* Effect of pistachio diet on lipid parameters, endothelial function, inflammation, and oxidative status: A prospective study. *Nutrition* 2010;26(4):399-404.
- Sartorelli DS, Damião R, Chaim R, Hirai A, Gimeno SGA, Ferreira SRG. Dietary ω -3 fatty acid and ω -3: ω -6 fatty acid ratio predict improvement in glucose disturbances in Japanese Brazilians. *Nutrition* 2010;26(2):184-191.
- Satil F, Azcan N, Baser K. Fatty acid composition of pistachio nuts in Turkey. *Chem Nat Compd* 2003;39(4):322-324.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 2011;403(1-2):136-138.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* 2007;101(2):492-501.
- Savage G, Dutta P, McNeil D. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *J Am Oil Chem Soc* 1999;76(9):1059-1063.

- Saxena R, Venkaiah K, Anitha P, Venu L, Raghunath M. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of India: contribution of their phenolic content. *Int J Food Sci Nutr* 2007;58(4):250-260.
- Schäfers FI, Herrmann K. Analysis of methyl and ethyl esters of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. *J Chromatogr A* 1982;240(2):387-396.
- Schuster B, Herrmann K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry* 1985;24(11):2761-2764.
- Schwartz H, Ilainen V, Pfiironen V, Lampi A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J Food Compos Anal* 2008;21(2):152-161.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG. *et al.* *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 2005;16(6):360-367.
- Seferoglu S, Seferoglu HG, Tekintas FE, Balta F. Biochemical composition influenced by different locations in Uzun pistachio cv. (*Pistacia vera* L.) grown in Turkey. *J Food Compos Anal* 2006;19(5):461-465.
- Segura R, Javierre C, Lizarraga MA, Ros E. Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. *Br J Nutr* 2006;96(1):S36-S44.
- Sellés G, Ferreyra R. Riego. En: *El nogal en Chile*. Lemus, G. ed. Santiago, Chile. INIA 2001. pp: 103-118.
- Serrano A, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Jiménez-Colmenero F. Nutritional profile of restructured beef steak with added walnuts. *Meat Sci* 2005;70(4):647-654.
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 2009;53(S2):S310-S329.
- Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. Phenolic Antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32(1):67-103.

- Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turk J Biol* 2011;35(5):635-639.
- Sharma P, Wisniewski A, Braga-Basaria M, Xu X, Yep M, Denmeade S, *et al.* Lack of an effect of high dose isoflavones in men with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy. *J Urol* 2009;182(5):2265-2273.
- Shen Y, Jin L, Xiao P, Lu Y, Bao J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *J Cereal Sci* 2009;49(1):106-111.
- Shimoda H, Tanaka J, Kikuchi M, Fukuda T, Ito H, Hatano T, *et al.* Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine: Hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *J Agric Food Chem* 2008;56(12):4444-4449.
- Shin Y, Liu RH, Nock JF, Holliday D, Watkins CB. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biol Technol* 2007;45(3):349-357.
- Simopoulos A. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002a;11:S163-S173.
- Simopoulos A. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002b;56(8):365-379.
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, *et al.* The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res/Fundam Mol Mech Mugag* 2007;620(1-2):83-92.
- Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-158.
- Siquet C, Paiva-Martins F, Lima J, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids - A structure-activity relationship study. *Free Radic Res* 2006;40(4):433-442.

