

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EN GRANOS ANCESTRALES DE USO ALIMENTARIO. COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Determination of Phenolic Composition in Ancestral Grains for Food Use. Comparison of Analytical Methods and Antioxidant Activity

Magdalena M.^a DELCOURT-GARCÍA; María Teresa ESCRIBANO-BAILÓN;
Montserrat DUEÑAS

Grupo de Investigación en Polifenoles. Departamento Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España
Correo-e: mduenas@usal.es

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue cuantificar los compuestos fenólicos totales de diferentes granos ancestrales: dos variedades de teff (*Eragrostis tef*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) y trigo espelta (*Triticum spelta*) por diferentes métodos espectrofotométricos (Folin-Ciocalteu y Fast Blue BB) y comparar con los resultados obtenidos de estudiar la composición fenólica individualizada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un sistema de detección de fotodiodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS). También se determinó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de los granos ancestrales estudiados por el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y FRAP (poder antioxidante reductor del hierro). El uso de HPLC-DAD-MS permitió identificar un gran número de compuestos fenólicos: compuestos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos, flavonoles, flavonas y flavanoles. Las flavonas fueron la familia de compuestos fenólicos más abundante detectada en las muestras de espelta, teff, blanco y marrón. Sin embargo, en el trigo sarraceno son los flavanoles (64 %). La cuantificación

de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS parece más oportuna que por los métodos espectrofotométricos. Con respecto a la actividad antioxidante, el trigo sarraceno mostró los valores más altos frente a su capacidad de captar radicales libres y poder reductor en relación a las otras muestras estudiadas, pudiéndose relacionar con su alto contenido en compuestos fenólicos.

Palabras clave: Compuestos fenólicos; granos ancestrales; Folin-Ciocalteu; Fast-Blue BB; HPLC-DAD-MS; actividad antioxidante.

ABSTRACT: The aim of this study was to quantify the total phenolic compounds of different ancestral grains such as two varieties of tef (*Eragrostis tef*) white and brown, buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and spelta (*Triticum spelta*), using different spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB) and to compare with the obtained results using high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). Furthermore, antioxidant activity of the extracts from these samples has been compared using two different in vitro assays: ferric reducing power (FRAP) and the ability to scavenge the ABTS^{•+}. The use of HPLC-DAD-MS allowed us to detect different groups of phenolic compounds: hydroxybenzoic and hydroxycinnamic derivatives, flavonols, flavones and flavanols. Flavones derivatives were the most abundant in spelta, white and brown teff. However, buckwheat presented the highest in flavanols (64 %). The phenolic compounds quantification carried out by HPLC-DAD-MS could be more appropriate than the obtained results using spectrophotometric methods. Regarding the antioxidant activity, the buckwheat seeds showed the highest value, which could be related to the highest phenolic content.

Keywords: Phenolic compounds; ancestral grains; Folin-Ciocalteu; Fast-Blue BB; HPLC-DAD-MS; antioxidant activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Granos ancestrales: características y composición*

Cada vez existe una mayor conciencia sobre lo que comemos y sobre los efectos que tienen los alimentos sobre la salud. En este contexto, están cobrando cada vez más importancia productos como las semillas ancestrales, por las

múltiples propiedades nutricionales y efectos beneficiosos que podrían ejercer sobre nuestra salud.

Los granos ancestrales son aquellos que no han sido transformados genéticamente con el paso del tiempo. Algunos de ellos han sido cultivados durante siglos; aunque en ocasiones su cultivo se ha restringido a áreas locales. En la actualidad, estas semillas están emergiendo de nuevo con fuerza debido a sus propiedades nutricionales. Aportan un alto contenido en fibra dietética, vitaminas, minerales, proteínas, almidón resistente.

