

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Escuela Politécnica Superior de Zamora  
Grado en Ingeniería Agroalimentaria

Trabajo de Fin de Grado

---

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y SU  
RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EN  
LENTEJAS**

---

AUTOR: LAURA VICENTE PASCUAL

TUTOR: ISABEL REVILLA MARTÍN

COTUTOR: ANA MARÍA VIVAR QUINTANA

DEPARTAMENTO: CONSTRUCCIÓN Y AGRONOMIA

ÁREA: TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

FECHA DE ADJUDICACIÓN: MARZO 2017

FECHA DE PRESENTACIÓN: SEPTIEMBRE 2017



# ÍNDICE

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas.....	4
I. OBJETIVOS.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	10
1. La lenteja.....	11
1.1. Definición.....	11
1.2. Taxonomía.....	11
1.3. Morfología y fisiología.....	12
1.4. Variedades.....	16
1.5. Exigencias del cultivo.....	20
1.5.1 Climáticas.....	20
1.5.2 Edáficas.....	21
1.6. Enfermedades y plagas.....	21
2. Distribución del cultivo.....	23
2.1. Situación a nivel mundial.....	23
2.2. Situación a nivel europeo.....	26
2.3. Situación a nivel de España.....	28
2.4. Situación por comunidades autónomas.....	30
3. Indicación Geográfica Protegida.....	32
3.1. IGP de lentejas en España.....	33
3.2. IGP Lenteja de La Armuña.....	33
3.2.1. Requisitos.....	33
4. Composición química y nutricional.....	36
4.1. Composición nutricional.....	36
4.1.1. Hidratos de carbono.....	38
4.1.2. Fibra.....	38
4.1.3. Grasas.....	39
4.1.4. Proteínas.....	39
4.1.5. Minerales.....	40

4.1.6. Vitaminas.....	41
4.1.7. Otros compuestos de interés.....	41
5. Polifenoles.....	41
6. Capacidad antioxidante.....	56
6.1 Métodos de análisis de la capacidad antioxidante.....	58
7. Polifenoles y capacidad antioxidante en lentejas.....	60
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
1. Materiales.....	74
1.1. Material vegetal.....	74
1.2. Material de laboratorio.....	77
1.3. Reactivos.....	78
2. Metodología.....	78
2.1. Extracción de polifenoles.....	78
2.2. Análisis espectrofotométrico de fenoles totales.....	80
2.3. Análisis cromatográfico de fenoles individuales.....	81
2.4. Análisis espectrofotométrico de capacidad antioxidante.....	82
3. Análisis estadístico.....	83
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
1. Polifenoles totales y actividad antioxidante.....	85
1.1. Extracción y cuantificación de fenoles totales.....	86
1.2. Cuantificación de la capacidad antioxidante.....	89
1.3. Influencia de las variedades.....	91
1.4. Influencia del ecotipo.....	95
1.5. Influencia de la generación.....	97
1.6. Diferencias entre guareña, jaspeada y microjaspeada.....	99
1.7. Influencia de la IGP.....	100
1.8. Influencia de la selección de semilla.....	101
1.9. Influencia del tipo de suelo.....	103
1.9.1. Influencia del suelo en lentejas cultivadas en la IGP.....	106
1.9.1. Influencia del suelo en lentejas rubia de La Armuña.....	107
1.9.1. Influencia del suelo en lentejas Guareña.....	108
2. Fenoles individuales.....	110
2.1. Perfil cromatográfico.....	110

2.2. Identificación de compuestos fenólicos.....	119
2.3. Contenido fenólico individual.....	126
2.3.1. Influencia de las variedades.....	127
2.3.2. Influencia del ecotipo.....	130
2.3.3. Influencia de la generación.....	131
2.3.4. Diferencias entre guareña, jaspeada y microjaspeada.....	132
2.3.5. Influencia de la IGP.....	134
2.3.6. Influencia de la selección de semilla.....	135
2.3.7. Influencia del tipo de suelo.....	136
2.3.7.1. Influencia del suelo en lentejas cultivadas en la IGP.....	136
2.3.7.2. Influencia del suelo en lentejas rubia de La Armuña.....	137
2.3.7.3. Influencia del suelo en lentejas Guareña.....	138
3. Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico.....	139
4. Conclusiones.....	141

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la planta de lentejas especie <i>Lens culinaris</i> .....	12
Figura 2. Formula floral .....	14
Figura 3. Estructura de la semilla de lenteja .....	15
Figura 4. Imagen de lenteja de La Armuña, tipo Guareña .....	16
Figura 5. Imagen de lenteja Castellana.....	17
Figura 6. Imagen de lenteja Pardina.....	17
Figura 7. Imagen de lenteja Verdina.....	18
Figura 8. Imagen de lenteja Beluga.....	18
Figura 9. Imagen de lenteja Crimson.....	19
Figura 10. Lenteja Urad dal. ....	19
Figura 11. Producción mundial de las legumbres desde 1990 hasta 2014. (Millones de toneladas). Gráfico obtenido de FAO.....	23
Figura 12. Producción mundial de lentejas, año 2013. Gráfico obtenido de FAO.....	24
Figura 13. Exportaciones de lentejas a nivel mundial durante el año 2013. Gráfico obtenido de MAPAMA.....	25
Figura 14. Superficie de leguminosas grano en la UE (hectáreas). Gráfico obtenido de MAPAMA.....	26
Figura 15. Producción de leguminosas grano en la UE (toneladas). Gráfico obtenido de MAPAMA.....	27
Figura 16. Superficie de leguminosas grano en España (miles de hectáreas). Gráfico obtenido de MAPAMA.....	28
Figura 17. Producción de leguminosas grano en España (miles de toneladas). Gráfico obtenido de MAPAMA.....	29
Figura 18. Superficie de leguminosas grano por CCAA. Campaña 2015/2016. Gráfico obtenido de MAPAMA.....	31

Figura 19. Producción de leguminosas grano por CCAA. Campaña 2015/2016.Gráfico obtenido de MAPAMA.....	31
Figura 20. Logotipo Lenteja de La Armuña.....	35
Figura 21. Estructuras químicas de los compuestos fenólicos simples más representativos.....	42
Figura 22. Estructuras químicas de los principales ácidos hidroxibenzoicos.....	43
Figura 23. Estructura química del ácido cinámico, y ácidos hidroxicinámicos.....	44
Figura 24. Estructura química de cumarina.....	44
Figura 25. Estructura química de umbeliferona.....	44
Figura 26. Estructura química de resveratrol.....	45
Figura 27. Estructura química de la benzoquinona.....	45
Figura 28. Estructura básica de lignanos.....	46
Figura 29. Estructura química de la lignina.....	47
Figura 30. Estructura común de los flavonoides.....	48
Figura 31. Estructura química de tanino condensado.....	49
Figura 32. Estructura básica del ácido tánico.....	49
Figura 33. Estructura química básica de chalcona.....	50
Figura 34. Estructura química de auronas.....	50
Figura 35. Estructura química de flavanonas.....	51
Figura 36. Estructura química de flavanoles.....	51
Figura 37. Estructura química básica catequina.....	52
Figura 38. Estructura química de los flavonoles.....	53
Figura 39. Estructura química básica flavonas.....	53
Figura 40. Estructura química de la isoflavona.....	54
Figura 41. Estructura química de neoflavonoides.....	55
Figura 42. A la izquierda estructura química de antocianidinas. A la derecha estructura química antocianinas. ....	56
Figura 43. A la izquierda OT-3 microjaspeada, a la derecha OT-4 jaspeada.....	76

Figura 44. Baño de ultrasonidos.....	79
Figura 45. Rotavapor programado a 30°C.....	79
Figura 46. Recta de calibración del ácido gálico. X= mg/ml; Y= área integrado bajo el pico.....	80
Figura 47. Matraces aforados con la muestra.....	81
Figura 48. Cubetas con diferentes muestras.....	82
Figura 49. Plano de términos municipales y tipos de suelos en los que se han recogido las muestras de lenteja realizado por el IRNASACSIC.....	104
Figura 50. Comparativa de los 5 tipos de perfiles presentes en lenteja Guareña.....	111
Figura 51. Comparativa de los 2 tipos de perfiles presentes en lenteja Rubia de la Armuña.....	112
Figura 52. Cromatograma tipo de lenteja Castellana. ....	113
Figura 53. Cromatograma tipo de lenteja Caviar. ....	113
Figura 54. Cromatograma tipo de lenteja Pardina. ....	113
Figura 55. Cromatograma tipo de lenteja Castellana pelada. ....	113
Figura 56. Cromatograma tipo de lenteja roja. ....	114
Figura 57. Cromatograma tipo de lenteja rápida. ....	114
Figura 58. Cromatograma tipo de lenteja Verdina. ....	114
Figura 59. Cromatograma tipo de lenteja Rubia de La Armuña. ....	114
Figura 60. Cromatograma tipo de lenteja Guareña. ....	115
Figura 61. Comparativa de los cromatogramas de los 9 tipos de lenteja estudiados.	115
Figura 62. Cromatograma de la muestra ERdA-7 y los picos identificados.....	116
Figura 63. Cromatograma obtenido con HPLC a 280nm. (Aguilera., et al, 2010)...	117
Figura 64. Arriba (A) cromatograma de lenteja Colliano, abajo (B) cromatograma de lenteja San Gerardo. Cromatogramas obtenidos con UPLC.....	118
Figura 65. A la izquierda espectro del pico E de nuestro perfil cromatográfico. A la derecha espectro del patrón del Kemferol. ....	122
Figura 66. A la izquierda espectro del pico A de nuestro perfil cromatográfico. A la derecha espectro del patrón del ácido gálico. ....	123



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción mundial de las principales legumbres, año 2013 (miles de toneladas) Tabla obtenido de FAO. ....	23
Tabla 2. Características analíticas recogidas en el pliego de condiciones de la IGP Lenteja de La Armuña. ....	34
Tabla 3. Tabla modificada de la composición nutricional de lentejas. (Moreiras, 2013). ....	37
Tabla 4. Comparativa del contenido fenólico en legumbres ordenadas cronológicamente. ....	64
Tabla 5. Composición individual de sustancias fenólicas presentes en diferentes tipos de leguminosas expresados en $\mu\text{g/g}$ de muestra, Fratianni et al., (2014).....	66
Tabla 6. Composición individual de sustancias fenólicas agrupadas por grupos en lentejas crudas, expresadas en $\mu\text{g/g}$ de muestra, Aguilera et al., (2010).....	67
Tabla 7. Comparativa de la capacidad antioxidante en legumbres ordenadas cronológicamente. ....	71
Tabla 8. Lentejas de tipo Guareña de primera y segunda reproducción. ....	74
Tabla 9. Lentejas de tipo Rubia de La Armuña. ....	75
Tabla 10. Lentejas proporcionadas por el Consejo Regulador no pertenecientes a los grupos R1, R2, ni ERdA. ....	76
Tabla 11. Lentejas agrupadas por variedades no proporcionadas por el Consejo Regulador. ....	77
Tabla 12. Valores medios de fenoles totales en las muestras de lentejas ordenadas por variedades. ....	87
Tabla 13. Valores medios de capacidad antioxidante en las muestras de lentejas...	90
Tabla 14. Contenido de fenoles totales expresado en $\text{mgGAE}/100\text{g}$ de las diferentes variedades.....	92
Tabla 15. Capacidad antioxidante expresada en $\text{ng Trolox/g}$ de las diferentes variedades. ....	94
Tabla 16. Contenido de fenoles totales expresado en $\text{mgGAE}/100\text{g}$ de las lentejas Guareñas y Rubias de La Armuña. ....	96

Tabla 17. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas y Rubias de La Armuña. ....	96
Tabla 18. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas de primera reproducción y de segunda reproducción. ....	97
Tabla 19. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas de primera reproducción y de segunda reproducción. ....	98
Tabla 20. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas, Guareñas microjaspeadas y Guareñas jaspeadas. ....	99
Tabla 21. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas, Guareñas microjaspeadas y Guareñas jaspeadas. ....	99
Tabla 22. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas cultivadas dentro y fuera de la IGP Lenteja de La Armuña.....	100
Tabla 23. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas cultivadas dentro y fuera de la IGP Lenteja de La Armuña.....	101
Tabla 24. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Rubias de La Armuña seleccionada y propia del agricultor. ....	102
Tabla 25. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Rubias de La Armuña seleccionada y propia del agricultor. ....	102
Tabla 26. Tipo de suelo predominante en cada término municipal.....	105
Tabla 27. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo. ....	106
Tabla 28. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo. ....	106
Tabla 29. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Rubia de La Armuña....	107
Tabla 30. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Rubia de La Armuña. ....	108
Tabla 31. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Guareñas. ....	109
Tabla 32. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Guareñas. ....	109

Tabla 33. Resumen de $\lambda$ max de los espectros de absorción UV de los grupos de fenoles en el estudio realizado por Aguilera et al., (2010). .....	120
Tabla 34. Tabla resumen de los grupos a los que pertenecen los diferentes picos identificados. ....	125
Tabla 35. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las variedades de lentejas. Las diferencias estadísticas se leen en vertical. ....	128
Tabla 36. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas Guareña y Rubia de La Armuña cultivadas dentro de la IGP. ....	130
Tabla 37. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas de primera y segunda generación. ....	131
Tabla 38. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de lentejas Guareña sin jaspeado, Guareña jaspeadas y Guareña microjaspeada. Las diferencias estadísticas se leen en vertical. ....	133
Tabla 39. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas Guareña cultivadas dentro y fuera de la IGP.....	134
Tabla 40. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas seleccionadas y usadas por el agricultor de la variedad Rubia de La Armuña. ....	135
Tabla 41. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas Guareña y Rubia de La Armuña. ....	136
Tabla 42. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas del tipo Rubia de La Armuña. ....	137
Tabla 43. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas Guareña.	138

# I. OBJETIVOS

Las legumbres han sido consideradas como un alimento fundamental para una dieta equilibrada, debido al alto contenido proteico, comparable con el de los alimentos de origen animal, además de su bajo contenido graso. Otro aspecto a destacar de las leguminosas grano, es su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico por las bacterias rhizobium que están en simbiosis con las raíces de estas, favoreciendo así las rotaciones con otros cultivos. El pasado año, 2016, fue el año internacional de las legumbres.

El consumo de lentejas se extiende a nivel mundial mientras que la mayor parte de la producción mundial se encuentra en América y Asia.

La lenteja es una leguminosa de la cual se consume el grano seco. Su componente principal son los hidratos de carbono, seguido de las proteínas, y donde destaca al igual que para el conjunto de legumbres su bajo contenido graso. También contiene gran variedad de fitoquímicos como polifenoles, fitoesteroles, y carbohidratos bioactivos, que aportan una actividad antioxidante considerable.

La lenteja es la legumbre con mayor concentración de polifenoles, y es una de las que presenta mayor capacidad antioxidante. Los polifenoles son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Asociado a su elevado poder antioxidante, se les atribuye la capacidad de prevenir diversas enfermedades. El estudio de fenoles y por ello también de la capacidad antioxidante, está condicionado por el método de extracción utilizado, además de las condiciones dadas durante esta etapa.

El objeto principal de este trabajo es determinar la composición fenólica y la capacidad antioxidante de varios tipos de lenteja, además de la correlación entre las variables. La composición fenólica se evaluará de forma total, además de la presencia de compuestos individuales. Por tanto, se correlacionará la capacidad antioxidante con la composición fenólica total e individual.

Para alcanzar este objetivo principal se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Obtener un método de extracción de fenoles rápido y que permita la obtención de valores repetitivos con el fin de poder evaluar los distintos factores que pueden afectar al contenido fenólico de todas las muestras de lentejas, y en particular de las lentejas pertenecientes a la IGP Lenteja de La Armuña.

- Obtener unos valores de capacidad antioxidante que al igual que en el contenido fenólico sean lo suficientemente repetitivos que permitan la evaluación de las lentejas antes citadas.
- Evaluar si interfieren en la capacidad antioxidante, y en el contenido de fenoles totales e individuales los siguientes factores:
  - Las variedades
  - Los ecotipos de la IGP Lenteja de La Armuña, Guareña y Rubia de la Armuña.
  - Las semillas certificadas de primera reproducción, R1, y las de segunda reproducción, R2, ambas de la variedad Guareña.
  - El cultivo dentro de la IGP o fuera.
  - El tipo de suelo.
  - El jaspeado o moteado presente en la superficie de algunas lentejas del tipo Guareña. Se pueden dar Guareña Jaspeada y Guareña Microjaspeada, dependiendo del tamaño de las motas negras, y Guareñas sin jaspeado (Guareñas).
  - La selección de semilla por parte del ITACYL.
- Comparar la capacidad antioxidante con el contenido fenólico total e individual, obteniendo una correlación numérica.

## II. INTRODUCCIÓN

## 1. LA LENTEJA

### 1.1. DEFINICIÓN

La definición de lenteja según la real academia de la lengua española es; planta herbácea, anual, de la familia de las Papilionáceas, con tallos de tres a cuatro decímetros, endebles, ramosos y estriados, hojas oblongas, estípulas lanceoladas, zarcillos poco arrollados, flores blancas con venas moradas, sobre un pedúnculo axilar, y fruto en vaina pequeña, con dos o tres semillas pardas en forma de disco de medio centímetro de diámetro aproximadamente.

Esta definición hace referencia a las lentejas cultivadas en España, sin dar una visión global del cultivo. Como se detalla más adelante, las características antes descritas como por ejemplo color de la flor y de la semilla puede variar según el tipo de lentejas.

### 1.2. TAXONOMÍA

**Reino:** Plantae

**Clase:** Angiospermas

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Leguminoseae o fabaceae

**Subfamilia:** Papilinoideas

**Género:** Lens

**Especie:** *Lens culentaria*



### 1.3. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Las lentejas son plantas esporofitas y anuales, es decir, germina y se reproduce en menos de un año. Su altura varía entre los 15 y 50 centímetros generalmente, aunque en algunas ocasiones puede alcanzar los 75 cm (Franco, Ramos, 1996).



Figura 1. Morfología de la planta de lentejas especie *Lens culinaris* (Wilhelm Thomé, Von Deutschland, Österreich y Schweiz, 1885)

En la subfamilia Papilinoideas se engloban otras leguminosas destinadas al consumo humano como el garbanzo (*Cicer arietinum*), el guisante (*Pisum sativum*), la soja (*Glycine soja*), etc.

Una de las características más particulares de las lentejas y de la familia Leguminosae es su raíz, la cual presenta nódulos radicales que contienen bacterias del género *Rhizobium* que viven en simbiosis con la planta. En dicha asociación, la leguminosa aporta a la bacteria hidratos de carbono para su desarrollo, y la leguminosa utiliza el nitrógeno atmosférico fijado por el *Rhizobium*. La simbiosis empieza por una infección

de la bacteria en los pelos radiculares en la raíz de la planta y después de su multiplicación dentro de ellos forma unos abultamientos llamados "nódulos". Los nódulos son de forma alargada y de un tamaño inferior a 6 mm. Según el número de nódulos que se producen en la planta se clasifican en genotipo de baja nodulación, de 15 a 25 nódulos por planta, o genotipo de alta nodulación, de 30 a 60 nódulos por planta. La cantidad de nitrógeno fijado por una planta depende del número de nódulos pero además está influenciada por la temperatura y por las horas de luz, favoreciendo el clima templado y los días cortos. La estimación de kilogramos de nitrógeno por cada hectárea y año en el cultivo de lentejas está entre 35 y 77 (Franco y Ramos, 1996).

Los tallos son delgados y casi erectos que tienden a crecer hacia arriba. Tiene forma cuadrada que se aprecia al ser cortados transversalmente.

Las hojas son alternas, formadas por un nervio principal del que parten otros secundarios y con estípulas (Strasburger, et al., 2004). Están formadas por folíolos pequeños, ovales y alargados que varían entre los 5 y 8 pares. Presentan color verde y aparecen zarcillos en la zona superior (Franco y Ramos, 1996), unas modificaciones de las hojas que permiten a las plantas sujetarse a objetos.

La inflorescencia es en racimo, que puede ser erecto o penduloso. Las flores son irregulares, hermafroditas, diploclamídeas, y con simetría dorsiventral. Se disponen en racimos axilares, entre el tallo y la hoja. Las flores están compuestas por (Strasburger, et al, 2004):

- Cáliz: Formado por 5 sépalos.
- Corola: Constituida por 5 pétalos. Un pétalo grande con forma de mariposa (estandarte), dos laterales (alas) y dos ventrales más o menos soldados (quilla). La coloración de los pétalos puede ser azul pálido, morado, rosado o blanco.
- Gineceo: Formado por un carpelo único.
- Androceo: Diez estambres que envuelven al pistilo, nueve soldados y uno libre.

La fórmula floral es igual para toda la subfamilia Papilionoideas es:

$$K(5) C5 A(10) \text{ ó } A(9)+1 G1$$

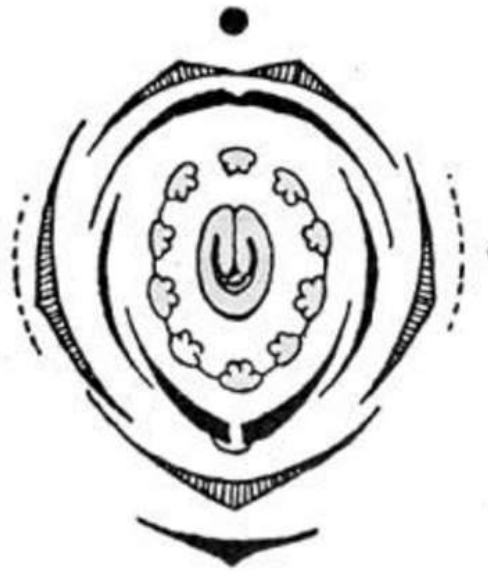


Figura 2. Fórmula floral ([www.biolib.de](http://www.biolib.de)).

Los frutos son simples, dehiscentes y monocarpelares. Tienen dos lados atravesados por un nervio. Se abren por la línea de sutura del carpelo (Strasburger, et al, 2004). La vaina mide entre 6 y 20 milímetros de longitud y de 3 a 12 milímetros de ancho, conteniendo dos o tres semillas en su interior (Franco y Ramos, 1996). Siendo variable el tamaño del fruto y semilla en función de la variedad.

La estructura de la semilla de lenteja es similar a la de otras leguminosas grano (Aykroyd, Doughty y Walker, 1982; Salunkhe, Kadam y Chavanet, 1985), pero su envoltura es más delgada (Hughes y Swanson, 1986).

Los componentes básicos de la semilla son tres: la envoltura (8%); cotiledones (90%) y embrión (2%), incluyendo la radícula, plúmula y eje embrionario (Bhatty, 1988).

La envoltura se divide en dos capas, testa o envoltura externa y tegmen o envoltura interna. La radícula contiene el embrión, el cual tomará las sustancias necesarias para su desarrollo del cotiledón. El cotiledón está constituido mayoritariamente por almidón. La plúmula es la parte desde la que se formarán el tallo y las primeras hojas de la lenteja.

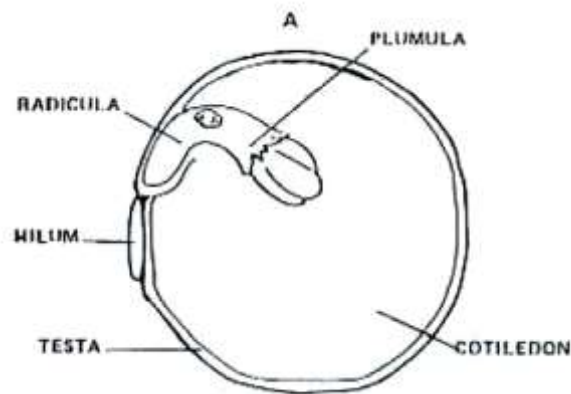


Figura 3. Estructura de la semilla de lenteja ([www.biolib.de](http://www.biolib.de)).

La germinación de la semilla de lenteja es hipogea, los cotiledones permanecen enterrados, únicamente la plúmula atraviesa el suelo, lo que disminuye la probabilidad de muerte por congelación, desecación, pastoreo, ataques de insectos o toxicidad debido a productos agroquímicos. Para germinar necesita al menos una temperatura de 15 °C, situándose su temperatura óptima de germinación entre los 18 y 21°C (Franco, Ramos, 1996).

Una vez depositada la semilla en el suelo y bajo condiciones adecuadas esta comienza su germinación. Tras la germinación comienza la emergencia de la plántula y crecimiento de la raíz principal. El siguiente estadio es en una planta de cuatro hojas, seguido del desarrollo de las raíces secundarias. Posteriormente aparecen las ramas secundarias y a continuación las terciarias. A la postre comienza la floración. La floración es escalonada, estructurándose en tres pisos, y dándose de arriba hacia abajo. La aparición de las vainas es secuencial, debido al escalonamiento floral (Franco, Ramos, 1996).

Son plantas C3, denominadas plantas normales, no tiene adaptaciones fotosintéticas para reducir la fotorrespiración.

## 1.4. VARIEDADES

El origen de la lenteja surgió en el sureste de Asia, desde allí se extendió a las zonas limítrofes hasta distribuirse por toda Asia y Europa. Las legumbres son uno de los cultivos más antiguos y más importantes consumidos en Europa y Asia (Gumienna et al., 2009). Posteriormente se extendió por el resto de continentes. Las leguminosas no han sufrido una selección, como sí se ha dado en los cereales, con el fin de aumentar su resistencia a plagas y enfermedades. Las lentejas que se cultivan y comercializan no pueden definirse como variedades puras, ya que son la consecuencia de cruces entre variedades y son reemplazadas para siembra durante años (Franco, Ramos, 1996).