- Sitte P, Strasburger. Tratado de Botánica. 35^a ed. Barcelona. Omega Ediciones. 2004.
- Sivam AS, Sun-Waterhouse D, Perera CO, Waterhouse GIN. Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. Food Chem 2012;131(3):802-810.
- Smit EN, Muskiet FAJ, Boersma ER. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. Prostag Leukotr Ess 2004;71(4):241-250.
- Smith-Warner SA, Genkinger J, Giovannucci E. Fruit and vegetable consumption and cancer. En: David Heber, George L. Blackburn, Vay Liang W. Go, John Milner, editors. Nutritional Oncology (Second Edition) Burlington: Academic Press; 2006. p. 97-173.
- Snider MD, McGarry JD, Hanson RW. Lipid Metabolism I: Synthesis, storage, and utilization of fatty acids and triacylglycerols. En: Devlin TM, ed. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 7th edition. Wiley & Sons, Inc. 2010: 662-89.
- Solar A, Colaric M, Usenik V, Štampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Sci 2006;170(3):453-461.
- Solar A, Jakopič J, Veberič R, Štampar E. Correlations between *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* severity and endogenous juglone and phenolic acids in walnut. J Plant Pathol 2012;94(1):229-235.
- Soong Y, Barlow P. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. Food Chem 2006;97(3):524-530.
- Sowmya R, Sachindra NM. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system. Food Chem 2012;134(1):308-314.
- Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. Biochem Biophys Res Commun 2000;272(1):236-241.

- Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxid Redox Signal* 2001;3(6):1023-39.
- Srinivas K, King JW, Howard LR, Monrad JK. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *J Food Eng* 2010;100(2):208-218.
- Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, *et al*. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 2002;23(1-3):39-100.
- Štampar F, Solar A, Hudina M, Veberič R, Colaric M. Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. *Food Chem* 2006;95(4):627-631.
- Stan SD, Kar S, Stoner GD, Singh SV. Bioactive food components and cancer risk reduction. *J Cell Biochem* 2008;104(1):339-356.
- Stevenson DE, Cooney JM, Jensen DJ, Zhang J, Wibisono R. Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(8):939-945.
- Stockham K, Paimin R, Orbell JD, Adorno P, Buddhadasa S. Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling. *J Food Compos Anal* 2011;24:686-691.
- Stoclet J, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M, El Bedoui J, Chataigneau M, *et al*. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004;500(1-3):299-313.
- Stonehouse W. Chapter 135 - The effects of walnuts (*Juglans regia*) on the characteristics of the metabolic syndrome. En: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson y Vinood B. Patel, Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, Vinood B. Patel, editors. *Nuts and seeds in health and disease prevention* San Diego: Academic Press; 2011. p. 1141-1148.
- Strack D. Phenolic metabolism. En: Dey P, Harborne JB., editors. *Plant biochemistry*. 3^a ed. Londres: Elsevier; 1997. p. 387-416.
- Suárez-López MM, Kizlansky A, López LB. Assessment of protein quality in foods by calculating the amino acids score corrected by digestibility. *Nutr Hosp* 2006;21(1):47-51.

- Sulaiman SF, Yusoff NAM, Eldeen IM, Seow EM, Sajak AAB, Supriatno, *et al.* Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *J Food Compos Anal* 2011;24(1):1-10.
- Sze-Tao KWC, Sathe SK. Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility. *J Sci Food Agric* 2000;80(9):1393-1401.
- Szydłowska-Czerniak A, Bartkowiak-Broda I, Karlovic I, Karlovits G, Szlyk E. Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars. *Food Chem* 2011;127(2):556-563.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommes J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem* 2009;113(4):1226-1233.
- Tagliacruzchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem* 2010;120(2):599-606.
- Tan JSL, Wang JJ, Flood V, Rochtchina E, Smith W, Mitchell P. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration - The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2008;115(2):334-341.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2003;57(8):321-325.
- Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Bare M, *et al.* Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(12):2777-2783.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Michalik J. Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol Biotechnol* 2009a;47(4):456-463.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Tuszyński T. Simulation of phenolic compounds transformations and interactions in an *in vitro* model of the human alimentary tract. *Food Sci Technol Int* 2009b;15(3):235-241.

- Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall GJ, Leirao MC, Vieira HLA, *et al.* Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2012;131(4):1443-1452.
- Taylor A, Hobbs M. 2001 Assessment of nutritional influences on risk for cataract. *Nutrition* 2001;17(10):845-857.
- Temime SB, Manai H, Methenni K, Baccouri B, Abaza L, Daoud D, *et al.* Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chem* 2008;110(2):368-374.
- Terpinc P, Čeh B, Ulrih NP, Abramovič H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Ind Crop Prod* 2012;39(0):210-217.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* 2006;19(6-7):669-675.
- Thomson Reuters. ISI Web of Knowledge. 2012; Disponible en: <http://www.accesowok.fecyt.es/>. Fecha de acceso: 22/05/2012, 2012.
- Tlili I, Hdider C, Lenucci MS, Ilahy R, Jebari H, Dalessandro G. Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *J Food Compos Anal* 2011;24(7):923-928.
- Tomaino A, Martorana M, Arcoraci T, Monteleone D, Giovinazzo C, Saija A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie* 2010;92(9):1115-1122.
- Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones? nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):1073-1080.
- Tomás-Barberán FA, Espín JC, García-Conesa M. Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. En: Stéphane Quideau, editor. *Chemistry and biology of ellagitannins: An underestimated class of bioactive plant polyphenols*, Londres: World Scientific; 2009a. p. 273-297.

- Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Larrosa M, Cerdá B, González-Barrio R, Bermúdez-Soto MJ, *et al.* Bioavailability, metabolism, and bioactivity of food ellagic acid and related polyphenols. En: Recent advances in polyphenol research: Wiley-Blackwell; 2009b. p. 263-277.
- Toor RK, Savage GP. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem* 2006;99(4):724-727.
- Torabian S, Haddad E, Rajaram S, Banta J, Sabaté J. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *J Hum Nutr Diet* 2009;22(1):64-71.
- Toselli M, Lucchi A, Rombolà AD, Quartieri M, Sorrenti G, Malaguti D, Rufato L, Marangoni B. Effect of variety on chemical composition of walnut kernel (*Juglans regia* L.) from organic production (Emilia-Romagna). *Italus Hortus* 2005;12(3):71-78.
- Tosun M, Celik F, Ercisli S, Yilmaz SO. Bioactive contents of commercial cultivars and local genotypes of walnut (*Juglans regia* L.). International Conference on Environmental and Agriculture Engineering 2011;15:110-114.
- Trichopoulou A, Critselis E. Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev* 2004;13(5):453-456.
- Trigui M, Hsouna AB, Tounsi S, Jaoua S. Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Ind Crop Prod* 2013;41(0):150-157.
- Tsang C, Auger C, Mullen W, Bornet A, Rouanet JM, Crozier A, Teissedre PL. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 2005;94(2):170-81.
- Tsantili E, Konstantinidis K, Christopoulos MV, Roussos PA. Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Sci Hort* 2011;129(4):694-701.
- Tsantili E, Takidelli C, Christopoulos MV, Lambrinea E, Rouskas D, Roussos PA. Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties. *Sci Hort* 2010;125(4):562-568.

- Tulipani S, Marzban G, Herndl A, Laimer M, Mezzetti B, Battino M. Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chem* 2011;124(3):906-913.
- Tura D, Gigliotti C, Pedo S, Failla O, Bassi D, Serraiocco A. Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. *Sci Hort* 2007;112(1):108-119.
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2002) USDA-Iowa State University database on the isoflavone content of foods. Nutrient data laboratory. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>. Fecha de acceso: 13/08/2011.
- US Department of Agriculture. 2010a. USDA National Nutrient database for standard reference, Release 23. Disponible en: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. Fecha de acceso: 13/08/2011.
- US Department of Agriculture. 2010b. Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, release 2. Nutrient Data Laboratory [updated May 2010]. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>. Fecha de acceso: 13/08/2011.
- US Department of Agriculture. Soil Survey Staff. Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2nd Edition. Natural resources conservation service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436. 1999.
- Vadivel V, Biesalski HK. Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. *Process Biochem* 2011;46(10):1973-1980.
- Vafiadis A, Bakalbassis E. A computational study of the structure-activity relationships of some *p*-hydroxybenzoic acid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80(12):1217-1223.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.