Algunas de las semillas ancestrales más importantes son teff, trigo sarraceno y trigo espelta. El teff (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) es un cereal anual procedente de Etiopía, perteneciente a la familia Poaceae. Se distinguen principalmente dos variedades, blanco y marrón o rojo. Destaca por su alto contenido en lisina, hierro y calcio (Baye, 2014). El trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) es un pseudocereal procedente de Asia Central, pertenece a la familia Polygonaceae. Es rico en lisina y arginina. También, presenta altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y almidón (Sedeje *et al.*, 2012). El trigo espelta (*Triticum spelta*) es una variedad de trigo que proviene del Antiguo Egipto, perteneciente a la familia Poaceae. Se caracteriza por su contenido en triptófano y lisina; y su alto contenido en magnesio, hierro, fósforo y zinc (Keriené *et al.*, 2015). También hay que destacar que tanto el teff y como el trigo sarraceno no tienen gluten, lo que permite su uso en dietas para personas celiacas. El teff y la espelta se caracterizan por tener un índice glucémico bajo (Sedeje *et al.*, 2012).

Además de su calidad nutricional, estas semillas presentan compuestos bioactivos, tales como fitoesteroles, vitaminas, y entre los que destacan los compuestos fenólicos, estando estos últimos estrechamente relacionados con efectos beneficiosos para la salud. Existen evidencias científicas sobre el potencial de los compuestos fenólicos como propiedades antioxidantes, anticancerígenas, cardioprotectoras, antiinflamatorias, antienvjecimiento y antimicrobianas, e incluso una mejora en la microbiota intestinal (Del Rio *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2019). Los efectos biológicos de los flavonoides se han relacionado con sus propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres.

Los objetivos del trabajo son: *i*) estudiar la composición fenólica individualizada mediante HPLC-DAD-MS de diferentes granos ancestrales tales como teff blanco, marrón, trigo sarraceno y espelta. *ii*) Cuantificar los compuestos fenólicos totales de las semillas ancestrales por diferentes métodos espectrofotométricos (Folin-Ciocalteu y Fast Blue BB) y comparar con los resultados obtenidos mediante HPLC-DAD-MS. *iii*) Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de los granos ancestrales estudiados por el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y FRAP (poder antioxidante reductor del hierro).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Muestras*

Semillas ancestrales de trigo sarraceno, dos variedades de teff proporcionadas por la empresa Dacsá-Molendum Ingredients (Zamora) y harina de trigo espelta comercial.

2.2. *Preparación de las muestras y extracción de los compuestos fenólicos*

Los granos de teff blanco, marrón y trigo sarraceno fueron triturados en un molinillo para obtener las harinas correspondientes.

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó siguiendo el método de Dueñas *et al.* (2015). La purificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante extracción en fase sólida con cartuchos de Sep Pak C₁₈ (Waters). Posteriormente, los compuestos fenólicos fueron analizados por HPLC-DAD-MS, según el método descrito por Dueñas *et al.* (2015).

2.3. *Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS*

El análisis de compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático y un detector de diodos en circuito integrado, acoplado a una estación de tratamiento de datos HP Chem Station (Rev. B. 04.01). La separación se llevó a cabo mediante una columna de fase reversa Spherisorb S3 ODS-2 C8, de 4,6 x 150 mm de dimensiones y un tamaño de partícula 3 µm, termostaticada a 35 °C. Las condiciones de HPLC y de MS fueron descritas previamente por Dueñas *et al.* (2015).

2.3.1. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

La identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS se realizó mediante comparación de los tiempos de retención, espectros UV-visible en el caso de disponer de patrones comerciales. La identidad y confirmación de otros compuestos se realizó a partir de la relación masa/carga (*m/z*) de cada compuesto y sus patrones de fragmentación obtenidos por el espectrómetro de masas.

Para el análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos identificados, se realizaron las curvas de calibrado a partir de patrones externos. Las rectas de calibrado de los compuestos se calcularon inyectando distintas concentraciones de la solución patrón, en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras, realizándose la regresión lineal frente al área del pico obtenida en cada caso.

2.4. *Determinación de compuestos fenólicos totales*

La determinación espectrofotométrica de compuestos fenólicos totales se realizó con los métodos de Folin-Ciocalteu y Fast Blue BB (FBBB).

2.4.1. Método Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu consiste en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin de color amarillo (mezcla de wolfrato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, ácido fosfomolibdotúngstico) en medio alcalino, dando una coloración azul intensa. Se siguió el método de Singleton *et al.* (1965) con ligeras modificaciones.