Pueden ser divididas en subgrupos teniendo en cuenta el tipo, el cual es reconocido a simple vista debido a su tamaño y color que además engloba cambio en su composición química. A continuación se describen algunas de las principales variedades que se pueden encontrar:

- Lenteja de La Armuña: es de gran tamaño, su tamaño varía entre 6 y 9 mm de diámetro. Son de color verdoso con algunos granos jaspeados y microjaspeados, un tipo de moteado que las distingue de las demás variedades de lentejas castellanas. Dentro de las la lenteja de La Armuña se distinguen dos tipos, la Guareña y La rubia de La Armuña. La Guareña se ha obtenido a partir de una selección en masa por tamaño y producción de la lenteja Rubia de La Armuña. Su principal zona de cultivo está en la Región de La Armuña, Salamanca. Las lentejas llevan la etiqueta de calidad Indicación Geográfica Protegida otorgado por el reglamento (CE) 510/206 de la Comunidad Económica Europea como Indicación Geográfica Protegida Lenteja de La Armuña. Se comercializa envasada ya que no está permitida su venta a granel con el distintivo de IGP.



Figura 4. Imagen de lenteja de La Armuña, tipo Guareña (proporcionada por la IGP).

- Lenteja Rubia Castellana: una de las variedades con semillas más grandes, posee un tamaño entre 7 y 9 milímetros. Lenteja de coloración verde clara con algunas motas más oscuras, que se denominan lentejas avinatadas. A causa de la luz se oxidan y se van oscureciendo con el tiempo. Su grano es ancho, aplastado, con forma de lente. Su principal zona de cultivo en España está en la comunidad autónoma de Castilla la Mancha.



Figura 5. Imagen de lenteja Castellana

- Lenteja Pardina o lenteja Francesa: es de pequeño tamaño, con un diámetro que varía entre 3 y 5 mm. De color marrón terroso o marrón rojizo con pequeños puntos negros en su piel y albumen amarillo. Este tipo se puede cultivar en España con la etiqueta de calidad Indicación Geográfica Protegida Lenteja de Tierra de Campos bajo las condiciones fijadas por el consejo regulador de dicha IGP, siendo esta zona donde se concentra su mayor producción en España.



Figura 6. Imagen de lenteja Pardina

- Lenteja Verdina, lenteja Estón o lenteja de Lanzarote: es de pequeño tamaño, varía entre 3,5 y 5 mm de diámetro. Tiene color verde claro, similar a la lenteja Rubia Castellana. Su cultivo en España se concentra en Castilla y León.



Figura 7. Imagen de lenteja Verdina

- Lenteja Beluga o lenteja Caviar: Se reconoce visualmente con facilidad debido a su color negro brillante. El cotiledón es de color amarillo. Es de tamaño muy pequeño y de forma semiesférica. Debe sus denominaciones al parecido visual que tienen con el caviar de Beluga.



Figura 8. Imagen de lenteja Beluga



- Lenteja Crimson o lenteja Coral: Lentejas pequeñas, con un tamaño comprendido entre los 3 y 5 mm de diámetro, procedente de Turquía. Su albumen es de color rojizo.



Figura 9. Imagen de lenteja Crimson

- Lenteja Urad dal: lentejas blancas procedentes de India.



Figura 10. Lenteja Urad dal. (<http://kgpexports.com/my-product/black-gram-urad-dal/>).

De los tipos de lentejas anteriormente citados, históricamente han sido cultivados en España los cuatro primeros, lenteja de La Aarnuña, Rubia Castellana, Pardina y Verdina.



Además de por su variedad, las lentejas se pueden dividir en función de su tamaño (Braulina, 1930).

- Raza macrosperma. El peso de 100 semillas debe ser superior a 4,5 g. Se caracterizan por fruto grande, que puede variar entre 15 y 20 mm de longitud, en el que contienen semillas planas con un diámetro que oscila entre los 6 y 8 mm. Las plantas varían entre los 25 y 75 cm de altura.
- Raza microsperma. El peso de 100 semillas debe ser inferior a 4,5 g. Su fruto es de menor tamaño que en la raza macrosperma, en este caso varía entre los 6 y 15 mm de longitud. Al igual que su fruto, sus semillas también son de menor tamaño, oscilando entre los 3 y 6 mm de diámetro. La altura de la planta está entre los 15 y 35 cm.

La mayoría de los tipos de lenteja autóctona española, son macrospermas, entre las que destacan las lentejas tipo de La Armuña y la lenteja Rubia Castellana.

Por otro lado, las lentejas se pueden comercializar con piel o sin piel. Un claro ejemplo es la lenteja Castellana, que se comercializa sin piel con el nombre de lenteja amarilla pelada. La lenteja Crimson también se suele comercializar pelada.

## **1.5. EXIGENCIAS DEL CULTIVO**

### **1.5.1. CLIMÁTICAS**

El cultivo de lenteja tiene una alta variabilidad genética y están bien adaptadas a diferentes condiciones climáticas.

Son cultivadas en invierno, donde los inviernos son suaves, y donde los inviernos son severos se suelen sembrar en primavera (Franco, Ramos, 1996).

En la comarca de La Armuña se siembran en otoño aprovechando el periodo de lluvias, que facilitará su correcta nascencia. Aunque la lenteja es un cultivo de secano, ya que tolera bien la carencia de agua, sus necesidades hídricas son mayores durante la emergencia. Para su desarrollo necesitan unas precipitaciones anuales de 250 a 800 mm por metro cuadrado. Le perjudica bastante las nieves y los rocíos.

Para germinar necesitan una temperatura mínima de 15°C, siendo su temperatura óptima entre los 18 y 25°C (Franco, Ramos, 1996).

### 1.5.2. EDÁFICAS

El cultivo de lentejas tolera bien la sequía, en cambio tolera peor los suelos encharcados y mal drenados (Franco, Ramos, 1996).

Su crecimiento se ve favorecido por suelos profundos, ricos en materia orgánica, arenosos, calizos y sueltos para evitar causar podredumbre en la parte radicular de la planta.

Es un cultivo muy sensible a la salinidad (Ayoub, 1977; Saxena, 1981), por ello suelos con presencia de sal puede ser un obstáculo para el rendimiento en la producción de lenteja.

Las leguminosas son cultivos que se han utilizado durante años para aportar nitrógeno al suelo y así obtener un mejor rendimiento en rotaciones con otros cultivos como cereales. Se desarrollan bien en suelos con un pH comprendido entre 5,5 y 9 (Saxena, 1981) pero si el pH es menor 4 no existe nodulación, y si es superior a 9 disminuye la fijación de nitrógeno por los nódulos ubicados en la raíz de planta (Tay, 1979).

### 1.6. ENFERMEDADES Y PLAGAS

Las enfermedades y plagas pueden disminuir el rendimiento obtenido por cosecha, pero además estas influyen en la composición de los metabolitos secundarios de las plantas, que en ocasiones se generan como respuestas a estas.

Las principales enfermedades que afectan a las lentejas están producidas por los siguientes hongos:

-*Fusarium oxysporum* y *Fusarium sp. lentis*: Estos hongos producen la marchitez vascular, una de las enfermedades más extendidas a nivel mundial (Franco y Ramos, 1996). Provoca la muerte de las plantas que se ven afectadas. Se ve favorecido cuando las temperaturas oscilan entre 17 y 31°C; el pH se sitúa entre 7,6 y 8; y la humedad del suelo es del 25% (Khame, 1981). Para evitar los daños es aconsejable evitar el monocultivo, evitar suelos muy húmedos.

- *Ascochyta fabae*. Es el hongo es el causante de la rabia o ascoquitosis en lentejas. Los daños característicos se manifiesta en hojas, tallos, vainas y semillas (Díaz, 1993).

Aparecen manchas a lo largo de la planta de forma circular, oscuras con un color blanquecino en el interior, pudiendo secar las hojas. Las semillas atacadas presentan la piel arrugada y con manchas color café en los bordes, y finalmente aparece el micelio blanquecino del hongo. Los ataques en hojas y tallos provocan una disminución de rendimiento, pero los ataques en semillas provocan la inutilización de estas para el consumo humano por el rechazo que provoca dichas manchas para el consumidor, destinándose esas semillas infectadas para el consumo animal, ya que tampoco se pueden destinar para resembrar porque el hongo permanece en ellas, lo que provocaría una menor nascencia y la contaminación de la cosecha (Franco y Ramos, 1996).

Las principales plagas que afectan a las lentejas son:

-Pulgones: Hay muchas variedades de pulgones, y estos afectan a gran cantidad de plantas. La especie de pulgón que más ataca al cultivo de la lenteja es *Aphys craccivora* (Bovey, 1984). La sintomatología que presenta es la aparición de zonas secas en hojas y tallo, que van progresando hasta secar la planta si el ataque es muy severo (Franco, Ramos, 1996).

-Gorgojos: Hay varias especies de gorgojos, algunas de ellas afectan a otras leguminosas como el garbanzo. Las especies de gorgojos que afectan a la lenteja son *Bruchus lentis* y *Bruchus sinaticornis*. Las hembras taladran el grano, donde realizan la puesta. La larva, vive en el interior del grano donde se alimenta (Franco y Ramos, 1996). Las semillas atacadas por las larvas quedan desprovistas para el consumo, pues quedan agujereadas y vacías en su interior. También comen los embriones por lo que la semilla agorgojada no puede ser utilizada para la siembra. Las larvas de gorgojo realizan su ciclo biológico dentro de la semilla por lo que después de la recolección se pueden extender en el lugar de almacenamiento (Alonso, 1993).

## 2. DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO (datos de la FAO y MAPAMA)

### 2.1. SITUACIÓN A NIVEL MUNDIAL

Se han encontrado evidencias de que las antiguas civilizaciones de Mesopotamia cultivaban legumbres como guisantes, habas y lentejas ya en el 8 000 a.C

La lenteja, es una leguminosa, cuya principal finalidad es el consumo humano. Se conocen como legumbres, debido a que cosechan con el fin de obtener la semilla seca. No se consideran los cultivos que se recolectan verdes como guisantes verdes o judías verdes; estos se catalogan como hortalizas. Además, tampoco se incluyen, los cultivos cuyo fin es la extracción de aceites para biocombustible como el mijo.

El cultivo de las leguminosas es importante para la rotación con cereales debido a su capacidad de fijar el nitrógeno, lo cual hace que este tipo de plantas sean más cultivadas.

La lenteja es relativamente tolerante a la sequía y su distribución es cosmopolita, se cultiva en todo el mundo.

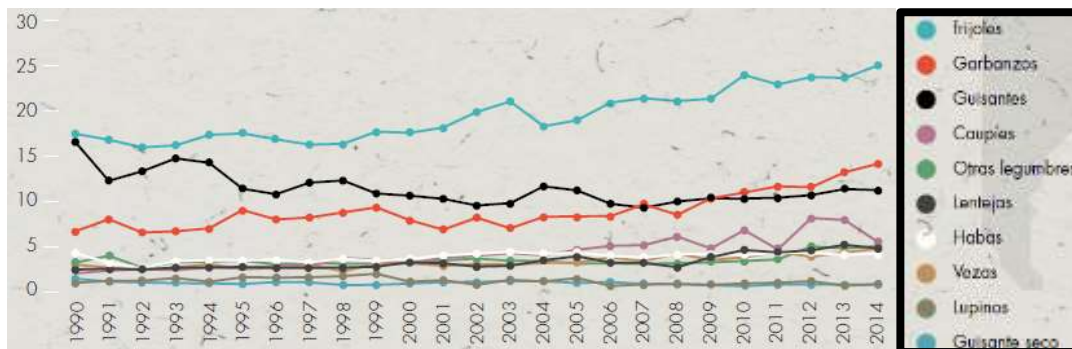


Figura 11. Producción mundial de las legumbres desde 1990 hasta 2014. (Millones de toneladas). Gráfico obtenido de FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>

La figura anterior muestra la evolución de la producción mundial de leguminosas desde 1990 hasta 2014.

La producción de legumbres desde los comienzos de los años 90 a nivel mundial ha permanecido casi constante, produciéndose un ligero aumento. Contrasta con el crecimiento del cereal, que gracias a los avances tecnológicos ha tenido un aumento mucho más pronunciado.

En el caso concreto de la lenteja, desde 1990 hasta 2014 tuvo un ligero aumento de la producción, más notable desde el año 2008. Apenas ha tenido variaciones de producción, en contraste con los guisantes o alubias, donde sus líneas de producción presentan más oscilaciones.

Su producción total es mucho menor que la de otras leguminosas como frijoles, garbanzos y guisantes.

Tabla1. Producción mundial de las principales legumbres, año 2013 (miles de toneladas) Tabla obtenido de FAO.

<http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>

	GUISANTE	LENTEJA	GARBANZO	FRIJOL	HABA	TOTAL
Europa	5.323	45	156	503	589	6.616
África	390	103	391	3.470	1.137	5.491
Asia	2.050	2.076	7.889	8.762	1.892	22.669
América	4.669	1.079	371	6.870	168	13.157
Oceania	340	135	309	46	218	1.048
<b>TOTAL</b>	<b>12.772</b>	<b>3.438</b>	<b>9.116</b>	<b>19.651</b>	<b>4.004</b>	<b>48.981</b>

En la tabla anterior se muestra la producción de las principales legumbres por continentes en el año 2013, expresadas como miles de toneladas.

El frijol fue la leguminosa más producida a nivel mundial, seguida por el guisante, el garbanzo, la haba y la lenteja.

Con los datos de la anterior tabla se va a extraer el porcentaje de lentejas producidas en cada continente, con el fin de un análisis más objetivo.

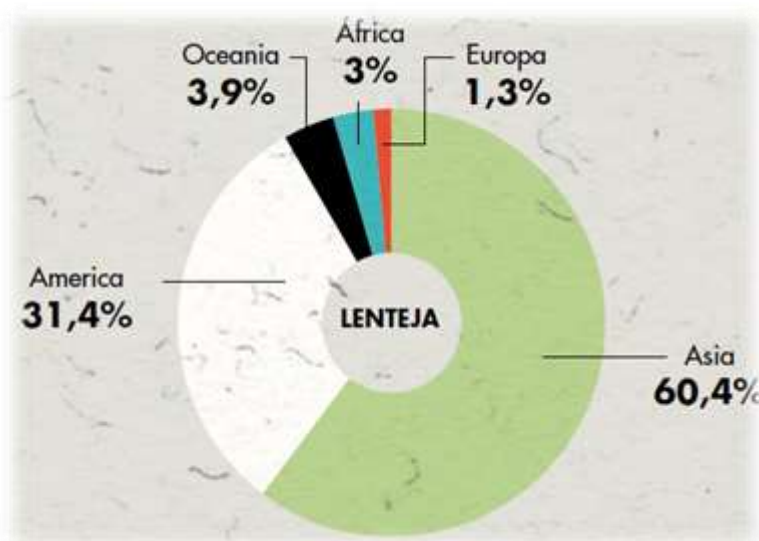


Figura 12. Producción mundial de lentejas, año 2013. Gráfico obtenido de FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>

La figura anterior muestra el porcentaje de lentejas producidas, dividido por continentes en el año 2013.

Asia fue el principal productor de legumbres mayoritarias con más de 22 millones de toneladas, y además fue el máximo productor de lentejas con un millón en el año 2013. En este continente se produjeron más de la mitad de las lentejas a nivel mundial. Los países asiáticos que más lentejas producen son la India y China.

América es el segundo continente con mayor producción de lentejas. Sobre todo, la producción de estas leguminosas se da en América del Norte, destacando Canadá como país más productor dentro de este continente.

Europa es el tercer productor de las principales leguminosas, pero en el caso de las lentejas es el último. El cultivo de lentejas en Europa se da principalmente en la zona mediterránea.

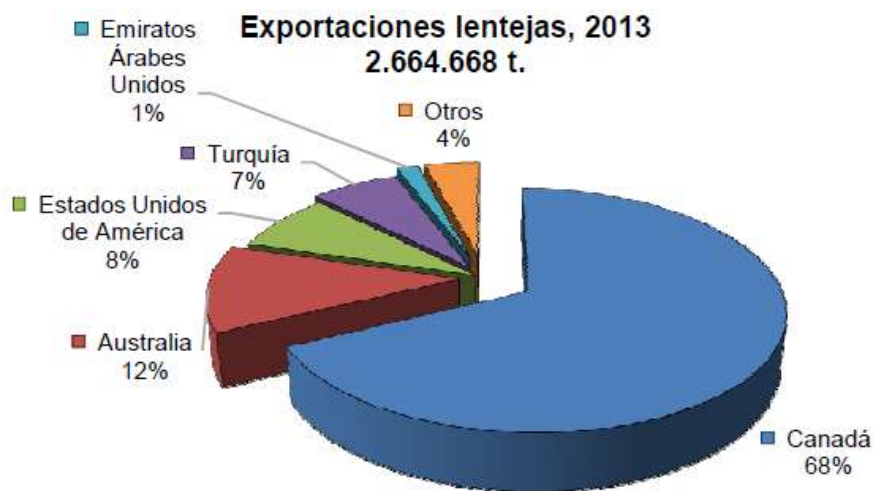


Figura 13. Exportaciones de lentejas a nivel mundial durante el año 2013. Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

La figura anterior muestra las exportaciones de lentejas a nivel mundial durante el año 2013.

El primer exportador y uno de los máximos productores a nivel mundial es Canadá, exportando el 68% de las lentejas que se exportan en el mundo.

Como principales exportadores no aparecen países asiáticos, que destacaban como máximos productores de lentejas. Esto es debido a su gran consumo de lentejas, y además importan este tipo de leguminosas.

Entre los principales exportadores no destaca ningún país de la Unión Europea, siguiendo la línea de lo anteriormente visto en la producción de dichas legumbres.

## 2.2. SITUACIÓN A NIVEL EUROPEO

La figura 14 muestra la evolución de la superficie ocupada por las principales leguminosas en la Unión Europea desde 2010 hasta 2014, y la media de esos 5 años.

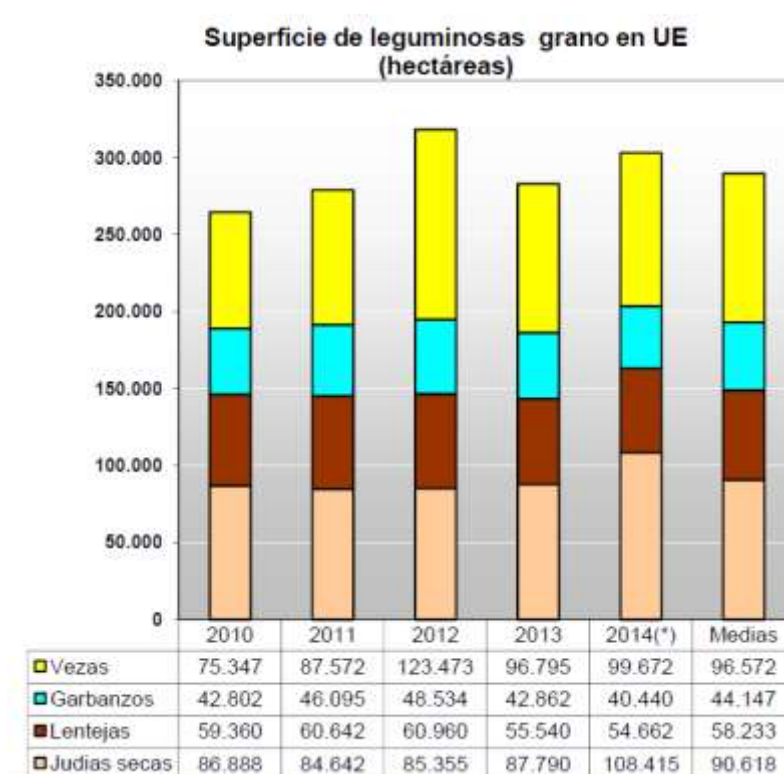


Figura 14. Superficie de leguminosas grano en la UE (hectáreas). Gráfico obtenido de MAPAMA

[http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

Las leguminosas más cultivadas en la Unión Europea son las vezas, las judías, las lentejas y los garbanzos, por orden descendente de superficie cultivada.

La lenteja es la tercera legumbre en superficie cultivada en la Unión Europea; dedicándose a este cultivo casi la mitad de superficie que a los dos primeros, la veza y las judías secas.

Durante los años 2013 y 2014 el cultivo de la lenteja tuvo un descenso en relación a la superficie.

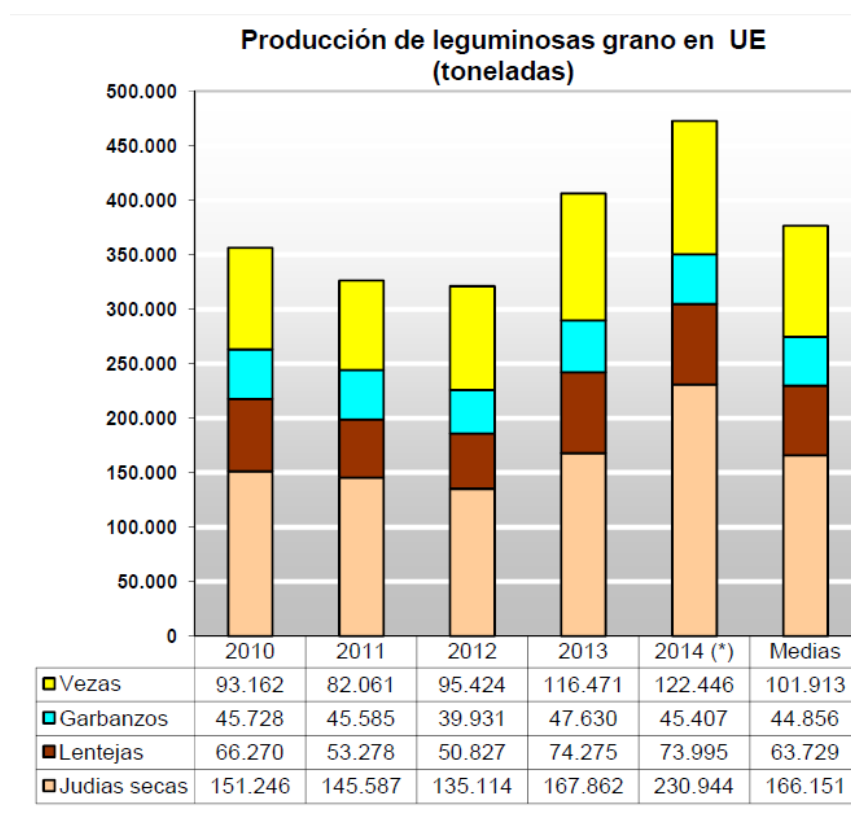


Figura 15. Producción de leguminosas grano en la UE (toneladas). Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

La figura anterior muestra la producción de las principales leguminosas en la Unión Europea desde 2010 hasta 2014, y la media de esos 5 años.

Las leguminosas con mayor producción en la Unión Europea son las vezas, las judías, las lentejas y los garbanzos; coincidiendo con lo anteriormente visto en superficie cultivada.



Las judías, son las leguminosas con mayor producción, y las segundas en superficie cultivada, por lo que su rendimiento es mayor que la veza y además también tiene un rendimiento mayor que las lentejas y los garbanzos.

La lenteja es la tercera legumbre en producción, al igual que en el caso de superficie cultivada.

Durante los años 2013 y 2014 el cultivo de la lenteja tuvo un aumento de su producción respecto a los años anteriores, lo que contrasta con un descenso de superficie cultivada, obteniéndose así en esos últimos años un mejor rendimiento del cultivo.

### 2.3. SITUACIÓN A NIVEL DE ESPAÑA

La figura 16 muestra la superficie ocupada por las principales leguminosas en España desde 2010 hasta 2015, y la media de dichos años.

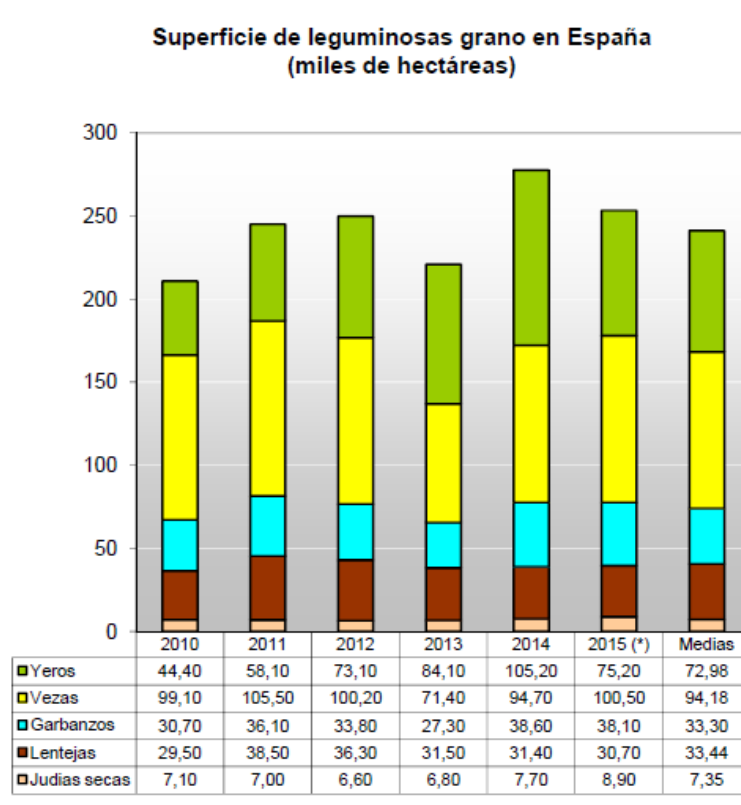


Figura 16. Superficie de leguminosas grano en España (miles de hectáreas). Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

Las leguminosas más cultivadas en la España son las vezas, los yeros, las lentejas, los garbanzos y las judías por orden descendente de superficie ocupada.