- Vallejo F, Gil-Izquierdo A, Pérez-Vicente A, García-Viguera C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2004;52(1):135-138.
- van Breda SGJ, de Kok TCM, van Delft JHM. Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach. *J Nutr Biochem* 2008;19(3):139-157.
- Vanhanen LP, Savage GP. The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. *Food Chem* 2006;99(1):64-69.
- Vaquero MP, Veldhuizen M, Vandokkum W, Vandenhamer CJA, Schaafsma G. Copper bioavailability from breakfasts containing tea - influence of the addition of milk. *J Sci Food Agric* 1994;64(4):475-481.
- Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem* 2008;111(4):816-823.
- Vattem D, Shetty K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem* 2003;39(3):367-379.
- Veberič R, Štampar F. Selected polyphenols in fruits of different cultivars of genus *Prunus*. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 2005;45(3):375-383.
- Veberič R, Trobec M, Herbinger K, Hofer M, Grill D, Štampar F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *J Sci Food Agric* 2005;85(10):1687-1694.
- Venkatachalam M, Sathe S. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J Agric Food Chem* 2006;54(13):4705-14.
- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4(3):327-347.
- Vidal JJ. El nogal y su cultivo. Edit. Ramos Americana. La Plata, Argentina; 1980.
- Vijaya Kumar Reddy C, Sreeramulu D, Raghunath M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Res Int* 2010;43(1):285-288.

- Villano D, Fernández-Pachón M, Troncoso A, García-Parrilla M. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Anal Chim Acta* 2005;538(1-2):391-398.
- Villano D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. *Talanta* 2004;64(2):501-509.
- Villarreal-Lozoya JE, Lombardini L, Cisneros-Zevallos L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chem* 2007;102(4):1241-1249.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ Exp Bot* 2007;61(3):199-223.
- Wahle KWJ, Brown I, Rotondo D, Heys SD. Chapter 4. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. En: Giardi MT, Rea G, Berra B. *Bio-Farms for nutraceuticals: Functional food and safety control by biosensors*. Giardi MT, Rea G, Berra B editors. Springer, 2010.
- Wall MM. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. *Food Chem* 2010;121(4):1103-1108.
- Wang C, Zhao J, Chen F, Cheng Y, Guo A. Separation, identification, and quantitation of phenolic acids in chinese waxberry (*Myrica rubra*) juice by HPLC-PDA-ESI-MS. *J Food Sci* 2012;77(2):C272-C277.
- Wang D, Lu J, Miao A, Xie Z, Yang D. HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *J Food Compos Anal* 2008;21(5):361-369.
- Wang T, Jonsdottir R, Olafsdottir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* 2009;116(1):240-248.
- Waterhouse AL. Wine Phenolics. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957(1):21-36.
- Wegrzyn TF, Farr JM, Hunter DC, Au J, Wohlers MW, Skinner MA, *et al*. Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chem* 2008;109(2):310-318.

- Wei Q, Ma X, Zhao Z, Zhang S, Liu S. Antioxidant activities and chemical profiles of pyroligneous acids from walnut shell. *J Anal Appl Pyrolysis* 2010;88(2):149-154.
- West SG, Krick AL, Klein LC, Zhao G, Wojtowicz TF, McGuinness M, *et al.* Effects of diets high in walnuts and flax oil on hemodynamic responses to stress and vascular endothelial function. *J Am Coll Nutr* 2010;29(6):595-603.
- Wichtl M, Anton R. *Plantes Therapeutiques, Tec. & Doc.*, Paris; 1999. pp. 291-293.
- Williamson G, Stalmach A. Absorption and metabolism of dietary chlorogenic acids and procyanidins. *Recent advances in polyphenol research*: Wiley-Blackwell; 2012. p. 209-222.
- Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res Int* 2011;44(1):217-224.
- Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 2006;54(11):4069-4075.
- Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 2004;52(12):4026-4037.
- Xu B, Chang SKC. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chem* 2012;134(3):1287-1296.
- Xu YX, Hanna MA. Evaluation of Nebraska hybrid hazelnuts: Nut/kernel characteristics, kernel proximate composition, and oil and protein properties. *Ind Crop Prod* 2010;31(1):84-91.
- Yang J, Liu RH, Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Sci Technol* 2009;42(1):1-8.
- Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT-Food Sci Technol* 2009;42(10):1573-1580.
- Yao L, Jiang Y, Shi J, Tomás-Barberán F, Datta N, Singanusong R, *et al.* Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr* 2004;59(3):113-122.