2.4.2. Método Fast Blue BB

El método FBBB consiste en la reacción del grupo (-OH) de los compuestos fenólicos con el radical diazonio (-N₂-) del reactivo Fast Blue BB. Como resultado de la sustitución electrofílica aromática, se forma un azo complejo. El método se optimizó en el laboratorio, siguiendo el método de Medina *et al.* (2011).

En ambos métodos los resultados se obtuvieron por interpolación de la absorbancia sobre una curva de calibrado obtenida con disoluciones de ácido gálico, independientemente de los compuestos fenólicos presentes en las muestras. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico /g de muestra.

2.5. *Determinación de la actividad antioxidante*

2.5.1. Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox)

El ensayo de la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) mide la capacidad de un compuesto para captar el radical coloreado ABTS •[±], en un medio acuoso, convirtiendo el mismo en un producto decolorado (Arts *et al.*, 2003). El protocolo que se utilizó fue descrito por Re *et al.* (1999).

2.5.2. Método FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro)

El método FRAP se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes presentes en la muestra para donar electrones y reducir el ion férrico a ferroso en medio acuoso ácido. Se siguió el método de Benzie y Strain (1996) con ligeras modificaciones.

Los resultados en ambos métodos fueron expresados como μmol TROLOX/g muestra.

2.6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (\pm SD) del triplicado correspondiente a cada muestra analizada.

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el análisis de la varianza (ANOVA) por comparación de medias con el test de Tukey HSD con el fin de indicar las diferencias significativas con un valor de significación de un $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales en los granos ancestrales

La Tabla 1 muestra el contenido en compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/g muestra) determinados espectrofotométricamente por los métodos Folin-Ciocalteu y FBBB. Los resultados muestran contenidos de compuestos fenólicos totales significativamente más altos con el método FBBB que con el método estándar Folin-Ciocalteu, con unos niveles mayores a los 90 minutos de reacción, exceptuando la espelta. Esta tendencia también fue observada por otros autores (López Froilán *et al.*, 2018; Maives *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2011). Esto podría deberse a que en el método Folin-Ciocalteu otros compuestos presentes en la matriz pueden actuar como interferentes.

El trigo sarraceno presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos en ambos métodos, presentando diferencias significativas con respecto a las otras muestras estudiadas, seguidas del teff marrón y blanco. La espelta mostró la concentración más baja en compuestos fenólicos totales en ambos métodos.

TABLA 1. Contenido en compuestos fenólicos totales (mg GAE/ g muestra) por Folin-Ciocalteu y Fast Blue BB

MÉTODO	Teff blanco	Teff marrón	Trigo sarraceno	Espelta
Folin Ciocalteu	9,87 \pm 0,24 ^c _A	8,55 \pm 0,24 ^b _A	32,60 \pm 0,46 ^d _A	3,27 \pm 0,16 ^a _B
FBBB 60 _{min}	44,17 \pm 1,39 ^b _B	50,87 \pm 6,09 ^c _B	67,99 \pm 0,44 ^d _B	1,94 \pm 0,33 ^a _A
FBBB 90 _{min}	51,36 \pm 1,32 ^b _C	60,55 \pm 6,78 ^c _C	77,32 \pm 0,71 ^d _C	2,07 \pm 0,06 ^a _A

Letras minúsculas diferentes dentro de cada fila indican diferencias significativas. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas entre los métodos.

3.2. Caracterización y composición de compuestos fenólicos en los granos ancestrales

Los compuestos fenólicos fueron identificados mediante HPLC-DAD-MS. En la Tabla 2 se recogen las características cromatográficas, espectrales de los compuestos fenólicos detectados, así como la composición de los compuestos fenólicos en las semillas estudiadas. Estas características nos permiten obtener información sobre la posible estructura de los compuestos, así como de la posible familia a la que pueden pertenecer. De esta manera, se consiguió la identificación de compuestos fenólicos pertenecientes a compuestos no flavonoideos (compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y compuestos flavonoideos (flavonoles, flavonas, flavanoles).