La lenteja ocupa la tercera posición en superficie cultivada de leguminosas en España. Se cultiva una tercera parte de superficie que de vezas, la leguminosa más cultivada, pero cuyo fin es la alimentación animal. Respecto al garbanzo, la superficie destinada es similar, ambas son las leguminosas con mayor superficie en España cuyo fin es la alimentación humana.

Durante los años 2013, 2014 y 2015 el cultivo de la lenteja tuvo un descenso en relación a la superficie respecto a los dos años anteriores, 2011 y 2012. Este misma evolución de apreciaba en la Unión Europea.

**Producción de leguminosas grano en España  
(miles de toneladas)**

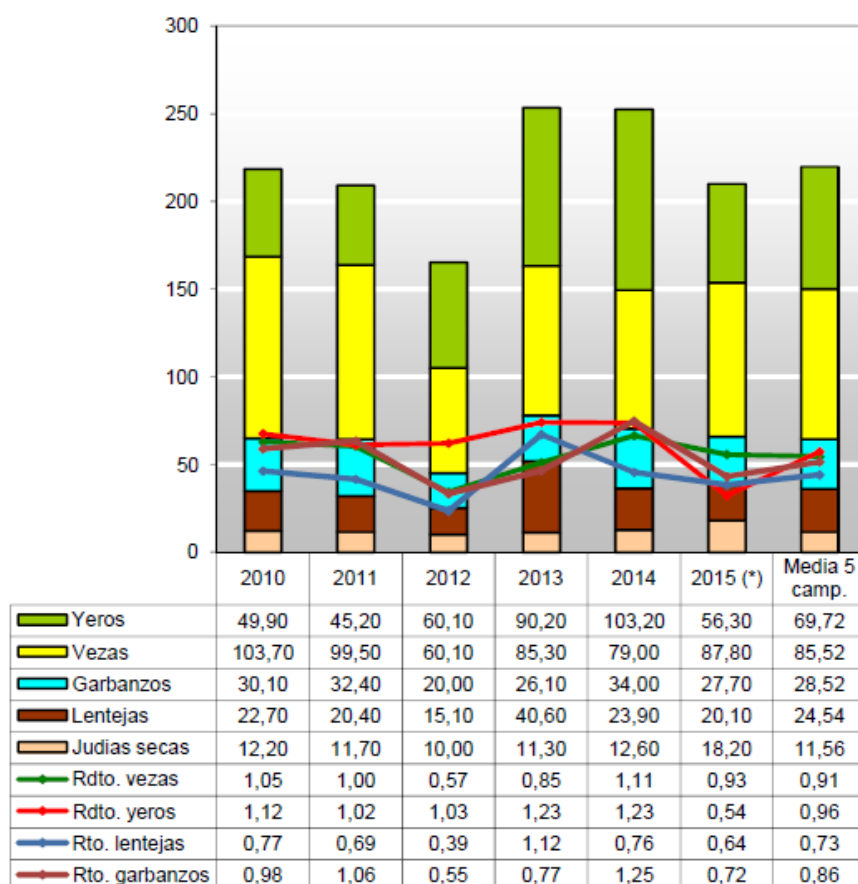


Figura 17. Producción de leguminosas grano en España (miles de toneladas). Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

La figura anterior muestra la producción y rendimiento de las principales leguminosas en España desde 2010 hasta 2015, y la media de esos 6 años.

Las leguminosas con mayor producción en la España son las vezas, los yeros, los garbanzos, las lentejas y las judías.

La lenteja ocupa la cuarta posición en producción de leguminosas en España, al contrario que en superficie, que ocupaba la tercera.

De las principales leguminosas, la lenteja es la que peor rendimiento tiene de media a lo largo de los 6 años. En cambio, en la Unión Europea la lenteja superaba al garbanzo en rendimiento; y las vezas tenían un rendimiento muy superior al de los garbanzos, siendo en España muy similares

El mayor rendimiento entre los años 2010 y 2015 de las lentejas se dio el año 2013, solo superada por los yeros

#### **2.4. SITUACIÓN POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS**

En España diversas comunidades tienen indicativos de calidad para algunas de las leguminosas más cultivadas en el país. Los principales indicativos de calidad presentes en leguminosas son indicaciones geográficas protegidas, existiendo dos denominaciones de origen protegidas, Fesols de Santa Pau y Mongeta del Ganxet ambas en Cataluña. Las indicaciones geográficas protegidas existentes en España son Faba Asturiana en Asturias, Faba de Lourenzá en Galicia, Alubia de La Bañeza-León, Garbanzo de Escacena en Andalucía, Garbanzo de Fuentesauco, Judías de El Barco de Ávila, lenteja de La Armuña y lenteja de Tierra de Campos en Castilla y León.

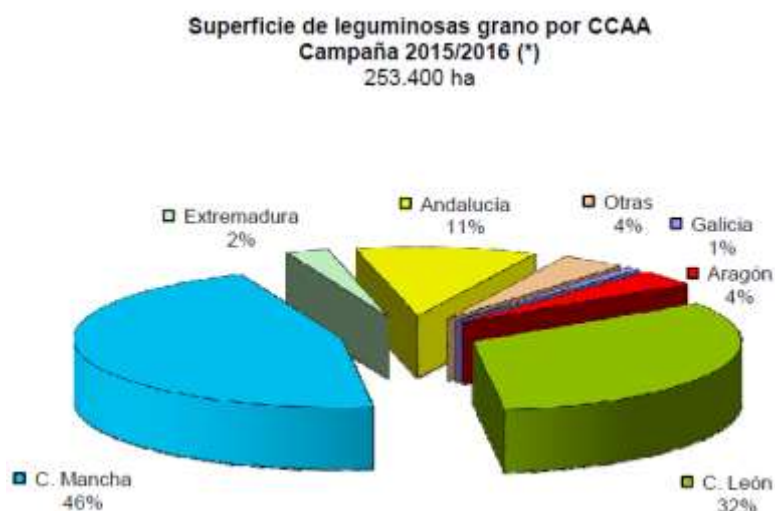


Figura 18. Superficie de leguminosas grano por CCAA. Campaña 2015/2016. Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

La figura anterior muestra la superficie del conjunto de leguminosas grano dividida por comunidades autónomas.

Castilla la Mancha es la comunidad con mayor superficie en España destinada a este tipo de cultivos, seguida por Castilla y León, brindando entre ambas más del 75% de la superficie que se dedica en este país al cultivo de estas especies.

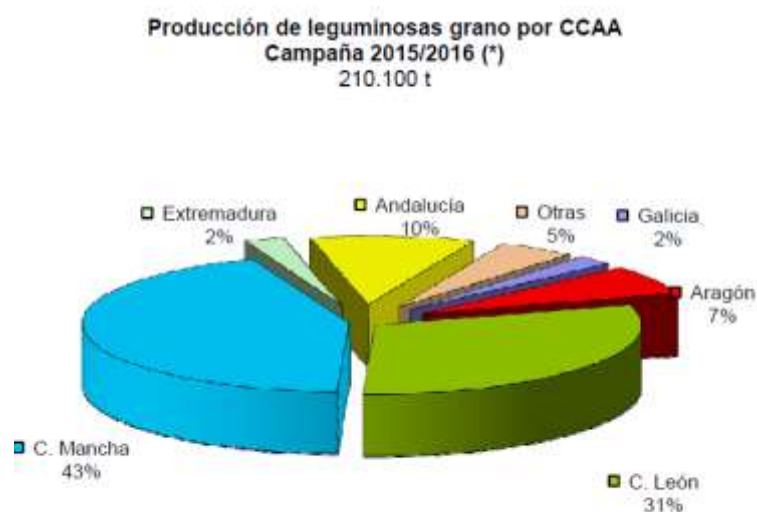


Figura 19. Producción de leguminosas grano por CCAA. Campaña 2015/2016. Gráfico obtenido de MAPAMA [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoopl31marzo2016_tcm7-417146.pdf)

La figura anterior indica la producción de leguminosas grano dividida por comunidades autónomas en España.

Los dos mayores productores son Castilla la Mancha y Castilla y León, teniendo casi el 75% de la producción a nivel español de leguminosas grano. En Castilla y León se encuentran las dos Indicaciones Geográficas Protegidas de lentejas, Lenteja de La aramuña y Lenteja de Tierra de Campos. Además de las IGP de lentejas, en esta comunidad se concentran la mayoría de IGPs de otras legumbres, IGP Garbanzo de Fuentesauco, IGP Judías de El Barco de Ávila y IGP Alubia de la Bañeza-León.

Los porcentajes de producción son muy similares a los porcentajes de superficies por lo que indica que los rendimientos son muy similares en el conjunto de comunidades; con excepción de Aragón, que posee el 7 % de la producción, cuando solo tenía el 4 % de superficie, lo que indica un rendimiento mucho mayor que el resto de comunidades.

### **3. INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA**

Las designaciones de índice geográfico protegido (IGP), están reguladas por la Unión Europea, en el Reglamento (CE) 510/2006, de 20 de marzo de 2006, sobre protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios.

Ese reglamento, define como IGP como el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio:

- Originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país,
- Que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda atribuirse a dicho origen geográfico.
- Cuya producción, transformación o elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada.

Por consiguiente en la IGP no es obligatorio que la producción, la transformación y la elaboración se realicen en la misma zona geográfica.

### **3.1. IGP DE LENTEJAS EN ESPAÑA**

En España hay dos indicaciones geográficas protegidas de lentejas, ambas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, IGP Lenteja de La Armuña e IGP Lenteja de Tierra de Campos.

La IGP Lenteja de La Armuña se cultiva en la zona norte de la provincia de Salamanca. La variedad permitida en el pliego de condiciones del consejo regulador es lenteja Rubia de La Armuña.

La IGP Lenteja de Tierra de Campos es producida en cuatro provincias, León, Palencia Valladolid y Zamora, permitiéndose solo en parte de estas, delimitada en el pliego de condiciones de la IGP. La variedad permitida para el cultivo dentro de esta IGP es de la variedad Pardina.

Ambas son lentejas muy diferentes, se distinguen con facilidad visualmente. La pardina es una lenteja de color más oscuro y tamaño más pequeño que la Rubia de La Armuña, como ya se ha expuesto en el apartado Variedades.

### **3.2. IGP LENTEJA DE LA ARMUÑA**

En el año 1992 se reconoce la Denominación Específica Lenteja de La Armuña, antes de la creación de la Unión Europea, por la Comunidad Económica Europea. Un año más tarde se aprobaría el reglamento específico dónde se incluían todos los factores a tener en cuenta desde su siembra hasta su llegada al consumidor. Con la entrada de la Unión Europea se modifican las Denominaciones Específicas, y esta se pasa a llamar IGP Lenteja de La Armuña en el año 1996.

#### **3.2.1. REQUISITOS**

Son lentejas procedentes de la variedad Rubia de La Armuña, dentro de las cuales se encuentran las Guareñas. Las lentejas Guareñas son una selección en masa de las Rubias de La Armuña, en función del tamaño, que se han realizado a lo largo de los años.

Se comercializan secas; se caracterizan por su color verde claro, son lisas o jaspeadas, miden hasta 9 mm de diámetro, enteras, con un contenido máximo de humedad del 15%, cuya finalidad es la alimentación humana. Solo se pueden distribuir las categorías Extra y Primera.

En el mercado se clasifican en tres tipos en función de su calidad:

- Calidad superior: extra
- Buena calidad: primera I
- Calidad comercial: segunda II

Tabla 2. Características analíticas recogidas en el pliego de condiciones de la IGP Lenteja de La Armuña.

<b>Contenido en 100grs</b>	<b>Media</b>
<b>Nº de semillas</b>	1.547
<b>Humedad</b>	10,64
<b>Hidratos de Carbono</b>	55
<b>Proteínas</b>	26,28
<b>Grasa</b>	0,87
<b>Fibra Bruta</b>	4,72
<b>Cenizas</b>	2,49
<b>Calcio</b>	0,02
<b>Magnesio</b>	0,08
<b>Hierro (mg/kg)</b>	57,67

La zona de producción de lentejas IGP Lenteja de La Armuña es la formada por los siguientes términos municipales pertenecientes en su mayoría a la comarca de La Armuña, situada al norte de la provincia de Salamanca, que da el nombre a esta IGP:

Aldealengua, Aldeanueva de Figueroa, Aldearrubia, Almenara de Tormes, Arcediano, Cabazabellosa de la Calzada, Cabrerizos, Calzada de Valdunciel, Castellanos de Moriscos, Castellanos de Villiquera, Espino de La Orbada, Forfoleda, Gomecello, Monterrubio de La Armuña, Moriscos, Negrilla de Palencia, Orbada, Pajares de la

Laguna, Palencia de Negrilla, Parada de Rubiales, Pedrosillo el Ralo, Pedroso de La Armuña, Pitiegua, Salamanca (parte del término municipal situada en la margen derecha del río Tormes), San Cristóbal de La Cuesta, Tardáguila, Topas, Torresmenudas, Valdunciel, Valverdón, Vellés (La), Villamayor, Villares de La Reina y Villaverde de Guareña.

Además de cumplir dichas condiciones de variedad y población, para poder comercializarse como Lenteja de La Armuña, la superficie donde van a ser cultivadas debe ser adscrita al Consejo Regulador de la IGP y las prácticas de cultivo serán autorizadas por dicho consejo.

Una vez obtenido el producto, la semilla debe ser manipulada exclusivamente en industrias registradas en el Consejo Regulador, y deben estar situadas en la zona de producción.

Junto a la etiqueta de la marca comercial que envasa las lentejas, debe ir la marca de conformidad, Lenteja de La Armuña, con el siguiente logotipo.



Figura 20. Logotipo Lenteja de La Armuña.

([http://www.meetspain.es/denominacion/arroz/lenteja\\_armuna.html](http://www.meetspain.es/denominacion/arroz/lenteja_armuna.html)).

Las etiquetas de las marcas comerciales deben ser aprobadas por el Consejo Regulador.

Los envases irán con el precinto de garantía, etiquetas o contraetiquetas numeradas y expedidas por el Consejo Regulador.



## **4. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL**

Las leguminosas aprovechadas para el consumo humano se diferencian en dos grupos. Se conocen como hortalizas a aquellas que se consumen las semillas o vainas sin madurar, y como legumbres las semillas secas que han sido separadas de las vainas.

La lenteja es una leguminosa de la cual se consume el grano seco. Como todas las legumbres, su característica más destacable en cuanto a su composición es el alto contenido en proteínas de origen vegetal con respecto a otros alimentos. Esta proteína es deficitaria en metionina, un aminoácido esencial en la dieta humana.

La proteína de los alimentos de origen vegetal es de bajo valor biológico, porque esta no contiene algún aminoácido esencial en las cantidades necesarias para el desarrollo humano. La metionina, deficitaria en lentejas, puede ser suplida con otros vegetales ricos en ella como los cereales, o por alimentos de origen animal, cuyas proteínas son de alto valor biológico.

Las semillas de lentejas también tienen un contenido alto en minerales, principalmente calcio y hierro. El hierro aportado por los alimentos vegetales es menos asimilable que el introducido en la dieta por alimentos cárnicos al ser hierro no hemo, que no forma parte de la hemoglobina.

También poseen una actividad alta de la enzima lipoxigenasa, provocando que se desarrollen sabores y olores desagradables durante el almacenamiento en condiciones adversas (Bhatty, 1988).

### **4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL**

Los datos sobre composición nutricional en lentejas son muy dispares, y estos dependen del tipo o variedad de lenteja, además de las condiciones de cultivo y medioambiente. Varios autores han unificado la composición nutricional, siendo una de las más recientes y completas la unificación realizada por (Moreiras et al., 2013).

Tabla 3. Tabla modificada de la composición nutricional de lentejas. (Moreiras, 2013).

<b>Compuesto</b>	<b>Gramos por 100g de porción comestible</b>
<b>Valor energético</b>	314 kcal 1,314 kJ
<b>Proteínas (g)</b>	23,8
<b>Lípidos totales (g)</b>	1,8
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	54,0
<b>Fibra (g)</b>	11,7
<b>Agua (g)</b>	8,7
<b>Calcio (mg)</b>	56,0
<b>Hierro (mg)</b>	7,1
<b>Yodo (µg)</b>	2,0
<b>Magnesio (mg)</b>	78,0
<b>Zinc (mg)</b>	3,1
<b>Sodio (mg)</b>	12,0
<b>Potasio (mg)</b>	737,0
<b>Fosforo (mg)</b>	240,0
<b>Selenio (µg)</b>	9,9
<b>Tiamina (mg)</b>	0,5
<b>Riboflavina (mg)</b>	0,2
<b>Equivalentes niacina (mg)</b>	5,6
<b>Vitamina B6 (mg)</b>	0,6
<b>Folatos (µg)</b>	35,0
<b>Vitamina C (mg)</b>	3,0
<b>Vitamina A: Eq retinol (µg)</b>	10,0

#### **4.1.1. HIDRATOS DE CARBONO**

Los glúcidos poseen el mayor porcentaje en la composición química de las lentejas. Su cantidad puede variar entre el 43% al 70% (Yadav et al., 2007). Existen estudios más recientes que sitúan la cantidad de estos entre un 54% para (Moreiras et al., 2013) y un 61,22% por (Molares et al., 2016), ambos dentro de los parámetros fijados anteriormente.

Para lentejas cultivadas en España se estima el contenido en 60,8% para la variedad de la Armuña, en 61,1% para la variedad Pardina y en 60,1% para la variedad Rubia Castellana (Morales et al., 2016).

La parte de la semilla de lenteja más abundante es el cotiledón, el cual está formado mayoritariamente por almidón, siendo este uno de los compuestos mayoritarios llegando a constituir entre 41,5% y 46,5% (Wang y Daun, 2006).

El almidón está compuesto por amilosa y amilopectina, dos polisacáridos. En lentejas, el contenido de amilosa varía entre el 20,7% y el 45,5%, dependiendo de las condiciones del cultivo y la variedad analizada. El contenido de amilopectina es inversamente proporcional al de la amilosa.

Además del almidón, aparecen otros hidratos de carbono como monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos que pueden van desde el 5% hasta el 9% (Bhatty, 1988). Los azúcares libres mayoritarios son rafinosa y estaquiosa. (Newman, , 1984; Ponz, 1992). La rafinosa es parcialmente causante de flatulencias por el consumo de lentejas, ya que el sistema digestivo de los humanos no contiene la enzima  $\alpha$ -galactosidasa indispensable para su digestión. Esto produce que a la llegada de las lentejas al intestino, la rafinosa sea degradada por bacterias, que la descomponen y fermentan anaeróticamente produciendo metano.

#### **4.1.2. GRASAS**

Las lentejas, como el resto de legumbres, poseen un contenido bajo de grasas. Los datos de Moreiras et al., (2013) señalan un contenido en lípidos del 1,8%. En estudios de especies cultivadas en Canadá se indican valores de grasa entre 1% y 1,3% (Wang y Daun, 2006).

Para lentejas cultivadas en España se sitúa un contenido en grasas de 0,6% para la variedad de la Armuña; 0,9% para la variedad Pardina; y 0,59% para la variedad Rubia Castellana, (Morales et al., 2016).

El contenido de grasa se ve afectado por la variedad y condiciones ambientales. El 90% de la fracción lipídica se encuentra en los cotiledones, el 6% en el embrión y el 2% en la envoltura de la semilla. (Singh et al., 1968) y son mayoritariamente triglicéridos ante los lípidos conjugados (glucolípidos y fosfolípidos). (Bhatty, 1988).

#### **4.1.1. FIBRA**

La cantidad de fibra dietética total varía entre el 11% y el 26,90% de la composición total (Yadav et al., 2007), situándose para Moreiras et al., (2013) en el 11,7%, valor que se encuentra en la parte baja del intervalo antes citado. La fibra dietética está formada por la suma de la fibra soluble y de la fibra insoluble.

La fibra insoluble está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina; variando entre el 92% y el 100% de la fibra dietética (Almeida, 2006). Representan la celulosa y hemicelulosa el 10%; y lignina entre el 2 y el 3% (Bhatty, 1988) de la composición nutricional. La celulosa, hemicelulosa y lignina no tienen propiedades nutricionales pero actúan favoreciendo el tránsito intestinal.

La fibra soluble está formada por pectinas, gomas, mucilagos, y oligosacáridos no digeribles, y como se ha expuesto anteriormente su contenido es mínimo.

#### **4.1.2. PROTEÍNAS**

Las proteínas son el segundo compuesto mayoritario por detrás de los hidratos de carbono con un intervalo del 28% al 32,1% de la composición total de la lenteja (Bhatty, 1988). Moreiras et al., (2013) estiman el contenido de proteínas en un 23,8 %, un dato más bajo que el anterior expuesto. Las legumbres se caracterizan por un contenido en proteínas elevado respecto al resto de vegetales, siendo importantes en una dieta equilibrada.

Para lentejas cultivadas en España, el contenido medio en proteína para la variedad de la Armuña es 24,69%, para lenteja Pardina 22,23% y para la Castellana 24,99% (Morales et al., 2016). El dato de las variedades Armuña y Castellana es similar.

La proteína no se distribuye equitativamente en las diferentes partes de la lenteja. El 90% encuentra en los cotiledones, el 5% en el embrión y el 4% en la cubierta (Singh, 1968).

La proteína mayoritaria en esta semilla es la globulina, con casi el 70% del total. Seguida de las gluteínas que varían entre el 10% y el 20%, y de las albúminas con un intervalo del 10% hasta el 20%.

El contenido en aminoácidos varía según el tipo y las condiciones ambientales. Cabe destacar el alto nivel de lisina en las lentejas, aminoácido esencial. Por otro lado, el contenido en metionina y cisteína es bajo, sin llegar su aporte al necesario en la dieta humana. Los aminoácidos de las legumbres son complementados con los de los cereales, ya que esos son ricos en metionina y cisteína, y deficitarios en lisina (Bhatty, 1988), lo que produce que aunque la proteína vegetal sea de bajo valor biológico, una dieta rica en estos dos grupos de alimentos puede llegar a cubrir las necesidades básicas de aminoácidos, siendo muy interesante para personas vegetarianas y en especial para veganos.

#### **4.1.3. MINERALES**

El contenido de minerales es variable. Los macronutrientes presentes son potasio, fósforo, calcio, magnesio y sodio; y los principales micronutrientes son hierro, cinc, cobre o manganeso.

Aunque el contenido en macronutrientes cambie según el estudio, lo que se mantiene constante en todos los estudios revisados es el orden de los 4 minerales mayoritarios; siendo el potasio el mineral mayoritario, seguido del fósforo, magnesio y calcio (Wang y Daun, 2006; Moreiras et al., 2013; Morales Corts 2016).

Los contenidos de los minerales de mayor interés en lentejas Españolas varían entre 0,79%, 0,81% y 0,54% de calcio para las variedades de la Armuña, Pardina y Castellana; de hierro 0,13% en lentejas de la Armuña, 0,095% en lentejas Pardinas y 0,1% en lentejas Castellanas; y de magnesio de 0,932%, 0,793% y 0,785%, para dichas variedades (Morales Corts, 2016).

En las lentejas casi el total del fósforo y la mayoría del calcio y del hierro se encuentran en los cotiledones (Singh et al, 1968).

No todos los nutrientes existentes en las lentejas son asimilados, ya que esto depende de su biodisponibilidad debido a la existencia de componentes antinutritivos que los retienen (Thavarajah et al., 2009). Dichos componentes pueden ser taninos, ácido fítico y oxalato entre otros (Yadav et al., 2007). Estos factores antinutricionales que interfieren en la digestión de las legumbres tienen una menor proporción en lentejas que en el resto de semillas que conforman este grupo.

#### **4.1.4. VITAMINAS**

Los folatos son el grupo de vitaminas mayoritarias en lentejas. El resto de vitaminas que aparecen en su composición son vitamina C, B3, B6, B2, B1 biotina, ácido pantoténico, Vitamina E, Colina, Vitamina A, K y D (Grusack, 2009) en cantidades muy bajas excepto la vitamina A con 10 µg/100g de lentejas, siendo así la segunda más abundante.

#### **4.1.5. OTROS COMPUESTOS DE INTERÉS**

Las lentejas también contienen otro tipo de compuestos en menor proporción, los fitoquímicos. Son sustancias presentes en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes, pero sí potencian la acción de otros nutrientes, teniendo así efectos positivos en la salud.

Los fitoquímicos más destacables son polifenoles, fitoesteroles, y carbohidratos bioactivos. Por la importancia para este estudio, a continuación se pasa a hacer una revisión en más profundidad de los polifenoles y sus propiedades.

### **5. POLIFENOLES**

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de sustancias químicas presentes en las plantas. Dichas biomoléculas son básicas para su fisiología, debido a que contribuyen en su morfología, crecimiento, y reproducción. También, están involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la agresión de patógenos y predadores, y la radiación ultravioleta (Bravo, 1998). Los compuestos fenólicos se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos

fenólicos por molécula, es decir por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo adosados a uno de los carbonos del anillo. Habitualmente son producto del metabolismo secundario de las plantas (Soto-Vaca et al., 2012).

Son compuestos de interés, ya que son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Asociado a su elevado poder antioxidante, se les atribuye la capacidad de prevenir obesidad, enfermedades coronarias, colesterol LDL más bajo (Xu y Chang, 2010).