- Yoshimoto T, Takahashi Y, Xu W, Kinoshita T, Sakashita T, Mabuchi H. Molecular mechanism of low density lipoprotein oxidation by 12-lipoxygenase overexpressing macrophages. *Oxygen and Life: Oxygenases, Oxidase and Lipid Mediators* 2002;1233:319-327.
- Youssef O, Guido F, Manel I, Youssef NB, Luigi CP, Mohamed H, *et al.* Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chem* 2011;124(4):1770-1776.
- Yu Y, Chang W, Wu C, Chiang S. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *J Nutr Biochem* 2005;16(11):675-681.
- Zafrilla P, Ferreres F, Tomás-Barberán F. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J Agric Food Chem* 2001;49(8):3651-3655.
- Zambon D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, *et al.* Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women - A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000;132(7):538-546.
- Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem* 2009;113(1):160-165.
- Zhao H, Chen W, Lu J, Zhao M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chem* 2010;119(3):1150-1158.
- Zhao H, Fan W, Dong J, Lu J, Chen J, Shan L, *et al.* Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem* 2008;107(1):296-304.
- Zhu K, Lian C, Guo X, Peng W, Zhou H. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chem* 2011;126(3):1122-1126.
- Zhu Q, Holt R, Lazarus S, Ensunsa J, Hammerstone J, Schmitz H, *et al.* Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J Agric Food Chem* 2002;50(6):1700-1705.
- Zhu Q, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem* 1997;45(12):4624-4628.

- Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, *et al.* The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact* 2010;188(2):334-339.
- Zilic S, Sukalovic VH, Dodig D, Maksimovic V, Maksimovic M, Basic Z. Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *J Cereal Sci* 2011;54(3):417-424.
- Zouari S, Ketata M, Boudhrioua N, Ammar E. *Allium roseum* L. volatile compounds profile and antioxidant activity for chemotype discrimination - Case study of the wild plant of Sfax (Tunisia). *Ind Crop Prod* 2013;41(0):172-178.
- Zwarts L, Savage GP, McNeil DL. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *Int J Food Sci Nutr* 1999;50(3):189-194.

ANEXOS

COMPLEJO DE CAMBIO		MUYBAJO	BAJO	NORMAL	ALTO	MUY ALTO
Extraídos en ACNH ₄						
SODIO	0,27 meq/100 gr		0,2	0,5	0,75	1,25
POTASIO	0,84 meq/100 g	329 ppm	0,3	0,6	0,9	1,3
CALCIO	6,93 meq/100 gr		4,5	9	10,5	12
MAGNESIO	1,87 meq/100 gr		0,75	1,5	2,25	3
C.C.C.	9,91 meq/100 gr		5	10	25	40
CALIZA ACTIVA	13,68 %		3	6	10	15
CARBONATOS TOTALES	46,42 %		5	10	25	50
MATERIA ORGANICA TOTAL	0,88 %		1,25	2	3	4
M.O. FÁCILMENTE OXIDABLE	0,67 %					
CARBONO ORGÁNICO TOTAL	0,51 %					
NITRÓGENO ORGÁNICO (Kjeldahl) .	0,05 %					
RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO	10,36					
FÓSFORO (Olsen)	79,85 ppm		10	25	45	70