3.2.1. Teff blanco y teff marrón

En ambas variedades de teff se identificaron un total de 20 compuestos (Tabla 2). El grupo de las flavonas fue la familia de compuestos fenólicos más abundante detectada en ambas muestras, principalmente por glucósidos de apigenina y luteolina, representando casi el 100 % del total de compuestos fenólicos (Tabla 3), siendo los compuestos mayoritarios para el teff blanco Ap-6-C-glucósido-6^{''}-O-(6^{'''}-O-vanilloil)hexósido (111,98 mg/g semilla) y el para el teff marrón, Lu-6-C-glucósido-7-O-hexósido (3490,04 mg/g semilla).

En la variedad blanca este grupo constituyó el 99,86 % respecto al total, destacando una mayoría derivados de apigenina (95,75 %), mientras que en la variedad marrón (100 %) fueron derivados de luteolina (86,61 %).

En la variedad blanca este grupo constituyó el 99,86 % respecto al total, destacando una mayoría derivados de apigenina (95,75 %), mientras que en la variedad marrón (100 %) fueron derivados de luteolina (86,61 %).

TABLA 2. Caracterización de compuestos fenólicos y composición de teff blanco, marrón, trigo sarraceno y trigo espelta ($\mu\text{g/g}$ muestra)
 (Ap:Apigenina; Lu:Luteolina)

Pico	t_R (min)	λ_{\max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	$\mu\text{g/g}$
Teff blanco						
1	5,34	326	353	191,179,173,161,135	Ácido 3-O-cafeoilquínico	t
2	5,92	336	755	503,473,341,311,282	Ap 8-C glucósido-O-hexósido-O-hexósido	t
3	11,21	326	353	191,179,135	Ácido cafeoilquínico	t

Pico	t _R (min)	λ _{max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	µg/g
4	11,85	340	609	447,357,327,299,285	Lu-6-C-glucósido-O-hexósido	6,14 ± 0,82
5	12,62	340	593	473,383,353,297	Ap-6,8-di-C-glucósido	6,24 ± 1,01
6	13,68	338	739	575,457,341,311,283	Ap-6-C-glucósido 2''-O-ramnósido-6''-O-hexósido	3,43 ± 0,38
7	14,85	322	577	311,28	Ap-4''-O-rutinósido	2,96 ± 0,20
8	15,25	338	593	473,431,341,311,283	Ap-6-C-glucósido-7-O-hexósido	83,80 ± 9,75
9	15,64	334	563	473,443,383,353,283	Ap-6-C-hexósido-8-C-pentósido	21,63 ± 1,82
10	16,19	350	447	357,327,299,285	Lu-8-C-glucósido	3,60 ± 0,45
11	16,93	314	337	161,163,173,155	Ácido 4-O- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,62 ± 0,21
12	16,94	338	563	473,383,353,325,297	Ap-6-C-pentósido-8-C-glucósido	6,79 ± 0,26
13	17,93	336	593	413,413,353,341,323,311,283	Ap-6-C-hexósido-2''-O-hexósido	2,27 ± 0,79
14	18,24	336	431	341,311,283	Ap-8-C-glucósido	109,57 ± 13,53
15	20,35	338	431	413,341,323,311,283	Ap-6-C-glucósido	9,52 ± 0,79
16	21,58	336	445	325,297,282	7-O-metil-Ap-6-C-glucósido	7,10 ± 0,45
17	22,40	352	759	411,357,339,327,299	Lu-6-C-glucósido-6''-O-(6'''-O-vanilloil) hexósido	8,92 ± 0,19
18	23,82	336	577	311,269	Ap-7-O-rutinósido	41,65 ± 2,39
19	26,15	334	743	341,323,311,283,269	Ap-6-C-glucósido-6''-O-(6'''-O-vanilloil) hexósido	111,98 ± 7,19
20	29,82	336	515	455,323,293,281	Ap-8-C-diacetilglucósido	28,69 ± 2,46
Teff marrón						
1	6,04	340	771	609,447,357,327,298	Lu-8-C-glucósido-O-hexósido-O-hexósido	46,18 ± 10,28
2	7,17	350	771	609,411,357,327,285	Lu-6-C-glucósido-6''-O-dihexósido	23,33 ± 4,31