Los compuestos fenólicos se clasifican como fenoles simples o polifenoles, en base al número de fenoles que contenga la molécula. Además, se pueden clasificar en no flavonoides o flavonoides; siendo flavonoides aquellos que poseen un esqueleto compuesto por 15 átomos de carbono formado por dos anillos bencénicos, unidos, mediante un heterociclo, siendo su estructura C6-C3-C6 (Moreno y Peinado, 2010).

#### A. No flavonoides

Dentro de los fenoles no flavonoides se incluyen los fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas.

##### ▪ Fenoles simples:

Los fenoles simples son compuestos que tienen dos grupos hidroxilo, uno en la posición 1 y otro que puede variar entre las posiciones 2, 3 y 4; o tres grupos hidroxilo, uno en la posición 1, otro en la 3 y otro que puede variar entre la posición 2 y 5, en el anillo aromático. Estos compuestos fenólicos tienen una demostrada capacidad antioxidante, además de una actividad biológica importante como antibióticos antiparasitarios y citotóxicos (Peñarrieta et al., 2014).

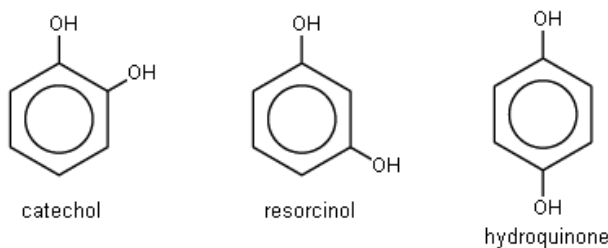


Figura 21. Estructuras químicas de los compuestos fenólicos simples más representativos. (<https://shwebook.com/search?q=catechol>).

▪ **Ácidos fenólicos:**

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Son aril-carboxílicos, es decir con uno o más grupos hidroxilo en un único arilo. La presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos. Los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos (Dziedzic y Hudson, 1984).

- Ácidos hidroxibenzoicos:

Su esqueleto químico tiene la forma C6-C1. Los principales representantes de este grupo son el ácido gálico, el ácido vainílico y el protocatéquico entre otros, que se diferencian por la situación de su núcleo benzoico. Se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal, pero especialmente los frutos rojos como los arándanos donde puede llegar a alcanzar los 270 mg/Kg de peso fresco (Manach et al., 2004).

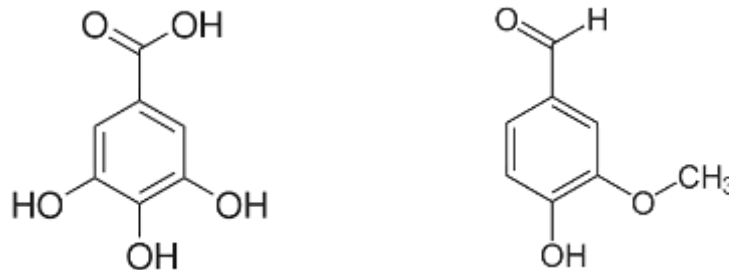


Figura 22. Estructuras químicas de los principales ácidos hidroxibenzoicos. A la izquierda el ácido gálico ([https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_g%C3%A1lico](https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_g%C3%A1lico)) , y a la derecha ácido vainílico ([https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_van%C3%ADlico](https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_van%C3%ADlico))

- Ácidos hidroxicinámicos:

Su esqueleto químico tiene la forma C6-C3. Son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos. A este grupo pertenecen el ácido cumárico, el cafeico y el ferúlico. Los ácidos hidroxicinámicos se caracterizan por la sustitución del grupo COOH por el grupo CH=CH-COOH. El doble enlace aumenta la capacidad antioxidante (Peñarrieta et al., 2014). De manera habitual, estos ácidos se encuentran glicosilados o esterificados con ácido quínico. La combinación del ácido cafeico y el ácido quínico forma ácido



clorogénico, que se encuentra en muchas frutas y, especialmente, en el café (Clifford, 2000).

Otro ácido fenólico común es el ácido ferúlico, es el más abundante en los granos de cereales unido mediante enlaces éster a hemicelulosas de la pared celular (D'Archivio, et al., 2007).

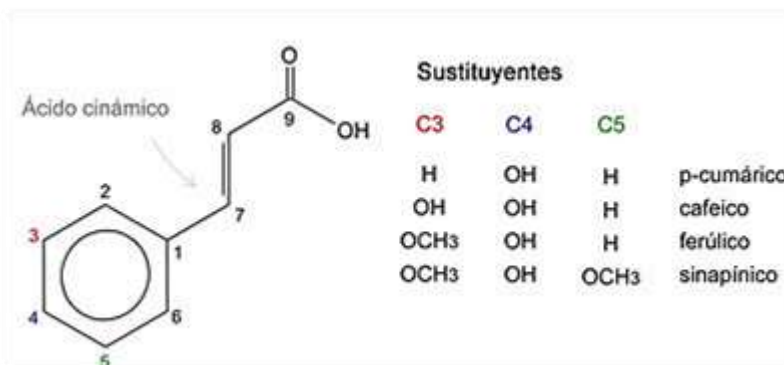


Figura 23. Estructura química del ácido cinámico, y ácidos hidroxicinámicos ([https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_hidroxicin%C3%A1mico](https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_hidroxicin%C3%A1mico)).

#### ▪ Cumarinas:

La cumarina pertenecen a la familia de las benzo- $\alpha$ -pironas, contienen un anillo aromático unido a un heterociclo. Se encuentra de forma natural en gran variedad de plantas, se encuentran en diversos alimentos como en frutas y hortalizas (Hoult y Payá, 1996). La cumarina básica carece de grupo hidroxilo, por lo que no es considerada un polifenol; pero el resto de cumarinas si lo tienen asociado a un carbono, considerándose así el grupo como compuestos fenólicos.

Dentro de las cumarinas destaca la umbeliferona con una importante actividad antioxidante (Ramesh y Pugalendi, 2006).

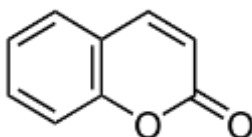


Figura 24. Estructura química de cumarina (<https://es.wikipedia.org/wiki/Cumarina>)

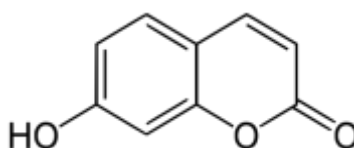


Figura 25. Estructura química de umbeliferona (<https://es.wikipedia.org/wiki/Umbeliferona>)

▪ **Estilbenos:**

Los estilbenos se encuentran en baja cantidad en la dieta humana. Están formados por dos ciclos bencénicos unidos un etanol. El resveratrol, es el polifenol más característico de este grupo. El resveratrol se encuentra de manera abundante en la piel de las uvas rojas (Manach et al., 2004),

Además, el resveratrol muestra actividad frente a diversas enfermedades crónicas, tales como inflamación, artritis, enfermedades cardiovasculares, y retrasa el envejecimiento (Shakibaei et al., 2009).

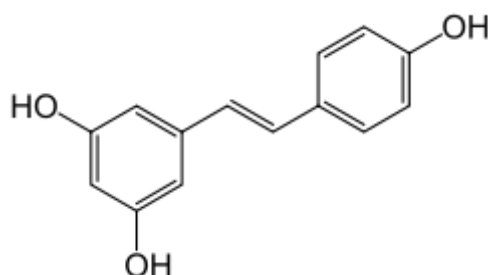


Figura 26. Estructura química de resveratrol (<https://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>)

▪ **Quinonas:**

Las quinonas se caracteriza por un anillo diona completamente conjugado. Se ha demostrado que las quinonas poseen propiedades redox y la coenzima Q10 es considerada un potente antioxidante. (Petillo y Hultin, 2008). Dicha coenzima es ampliamente usada en cosmética.

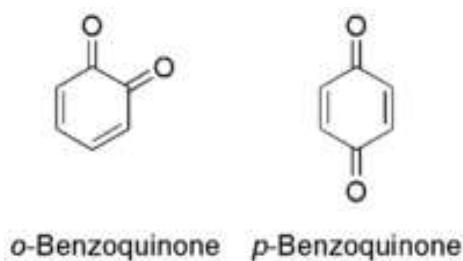


Figura 27. Estructura química de la benzoquinona (<https://es.wikipedia.org/wiki/Quinona>)

## ▪ Lignanos y ligninas:

### - Lignanos:

Son compuestos fenólicos dímeros, y son derivados de fenilalanina y alcoholes cinámicos. Se forman por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano presentes en varios alimentos, como granos, hortalizas y uvas (Milder et al., 2005).

Los lignanos son encontrados en una gran variedad de plantas que incluyen las semillas de lino, semillas de calabaza, semillas de ajonjolí, centeno, soja, brócoli, frijoles, y en algunas bayas (Crosby, 2005).

Los lignanos tienen una elevada capacidad antioxidante, y se consideran como fuentes de fitoestrógenos en la dieta, en particular el sesamol (Sadeghi, et al., 2009).

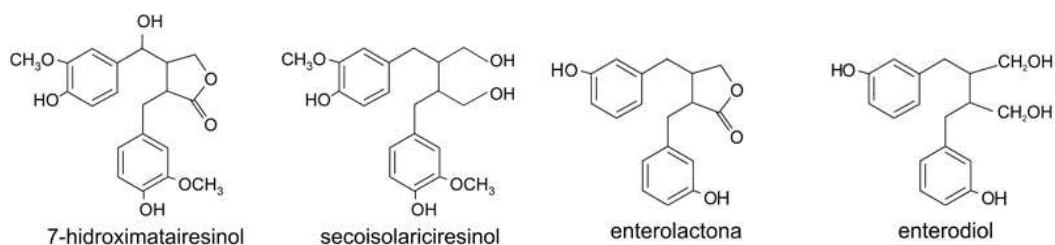


Figura 28. Estructura básica de lignanos  
(<https://es.wikipedia.org/wiki/Lignano#/media/File:Lignanos.jpg>)

### - Ligninas:

Las ligninas son polímeros fenólicos complejos. Son los segundos polímeros orgánicos complejos más abundantes en el reino vegetal, después de la celulosa.

Su función biológica es proporcionar apoyo estructural. Son necesarias en la formación de las paredes celulares, dando rigidez y haciendo no se pudren fácilmente, especialmente importantes en la formación de la madera y la corteza. Químicamente las ligninas son polímeros fenólicos reticulados. (Lebo et al., 2001).

Sus estructuras químicas son muy heterogéneas ya que están formados por compuestos fenólicos polimerizados con los azúcares. Componen parte de la fibra dietética en los alimentos.

Las ligninas están presentes en varios alimentos, especialmente en los cereales de grano entero, y han demostrado una considerable capacidad antioxidante en pruebas sobre las células rojas de la sangre (Vinardell et al., 2007).

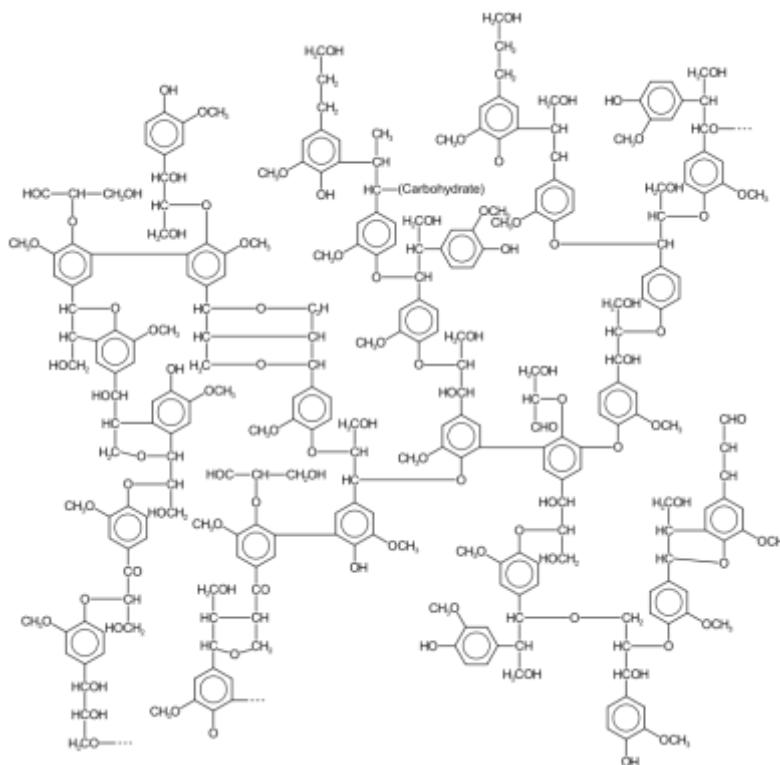


Figura 29. Estructura química de la lignina ([https://es.wikipedia.org/wiki/Lignina#/media/File:Lignin\\_structure.svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Lignina#/media/File:Lignin_structure.svg)).

## **B. Flavonoides**

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes (Bravo, 1998). Este grupo está formado por compuestos con una estructura básica común, la cual es un difenilpropano (C6-C3-C6), y consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Bravo, 1998). Derivan de aminoácidos aromáticos (fenilamina y tirosina) y tienen tres estructuras anilladas. La diferencia entre las estructuras de los distintos flavonoides es debida a reacciones de hidroxilación, alcalinización y glicosidación que sufre la molécula del aminoácido del que provienen (Khoddami et al., 2013). Son responsables junto a la clorofila y los carotenos de las coloraciones de las plantas que los contienen (Khoddami et al., 2013).

Poseen propiedades antioxidantes comparables con la de la vitamina E, antiinflamatorias, antitrombóticas, antitumorales, antialérgicas, antiasmáticas e inhibidoras de encimas.

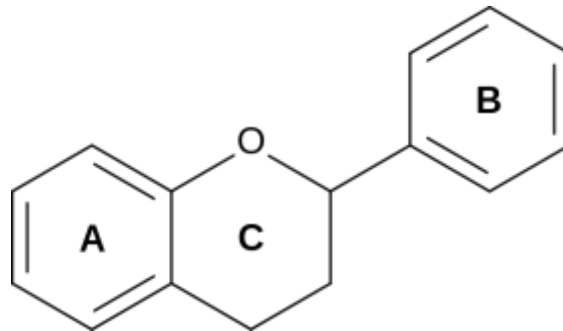


Figura 30. Estructura común de los flavonoides.  
([https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Flavonoid\\_basis.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Flavonoid_basis.svg)).

En función del estado de oxidación de la cadena de átomos de carbono, los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases.

- **Taninos:**

Los taninos son compuestos fenólicos muy comunes en el reino vegetal. Tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas afectando a su digestibilidad, pero también les confiere a los alimentos una característica sensorial interesante, asociada al término astringencia. Están presentes en hojas, en frutos y en las cortezas de las plantas, cuya función es de protección de herbívoros, debido a su elevada astringencia, y de las infecciones (Vermerris, Nicholson, 2008).

Se clasifican en dos grupos según su estructura química, los taninos condensados y los taninos hidrolizables.

- Taninos condensados:

Los taninos condensados o proantocianidina, término que se ha usado se desconoce la antocianidina, son derivados de flavan 3-ol o catequinas unidos entre sí por enlaces carbono – carbono. Liberan tras una hidrólisis ácida una antocianidina. Tienen un elevado peso molecular dependiendo del grado de polimerización. Es común encontrar este grupo de taninos dentro de la clasificación de flavonoides debido a su estructura básica.

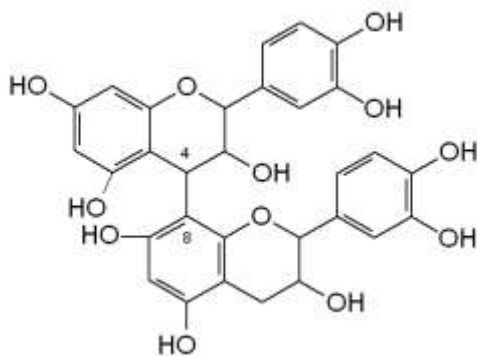


Figura 31. Estructura química de tanino condensado.  
[http://www.profitocoop.com.ar/contenidos\\_listar.asp?id\\_categoria=2&subcategoria=1](http://www.profitocoop.com.ar/contenidos_listar.asp?id_categoria=2&subcategoria=1).

- Taninos hidrolizables:

Se caracterizan porque pueden ser fácilmente hidrolizables por ácidos, bases, agua caliente o enzimas. Después de una hidrólisis se libera galotaninos o elagitaninos que proceden de ácido gálico o ácido elágico respectivamente. Se encuentran en las fresas y otras plantas (Salminen et al., 1999). El ácido tánico procede de una molécula de glucosa a la cual se le pueden esterificar hasta 5 moléculas de ácido gálico (Bravo, 1998).

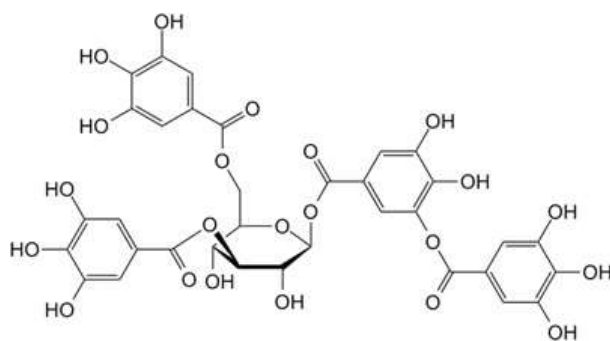


Figura 32. Estructura básica del ácido tánico.  
<http://www.hablemosclaro.org/ingreperia/acido-tanico.aspx>.

▪ **Chalconas:**

Su estructura básica está formada por un anillo bencénico unido a una cadena propánica que está unida a su vez a otro anillo bencénico. Difieren de la estructura básica de los flavonoides ya que tienen una cadena lineal para unir los anillos.

Son pigmentos amarillentos responsables del color de las flores y los frutos. Están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que los colores que le dan a las flores atraen a los insectos.

El xanthohumol se encuentra en el lúpulo que se adiciona a la malta para producir cerveza. Este posee demostradas propiedades antioxidantes y antibacterianas (Davie et al., 1998; Yamaguchi et al., 2008).

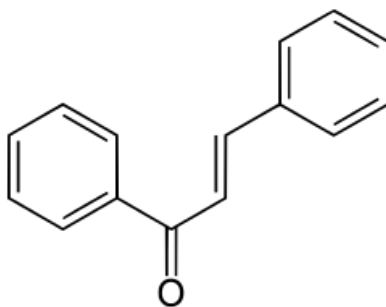


Figura 33. Estructura química básica de chalcona.

<https://es.wikipedia.org/wiki/Chalcona>.

#### ▪ Auronas:

Las auronas son un tipo de flavonoides, cuya estructura química es muy parecida a la de las chalconas, con la diferencia de que la cadena lineal de las chalconas está sustituida por un anillo heterociclo en las auronas. Las auronas son responsables de la coloración amarilla de algunas plantas. A pesar de que se ha sugerido que estos compuestos están relacionados estrechamente con las chalconas, hay pocos indicios acerca de sus vías biosintéticas (Sánchez y Rosazza, 2004).

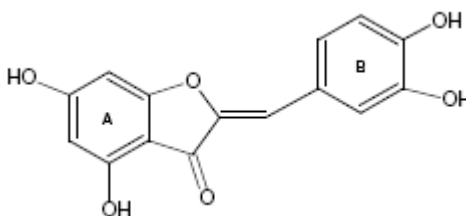


Figura 34. Estructura química de auronas.  
(Rev. Bol. Quim v.31 n.2 La Paz dic. 2014)

#### ▪ Flavanonas y flavanoles:

La diferencia estructural que caracteriza a este grupo de flavonoides reside en el anillo que une los grupos fenilo, en el grupo flavanonas es un anillo heterociclo de oxígeno

con un grupo cetona en posición 4, y en los flavanoles existe un grupo hidroxilo que se añade al anillo heterociclo en la posición 5.

- Flavanonas:

Las flavanonas contienen un anillo heterociclo de oxígeno con un grupo cetona en C4. Los alimentos que contienen flavanonas en altas concentraciones son los cítricos, aunque también se encuentran en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta. Entre los diversos miembros de las flavanonas cabe destacar a la naringenina que posee propiedades anti-inflamatorias (Vafeiadou, Vauzour, Lee, Rodríguez-Mateos y Spencer, 2009), abundante principalmente en el pomelo; la hesperedina, en la naranja; y el eriodictiol, en el limón.

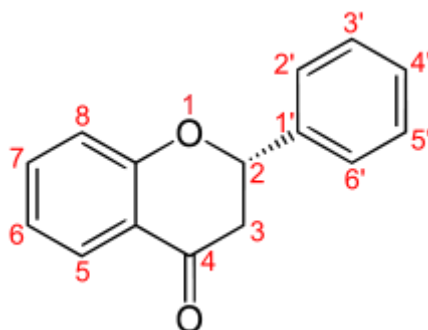


Figura 35. Estructura química de flavanonas  
(<https://es.wikipedia.org/wiki/Flavanona>).

- Flavanoles:

Los flavanoles poseen un anillo heterociclo de oxígeno con un grupo hidroxilo en C5. A diferencia del resto de los flavonoides. Un ejemplo del grupo de flavanoles es la taxifolina, presente en frutos de especies tropicales.

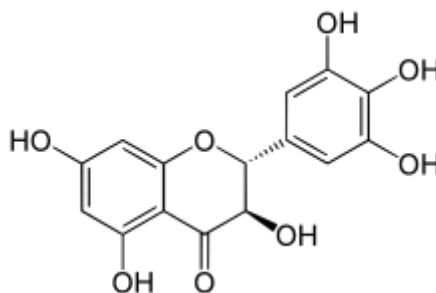


Figura 36. Estructura química de flavanoles.  
(<https://es.wikipedia.org/wiki/Flavanol>)



Los flavan-3-oles son un grupo de flavanoles. Su estructura química difiere de la básica de los flavonoides en que no presentan saturación entre el carbono 2 y 3 y contiene un grupo hidroxilo en la posición 3 del heterociclo de oxígeno.

A este grupo pertenecen las catequinas, y las leucoantocianinas.

Su estructura presenta la característica de incorporar un grupo hidroxilo o galato en la posición 3 del heterociclo (figura 34). Destacar que a diferencia de la mayoría de flavonoides, las catequinas se presentan en la naturaleza sin uniones a azúcares, es decir, como agliconas. Las catequinas se encuentran en frutas, pero las principales fuentes de catequinas son el té verde y el chocolate (Van de Putte, Hollman, 2000). El consumo de catequina está asociado con la inhibición de la trombosis arterial, la actividad antiinflamatoria, la reducción del colesterol total y lipoproteína de baja densidad in vivo como parte de su capacidad antioxidante (Aron y Kennedy, 2008).

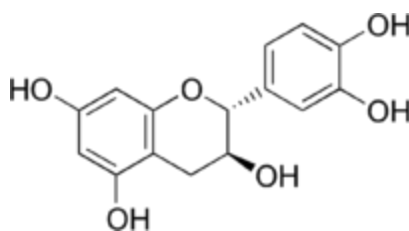


Figura 37. Estructura química básica catequina

(<https://es.wikipedia.org/wiki/Catechina>).

Las leucoantocianinas difieren en su estructura en comparación con las catequinas que poseen un grupo hidroxilo en la posición 4 del heterociclo. Están presentes en las plantas y son precursores de antocianinas, catequinas y taninos condensados.

- **Flavonas y flavonoles:**

- Flavonoles:

Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3, siendo dicha insaturación la única diferencia que presentan con las flavanonas y flavanoles. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3, diferenciándolas con las flavonas. Representan el grupo más ubicuo de polifenoles presente en los alimentos. La quercetina es el compuesto más representativo, se

encuentran en los alimentos como glucósidos (Hertog, Hollman y Venema, 1992). Las principales fuentes de estos compuestos son las verduras y las frutas, además del té y el vino. La biosíntesis de flavonoles es un proceso fotosintético, lo cual provoca que los flavonoles se localicen principalmente en el tejido externo y aéreo de la planta. Como ya se ha destacado, la distribución y la concentración de los flavonoles depende de la exposición al sol, y puede provocar distinta concentración en frutas procedentes de la misma planta.

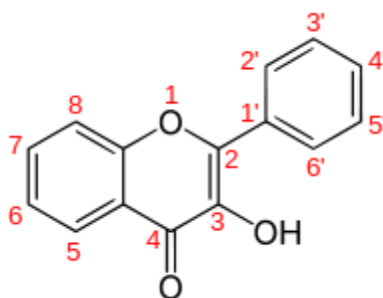


Figura 38. Estructura química de los flavonoles.

(<https://es.wikipedia.org/wiki/Flavonol>).

- Flavonas:

Poseen un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Perejil y apio representan una fuente comestible de flavonas, además estas se encuentran en la piel de las frutas.

Un ejemplo de flavona es la apigenína, se encuentran en los alimentos como glucósidos (Hertog, Hollman y Venema, 1992).

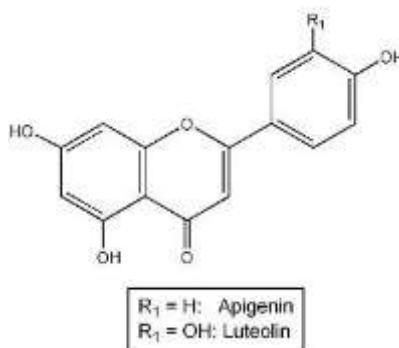


Figura 39. Estructura química básica flavonas.  
(<http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c4.htm>).

▪ **Isoflavonas y neoflavonoides:**

- Isoflavonas:

La diferencia estructural de las isoflavonas con la estructura de los flavonoides reside en la colocación del segundo fenol, en posición C3. Además tiene dos grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4. Las isoflavonas son químicamente similares a los estrógenos y son capaces de unirse a los receptores de estas hormonas, por lo que se clasifican como fitoestrógenos.