Pico	t _R (min)	λ _{max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	µg/g
3	9,64	346	755	473,357,339,327,309,298	Lu-6-C-glucósido-2 ^o -O-ramnósido-6 ^o -O-hexósido	97,46 ± 2,15
4	11,67	350	609	447,357,327,299,285	Lu-6-C-glucósido-7-O-hexósido	3490,04 ± 22,12
5	12,65	348	755	447,357,327,299	Lu-6-C-glucósido-7-O-ramnosil-hexósido	386,07 ± 10,79
6	15,32	338	593	473,431,341,311,283	Ap-6-C-glucósido-7-O-hexósido	482,74 ± 1,51
7	15,62	334	563	473,443,383,353,283	Ap-6-C-hexósido-8-C-pentósido	423,71 ± 4,61
8	16,13	350	447	357,327,299,285	Lu-8-C-glucósido	764,00 ± 39,47
9	16,46	340	623	371,341,327,313,269	7-O-metil-Lu-6-C-glucósido 6 ^o -O-hexósido	267,63 ± 18,07
10	16,96	338	563	473,383,353,325,297	Ap-6-C-pentósido-8-C-glucósido	154,24 ± 19,08
11	17,29	352	461	371,341,313,298	7-O-metil-Lu-8-C-glucósido	46,67 ± 4,49
12	18,33	336	431	341,311,283	Ap-8-C-glucósido	179,53 ± 13,05
13	19,17	350	489	429,357,327,299,285	Lu-8-C-acetilglucósido	68,31 ± 1,68
14	20,07	344	593	285	Lu-7-O-rutinósido	423,86 ± 19,15
15	20,60	348	789	609,411,357,339,327,285	Lu-6-C-glucósido-6 ^o -O-(6 ^o -O-siringoil) hexósido	401,57 ± 16,18
16	21,18	348	447	327,285	Lu-7-O-glucósido	273,74 ± 10,28
17	22,32	352	759	411,357,339,327,299	Lu-6-C-glucósido-6 ^o -O-(6 ^o -O-vanilloil) hexósido	1798,08 ± 52,98
18	23,27	334	729	609,411,357,339,327,299,285	Lu-6-C-glucósido-6 ^o -O-(6 ^o -O- <i>p</i> -hidroxibenzoil)hexósido	58,41 ± 9,28
19	24,29	352	489	429,357,327,299,285	Lu-8-C-acetilglucósido	31,24 ± 1,73
20	26,2	350	531	471,339,327,309,297	Lu-8-C-diacetilhexósido	43,22 ± 1,20

Pico	t _R (min)	λ _{max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	µg/g
Trigo sarraceno						
1	4,74	262,294	3115	153	Ácido protocatequico hexósido	trazas
2	5,50	280	451	289	(Epi)catequina hexósido	1634,82 ± 293,00
3	6,20	271	451	289	(Epi)catequina hexósido	857,61 ± 43,24
4	6,68	280	451	289	(Epi)catequina hexósido	760,28 ± 72,57
5	7,68	316	487	179,135	Cafeoil hexósido ramoside (swertiamacroside)	2066,23 ± 84,71
6	7,91	279	289	245, 151, 137	Catequina	870,77 ± 6,77
7	9,03	278	577	451, 425, 407, 289	Dímero PC	204,55 ± 26,49
8	11,09	274	289	245, 151, 137	Epicatequina	1136,60 ± 61,10
9	11,77	302	531	223	Sinapoil hexósido rhamnoside	114,87 ± 3,03
10	13,95	318	781	473,179	Cafeoil dihexoside rhamnoside pentoside	329,45 ± 25,75
11	14,63	302	531	223	Sinapoil hexósido rhamnoside	884,17 ± 0,04
12	15,01	308	827	665,503,485,341, 323,179	Tricafeoil dihexósido	463,27 ± 56,43
13	17,69	330	515	179	Dicaffeoil quínico	110,20 ± 24,12
14	18,02	274	441	289,169	Epicatequina galato	352,19 ± 3,18
15	18,05	-	833	561,543,289,271	Trímero (2 afzelechin+1 epicatequina)	310,79 ± 53,87
16	19,62	354	609	301	Quercetina rutinósido	2027,59 ± 98,60
17	20,14	306	795	487,325,179	Cafeoil dihexoside dirhamnoside	104,05 ± 11,57
18	20,35	274	727	561,455,289,271	Epiatzelquina-epicatequina-metil galato	590,21 ± 40,81
19	21,00	352	463	301	Quercetina glucósido	trazas

Pico	t _R (min)	λ _{max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	µg/g
20	23,65	274	753	289	Epicatequina-epicatequina-dimetilgalato	803,79 ± 43,88
21	24,72	318	447	301	Quercetina rhamnoside	trazas
22	26,59	354	651	301	Quercetina acylrutinosido	trazas
23	26,71	274	741	469,319,271	Epiafzelquina-epicatequina-O-dimetilgalato	2467,75 ± 134,91
24	27,37	352	651	301	Quercetina acetilrutinosido	71,20 ± 11,79
25	29,51	270	469	319,271,125	Epicatequina-O-3,4-dimetilgalato	990,18 ± 2,69
Trigo espelta						
1	5,13	260,296	153	109	Ácido protocatéquico	949,00 ± 83,10
2	7,32	306	337	191,73,163,155,137	Ácido <i>p</i> -coumaroilquínico	59,80 ± 13,90
3	11,5	324	179	135	Ácido cafeico	183,10 ± 32,50
4	13,37	332	593	473,443,383,353	Ap- 6,8, di C-glucósido	9,10 ± 2,20
5	13,4	280	203	-	Triptófano	
6	14,6	336	563	503,473,443,413,383,353,297	Ap-C-hexósido-O-pentósido	552,40 ± 25,90
7	14,9	336	563	503,473,443,413,383,353,298	Ap-C-hexósido-O-pentósido	772,20 ± 42,80
8	15,5	338	563	473,443,413,383,353,299	Ap-C-hexósido-O-pentósido	435,20 ± 22,10
9	15,88	336	563	503,473,443,413,383,353,298	Ap-C-hexósido-O-pentósido	2181,90 ± 91,40
10	18,02	340	593	503,413,383	Ap-C-hexósido-O-hexósido	trazas
11	18,3	346	533	515,473,443,413,383,353,325,297	Ap-6,8, di C-pentósido	4,50 ± 0,10
12	19,02	348	533	515,473,443,413,383,353,325,297	Ap-6,8, di C-pentósido	52,00 ± 5,60
13	19,25	324	193	149	Ácido ferúlico	302,40 ± 38,80
14	19,69	328	563	473,383,353	Ap-C-hexósido-O-pentósido	trazas

Pico	t _R (min)	λ _{max}	[M-H] ⁻	fragmentos	Identificación	µg/g
15	20,77	352	639	435,373,331,315	Laricitrina O-rutinosido	trazas
16	21,7	332	769	545,455,425,395, 365,335	Ap 2 ^o -sinapoil-C- hexósido-C-pentósido	132,40 ± 20,80
17	22,14	332	815	739,545,345,330, 315	Siringetina dihexósido rhamnosido	96,80 ± 0,60
18	22,69	332	769	563,545,425,365, 335	Ap- 2 ^o -sinapoil-C- hexósido-C-pentósido	377,00 ± 52,80
19	23,17	336	769	563,545,455,425, 365,335	Api- 2 ^o -sinapoil-C- hexósido-C-pentósido	235,20 ± 11,60
20	24,1	354	623	315	Isorhamnetina rutinósido	53,50 ± 3,20
21	24,71	366	653	345,330	Siringetina rutinósido	29,70 ± 2,70
22	25,45	344	769	637,545,425,365, 335	Ap-2 ^o -sinapoil-C- hexósido-C-pentósido	41,80 ± 5,40

3.2.2. Trigo sarraceno

En el trigo sarraceno se identificaron un total de 25 compuestos (Tabla 2). El grupo de los flavanoles fue la familia de compuestos fenólicos más abundante, representando el 63,82 % (Tabla 3); como compuesto mayoritario destaca epiafzelquina-epicatequina-O-di metilgalato (2467,75 mg/g semilla). En esta muestra se encontró el mayor contenido en compuestos hidroxicinámicos, un 23,83 % con respecto al total.