Las principales isoflavonas son la genisteína, daidzeína y gliciteína, y se encuentran casi exclusivamente en las plantas leguminosas, siendo la soja y sus productos derivados la principal fuente de isoflavonas de la dieta humana.

Su consumo se asocia con efectos beneficiosos para la salud; como por ejemplo, protección contra determinados cáncer, enfermedades cardiovasculares. Además poseen actividad antioxidante con efectos antiinflamatorios y vasodilatadores (Steiner et al., 2008; Schwartz et al., 2009).

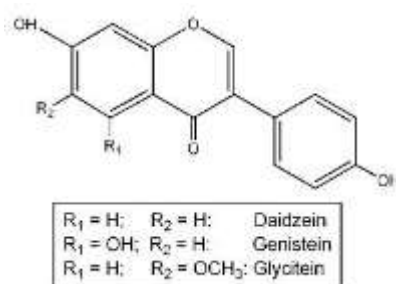


Figura 40. Estructura química de la isoflavona.  
(<http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c4.htm>).

- Neoflavonoides:

En el caso de los neoflavonoides el segundo fenol se sitúa en el carbono 4 en el heterociclo y el grupo cetona en la posición 2. Los neoflavonoides son menos comunes en los alimentos que las isoflavonas.

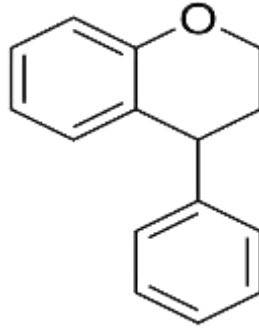


Figura 41. Estructura química de neoflavonoides.  
(<http://www.wikiwand.com/it/Neoflavonoide>).

▪ **Antocianidinas y antocianinas:**

- Antocianidinas:

La principal característica de antocianidinas en cuanto a su estructura química es la presencia de un catión en el anillo central y un grupo hidroxilo en la posición 3 del mismo anillo. Por lo general, las antocianidinas se encuentran en las plantas en forma de glicósidos, ya que la aglicona es altamente inestable (Manachet al., 2004). Las antocianidinas principales son la cianidina, pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina y la malvidina (Vermerris y Nicholson, 2008). Las antocianidinas son pigmentos solubles responsables de la mayoría de los colores rojo, azul y púrpura de las frutas, verduras, flores (Mazza et al., 2004). Las antocianidinas están presentes en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y algunas verduras, aunque son más abundantes en las frutas.

- Antocianinas:

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas. El glucósido se forma en la mayoría de los casos con la glucosa unida en la posición 3 del anillo central sustituyendo al grupo hidroxilo. Las antocianinas se encuentran ampliamente en alimentos de origen vegetal, como las antocianidinas, son responsables de la coloración de los frutos y flores.

Las antocianinas y antocianidinas poseen una elevada capacidad antioxidante, están presentes en vinos proporcionando también el color rojizo.

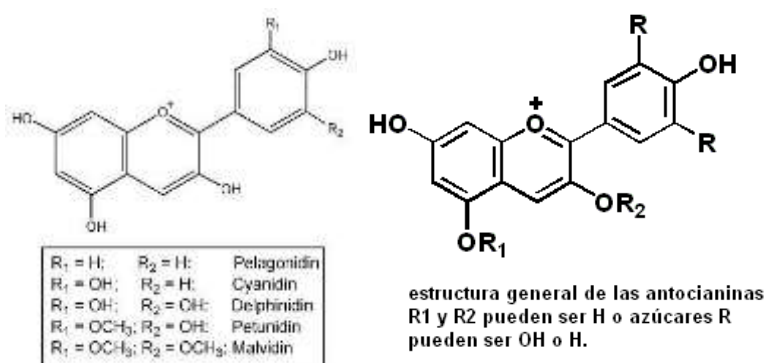


Figura 42. A la izquierda estructura química de antocianidinas (<http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c4.htm>). A la derecha estructura química antocianinas. (<http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/antocianinas>).

## 6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es una sustancia que impide o retrasa la oxidación de las moléculas.

La oxidación es un proceso químico que implica la transferencia de electrones de una molécula a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, estos son altamente reactivos y claves para formar otros radicales libres en cadena. Los antioxidantes acaban estas reacciones eliminando el radical libre, e inhiben otras reacciones de oxidación, provocando su propia oxidación.

Un antioxidante dietético, es una sustancia contenida en los alimentos de consumo habitual y que puede prevenir los efectos negativos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas de los humanos (Patthamakanokporn, et al., 2008).

Los compuestos antioxidantes individuales no actúan solos. Actúan en combinación con otros antioxidantes, ya que las interacciones entre ellos pueden producir efectos sinérgicos o antagónicos en la capacidad antioxidante total (Niki y Noguchi, 2000).

La capacidad antioxidante de los alimentos de origen vegetal procede de la acción de

una amplia diversidad de antioxidantes como las vitaminas C y E, polifenoles, carotenoides, terpenoides, compuestos de Maillard y minerales traza (Pérez, et al., 2007).

Cuantitativamente, los principales antioxidantes dietéticos son los polifenoles, seguidos por las vitaminas y los carotenoides (O'Neill et al., 2001; Saura-Calixto & Gon-i, 2006).

- Los Polifenoles. Los polifenoles indican la riqueza antioxidante de la mayor parte de los alimentos habitualmente consumidos, debido a su elevada concentración en los alimentos respecto a otros compuestos antioxidantes. Existen gran número de compuestos fenólicos en vegetales, citados anteriormente los más importantes.
- Las Vitaminas antioxidantes. Destacan el ácido ascórbico o Vitamina C y la Vitamina E. La vitamina E incluye solo alfa-tocoferol, las isoformas, alfa, beta, gama y delta de los tocoferoles y los tocotrienoles.
- Los Carotenoides. Desde un punto de vista químico, los carotenoides comprenden los carotenos que no incluyen átomos de oxígeno en su estructura, y las xantofilas que sí lo presentan, mayormente bajo la forma de hidroxilos. Como carotenos se incluyen aquellos compuestos que son Pro-Vitamina A; alfa-caroteno, beta-caroteno y licopeno; por ello no lo englobamos como vitaminas. Las principales xantofilas son beta-criptoxantina, luteína, astaxantina y zeaxantina.

Las ingesta diaria estimada es de 1 g para los polifenoles, 110 mg para las vitaminas antioxidantes y 9,4 mg para los carotenoides (O'Neill et al., 2001; Saura-Calixto & Goni, 2006).

Los antioxidantes desempeñan un papel en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y en la reducción de la mortalidad total asociada con dietas ricas en alimentos vegetales, particularmente frutas y verduras (Bazzano et al., 2002, Brighenti et al. 2005, Pitsavos et al., 2005, Trichopoulou et al., 2003).

## 6.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La medición de la actividad antioxidante de un alimento, permite cuantificar la capacidad que tendrían todos los compuestos antioxidantes presentes en éste.

Los principales ensayos que se basan en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con un radical libre son los siguientes:

- Ensayo de poder antioxidante reductor férrico o ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power): Se trata de una reacción de transferencia de electrón (SET, Single Electron Transfer), que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie & Strain, 1996). El reactivo FRAP, que contiene TPTZ, FeCl<sub>3</sub> y acetato de butilo, se mezcla con agua destilada y la muestra de ensayo. Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm después de 30 min, utilizando un espectrofotómetro (Benzie & Strain, 1996; Pulido, Bravo & Saura -Calixto, 2000). Este ensayo tiene una serie de inconvenientes, otros compuestos pueden absorber a 595 nm, además cualquier compuesto con un potencial redox inferior a 0,77 V, aunque no se comporte in vivo como un antioxidante, puede reducir el hierro. Los resultados se expresan en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.
- Actividad de captación del radical DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) o ensayo DPPH: Este ensayo mide la capacidad de escrutinio de radicales libres de una muestra. Este ensayo combina una reacción de transferencia de electrón (SET, Single Electron Transfer), y una reacción reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT) (Foti et al., 2004; Prior et al., 2005). En este método se sitúa el DPPH, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995), la medición se realiza hasta que la reacción alcance una meseta. Sanchez-Moreno et al. (1998) modificó el método introduciendo parámetros cinéticos: la EC<sub>50</sub>,

que es la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical; el tEC50, que es el tiempo necesario que necesita esa concentración para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical y la eficiencia antirradic lica (AE)= 1/( EC50\* tEC50), que tiene en cuenta los dos factores. Cuanto mayor sea AE, el antioxidante ejercerá su acci3n con menos concentraci3n y en menos tiempo. Posteriormente, Torres et al. (2002), añadieron nuevos parámetros multiplicando por dos la EC50 (expresada en mol compuesto/mol DPPH); y el inverso de este valor que representa los moles de radical reducidos por mol de antioxidante, dando una idea de los átomos de hidr3geno que intervienen en la reacci3n. Como en el ensayo FRAP, otros compuestos pueden absorber a la longitud de onda usada en este ensayo, 515 nm.

- Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS ( cido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulf3nico): En ensayo ABTS calcula la capacidad para averiguar los radicales libres de una muestra. Desde el punto de vista mecánico en el ensayo ABTS existe una reacci3n SET, Single Electron Transfer (Foti, Dasquino Geraci, 2004; Prior et al., 2005), y está basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical cati3nico ABTS. Se prepara el reactivo ABTS mezclando ABTS, persulfato de potasio y agua y este guarda en oscuridad durante 16 horas. Se diluye el reactivo ABTS en el tamp3n fosfato (pH 7,4) hasta obtener una absorbancia comprendida entre  $0,70 \pm 0,02$  a una longitud de onda dependiente del m3todo usado y sus modificaciones, siendo lo más habitual 734nm y 658nm. Se añade la muestra, se agita y se mide la reducci3n de absorbancia en un espectrof3tmetro de manera continuada durante aproximadamente 10 minutos. El tiempo es variable seg3n el m3todo descrito. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se est  analizando en el mismo tiempo (Miller et al., 1993). Los antioxidantes, además de reaccionar con el radical para producir la mol3cula original, pueden generar otros compuestos.
- Ensayo de capacidad de absorci3n de radicales de ox3geno o ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): Mide la capacidad de captaci3n de un radical espec3fico, el peroxilo, generado a partir de la mol3cula orgánica AAPH (2, 2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro). Se trata de un mecanismo



HAT (Foti, Dasquino Geraci T, 2004; Prior et al., 2005). La muestra se mezcla con solución buffer de fosfato (PBS), AAPH y fluoresceína. Los radicales atacarán a la molécula de fluoresceína, produciendo fluoresceína oxidada, que ya no emite fluorescencia y, produciendo, por tanto, un descenso en la misma. La fluorescencia se registra hasta que alcanza el valor cero en un espectrofotómetro de fluorescencia. Los resultados se calculan usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de fluorescencia entre el blanco y la muestra y se expresan como equivalentes Trolox (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001).

FRAP, ABTS y DPPH se realizan en un espectrofotómetro, mientras que ORAC requiere un fluorímetro. En cuanto al tiempo necesario para cada ensayo, ABTS tarda entre 6 y 10 min (Re et al., 1999), mientras que el ensayo FRAP toma 30 min (Pulido et al., 2000) y ORAC 30-40 min (Ou et al., 2001); y DPPH toma más tiempo, dependiendo de la muestra individual (Sánchez-Moreno et al., 1998).

Cada método proporciona valores precisos y repetibles, pero las cifras de capacidad antioxidante pueden diferir sustancialmente entre un método y otro.

## **7. POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LENTEJAS**

Las legumbres tienen gran contenido en proteínas, que a la vez que el poder de adquisición aumenta, estas son sustituidas por proteínas de origen animal ya que estas últimas son más caras pero a menudo más apreciadas por sus características organolépticas. Pero las legumbres, al ser productos vegetales, contienen además otros compuestos, como metabolitos secundarios de las plantas. Los compuestos biológicamente activos de interés en semillas de leguminosas provienen de muchas clases químicas. Incluyen fenoles, de los que destacan ácidos fenólicos así como sus derivados, además de tocoferoles y vitamina C (Amarowicz, 2010).

Estudios recientes han mostrado que las leguminosas exhiben una actividad antioxidante significativa (Tsuda, et al., 1994, Takahata et al., 2001, Cardador-Martínez et al., 2002, Duenas et al., 2002, Troszynska y Ciska 2002, Amarowicz et al., 2003, Beninger et al., 2003, Takahashi et al., 2005). Estos estudios indican que las leguminosas pueden servir como una excelente fuente dietética de antioxidantes

naturales para la prevención de enfermedades y la promoción de la salud. Asimismo, los polifenoles son estudiados en legumbres, debido a que trata de un alimento vegetal con una alta concentración de dichos fitoquímicos.

No todas los tipos de legumbres tienen el mismo contenido en fenoles totales, ni la misma capacidad antioxidante. Con el fin de observar las diferencias entre las distintas legumbres, así como establecer el contenido o rango de fenoles totales y la capacidad antioxidante en lentejas, se ha realizado una consulta bibliográfica de algunos artículos posteriores al año 2000 en diversas bases de datos.

Los artículos referidos al contenido de fenoles totales consultados ordenados cronológicamente son:

- Aproximación al contenido de compuestos fenólicos extraíbles totales de diferentes muestras de alimentos mediante la comparación de métodos cromatográficos y espectrofotométricos. En este estudio, Escarpa y González (2001) estudian el contenido de polifenoles totales con diferentes métodos en algunos alimentos, entre los cuales se encuentran dos tipos de legumbres, las lentejas y los guisantes. El estudio de polifenoles totales lo hace por medio de dos métodos. Para realizar una comparativa entre diferentes estudios, tendremos en cuenta el método más efectivo, método de extracción por ultrasonidos y el método de cuantificación descrito por Forrest y Bendall (1969). Para facilitar la comparación los datos los expresaremos como mg de ácido gálico (GAE)/g. Las lentejas obtienen valores de 6,346 mgGAE/g, para las dos variedades de guisantes estudiadas 0,449/mgGAE/g y 0,458 mgGAE/g, por tanto una media de 0,454 mgGAE/g de fenoles totales en guisantes.
- Contribución de los antioxidantes de bajo peso molecular a la capacidad antioxidante de las semillas de lentejas crudas y procesadas (Fernandez-Orozco, et al., 2003). Se estudian cuatro cultivares de lentejas procedentes de España, de las cuales se mide su contenido en fenoles totales crudas, cocidas, y germinadas. En este análisis al tener datos de lentejas crudas nos centraremos en ellos. Los fenoles totales de cada cultivar de lenteja han sido extraídos usando dos tipos de solventes diferentes, y metanol 80% y tampón fosfato. El contenido de fenoles totales se determinó por el método descrito por Naczki y Shahidi (1989). La

extracción con tampón fosfato obtuvo resultados más altos en todos los cultivares de lenteja, siendo la lenteja denominada Almar, procedente de Valladolid, la que obtuvo un mayor contenido de fenoles totales con 4,17 mg catequina/g.

- Estudio comparativo de los perfiles fenólicos y las actividades antioxidantes de las leguminosas y como se ven afectados por los disolventes de extracción. En este estudio, Xu y Chang (2007), realizan una comparativa de fenoles totales en diferentes tipos de legumbres; guisante verde y amarillo, garbanzo, soja amarilla y negra, lenteja y judía roja y negra. Además compara los resultados de 6 solventes diferentes en las mismas condiciones de trabajo. Utilizaron el método de extracción de maceración con agitación y el método de cuantificación de Singleton y Rossi (1965) y Singleton y Lamuela-Raventos (1999). Como usan diferentes solventes, y la lentejas es la leguminosa objeto de este estudio, usaremos los datos referentes al solvente que proporciona mayor contenido de fenoles totales en lentejas, la acetona ácida. Se obtuvo un contenido para el guisante verde 1,13 mg/g, para el guisante amarillo 1,28mgGAE/g, para el garbanzo 1,57mgGAE/g, para la lenteja 7,53 mgGAE/g, para la soja amarilla 2,23 mgGAE/g, para la soja negra 6,18 mgGAE/g, para la judía roja 5,9 mgGAE/g y para la judía negra 6,89 mgGAE/g. Se realiza la media de los valores obtenidos en los dos tipos de soja, guisante y de judía con el fin de una comparativa final. Por tanto el contenido de fenoles totales de la soja es 4,205 mgGAE/g, de guisante 1,205 mgGAE/g, y de la judía es 6,395 mgGAE/g.
- Actividad antioxidante y contenido fenólico de lentejas, garbanzos, guisantes y soja, y sus cambios cuantitativos durante el procesamiento, Han y Baik (2008) En él se compara el contenido de polifenoles totales entre diferentes tipos de legumbres, en lentejas pardinas y lentejas Crimson, guisantes verdes y amarillos, garbanzos, y soja. La determinación de fenoles totales se realizó según el procedimiento de Bendelow (1977). Los valores obtenidos de fenoles totales en este artículo son, para la lenteja pardina 12 mgGAE/g, para la lenteja Crimson 11,8 mg/g, para el garbanzo 2,2 mgGAE/g, para el guisante amarillo 2,5 mgGAE/g, para el guisante verde 1,2 mgGAE/g y para la soja 2,3 mgGAE/g.

Aunque se tratan de guisantes y lentejas muy diferentes, se procede a realizar la media de ambos resultados con el fin de una comparativa final. Por tanto, el valor de fenoles totales en lentejas es de 11,9 mgGAE/g, y de guisantes 1,85 mgGAE/g.

- Capacidad de eliminación de radicales libres, actividad antioxidante y composición fenólica de la lenteja verde (Amarowicz et al., 2010). Este estudio se centra en lentejas, donde se realiza un estudio de fenoles totales, además de la separación de compuestos, por un lado los de bajo peso molecular y por otro lado los taninos. La extracción de compuestos fenólicos se realizó con acetona 80% según el método descrito por Amarowicz, Piskula, Honke, Rudnicka, Troszynska, y Kozłowska, 1995. Se obtuvo un contenido de 68 mg catequina/g de fenoles totales en lentejas.
- Composición química, digestibilidad de los carbohidratos y capacidad antioxidante de variedades mejicanas cocinadas de frijol negro, garbanzos, y lentejas. Silva-Cristobal et al., (2010) realizan una cuantificación de fenoles totales de varios tipos de legumbres cocidas. Utilizaron el método de extracción de maceración con agitación y el método de cuantificación de polifenoles totales descrito por Jiménez-Escrig y colaboradores (2001). El resultado obtenido de polifenoles totales está expresado en mgGAE/g de muestra es de 2,54 mgGAE/g de frijol negro, 0,72 mgGAE/g de garbanzo, y 3,09 mgGAE/g de lenteja.
- Fenoles y actividad antioxidante en la envoltura de lentejas y guisantes. Oomah et al., (2010) comparan el contenido de fenoles totales de lentejas verdes y rojas, y de guisantes amarillos. Se realizó la extracción con diferentes solventes por el método descrito por Oomah et al., 2010. Estudian los valores obtenidos por diferentes partes de la leguminosa, así como el conjunto. Este análisis se centra en los valores obtenidos para el conjunto de cada una de las lentejas y el conjunto del guisante. El solvente con el que se obtiene una mayor extracción de compuestos fenoles en lentejas en este artículo es con agua caliente, por tanto son los valores que se observarán en este apartado. La lenteja roja fue la que mayor contenido en fenoles totales obtuvo con 20,82 mg catequina/g, seguida de

la lenteja verde 19,31 mg catequina/g, y por último el guisante amarillo 15,11 mg catequina/g. La media de las dos lentejas es de 20,065 mg catequina/g.

- Composición de polifenoles y actividad antioxidante de diferentes ecotipos de guisantes, lentejas y garbanzos de la región de la Campania. Fratianni et al., (2014) comparan el contenido de polifenoles totales e individuales entre diferentes tipos de legumbres, dos tipos de guisante, dos tipos de lenteja y dos tipos de garbanzo. Utilizaron el método de cuantificación de Singleton y Rossi (1965). Para la lenteja San Gerardo 1,098 mgGAE/g, para la lenteja Colliano 1,594 mgGAE/g, para el guisante San Gerardo 0,206 mgGAE/g, para el guisante San Rufo 0,213 mgGAE/g, para el garbanzo de Sassano 0,147 mgGAE/g y para el garbanzo de Castelcivita 0,183 mgGAE/g. Para facilitar la comparación se realiza la media de los dos valores obtenidos por tipo de leguminosa. Para lentejas 1,346 mgGAE/g, para guisante 0,210 mgGAE/g y para garbanzo 0,165 mgGAE/g.

Tabla 4. Comparativa del contenido fenólico en legumbres ordenadas cronológicamente.

Autor	Unidades	Fenoles totales				
		Lenteja	Guisante	Judía	Garbanzo	Soja
Escarpa y González (2001)	mg GAE/g	6,346	0,454	-	-	-
Fernandez-Orozco, et al., (2003)	mg catequina/g	4,17	-	-	-	-
Xu y Chang (2007)	mgGAE/g	7,53	1,205	6,395	1,57	4,205
Han y Baik (2008)	mgGAE/g	11,9	1,85	-	2,2	2,3
Amarowicz et al., 2010)	mg catequina/g	68	-	-	-	-
Silva-Cristobal et al (2010) cocidos	mgGAE/g	3,09	-	2,54	0,72	-
Oomah et al., (2010)	mg catequina/g	20,07	15,11	-	-	-
Fratianni et al, (2014)	mgGAE/g	1,346	0,210	-	0,165	-

Las unidades con las que se expresan el contenido de fenoles total están en función de la sustancia usada para la calibración, siendo lo más habitual el uso del ácido gálico y de la catequina como sustancias para la realización de las rectas de calibrado.

La variabilidad de resultados es alta. Esto puede ser debido a que en cada estudio se han usado diferentes variedades de cada leguminosa, además que en algunos se ha realizado la media entre dos tipos. Además de estar condicionados por la variedad de legumbre usada, los análisis han sido realizados por diferentes métodos, lo que condiciona la extracción y cuantificación de fenoles totales en leguminosas. No solo el método en la etapa de extracción condiciona el contenido final de fenoles totales en leguminosas, también es condicionado por el tipo de solvente usado en la extracción (Xu y Chang, 2007), además de las condiciones de trabajo, como la temperatura (Santos-Buelga et al., 2012) y el tiempo de extracción.

Sin embargo, en todos los artículos recopilados, la lenteja es el tipo de legumbre con mayor contenido en fenoles totales, tanto en lentejas no cocinadas, como en lentejas cocinadas. Las leguminosas grano que mayor contenido de fenoles tienen después de las lentejas son la judía y la soja.

Del mismo modo, Fratianni et al., (2014) además de realizar la cuantificación de fenoles totales, realiza una identificación y cuantificación fenoles individuales en lentejas guisante y garbanzos. Identifica 12 compuestos fenólicos diferentes en las muestras de dichas legumbres, donde analiza dos tipos de cada legumbre. Las cantidades las expresa en  $\mu\text{g/g}$  de muestra.

Tabla 5. Composición individual de sustancias fenólicas presentes en diferentes tipos de leguminosas expresados en µg/g de muestra, Fratianni et al., (2014).

<b>Compuesto</b>	<b>Lenteja Colliano</b>	<b>Lenteja San Gerardo</b>	<b>Garbanzo Castelvita</b>	<b>Garbanzo Sassano</b>	<b>Guisante San Gerardo</b>	<b>Guisante San Rufo</b>
Ácido gálico	33,65	22,67	6,2	5,42	93,06	21,16
Ácido clorogénico	109,8	95,9	4,62	7,37	50,32	46,42
Catequina	0	0	178,21	147,49	20,96	24,86
Ácido cafeico	54,76	98,28	0	0	4,98	9,94
Epicatequina	0	0	1,23	1,36	46,27	67,05
Ácido cumárico	13,44	43,16	0,43	0	2,44	6,04
Rutina	17,88	67,1	0	0	0	7,14
Quercentina	2,65	0	3,17	0,37	0	0
Luteolín	0	21,35	0,55	0	0	0
Naringenín	0	21,35	0	0	0	0
Ácido ferúlico	0	0	5,03	8,37	0	9,78
Hyperoside	0	0	0	0	0	1,95

Existe diferencia en cuanto a la composición fenólica individual de los tipos de leguminosas analizados. Cada tipo presenta una composición diferente de compuestos fenólicos, sin observar que estas sigan un patrón común. La composición entre diferentes variedades de un mismo tipo de legumbre presenta una mayor similitud.

En las lentejas destaca el contenido en ácidos hidroxicinámicos como son el cafeico, clorogénico y cumárico. Estos compuestos presentan entre el 46-70% de la composición fenólica total en lentejas.

Aguilera et al., (2010) no realiza una cuantificación de fenoles totales, se centra en el estudio de los contenidos fenólicos individuales en lentejas, realizando un estudio más enfocado a este tipo de leguminosa, lo cual le permite una identificación de mayor número de sustancias fenólicas. Tras el análisis de lentejas pardinas se identificaron un total de 35 compuestos fenólicos. Las cantidades las expresa en  $\mu\text{g/g}$  de muestra.

Tabla 6. Composición individual de sustancias fenólicas agrupadas por grupos en lentejas crudas, expresadas en  $\mu\text{g/g}$  de muestra, Aguilera et al., (2010).

<b>Compuesto</b>	<b><math>\mu\text{g/g}</math> de muestra</b>
Hidroxibenzoicos	5,69
Hidroxicinámicos	3,76
Catequinas y proantocianidinas	74,48
Flavonoles y dihidroflavonoides	17,89
Flavonas y flavanonas	4,89
Otros compuestos	0,91

A las catequinas y proantocianidinas corresponden el 69% del total de compuestos fenólicos identificados, a flavonoles el 17%, a flavonas y flavanonas el 5 %, a hidroxibenzoicos el 5 % y a hidroxicinámicos el 3,5 % y el restante a otros compuestos.

El grupo de catequinas y proantocianidinas no solo destaca por ser el grupo que mayor contenido presenta de este tipo de sustancias, además es el grupo con más compuestos detectados, once. Entre estos compuestos destaca catequina 3 glucósido, que aporta 39,86  $\mu\text{g/g}$  de muestra. Este es el compuesto que más aporta en el conjunto de todos los compuestos encontrados en lentejas, seguido de un trímero de proantocianidina, 9,30  $\mu\text{g/g}$  de muestra, también perteneciente al mismo grupo de compuestos.



Entre ambos estudios se pueden encontrar pocas similitudes, ya que ambos son enfocados de formas diferentes. Aguilera et al., (2010) hace una búsqueda más amplia de compuestos, buscando derivados de compuestos como dímeros o trímeros, con el fin de agruparlos en grupos de fenoles, no solo buscando compuestos fenólicos puros. Mientras Fratianni et al., (2014) realiza una búsqueda de los compuestos fenólicos puros que pueden estar presentes en leguminosas, obteniendo como resultado que en lentejas muchos de los buscados no se encuentran además de que quedan muchos picos por identificar. Un ejemplo de este es la catequina, compuesto no encontrado como tal por Aguilera et al., (2010), pero si encontrado como derivado, catequina 3 glucósido.

Por otro lado, los artículos consultados referidos a capacidad antioxidante total ordenados cronológicamente son los siguientes:

- Contribución de los antioxidantes de bajo peso molecular a la capacidad antioxidante de las semillas de lentejas crudas y procesadas (Fernandez-Orozco, et al., 2003). Se estudia la capacidad antioxidante de cuatro cultivares de lentejas procedentes de España crudas, cocidas, y germinadas. Se han usado dos tipos de solventes diferentes, y metanol 80% y tampón fosfato, y la capacidad antioxidante se ha medido usando el reactivo ABTS. Al contrario que en la extracción de fenoles, se obtiene una mayor capacidad antioxidante, en 3 de las 4 muestras, al usar metanol al 80%. El cultivar con mayor capacidad antioxidante es el denominado Paula usando, procedente de la provincia de Salamanca, cuya actividad antioxidante es de 34,55  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ .
- Estudio comparativo de los perfiles fenólicos y las actividades antioxidantes de las leguminosas y como se ven afectados por los disolventes de extracción, Xu y Chang (2007). En este estudio comparan la actividad antioxidante de diferentes leguminosas grano, guisante verde y amarillo, garbanzo, soja amarilla y negra, lenteja y judía roja y negra. La capacidad antioxidante la mide a través de tres ensayos diferentes, ensayo DPPH, ensayo FRAP, y ensayo ORAC. Asimismo compara los resultados de 6 solventes diferentes en cada tipo de ensayo. Los resultados obtenidos en los estudios DPPH y ORAC son expresados en  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$  de leguminosa. Dependiendo el ensayo, DPPH u ORAC, es diferente el solvente que obtiene una mayor actividad antioxidante. Con el fin de comparar diferentes estudios, se escogen los datos de mayor valor, es decir, el

ensayo que obtiene mayor actividad antioxidante y el solvente con mayor actividad antioxidante en dicho ensayo en lentejas, ya que estas son el objeto del estudio. Por lo anteriormente mencionado, se escoge el ensayo ORAC, y como solvente etanol al 70%. La soja negra en las condiciones anteriormente descrita es la que mayor capacidad antioxidante presenta, 162,52  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , seguida por la lenteja con 97,66  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , seguida por la soja amarilla con 86,84  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , consecutivamente se encuentra la judía negra con 79,27  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , la judía roja con 61,20  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , el guisante verde con 40,30  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , el garbanzo con 34,66  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , y en último lugar el guisante amarillo con 33,42  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ . Para facilitar la comparación, se realiza la media entre los diferentes tipos de leguminosa de los que hay más de un valor, como el guisante, la judía o la soja. La media para la soja es de 124,68  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , para la judía 70,24  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , y para el guisante 36,86  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ .

- Actividad antioxidante y contenido fenólico de lentejas, garbanzos, guisantes y soja, y sus cambios cuantitativos durante el procesamiento. Han y Baik (2008) comparan la capacidad antioxidante entre diferentes tipos de legumbres, en lentejas pardinas y lentejas Crimson, guisantes verdes y amarillos, garbanzos, y soja medidas mediante el ensayo ABTS. Los valores obtenidos para la capacidad antioxidante total ordenadas de mayor a menor valor son, en lenteja pardina 14  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , en lenteja Crimson 14  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , en soja 10,2  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , en guisante amarillo  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , en garbanzo 2  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , en guisante verde 1,8  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ . Al igual que en el caso anterior, se realizan las medias de los valores de guisantes y de lentejas. Por tanto, el valor de la capacidad antioxidante totales en lentejas es de 14  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , y en guisantes 2,6  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ .
- Capacidad de eliminación de radicales libres, actividad antioxidante y composición fenólica de la lenteja verde (Amarowicz et al., 2010). En este artículo solo es estudiada la lenteja, donde se analiza la actividad antioxidante de

tres formas diferente. La actividad antioxidante total fue medida usando un kit Randox, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al igual que en el caso de polifenoles, se realizó la medida para el conjunto de la semilla y también se dividió el extracto en fracciones que fueron medidas. La capacidad antioxidante total para la semilla completa de lenteja es de 0,75  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ .

- Evaluación del perfil fenólico y propiedades antioxidantes de lenteja Padina por deshidratación industrial (Aguilera et al., 2010). En este estudio se determina la capacidad antioxidante de lentejas de la variedad Pardina, evaluándose estas crudas; remojadas; remojadas y cocidas; y remojadas, cocidas y deshidratadas. La capacidad antioxidante se midió a través del ensayo ORAC. Se obtuvo una capacidad antioxidante de 66,97  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$  en lentejas Pardinias crudas.
- Fenoles y actividad antioxidante en la envoltura de lentejas y guisantes. Oomah et al., (2010) comparan la capacidad antioxidante de dos tipos de lentejas, lentejas verdes y lentejas rojas, y de guisantes verdes. Se realizó la medida tanto en el total de la lenteja como solo en la piel o envoltura. El método usado para medir la capacidad antioxidante, fue el ensaño ORAC. Como el resto de valores aportados en los diferentes estudios se refieren al conjunto de la lenteja, los valores extraídos de este artículo son los obtenidos para el conjunto de la leguminosa, aunque el estudio de la piel obtiene una mayor capacidad antioxidante por gramo de muestra. La lenteja verde fue la que mayor capacidad antioxidante obtuvo, 136,17  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , seguida de la lenteja roja con 134,81  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ , y por último el guisante con 10,36  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ . Los valores de lentejas son muy próximos, situándose la media en 135,49  $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ .
- Composición de polifenoles y actividad antioxidante de diferentes ecotipos de guisantes, lentejas y garbanzos de la región de la Campania (Fратиanni, et al., 2014) En este estudio se compara la capacidad antioxidante de seis leguminosas grano, dos tipos de guisante, dos tipos de lenteja y dos tipos de garbanzo. La capacidad antioxidante fue medida mediante el ensayo DPPH, y las unidades expresadas como la concentración en miligramos de la muestra necesaria para

inhibir la actividad del radical DPPH en un 50% durante 60 minutos. Los valores obtenidos fueron para la lenteja de San Gerardo 2,22 mg EC50, para la lenteja Colliano 1,70 mg EC50, para guisante San Gerardo 24,55 mg EC50, para guisante San Rufo 18,53 mg EC50, para garbanzo Sassano 77,09 mg EC50y para garbanzo 47,90 mg EC50. La lenteja Colliano es la que mejor capacidad antioxidante presenta, ya que es la que menor cantidad necesita para reducir al 50% el reactivo DPPH. Las medias de cada tipo de leguminosa son 1,96 mg EC50, 21,54 mg EC50, 62,50 mg EC50, para lentejas, guisantes y garbanzos respectivamente.

Tabla 7. Comparativa de la capacidad antioxidante en legumbres ordenadas cronológicamente.

Autor	Método	Unidades	Actividad antioxidante				
			Lenteja	Guisante	Judía	Garbanzo	Soja
Fernandez-Orozco, et al., (2003)	ABTS	μmol Trolox equivalente/g	34,55	-	-	-	-
Xu y Chang (2007)	ORAC	μmol Trolox equivalente/g	97,66	36,86	70,24	34,66	124,68
Han y Baik (2008)	ABTS	μmol Trolox equivalente/g	14	2,6	-	2	10,2
Amarowicz et al., (2010)	Kit Randox	μmol Trolox equivalente/g	0,75	-	-	-	-
Aguilera et al., (2010)	ORAC	μmol Trolox equivalente/g	66,97	-	-	-	-
Oomah et al., (2010)	ORAC	μmol Trolox equivalente/g	135,49	10,36	-	-	-
Fратиanni et al., (2014)	DPPH	mg EC50	1,96	21,54	62,50	-	-

La mayoría de los datos extraídos de los artículos anteriormente citados están expresados en μmol Trolox equivalente/g. Entre estos se pueden observar datos muy diferentes, los obtenidos por Xu, Chang (2007), Aguilera et al. (2010) y Oomah et al. (2010), son mucho más altos que los obtenidos en los otros dos estudios. Los estudios con capacidad antioxidante mayor realizaron la medición mediante el ensayo ORAC, mientras que Han y Baik (2008) y Fernandez-Orozco et al., (2003) realizaron la medición de la capacidad antioxidante por el método ABTS y Amarowicz et al., (2010) con un kit Randox.

A diferencia de lo ocurrido en el caso de fenoles, las lentejas no son las que mayor capacidad antioxidante presentan en todos los estudios. La soja, en uno de los estudios de los cuales tenemos datos referentes a su capacidad antioxidante, presenta mayor valor que la lenteja, en concreto la soja negra (Xu, Chang, 2007). En ese mismo estudio, la lenteja si presentaba un mayor contenido en fenoles totales. Por tanto las lentejas son las leguminosas con mayor contenido en fenoles totales pero no son las que mayor capacidad antioxidante presenta, aunque si presentan una alta capacidad antioxidante. En el otro caso del que disponemos de datos referentes a la capacidad antioxidante de soja, su capacidad antioxidante es menor al de la lenteja, pero no disponemos información del tipo de soja utilizado en el estudio, pero destaca su alta capacidad antioxidante en referencia a su bajo contenido fenólico total.

Teniendo en cuenta que el contenido de fenoles totales es muy superior en lentejas y que obtiene una alta actividad antioxidante, se supone que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante de las lentejas (Han, Baik, 2008).

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIALES

### 1.1. MATERIAL VEGETAL

Se han analizado un total de 60 muestras de lentejas pertenecientes a 9 tipos de lentejas diferentes. De ellas, 42 han sido proporcionadas por el Consejo Regulador de la Indicación Geográfica Protegida Lenteja de La Armuña.

Del total de las 42 muestras proporcionadas por el Consejo Regulador de dicha identidad, doce corresponden a la semilla certificada de primera reproducción “R1” de la variedad Guareña y once a la semilla certificada de segunda reproducción “R2” del tipo Guareña. La lenteja de tipo Guareña es una semilla que procede de una selección en masa en cuanto a tamaño y producción de la lenteja Rubia de La Armuña. El conjunto de esas veintitrés muestras han sido cultivadas dentro de la IGP. Además de tratarse de semillas de diferente reproducción, han sido cultivadas en diferentes campañas 2014-2015 para R1 y 2013-2014 para R2.

Tabla 8. Lentejas de tipo Guareña de primera y segunda reproducción.

GUAREÑA	CÓDIGO	PROCEDENCIA
R1	R1-1	VILLARES DE LA REINA
	R1-2	LA VELLÉS
	R1-3	CASTELLANOS DE MORISCOS
	R1-4	PAJARES DE LA LAGUNA
	R1-5	VILLAVERDE DE LA GUAREÑA
	R1-6	VILLARES DE LA REINA
	R1-7	NEGRILLA DE PALENCIA
	R1-8	LA VELLÉS
	R1-9	PALENCIA DE NEGRILLA
	R1-10	TOPAS
	R1-11	CABRERIZOS
	R1-12	LA ORBADA
R2	R2-1	CASTELLANOS DE MORISCOS
	R2-2	TARDÁGUILA
	R2-3	CASTELLANOS DE MORISCOS
	R2-4	PAJARES DE LA LAGUNA
	R2-5	VILLAVERDE DE GUAREÑA
	R2-6	TARDÁGUILA
	R2-7	CABEZABELLOSA DE LA CALZADA
	R2-8	SAN CRISTOBAL DE LA CUESTA
	R2-9	VILLARES DE LA REINA
	R2-10	VILLAVERDE DE GUAREÑA
	R2-11	VILLARES DE LA REINA

También, dentro de las semillas proporcionadas por el Consejo Regulador se encuentran 9 muestras que pertenecen al ecotipo Rubia de la Armuña, codificadas en el presente estudio como “ERdA”. Este grupo lo componen por un lado lentejas procedentes de la selección de semilla recogidas en el año 2002 por el ITACYL, cuando dentro de la IGP aún no se registraba la variedad Guareña; y por otro lado, la semilla propia de toda la vida del agricultor. Las muestras proceden de siete localidades incluidas en los límites de la IGP.

Tabla 9. Lentejas de tipo Rubia de La Armuña.

<b>RUBIA DE LA ARMUÑA</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
ERdA	ERdA-1	MONTERRUBIO DE LA ARMUÑA	SELECCIONADA
	ERdA-2	TARDÁGUILA	SELECCIONADA
	ERdA-3	VILLARES DE LA REINA	PROPIA DEL PRODUCTOR
	ERdA-4	VILLAVERDE DE GUAREÑA	SELECCIONADA
	ERdA-5	CASTELLANOS DE MORISCOS	PROPIA DEL PRODUCTOR
	ERdA-6	PALENCIA DE NEGRILLA	PROPIA DEL PRODUCTOR
	ERdA-7	VILLARES DE LA REINA	SELECCIONADA
	ERdA-8	PALENCIA DE NEGRILLA	PROPIA DEL PRODUCTOR
	ERdA-9	PEDROSILLO EL RALO	SELECCIONADA

Además de las anteriormente citadas, otro grupo de lentejas, codificado como “OT”, fue proporcionado por el Consejo Regulador de la IGP Lenteja de La Armuña. Este grupo es más heterogéneo que los anteriormente citados. Está formado por diez muestras de lentejas, de las cuales cinco son de la variedad Guareña pero estas cultivadas fuera de los márgenes de la IGP, una muestra del tipo Guareña microjaspeada, una muestra del tipo Guareña jaspeada, dos muestras de la variedad Pardina cultivadas en la provincia de Valladolid, y una muestra de la variedad Rubia Castellana cultivada en Castilla La Mancha.



Tabla 10. Lentejas proporcionadas por el Consejo Regulador no pertenecientes a los grupos R1, R2, ni ERdA.

<b>CÓDIGO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
OT-1	GUAREÑA FUERA DE IGP	MINAYA (ALBACETE)
OT-2	GUAREÑA FUERA DE IGP	MINAYA (ALBACETE)
OT-3	GUAREÑA MICROJASPEADA	PAJARES DE LA LAGUNA
OT-4	GUAREÑA JASPEADA	PAJARES DE LA LAGUNA
OT-5	GUAREÑA FUERA DE IGP	VILORIA (VALLADOLID)
OT-6	PARDINA	VALDENEBRO DE LOS VALLES
OT-7	PARDINA	BERCERO DE CAMPOS (VALLADOLID)
OT-8	GUAREÑA FUERA DE IGP	LERMA (BURGOS)
OT-9	GUAREÑA FUERA DE IGP	ALMADRONES (GUADALAJARA)
OT-10	RUBIA CASTELLANA	HORCAJO DE SANTIAGO (CUENCA)

Las lentejas jaspeadas y microjaspeadas se diferencian morfológicamente del resto de Guareñas en que presentan un moteado en la superficie. El moteado de las lentejas jaspeadas es de mayor tamaño que el de las lentejas microjaspeadas.



Figura 43. A la izquierda OT-3 microjaspeada, a la derecha OT-4 jaspeada.

Las dieciocho muestras restantes, no proporcionadas por la IGP, pertenecen a 7 grupos de lentejas. Estas son numeradas en función del orden en las que han sido adquiridas y codificadas con la letra “N”. Los tipos seleccionados han sido escogidos en función de las variedades más consumidas en España, además de otras cuya introducción en dicho mercado está siendo mayor en los últimos años.

Tabla 11. Lentejas agrupadas por variedades no proporcionadas por el Consejo Regulador.

<b>VARIEDAD</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>MARCA COMERCIAL O LUGAR DE COMPRA</b>
CASTELLANA	N-11	CASTELLANA LA SALMANTINA
	N-12	CASTELLANA ECO LA SALMANTINA
	N-13	CASTELLANA ESPECIAL LA SALMANTINA
VERDINA	N-8	VERDINA LA SALMANTINA
	N-5	VERDINA DU PUY LA SALMANTINA
	N-9	VERDINA ECO LA SALMANTINA
	N-14	VERDINA COMPRADA EN ZAMORA
PARDINA	N-7	PARDINA LA SALMANTINA
	N-15	PARDINA LUENGO
	N-18	PARDINA DON CARLOS
CASTELLANA PELADA	N-6	CASTELLANA PELADA LA SALMANTINA
	N-16	CASTELLANA PELADA HACENDADO
ROJA O CRIMSON	N-1	ROJA LA SALMANTINA
	N-2	ROJA LA COCHURA
	N-17	ROJA AP
CAVIAR	N-3	CAVIAR LA SALMANTINA
	N-4	CAVIAR COMPRADA EN ZAMORA
REGULAR	N-10	RÁPIDA LA SALMANTINA (REGULAR)

## 1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

El material usado para los diferentes análisis realizados ha sido el siguiente:

- Molino de martillos
- Equipo frigorífico y congelador
- Balanza de precisión
- Espátula
- Baño de ultrasonidos
- Centrifuga
- Tubos de centrifuga
- Papel de filtro Whatman
- Pipetas
- vaso de precipitado
- Matraz aforado
- Embudo
- Rotavapor
- Matraz corazón

- Espectrofotómetro
- Cubetas
- Filtros de 17 mm, 0,45µm
- Equipo de filtración para HPLC con matraz kitasato
- HPLC

### **1.3. REACTIVOS**

- ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- Ácido fórmico (concentración 100%)
- Acetonitrilo gradiente HPLC
- Metanol gradiente HPLC
- Metanol de síntesis
- Patrones de ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cumárico, catequina, rutina, kenferol y quercentina.
- Persulfato de potasio
- Reactivo de folin-Ciocalteu
- Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%
- Para la preparación del tampón fosfato salino (PBS):
  - o Cloruro de sodio
  - o Fosfato de potasio monobásico
  - o Fosfato de disódio
  - o Cloruro de potasio
  - o Hidróxido de sodio para ajustar su pH.
- Trolox

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES**

Para facilitar una correcta extracción del contenido fenólico presente en las semillas de lentejas, estas pasan a través de un molino de martillos. Son molturadas hasta pasar por un tamiz de tamaño sémola presente antes de la salida del molino. Una vez molturadas

las muestras son congeladas hasta el proceso de extracción, evitando así su posible deterioro.

Para la extracción de polifenoles se utiliza el método descrito por Luo et al., (2011) con modificaciones. Se pesan en una balanza de precisión 1,5 g de lenteja previamente molturada que se mezclan con 15 ml de metanol de síntesis y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 15 min.



Figura 44. Baño de ultrasonidos

Finalizado el tiempo, se introduce la mezcla en la centrifuga a 1500 r.p.m durante 10 min. Al terminar se separan las fases, se filtra con papel Whatman y se recoge el sobrenadante. El sobrenadante se concentra en rotavapor a 30°C. El extracto se redisuelve en 2ml de metanol gradiente HPLC y se guarda a temperaturas de congelación hasta su posterior análisis. Cada muestra se extrajo por duplicado.



Figura 45. Rotavapor programado a 30°C.

## 2.2. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE FENOLES TOTALES

Se fundamenta en que los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos reaccionan con la solución Folin-Ciocalteus en medio básico, lo que proporciona un compuesto de color azul. La intensidad del compuesto azul es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos en el medio.

El método utilizado es descrito por Forrest y Bendall (1969) con pequeñas modificaciones. El procedimiento para la preparación de la muestra es el siguiente, en un matraz aforado de 25 ml se añaden 0,5ml de extracto, 0,5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, 10 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% y por último se enrasa hasta 25ml con agua destilada. También se prepara un blanco con el mismo procedimiento, pero sustituyendo la muestra por agua destilada. Se dejan en reposo durante 1h y posteriormente se mide en un espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 750nm. Los resultados de absorbancia obtenidos son correlacionados con una recta de calibrado realizada con ácido gálico como estándar.

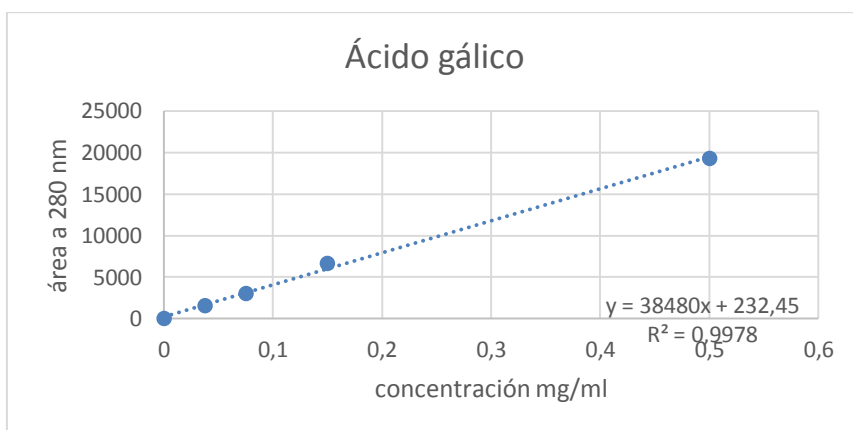


Figura 46. Recta de calibración del ácido gálico. X= mg/ml; Y= área integrado bajo el pico.



Figura 47. Matraces aforados con la muestra.

El análisis espectrofotométrico se realiza utilizando un espectrofotómetro Jenway 6465, con cubetas Hellma 6030-OG de 10mm.

### **2.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE FENOLES INDIVIDUALES**

Previo a la introducción de las muestras en el HPLC estas son filtradas un filtro de 17 mm y 0,45  $\mu\text{m}$ , con el fin de evitar posibles obstrucciones de la columna.

Las condiciones iniciales del análisis cromatográfico son las siguientes:

- Fase estacionaria: Agilent Hypersil ODS C18 de 250 mm x 4,6 mm
- Fase móvil: Acetonitrilo (A) y ácido fórmico 4,5% (B)

Una vez escogidas la fase móvil y la fase estacionaria y teniendo en cuenta ambas, se realizan una serie de pruebas con el fin de ajustar el método más adecuado. Las condiciones finalmente establecidas son:

- Flujo: constante, 1,5 ml/min
- Temperatura de la columna: 30 °C
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{l}$
- Gradiente: min 0-8: 5% B, 95% A; min 10: 15% B, 85% A; min 15: 20% B, 80% A; min 20: 25% B, 75% A; min 30: 70% B, 30% A; min 40-50: 5% B, 95% A
- Detección a 280 nm y 330 nm

El análisis cromatográfico se realiza utilizando un cromatógrafo Agilent Technologies Serie 1100, formado por un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de matriz de diodos (DAD).

## 2.4. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE CAPACIDAD

### ANTIOXIDANTE

El método utilizado es descrito por Re et al., (1999) con modificaciones. Se diluye el reactivo ABTS en el tampón fosfato (pH 7,4) hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.70±0.02 a 734 nm. Esto se hace en la cubeta Hellma 6030-OG de 10mm. Posteriormente se le añaden 10 µl del extracto metanólico y se agita y se mide la absorbancia de manera continuada durante 10 minutos.



Figura 48. Cubetas con diferentes muestras.

Se apuntan los valores inicial (t=0) y final (t=10 min) de absorbancia para calcular el % de disminución de la señal.

$$\% \text{ de disminución de la señal} = 100 \cdot \frac{\text{Absinicial} - \text{Absfinal}}{\text{Absinicial}}$$

Los resultados de absorbancia obtenidos son correlacionados con una recta de calibrado realizada con Trolox como estándar. Concentración= (% disminución +2.1075)/1.8152.

Se lleva a cabo el mismo procedimiento con cantidades diferentes de Trolox como antioxidante y se representa la cantidad añadida de Trolox frente al % de disminución de la señal. De esta manera se relaciona el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

El análisis espectrofotométrico se realiza utilizando un espectrofotómetro UVmini1240 UV-Vis Spectrophotometer Shimadzu.

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realiza mediante el programa SPSS versión 15.0.

Para poder comparar si las medias aritméticas de la variable son diferentes significativamente y ver las posibles influencias de los diferentes factores entre dos o más grupos de resultados, se utilizó el procedimiento ANOVA de un factor que consiste en comparar varios grupos respecto a una variable cuantitativa, a un nivel de significación de 0,05.

Se utilizó el test Post-hoc Tukey-b para hacer comparaciones múltiples por parejas, con el fin de ver a qué grupo pertenece cada una de las variables.



# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Este estudio ha sido desarrollado con el fin de cuantificar la capacidad antioxidante y la cantidad de fenoles en diferentes variedades de lentejas y observar la relación entre ellas. Además, tenemos información de algunas variables dentro del mismo tipo de lenteja, lo que nos permitirá el estudio de la influencia de dichas variables en la composición de las lentejas en cuanto a polifenoles y capacidad antioxidante se refiere.

Se ha demostrado que las legumbres pueden ayudar en la prevención del cáncer de mama (Adebamowo et al., 2005), además de aportar otros beneficios para la salud con respecto a las enfermedades cardiovasculares (Kushi et al., 1999) y la salud ósea (Alekel y otros 2000), todas ellas ligadas a la capacidad antioxidante. Esta actividad antioxidante está relacionada con el contenido de compuestos fenólicos de lentejas (Dueñas, Hernández, Estrella, 2005). Además, varios estudios experimentales han demostrado que las leguminosas exhiben una actividad antioxidante significativa (Dueñas et al., 2002; Troszynska, Ciska, 2002; Amarowicz et al., 2003).

Una vez realizada la extracción y cuantificación de fenoles totales y de la capacidad antioxidante, y mediante un estudio estadístico se pretende examinar si existen diferencias significativas, en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante por separado, en función de:

- La variedad. Entre Guareña, Rubia de La Armuña, Castellana, Verdina, Pardina, Castellana Pelada, Crimson o Roja, Caviar y Rápida. Trataremos Guareñas y Rubias de la Armuña como variedades distintas con el fin de estudiar si hay diferencias entre ellas.
- El ecotipo cultivado dentro de la IGP lenteja de la Armuña, Guareña o Rubia de La Armuña.
- La generación; si se trata de semilla certificada de primera generación (Guareña 14-15) o de segunda generación (Guareña 13-14).
- Los tipos de Guareña. Guareña microjaspeada, Guareña jaspeada o Guareña sin jaspedo.
- La influencia de la IGP, Guareña cultivada dentro de la IGP o fuera de la IGP.
- La influencia de la selección de semilla. Semilla seleccionada por el ITACYL o usada año tras año por el agricultor.
- La influencia del tipo de suelo.

## **1.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES**

Para el estudio partimos de 60 muestras de lentejas trituradas a las cuales se les ha realizado una extracción por duplicado usando el método de ultrasonidos. La cuantificación ha sido realizada por el método Folin-Ciocalteu.

La extracción es el paso más determinante en el proceso completo de extracción y cuantificación de polifenoles totales. La cantidad extraída de fenoles se ve influenciada por el tiempo de extracción, la temperatura alcanzada ya que pueden volatilizarse algunos compuestos (Khoddami., et al, 2013), el tipo de solvente y la proporción de este con la muestra (Xu y Chang , 2007), y también por el método utilizado para dicha extracción. Además de los factores que se dan durante la extracción, la cantidad de fenoles final está influenciada por la preparación y conservación de la muestra (Santos-Buelga., et al, 2012).

Para la preparación y conservación de las muestras de lentejas, estas han sido molidas y conservadas en congelación. Estas condiciones son las óptimas para evitar la pérdida de compuestos fenólicos (Santos-Buelga., et al, 2012).

Además de la extracción y sus condicionantes, la cantidad de fenoles totales puede variar en función de otros factores que se estudiarán posteriormente con la aplicación de la estadística.

Los valores obtenidos para fenoles totales por el método de ultrasonidos en este estudio son los siguientes:

Tabla 12. Valores medios de fenoles totales en las muestras de lentejas ordenadas por variedades.

<b>CÓDIGO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>FENOLES</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>FENOLES</b>
	<b>D</b>	<b>(mgGAE/100g)</b>	<b>O</b>		<b>(mgGAE/100g)</b>
<b>R1-1</b>	GUAREÑA	20,49	<b>ERDA-1</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	28,94
<b>R1-2</b>	GUAREÑA	18,44	<b>ERDA-2</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	32,02
<b>R1-3</b>	GUAREÑA	23,45	<b>ERDA-3</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	32,73
<b>R1-4</b>	GUAREÑA	17,68	<b>ERDA-4</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	30,57
<b>R1-5</b>	GUAREÑA	28,51	<b>ERDA-5</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	23,39
<b>R1-6</b>	GUAREÑA	24,83	<b>ERDA-6</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	29,66
<b>R1-7</b>	GUAREÑA	26,71	<b>ERDA-7</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	30,89
<b>R1-8</b>	GUAREÑA	25,19	<b>ERDA-8</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	20,03
<b>R1-9</b>	GUAREÑA	23,28	<b>ERDA-9</b>	RUBIA DE LA ARMUÑA	17,65
<b>R1-10</b>	GUAREÑA	26,63	<b>N-11</b>	CASTELLANA	30,12
<b>R1-11</b>	GUAREÑA	22,34	<b>N-12</b>	CASTELLANA	25,45
<b>R1-12</b>	GUAREÑA	22,77	<b>N-13</b>	CASTELLANA	26,49
<b>R2-1</b>	GUAREÑA	26,88	<b>OT-10</b>	CASTELLANA	40,13
<b>R2-2</b>	GUAREÑA	19,99	<b>N-8</b>	VERDINA	22,28
<b>R2-3</b>	GUAREÑA	20,67	<b>N-5</b>	VERDINA	39,38
<b>R2-4</b>	GUAREÑA	26,45	<b>N-9</b>	VERDINA	37,29
<b>R2-5</b>	GUAREÑA	22,26	<b>N-14</b>	VERDINA	30,05
<b>R2-6</b>	GUAREÑA	29,02	<b>OT-6</b>	PARDINA	30,56
<b>R2-7</b>	GUAREÑA	28,68	<b>OT-7</b>	PARDINA	27,90
<b>R2-8</b>	GUAREÑA	26,77	<b>N-7</b>	PARDINA	22,56
<b>R2-9</b>	GUAREÑA	29,81	<b>N-15</b>	PARDINA	23,60
<b>R2-10</b>	GUAREÑA	34,39	<b>N-18</b>	PARDINA	15,33
<b>R2-11</b>	GUAREÑA	23,38	<b>N-6</b>	CASTELLANA PELADA	12,95
<b>OT-1</b>	GUAREÑA	25,48	<b>N-16</b>	CASTELLANA PELADA	20,03
<b>OT-2</b>	GUAREÑA	32,48	<b>N-1</b>	ROJA	18,01
<b>OT-3</b>	GUAREÑA	23,10	<b>N-2</b>	ROJA	17,72
<b>OT-4</b>	GUAREÑA	22,80	<b>N-17</b>	ROJA	14,03
<b>OT-5</b>	GUAREÑA	28,80	<b>N-3</b>	CAVIAR	21,26
<b>OT-8</b>	GUAREÑA	24,79	<b>N-4</b>	CAVIAR	14,36
<b>OT-9</b>	GUAREÑA	38,80	<b>N-10</b>	RÁPIDA	17,24

Si se compara el rango de concentración obtenido en este trabajo, que varía entre los 12-34 mg GAE/100g de lenteja, y se compara con los datos expuestos en el apartado 5.1. que varían entre 100-1200 mg GAE/100g de lenteja, los resultados obtenidos de fenoles totales en lentejas son bajos.

Como hemos dicho anteriormente, la preparación de la muestra se ha realizado en condiciones óptimas, por ello no se considerará esta parte como condicionante del bajo contenido de fenoles totales.

En cuanto al método de extracción seleccionado, la utilización de ultrasonidos obtiene buenos rendimientos de extracción, comparables con el método soxhlet y superiores a la maceración (Santos-Buelga., et al, 2012). Además el método de ultrasonidos ha permitido una extracción rápida de los fenoles totales, siendo esta una de las mayores ventajas que permite este método.

Por ello, las bajas cantidades de fenoles totales extraídas son debidas a las condiciones escogidas en la extracción. Las temperaturas más altas se alcanzaron en el rotavapor, pero estas no superaron los 30°C. Por tanto, se considera que dichas temperaturas no han influido en la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos.

Una de las causas responsable de dicha extracción puede ser el tipo de solvente utilizado, metanol. El uso de solventes orgánicos puros puede originar que la extracción de sustancias polares no sea completa (Santos-Buelga et, al, 2012). Por otro lado, Xu y Chang (2007) realizan un estudio usando 6 solventes diferentes, para la extracción y cuantificación de fenoles totales en legumbres, en el cual se concluye que la acetona presenta mejor rendimiento que el metanol para la extracción de fenoles en lentejas. Además del tipo de solvente, también influye la proporción entre el solvente y la muestra. La cantidad de muestra con respecto al solvente es muy elevada en comparación con la usada en los estudios consultados. Esto puede haber originado una extracción incompleta de compuestos fenólicos.

Los datos obtenidos se han realizado bajo las mismas condiciones, que unido al método de ultrasonidos han permitido obtener réplicas muy buenas, lo que permite realizar una comparación entre las diferentes clases de lentejas y las variables que les influyen.

## **1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Para el estudio partimos de los extractos metanólicos previamente preparados mediante el método de ultrasonidos. Para la medida de la capacidad antioxidante se usa el ensayo ABTS, anteriormente descrito en el apartado de materiales y métodos.

Al igual que la extracción es un paso determinante en el contenido final de fenoles totales, también influye en la actividad antioxidante final, debido a que las lentejas muestran actividad antioxidante relacionada con su contenido fenólico total (Fernández-Orozco, Zielinski, Piskula, 2003). Por todo lo anterior, como para el análisis de capacidad antioxidante partimos del mismo extracto usado para fenoles totales, todos los factores que afecten al contenido fenólico total, lo harán en la capacidad antioxidante.

Los valores obtenidos para la capacidad antioxidante en lentejas medidas mediante el método ABTS:

Tabla 13. Valores medios de capacidad antioxidante en las muestras de lentejas.

<b>CÓDIGO</b>	<b>LENTEJA</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ng Trolox /g</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>LENTEJA</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ng Trolox /g</b>
R1-1	GUAREÑA	12,45	ERDA-1	RUBIA DE LA ARMUÑA	17,10
R1-2	GUAREÑA	11,32	ERDA-2	RUBIA DE LA ARMUÑA	18,80
R1-3	GUAREÑA	14,08	ERDA-3	RUBIA DE LA ARMUÑA	19,19
R1-4	GUAREÑA	10,90	ERDA-4	RUBIA DE LA ARMUÑA	18,00
R1-5	GUAREÑA	16,87	ERDA-5	RUBIA DE LA ARMUÑA	14,04
R1-6	GUAREÑA	14,84	ERDA-6	RUBIA DE LA ARMUÑA	17,50
R1-7	GUAREÑA	15,88	ERDA-7	RUBIA DE LA ARMUÑA	18,18
R1-8	GUAREÑA	15,04	ERDA-8	RUBIA DE LA ARMUÑA	12,19
R1-9	GUAREÑA	13,99	ERDA-9	RUBIA DE LA ARMUÑA	10,88
R1-10	GUAREÑA	15,83	N-11	CASTELLANA	17,75
R1-11	GUAREÑA	13,47	N-12	CASTELLANA	15,18
R1-12	GUAREÑA	13,71	N-13	CASTELLANA	15,75
R2-1	GUAREÑA	15,97	OT-10	CASTELLANA	23,27
R2-2	GUAREÑA	12,17	N-8	VERDINA	12,83
R2-3	GUAREÑA	12,55	N-5	VERDINA	22,86
R2-4	GUAREÑA	15,73	N-9	VERDINA	21,70
R2-5	GUAREÑA	13,43	N-14	VERDINA	12,38
R2-6	GUAREÑA	17,15	OT-6	PARDINA	18,00
R2-7	GUAREÑA	16,96	OT-7	PARDINA	16,53
R2-8	GUAREÑA	15,91	N-7	PARDINA	14,01
R2-9	GUAREÑA	17,58	N-15	PARDINA	7,42
R2-10	GUAREÑA	20,11	N-18	PARDINA	6,26
R2-11	GUAREÑA	14,04	N-6	CASTELLANA PELADA	11,59
OT-1	GUAREÑA	15,20	N-16	CASTELLANA PELADA	8,19
OT-2	GUAREÑA	19,06	N-1	ROJA	11,31
OT-3	GUAREÑA	13,88	N-2	ROJA	9,99
OT-4	GUAREÑA	13,72	N-17	ROJA	9,61
OT-5	GUAREÑA	17,03	N-3	CAVIAR	12,87
OT-8	GUAREÑA	14,82	N-4	CAVIAR	9,07
OT-9	GUAREÑA	22,53	N-10	RÁPIDA	10,66

En comparación con los datos obtenidos por Han y Baik (2008), y Fernandez-Orozco, et al., (2003) los únicos artículos de la bibliografía consultada que usa el mismo tipo de ensayo (ABTS) usando el trolox para la expresión de los resultados, los datos son muy bajos. Esto también ocurría en el contenido de fenoles totales en el mismo artículo, por lo que valores tan bajos están relacionados con el bajo contenido fenólico.

En cuanto a la obtención de resultados tan bajos, interfieren todas las variables citadas para fenoles, como el tipo de disolvente, y la proporción de este; además de otros propios de la medición de la capacidad antioxidante. El ensayo de ABTS tiene algunas limitaciones. Algunos autores destacan que como el ABTS es el ensayo más corto, pueden no haber terminado al completo las reacciones, lo que no permitiría una lectura completa del contenido de antioxidantes. En relación a los otros dos ensayos habituales en la medición de actividad antioxidante, tanto el DPPH y el FRAP, ambos pueden tener interferencias en las longitudes de ondas usadas además de necesitar un mayor tiempo para completar el examen.

Se han obtenido réplicas muy buenas entre los dos análisis realizados a cada muestra de lentejas, teniendo en cuenta que se realizaron dos extracciones desde el inicio, partiendo de las lentejas trituradas. En base a las buenas réplicas obtenidas en la capacidad antioxidante de lentejas, se ha realizado una comparación entre las diferentes clases de lentejas y algunos de los factores que pueden influir en el resultado.

### **1.3. INFLUENCIA DE LAS VARIEDADES**

La amplia gama de lentejas, recopiladas en el apartado materiales y métodos, son muy diferentes morfológicamente en cuanto a la semilla se refiere, tanto en color, como en tamaño. Morales-Corts (2016) analiza tres tipos de lentejas (lenteja IGP de La Armuña, Pardin y Castellana), encontrando diferencias significativas tanto en cualidades morfológicas como diámetro y peso de 100g como en la composición nutricional en parámetros como proteínas, grasa, fibra y cenizas. Con este estudio se pretende conocer si también existe diferencia entre estas en la composición de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Las diferencias de coloración de las plantas muchas veces están relacionadas con fenoles, y carotenoides, presentando diferente capacidad antioxidante entre ellos y cada tipo de estos.



Según la bibliografía consultada las leguminosas con capa oscura, dentro de ellas las lentejas, poseían una alta capacidad antioxidante debido a elevados contenidos de taninos condensados (Takahata et al., 2001; Cardador-Martínez et al., 2002; Trozinska et al., 2002; Wu et al., (2004).

Las lentejas Guareñas y Rubias de la Armuña las consideraremos como dos variedades distintas con el fin de estudiar si hay diferencias entre ellas, aunque posteriormente se indague más en esta cuestión.

Con el fin de comprobar si existen diferencias significativas entre las variedades, se realizó un estudio estadístico partiendo de los valores obtenidos de las 60 muestras de lentejas analizadas por duplicado, agrupadas en los 9 tipos de lentejas distintos usados.

Las medias del contenido fenólico total se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 14. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las diferentes variedades.

<b>Variedad</b>	<b>Media (mgGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	25,50 <sub>ab</sub>	4,85	0,000
Rubia de la Armuña	27,32 <sub>b</sub>	5,48	
Castellana	30,55 <sub>b</sub>	6,28	
Verdina	32,25 <sub>b</sub>	7,40	
Pardina	23,99 <sub>ab</sub>	5,58	
Castellana pelada	16,49 <sub>a</sub>	4,19	
Roja	16,59 <sub>a</sub>	2,29	
Caviar	17,81 <sub>a</sub>	4,35	
Rápida	17,24 <sub>a</sub>	2,42	

El análisis con ANOVA se realiza con una significación del 95%.

La variedad Verdina, es la que mayor contenido medio en polifenoles presenta, seguida de la variedad Castellana, de la Rubia de La Armuña, de la Guareña y de la Pardina. En últimos lugares se encuentran muy próximas las variedades Caviar, Rápida, Roja y Castellana ordenadas en orden descendente.

Para observar las diferencias significativas de forma más clara al tratarse de varios conjuntos, se usa la herramienta pruebas post hoc Tukey b, para observar subconjuntos homogéneos.

Se muestran diferencias significativas entre algunos grupos de lentejas. Las variedades Castellana pelada, Roja, Rápida y Caviar presentan diferencias significativas con las

variedades Rubia de La Armuña, Castellana y Verdina. Mientras que las variedades Guareña y Pardina pertenecen a los dos subconjuntos, no mostrando diferencias significativas con el resto.

En esta leguminosa, las más oscuras de capa son las lentejas Pardina y Caviar, y no presentan contenidos más altos de fenoles totales.

Algunos autores ya han estudiado la diferencia del contenido fenólico entre diferentes variedades de lentejas. Hang y Baik (2008) estudian el contenido de fenoles totales de varias leguminosas entre las que se encuentran lentejas de la variedad Pardina y de la variedad Crimson o roja. No encuentran diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las dos variedades, al igual que ha sucedido en nuestro estudio entre dichas variedades. Por otro lado Fratianni et al., (2014) estudian el contenido de fenoles totales de dos tipos de lentejas, entre las que encuentra diferencias. El autor afirma que las diferencias en el contenido fenólico pueden ser debidas al tipo de lenteja, aunque también las asocia a la región geográfica de donde provienen y a diferentes condiciones en la extracción.

Las variedades pelada y roja, que corresponden con menor contenido de polifenoles, son lentejas desprovistas de su piel, lentejas peladas.

Las lentejas Castellanas peladas y Castellanas tienen diferencias significativas en cuanto al contenido de polifenoles. Son lentejas de la misma variedad, en las que unas presentan piel y las otras no. Aunque otras variables pueden afectar su contenido en polifenoles, ya que provienen de marcas comerciales diferentes, la diferencia es muy amplia entre ambas, llegando casi a doblar en el contenido de fenoles totales las Castellanas a las Castellanas peladas. En base a estos datos, al eliminar la piel el contenido de polifenoles baja sustancialmente. Han y Baik (2008) observaron una reducción aproximada del 88% de fenoles totales en lentejas, lo que indica que la mayoría de estos compuestos se encuentran en la envoltura y no en el cotiledón. Las lentejas eran el único tipo de leguminosa que presentaba una reducción tan notoria al retirar la envoltura, siendo los garbanzos los que tenían la segunda mayor reducción con el 37%.

Por otro lado, las medias de la capacidad antioxidante se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 15. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las diferentes variedades.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	15,21 <sub>abc</sub>	2,67	0,000
Rubia de La Armuña	16,21 <sub>bc</sub>	3,02	
Castellana	17,99 <sub>c</sub>	3,46	
Verdina	17,44 <sub>c</sub>	5,26	
Pardina	12,44 <sub>abc</sub>	5,17	
Castellana pelada	9,89 <sub>a</sub>	2,01	
Crimson o roja	10,30 <sub>a</sub>	1,38	
Caviar	10,97 <sub>ab</sub>	2,40	
Regular o rápida	10,66 <sub>ab</sub>	1,33	

Existen diferencias significativas entre algunas de las lentejas analizadas. Las lentejas Castellana pelada y roja son significativamente diferentes a la Rubia de La Armuña, Verdina y Castellana. Y las variedades Verdina y Castellana son significativamente diferentes respecto a las Castellana pelada, roja, Rápida y Caviar. Las variedades Pardina y Guareña no presentan diferencias con el resto de lentejas.

El tipo Castellana pelada, del mismo modo que sucedía en el caso de fenoles totales, es la que menor capacidad antioxidante presenta, seguida de la roja. Por otro lado la variedad Castellana es la que más capacidad antioxidante presenta, seguida de la variedad Verdina. En el caso de fenoles totales era la Verdina la que mayor contenido obtenía, seguida de la Castellana.

Oomah et al., (2010) comparan la capacidad antioxidante de dos tipos de lentejas, lentejas verdes y lentejas rojas, y guisantes. No encuentra diferencias significativas entre la capacidad antioxidante de los dos tipos en las extracciones realizadas con acetona, agua caliente y etanol, pero si encuentra diferencias significativas entre ambos tipos de lentejas cuando la extracción se realiza con agua, siendo superior la capacidad antioxidante de lentejas verdes. La capacidad antioxidante de las lentejas verdes es superior al de las lentejas rojas en todos los casos excepto en el que la extracción se realiza con agua caliente.

Xu y Chang (2010) estudia la capacidad antioxidante de 11 tipos de lentejas cultivadas en Estados Unidos, mediante la capacidad de barrido del radical peroxílico (PRSC) encontrando diferencias significativas entre las diferentes variedades. Tres de esas

variedades coinciden con algunas de este estudio, la Pardina, la Regular y la Crimson, presentando diferencias significativas entre ellas. En nuestro estudio esas variedades no presentan diferencias significativas. Las diferencias entre los resultados de ambos estudios están influenciadas por el método utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante además de que no coinciden todas las variedades.

Al igual que lo que ocurriera en el caso de fenoles totales, las dos lentejas con menor capacidad antioxidante son lentejas desprovistas de su envoltura o cáscara. Además existen diferencias significativas entre las Castellanas peladas y las Castellanas a las que no se les han eliminado su cáscara. La Castellana pelada es la que menor capacidad antioxidante presenta con 9,89 nmol Trolox equivalente/g, mientras que la Castellana es la que mayor actividad antioxidante presenta con 17,99 nmol Trolox equivalente/g, el descenso de la actividad antioxidante es sustancial. Este hecho ha sido comprobado por varios autores con anterioridad. La capa de semillas, en la que se encuentran principalmente compuestos fenólicos con estructuras flavonoides, presenta una mayor actividad antioxidante que el cotiledón en las lentejas (Amarowicz et al., 2000, Shahidi et al., 2001, Takahata et al., 2000). Por ello, la envoltura de semillas de las leguminosas podría utilizarse como una fuente natural de antioxidantes para reemplazar el uso de antioxidantes sintéticos en los alimentos (Ronzio et al., 1998). Además, según Han y Baik (2008), las grandes disminuciones en la actividad antioxidante de lentejas coincidió con la reducción aproximada del 88% en el contenido de fenoles total al eliminar la envoltura, lo que indica que los compuestos responsables de actividad antioxidante se distribuyen mayoritariamente en la envoltura.

#### **1.4. INFLUENCIA DEL ECOTIPO**

Dentro de la IGP lenteja de La Armuña se distinguen dos tipos, la Guareña y la Rubia de La Armuña. La Guareña se ha obtenido a partir de una selección en masa por tamaño y producción del ecotipo lenteja Rubia de La Armuña.

Las semillas de las dos tipos de lentejas cultivadas en La Armuña dentro de la IGP, proceden de una línea común, las diferencias morfológicas residen en su tamaño.

En cuanto al contenido nutricional, se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la cantidad de grasa y fibra, siendo superior en la variedad Guareña, y en el

contenido en magnesio, siendo superior en el ecotipo Rubia de la Armuña (Morales-Corts, 2016). Por otro lado del Río (2017) no encuentra diferencias significativas en ninguno de los grupos de los ácidos grasos (ácidos grasos saturados, monoinsaturados poliinsaturados e insaturados) entre ambos ecotipos, y solo encuentra diferencias significativas en uno de los 17 ácidos grasos presentes en ambos ecotipos.

Al igual que el contenido nutricional anteriormente descrito, se pretende investigar si existen diferencias significativas en cuanto al contenido de fenoles totales se refiere entre las lentejas Guareñas y Rubia de La Armuña cultivadas dentro de la IGP Lenteja de La Armuña.

Tabla 16. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas y Rubias de La Armuña.

<b>Variedad</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	25,50 <sub>a</sub>	4,85	0,178
Rubia de La Armuña	27,32 <sub>a</sub>	5,48	

El análisis con ANOVA se realiza con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

El contenido de fenoles totales es superior en el ecotipo Rubia de La Armuña que en el tipo Guareña. Aunque las lentejas del ecotipo Rubia de La Armuña tienen un mayor contenido, no existen diferencias significativas entre ambos tipos.

Al igual que anteriormente para el caso de fenoles, se pretende indagar en cómo afecta a la capacidad antioxidante la influencia del ecotipo de lenteja.

Tabla 17. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas y Rubias de La Armuña.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	15,21 <sub>a</sub>	2,67	0,178
Rubia de La Armuña	16,21 <sub>a</sub>	3,02	

La actividad antioxidante es superior en el ecotipo Rubia de La Armuña que en el tipo Guareña, como ya ocurriera en el contenido de fenoles totales. Aunque las lentejas del

ecotipo Rubia de La Armuña tienen un mayor contenido, no existen diferencias significativas entre ambos tipos, ya que la significación obtenida no es menor a 0,05.

Por tanto, entre ambos ecotipos no existen diferencias significativas en estos parámetros nutricionales, fenoles totales y capacidad antioxidante.

### 1.5. INFLUENCIA DE LA GENERACIÓN

En este apartado se pretenden comparar semillas certificadas del tipo Guareña de primera y segunda reproducción (R1 y R2 respectivamente).

No se ha encontrado ningún estudio que compare dicho parámetro en cuanto a contenido de fenoles totales, pero si la influencia de este en otros parámetros de la composición nutricional. Se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la cantidad de hidratos de carbono, hierro y proteína, siendo superior en semilla de primera reproducción el contenido de hierro y proteína, y en semilla de segunda reproducción los hidratos de carbono (Morales-Corts, 2016). También encuentra diferencias significativas del Río (2017) en algunos de los parámetros que estudia entre lentejas de primera y segunda reproducción, encontrando diferencias en los ácidos grasos saturados y en los ácidos grasos insaturados, además de encontrar diferencias significativas en cuatro ácidos grasos.