3.2.3. Trigo espelta

El grupo de las flavonas fue la familia de compuestos fenólicos más abundante en el trigo espelta, representando el 75,15 % (Tabla 8); el compuesto mayoritario fue Ap-C-hexósido-O-pentósido (2181,90 mg/g semilla). Fue la única muestra que presentó compuestos no flavonoideos en forma de compuestos hidroxibenzóicos, representando casi un 15 %.

Con el objetivo de poder establecer una mejor comparación entre las muestras estudiadas, en la Tabla 3 se muestra el contenido de grupos de compuestos fenólicos para cada muestra (mg/g muestra) y el porcentaje de cada uno de los grupos con respecto al contenido total.

El contenido total más alto de compuestos fenólicos determinado por HPLC fue también en el trigo sarraceno (17,08 mg/g muestra).

Respecto al contenido en flavonoides, el teff y la espelta mostraron como compuestos mayoritarios las flavonas (entre el 75 y el 100 % del total). Sin embargo, en el trigo sarraceno los compuestos fenólicos mayoritarios fueron los flavanoles, representando un 63,82 % del total.

TABLA 3. Contenido de grupos de compuestos fenólicos para cada muestra (mg/g muestra) y composición porcentual de cada uno de los grupos con respecto al contenido total

Grupos	Teff blanco	Teff marrón	Trigo sarraceno	Espelta
Compuestos hidroxibenzoicos	nd	nd	trazas	0,95 ± 0,08 (14,94 %)
Compuestos hidroxicinámicos	0,001 ± 0,000 ^a (0,14 %)	nd ^a	4,07 ± 0,16 ^c (23,83 %)	0,45 ± 0,04 ^b (7,07 %)
Flavanoles	nd ^a	nd ^a	2,10 ± 0,11 ^c (12,29 %)	0,19 ± 0,01 ^b (2,99 %)
Flavonas	0,45 ± 0,04 ^b (99,86 %)	9,45 ± 0,05 ^d (100 %)	nd ^a	4,78 ± 0,25 ^c (75,15 %)
Flavan 3-oles y proantocianidinas	nd	nd	10,90 ± 0,31 (63,82 %)	nd
Total Compuestos HPLC	0,45 ± 0,04^a	9,45 ± 0,05^c	17,08 ± 0,04^d	6,36 ± 0,36^b

Letras diferentes dentro de cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto al contenido en ácidos fenólicos, identificamos compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Los compuestos hidroxibenzoicos fueron principalmente cuantificados en las muestras de espelta representando un 14,94 %. Sin embargo, los compuestos hidroxicinámicos se encuentran ampliamente representados en las muestras de trigo sarraceno suponiendo el 23,83 % respecto al total; en la espelta representaron el 7,07 % y en el teff blanco supusieron un porcentaje mínimo (0,14 %).

Como se puede observar, existen importantes diferencias cuantitativas en el contenido en compuestos fenólicos según el método utilizado. Hay que señalar que los métodos generales (Folin-Ciocalteu y FBBB) cuantifican según una recta de calibrado de ácido gálico, perteneciente a la familia de los ácidos hidroxibenzoicos, compuestos que, como hemos visto en la determinación por HPLC-DAD-MS, están escasamente representados en las muestras objeto de estudio. Sin embargo, en este último método, la cuantificación se lleva a cabo utilizando rectas de calibrado de patrones pertenecientes a las distintas familias de compuestos fenólicos analizados.

3.3. *Determinación de actividad antioxidante (TEAC y FRAP)*

La muestra de trigo sarraceno presentó los valores más altos de actividad antioxidante para ambos métodos (valor TEAC 16,5 mmol Trolox/g muestra y valor FRAP 65,45 mmol Trolox/g muestra), mostrando diferencias significativas con respecto al resto. Sin embargo, el teff blanco y el teff marrón no mostraron diferencias significativas para ambos métodos. Valores TEAC que oscilaban entre 12,07 para el teff blanco y 11,35 mmol Trolox/g muestra para el teff marrón y los valores FRAP entre 14,26 para el teff blanco y 14,87 mmol Trolox/g muestra para el teff marrón. Las muestras de espelta fueron las que presentaron los valores más bajos para ambos métodos (valor TEAC 1,17 mmol Trolox/g muestra y valor FRAP 2,60 mmol Trolox/g muestra).

También se puede observar que existe una relación entre la mayor concentración de compuestos fenólicos encontrada en la muestra de trigo sarraceno con los valores más altos de la actividad antioxidante.

4. CONCLUSIÓN

1. En general, los valores de compuestos fenólicos totales en los granos ancestrales estudiados, determinados por el método Fast Blue BB, han sido significativamente más altos que los calculados por el método estándar Folin-Ciocalteu y, en ambos casos, muy superiores a los determinados por HPLC-DAD-MS.
2. Según la composición fenólica determinada por HPLC-DAD-MS, parece más oportuno llevar a cabo la cuantificación de los compuestos fenólicos por este método que con los métodos espectrofotométricos generales, ya que estos últimos utilizan como recta de calibrado el ácido gálico, compuesto escaso o nulumamente representado en las muestras analizadas.
3. Mediante la caracterización por HPLC-DAD-MS se ha conseguido la identificación de un gran número de compuestos fenólicos: no flavonoides (compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanoles).
4. Las flavonas son la familia de compuestos fenólicos más abundante detectada en las muestras de espelta, teff, blanco y marrón. Sin embargo, en el trigo sarraceno son los flavanoles (64 %). De las flavonas presentes en el teff, parece que principalmente están en forma de glicósidos de apigenina en el blanco y de luteolina en el marrón; lo que indica diferencias importantes en sus rutas biosintéticas.
5. Los valores más elevados de actividad antioxidante, determinados mediante los métodos FRAP y TEAC, se han obtenido en las muestras de trigo

sarraceno, mostrando diferencias significativas con respecto a las otras muestras, pudiéndose relacionar con su alto contenido en compuestos fenólicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Arts Mariken JJJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen G, Bast A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.* 2003; 80(3):409-414.
- Baye, K. Teff: Nutrient Composition and Health Benefits. International Food Policy Research Institute (IFPRI) and Ethiopian Development Research Institute (EDRI); 2014. p. 67.
- Benincasa P *et al.* Phenolic compounds in grains, sprouts and wheatgrass of hulled and non-hulled wheat species. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(9):1795-1803.
- Benzie Iris FF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70-76.
- Del Rio D, Rodríguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(14):1818-1892.
- Dueñas M, Martínez-Villaluenga C, Limón RI, Peñas E, Frias J. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Res Int.* 2015; 70:55-63.
- Fraga CG, Kroft DC, Kennedy DO, Tomás-Berberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food funct.* 2019; 10:514-528.
- Kerienė I, Mankevičienė A, Bliznikas S, Jablonskyte-Rasce D, Maiksteniene S, Cesnuleviciene R. Biologically active phenolic compounds in buckwheat, oats and winter spelt wheat. *Zemdirbyste-Agriculture.* 2015; 102(3):289-296.
- López-Froilán R, Hernández-Ledesma B, Cámara M, Pérez-Rodríguez ML. Evaluation of the antioxidant potential of mixed fruit-based beverages: a new insight on the Folin Ciocalteu method. *Food Anal Method.* 2018; 11(10): 2897-2096.
- Maives HA. Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis Thunb.* peduncles in different maturity stages. *J Funct Food.* 2015; 18(B):1117-1124.
- 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.
- Sedeje I, Saka M, Mandi A, Mišan A, Tumbas V, Čanadanović-Brunet J. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Grain and Fractions: Antioxidant Compounds and Activities. *J Food Sci.* 2012; 77(9):954-959.
- Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 16:144-158.