Para averiguar si existen diferencias significativas entre los 24 valores obtenidos para semillas de primera reproducción (R1), y los 22 valores obtenidos de las 11 muestras de segunda reproducción (R2) se realizó un estudio estadístico.

Tabla 18. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas de primera reproducción y de segunda reproducción.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
R1 Lenteja de primera reproducción	23,36 <sub>a</sub>	3,66	0,020
R2 Lenteja de segunda reproducción	26,21 <sub>b</sub>	4,49	

El análisis con ANOVA se realiza con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

El contenido de fenoles totales es superior en las lentejas de segunda reproducción que en las lentejas de primera reproducción, y además, entre ambas existen diferencias significativas ya que la significación entre ambas es menor a 0,05.

Del mismo modo, se comparan los valores obtenidos para la capacidad antioxidante de lentejas de primera reproducción y segunda reproducción.

Tabla 19. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas de primera reproducción y de segunda reproducción.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
R1 Lenteja de primera reproducción	14,03 <sub>a</sub>	2,02	0,022
R2 Lenteja de segunda reproducción	15,60 <sub>b</sub>	2,47	

Las lentejas de segunda reproducción obtienen valores más altos de capacidad antioxidante que las de primera reproducción. Como ya ocurriera en el caso de fenoles totales, sí existen diferencias significativas entre ambos tipos de lentejas. No se han encontrado artículos que estudien las posibles diferencias entre generaciones en cuanto a la capacidad antioxidante de lentejas.

Entre estos dos grupos de lentejas no solo existe la diferencia de generación, también han sido cultivadas en años diferentes. Las lentejas de primera reproducción fueron cultivadas durante la campaña 2014-2015. Por otro lado, las lentejas de segunda generación fueron cultivadas durante la campaña 2013-2014. Las características nutricionales de la lenteja están condicionadas por las características del cultivo y por las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo (Bhatty, 1988). Por tanto, el año en el que son cultivadas está claramente relacionado con las condiciones ambientales de dicho año, y estas con el contenido nutricional de las semillas.

Por todo ello, aunque existen diferencias significativas en el contenido fenólico total y en la capacidad antioxidante entre las semillas certificadas de primera generación y las semillas certificadas de segunda generación, no se puede concluir con exactitud que estas se deban a la generación de la que procede la semilla de lenteja y no a las diferencias climatológicas producidas entre las dos campañas.

## 1.6. DIFERENCIAS ENTRE GUAREÑA, JASPEADA Y MICROJASPEADA

Las lentejas de tipo Guareña pueden presentar en la superficie de las semillas unas motas de tonalidad más oscura. Estas, a su vez, pueden presentarse de dos tamaños.

Las lentejas con motas de menor tamaño se llaman microjaspeadas, mientras que si las motas son grandes se llaman jaspeadas.

Como ya se ha señalado en otro apartado anterior, el color de las semillas en legumbres puede estar relacionado con algunos compuestos fenólicos y con ello con la capacidad antioxidante, pero no se tiene constancia de la relación del moteado con estos compuestos. Para estudiar la relación del moteado sobre la composición de fenoles totales se realizó un estudio estadístico con los datos obtenidos de Guareñas jaspeadas, microjaspeadas y sin jaspeado cultivadas dentro de la IGP Lenteja de La Armuña.

Tabla 20. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas, Guareñas microjaspeadas y Guareñas jaspeadas.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	25,68 <sub>a</sub>	4,96	0,560
Microjaspeada	23,10 <sub>a</sub>	1,49	
Jaspeada	22,80 <sub>a</sub>	2,09	

Las lentejas Guareña sin jaspeado son las que mayor contenido en fenoles totales presentan, seguidas de las microjaspeadas y de las jaspeadas. No existen diferencias significativas entre las tres. El jaspeado o moteado no influye en el contenido fenólico total de las lentejas de la variedad Guareña.

Por otro lado, se realizó un estudio estadístico con los resultados obtenidos en la capacidad antioxidante.

Tabla 21. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas, Guareñas microjaspeadas y Guareñas jaspeadas.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña	15,31 <sub>a</sub>	2,73	0,560
Microjaspeada	13,88 <sub>a</sub>	0,82	
Jaspeada	13,72 <sub>a</sub>	1,15	



Al igual que se diera en fenoles totales, las lentejas Guareña sin jaspeado son las que mayor actividad antioxidante presentan, seguidas de las microjaspeadas y de las jaspeadas. Entre estos tipos de lentejas no existen diferencias significativas entre las tres, ya que la significación es mayor a 0,05.

Por tanto, podemos concluir que el jaspeado o moteado no influye en la capacidad antioxidante, del mismo modo que ocurría en el caso de fenoles totales.

### 1.7. INFLUENCIA DE LA IGP

El cultivo de las lentejas en la IGP Lenteja de La Armuña se realiza bajo las condiciones climáticas y edáficas que se dan en la zona norte de la Provincia de Salamanca. El cultivo en la región de La Armuña le confiere a la IGP unas cualidades determinadas, además de una reputación.

Las lentejas cultivadas fuera de la IGP, han sido cultivadas en las provincias de Albacete, Burgos, Guadalajara y Valladolid. Tanto las lentejas cultivadas dentro y fuera de la IGP se cultivan en el centro de España. Todas las zonas se ven afectadas por el mismo tipo de clima, el clima continental. Aunque todas las zonas estén afectadas por el mismo clima, cada zona se ve afectada por un microclima diferente.

En este apartado se pretende averiguar si existen diferencias significativas en el contenido de fenoles totales y en la capacidad antioxidante entre las lentejas del tipo Guareña dentro de la IGP, y las lentejas de la mismo tipo cultivadas fuera de la IGP, viendo así la influencia de las características de la región en el contenido de compuestos fenólicos.

Ambas variables se analizan estadísticamente por separado.

Tabla 22. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Guareñas cultivadas dentro y fuera de la IGP Lenteja de La Armuña.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña dentro IGP	24,58 <sub>a</sub>	4,15	0,001
Guareña fuera IGP	30,07 <sub>b</sub>	5,69	

El análisis con ANOVA se realiza con una significación del 95%.

El contenido de fenoles totales es superior en las lentejas cultivadas fuera de la IGP Lenteja de La Armuña, que los obtenidos en lentejas cultivadas dentro de la IGP, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 23. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Guareñas cultivadas dentro y fuera de la IGP Lenteja de La Armuña

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Guareña dentro IGP	14,70 <sub>a</sub>	2,29	0,001
Guareña fuera IGP	17,73 <sub>b</sub>	3,13	

Igualmente se observa que sí existen diferencias significativas entre las lentejas cultivadas dentro y fuera de la IGP, siendo superior la capacidad antioxidante de las lentejas Guareñas cultivadas fuera de la IGP.

Las condiciones ambientales tienen una influencia significativa sobre la composición química de las leguminosas (Al-Karaki, et al., 1997). Por tanto las condiciones que se dan en la región de La Armuña parece que sí afectan significativamente a la capacidad antioxidante de las lentejas además de a su contenido fenólico total. Aunque en otro estudio realizado por del Río (2017) no encuentra diferencias significativas en los ácidos grasos de lentejas cultivadas dentro y fuera de la IGP Lenteja de La Armuña.

### **1.8. INFLUENCIA DE LA SELECCIÓN DE SEMILLA**

En la IGP Lenteja de La Armuña se han utilizado a lo largo de los años la semilla recolectada por el agricultor para la siembra en campañas posteriores. Por otro lado, y de forma más reciente, se ha introduciendo semilla seleccionada por el ITACYL.

La selección se ha realizado para el ecotipo Rubia de la Armuña con el fin de obtener una mejora en la pureza de la semilla, evitando así la posible heterogeneidad sufrida con los años, lo cual puede derivar en que no se cumplan los parámetros descritos en el pliego de condiciones de la IGP.

Tabla 24. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de las lentejas Rubias de La Armuña seleccionada y propia del agricultor.

<b>Tipo de Lenteja</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Rubia de La Armuña seleccionada	28,01 <sub>a</sub>	5,64	0,565
Rubia de La Armuña agricultor	26,45 <sub>a</sub>	5,54	

El contenido de fenoles totales es superior en las lentejas seleccionada por el ITACYL del ecotipo Rubia de La Armuña, que los obtenidos en las semillas procedentes del uso del agricultor. Sin embargo, entre lentejas seleccionadas y usadas por el agricultor no existen diferencias significativas en relación al contenido de fenoles totales.

Tabla 25. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de las lentejas Rubias de La Armuña seleccionada y propia del agricultor.

<b>Tipo de lenteja</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Rubia de La Armuña seleccionada	16,59 <sub>a</sub>	3,11	0,565
Rubia de La Armuña agricultor	15,73 <sub>a</sub>	3,05	

El análisis con ANOVA se realiza con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

Igualmente, la capacidad antioxidante obtenida en las lentejas seleccionadas es mayor que la obtenida en las semillas procedentes del uso del agricultor, pero entre ellas no existen diferencias significativas, al igual que sucedía en el contenido fenólico total.

Del Río (2017) estudia la influencia de la selección de semilla en el perfil lipídico de lentejas Rubia de La Armuña, no encontrando diferencias significativas, al igual que lo ocurrido en nuestro estudio tanto en fenoles individuales y en capacidad antioxidante.

La adquisición de semillas certificadas por parte del agricultor puede otorgarle beneficios en cuanto a resistencias a plagas y enfermedades se refiere, además de plantas más homogéneas, lo que facilita las diferentes labores a realizar sobre el cultivo, como por ejemplo el abonado; pero no tiene influencia sobre estos parámetros.

## **1.9. INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO**

Como se ha indicado anteriormente, las condiciones ambientales influyen en el contenido nutricional de las lentejas, entre ellas el tipo de suelo.

En este apartado se pretende averiguar la influencia del tipo de suelo en el contenido de fenoles totales y en la capacidad antioxidante de lentejas. Para ello partimos solo de lentejas cultivadas dentro de la IGP, que son de las cuales tenemos información en cuanto al suelo.

La IGP Lenteja de La Armuña engloba un total de 34 municipios inscritos, pero en la siguiente imagen se describen los tipos de suelo predominantes de los municipios donde se han recogido las muestras de las lentejas Rubia de La Armuña y Guareñas cultivadas dentro de la IGP utilizadas en el presente estudio.

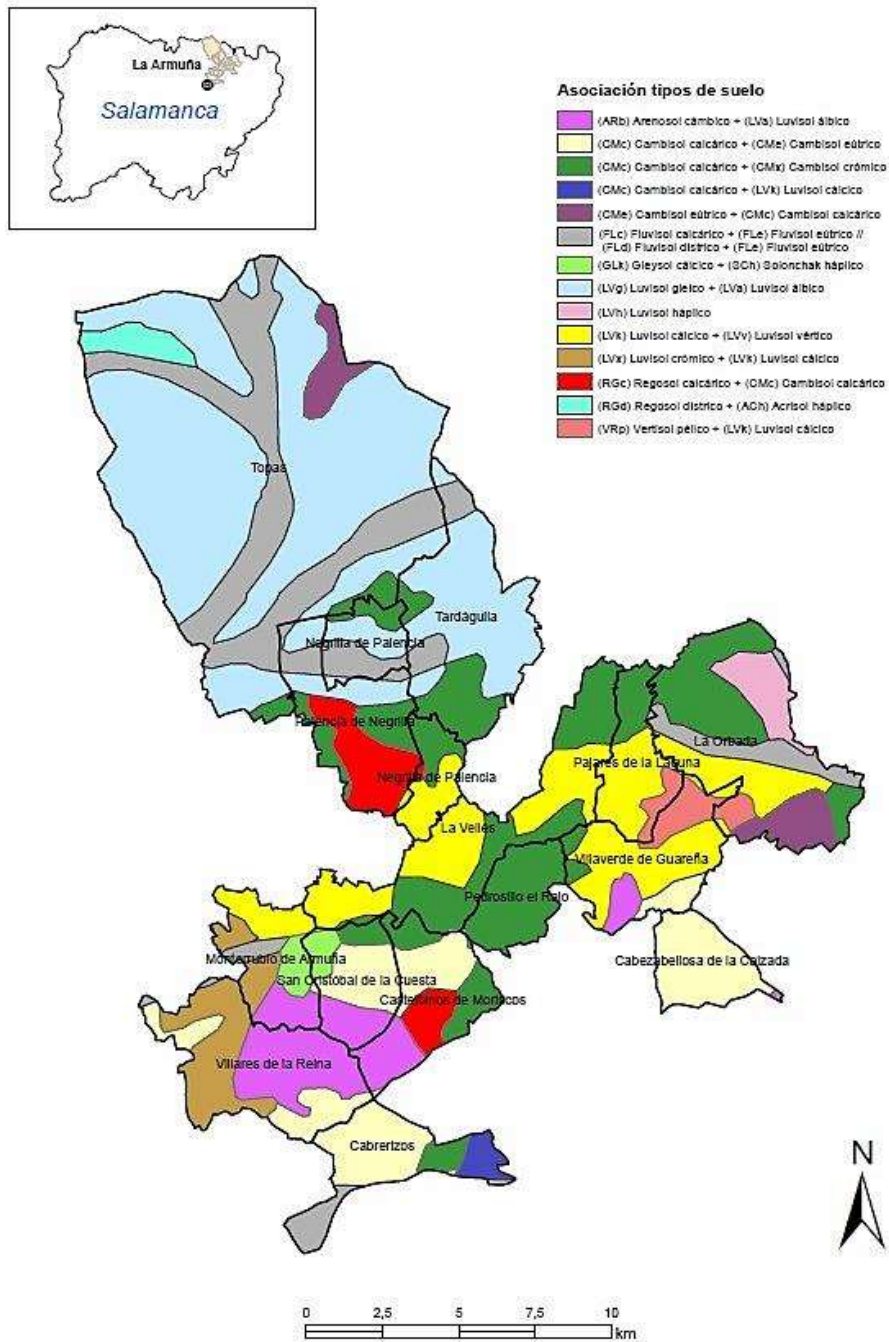


Figura 49. Plano de términos municipales y tipos de suelos en los que se han recogido las muestras de lenteja realizado por el IRNASACSIC (Morales-Corts, 2016).

Existen catorce tipos de suelo en la zona anteriormente descrita en el plano. En algunos términos municipales se encuentran varios tipos de suelo. Por ello es necesario agrupar los distintos suelos en categorías, con el fin de asignar a cada término municipal el tipo de suelo predominante para facilitar el posterior análisis estadístico.

Tabla 26. Tipo de suelo predominante en cada término municipal

<b>Término municipal</b>	<b>Tipo de suelo</b>	<b>Suelo predominante</b>
Cabezabellosa de la Calzada	CMc+Cme	Vertisol Pélico
Cabrerizos	CMc+Cme	Vertisol Pélico
Castellanos de Moriscos	CMc+CMx	Vertisol Pélico
La Orbada	CMc+CMx	Vertisol Pélico
La Vellés	LVk+LVv	Luvisol Cálcico
Monterrubio de la Armuña	LVk+LVv	Luvisol Cálcico
Negrilla de Palencia	LVk+LVv	Luvisol Cálcico
Pajares de la Laguna	LVk+LVv	Luvisol Cálcico
Palencia de Negrilla	CMc+CMx	Vertisol Pélico
Pedrosillo el Ralo	CMc+CMx	Vertisol Pélico
San Cristóbal de la Cuesta	CMc+Cme	Vertisol Pélico
Tardáguila	LVg+Lva+CMc	Luvisol Gleico y Cambisol Calcárico
Topas	LVg+LVa	Luvisol Gleico-Álbico
Villares de la Reina	LVk+ARbCme+CMc	Luvisol Cálcico
Villaverde de Guareña	LVk+LVv+VRp	Vertisol Pélico

Al agrupar los diferentes tipos de suelo en función del predominante, se han obtenido 5 tipos de suelo.

Del Río, en su trabajo sobre la composición de ácidos grasos en lentejas D.O. Armuña (2017) encontró una influencia de los diferentes tipos de suelo en cuanto a la composición de ácidos grasos, de modo que los suelos luvisol gleico y cambisol calcárico, luvisol cálcico y cambisol calcárico presentaban valores de ácidos grasos similares, mientras que el vertisol pélico presentaba diferencias con los anteriores.

Se ha realizado un estudio estadístico general de los tipos de lentejas estudiados pertenecientes a la IGP, englobándose conjuntamente Guareñas y Rubias de la Armuña. Como en este estudio pueden influir otros factores como el tipo de lenteja, también se ha estudiado estadísticamente la influencia del suelo para conjuntos más pequeños con características comunes:

- Rubia de La Armuña.
- Guareña.

### 1.9.1. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS CULTIVADAS EN LA IGP

En este apartado se ha realizado un estudio estadístico comparando los datos obtenidos de fenoles toles y en la capacidad antioxidante en las lentejas Guareñas y Rubias de La Armuña agrupándolas en función de los tipos de suelos descritos en el apartado anterior.

Tabla 27. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo.

<b>Tipo de suelo</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Cambisol calcárico	23,51	3,89	0,034
Luvisol cálcico	25,65	4,58	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	27,01	5,77	
Luvisol gleico-álbico	26,63	0,05	
Vertisol pélico	28,93	5,05	

El contenido de fenoles totales es superior en las lentejas cultivadas en suelos donde predomina el Vertisol Pélico, siendo en el Cambisol Calcárico donde menor contenido se obtiene.

Cuando se aplica el test Tukey b para detectar diferencias significativas entre muestras se observa que aunque entre los diferentes tipos de suelos si existen diferencias significativas según el ANOVA  $\alpha=0,05$ , debido a la sensibilidad de la herramienta usada para la división entre subgrupos, esta no es capaz de realizar divisiones con los datos obtenidos.

Por otro lado, se realiza un estudio estadístico para observar si existen diferencias significativas entre los 5 tipos de suelos para la capacidad antioxidante de lentejas Rubia de la Armuña y Guareñas cultivadas dentro de la IGP.

Tabla 28. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo.

<b>Tipo de suelo</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Cambisol calcárico	14,12	2,14	0,034
Luvisol cálcico	15,29	2,52	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	16,04	3,18	
Luvisol gleico-álbico	15,83	0,03	
Vertisol pélico	17,10	2,78	

El Cambisol Calcárico es el tipo de suelo con menor capacidad antioxidante, seguido del Luvisol Cálculo, Luvisol Gleico y Cambisol Calcárico, Luvisol Gleico-Álbico, hasta el Vertisol Pélico que es el tipo suelo con mayor capacidad antioxidante. Este pues destaca por su elevado contenido en fenoles totales y actividad antioxidante como también se diferencian en los ácidos grasos (del Río, 2017).

Tras el análisis estadístico con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ ; se observa que si existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelos predominantes dentro de la IGP. Aunque si existen diferencias significativas, debido a la sensibilidad del post hoc Tukey-b, no es capaz de realizar divisiones en subconjuntos homogéneos con los datos obtenidos.

Para analizar de forma más exacta solo la influencia del suelo en el contenido de fenoles totales y en la capacidad antioxidante en lentejas, se dividen las muestras atendiendo al tipo de lenteja al que pertenecen. Estudiándose por un lado los datos de fenoles totales de lentejas Rubias de La Armuña y por otro las lentejas Guareñas.

### 1.9.2. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS RUBIA DE LA ARMUÑA

Como ya se ha señalado en el apartado anterior, con el objetivo de ver la influencia del suelo, en este apartado se va a estudiar la influencia de los diferentes tipos de suelo en las lentejas de tipo Rubia de la Armuña. Las lentejas Rubia de la Armuña se han cultivado en 7 pueblos, los cuales corresponden a 4 tipos de suelos, a diferencia de lo ocurrido en el apartado anterior donde el conjunto de las muestras pertenecían a cinco tipos de suelos diferentes.

Tabla 29. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Rubia de La Armuña.

Tipo de suelo	Media (gGAE/100g)	Desviación típica	Significación
Cambisol calcárico	22,68 <sub>a</sub>	5,03	0,003
Luvisol cálculo	30,86 <sub>ab</sub>	2,03	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	32,02 <sub>b</sub>	0,511	
Vertisol pélico	30,57 <sub>ab</sub>	0,91	



El análisis con ANOVA se realiza con una significación del 95%.

Existen diferencias significativas entre el Cambisol Calcárico y el Luvisol Gleico + Cambisol Calcárico; mientras el Vertisol Pélico, y el Luvisol Cálculo no presentan diferencias con el resto de los suelos.

Aunque tanto en este apartado como en el anterior se encuentran diferencias significativas, no coincide el tipo de suelo con mayor contenido fenólico total en lentejas. En el apartado anterior el Vertisol Pélico es el suelo con mayor contenido, mientras que en este apartado este tipo de suelo es el segundo con menor contenido fenólico. Por el contrario, el Cambisol Calcárico es el que menor contenido fenólico presenta en ambos apartados.

Tabla 30. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Rubia de La Armuña.

<b>Tipo de suelo</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Cambisol calcárico	13,66 <sub>a</sub>	2,77	0,003
Luvisol cálcico	18,16 <sub>ab</sub>	1,12	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	18,80 <sub>b</sub>	0,28	
Vertisol pélico	18,00 <sub>ab</sub>	0,50	

Como en los fenoles totales, se encuentran diferencias significativas entre el Cambisol Calcárico que es el que menor actividad antioxidante presenta, y el Luvisol Gleico y Cambisol Calcárico; mientras que los otros dos tipos de suelos no presentan diferencias significativas entre ellos ni con el resto de suelos.

Para este tipo de lentejas destacan los bajos contenidos de fenoles totales y por tanto de actividad antioxidante de las muestras cultivadas en el cambisol calcárico.

### **1.9.3. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS GUAREÑA**

Para confirmar las diferencias significativas anteriormente observadas, en este apartado se realiza un estudio comparativo de los diferentes tipos de suelo con los datos obtenidos para el tipo Guareña.

Tabla 31. Contenido de fenoles totales expresado en mgGAE/100g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Guareñas.

<b>Tipo de suelo</b>	<b>Media (gGAE/100g)</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Cambisol calcárico	23,85 <sub>a</sub>	3,43	0,153
Luvisol cálcico	23,92 <sub>a</sub>	3,79	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	24,50 <sub>a</sub>	5,50	
Luvisol gleico-álbico	26,62 <sub>a</sub>	0,05	
Vertisol pélico	28,39 <sub>a</sub>	5,84	

No existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelos con las muestras obtenidas de las lentejas del tipo Guareña.

Para el análisis estadístico de la influencia del suelo sobre la capacidad antioxidante se han dividido los resultados obtenidos en función del suelo predominante en cada municipio.

Tabla 32. Capacidad antioxidante expresada en ng Trolox/g de los diferentes tipos de suelo con datos obtenidos de lentejas Guareñas.

<b>Tipo de suelo</b>	<b>Media ng Trolox/g</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Significación</b>
Cambisol calcárico	14,30 <sub>a</sub>	1,89	0,153
Luvisol cálcico	14,34 <sub>a</sub>	2,09	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	14,66 <sub>a</sub>	3,03	
Luvisol gleico-álbico	15,83 <sub>a</sub>	0,03	
Vertisol pélico	16,80 <sub>a</sub>	3,22	

No se han obtenido diferencias significativas entre los 5 tipos de suelos con los datos de capacidad antioxidante de lentejas tipo Guareña.

En ambos parámetros, capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales, destaca que fue el suelo vertisol pélico el que presentó mayores valores, al igual que ocurría cuando se consideraban en conjunto lentejas del tipo Guareña y Rubia de La Armuña, además este suelo también era el que mayores diferencias presentaba cuando se consideró la influencia del suelo sobre otros parámetros nutricionales como los ácidos grasos (del Río, 2017).

En conjunto se observa que el cambisol calcárico tiende a dar contenidos más bajos de capacidad antioxidante y de fenoles totales, mientras que el vertisol pélico tiende a dar cantidades más altas. Las diferencias del vertisol pélico con los otros suelos pueden ser debidas a la cantidad de calcio, propiedad común de los suelos cambisol calcárico, luvisol cálcico, y luvisol gleico y cambisol calcárico.

En base a los datos obtenidos en este apartado dada que no se encuentran diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelo, aunque se encontraran diferencias significativas entre los tipos de suelos para el tipo Rubia de La Armuña, y en el conjunto entre Guareña y Rubia de La Armuña, no se puede afirmar que el tipo de suelo influya en la composición de fenoles totales y en la capacidad antioxidante de lentejas dado que los resultados varían fuertemente en función del conjunto de muestras consideradas. Además se ha realizado una generalización del suelo de cada municipio en función de la predominancia de este, pero no se sabe con exactitud el tipo de suelo en cada parcela de las que provienen las lentejas. Además del tipo de suelo, en las condiciones edáficas influyen otros factores como textura y estructura de este, pH, etc.

## **2. FENOLES INDIVIDUALES**

### **2.1. PERFIL CROMATOGRÁFICO**

Además de estudiar la influencia de los diferentes factores considerados sobre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante, se pretende discutir la influencia de los mismos sobre los diferentes grupos de fenoles presentes en las semillas de lentejas.

Para ello se parte del análisis cromatográfico, mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de los extractos de metanol obtenidos tras la extracción con ultrasonidos de las semillas de lenteja.

Por último se pretende establecer la existencia de correlaciones significativas entre todos los parámetros estudiados.

Se han revisado los 120 cromatogramas pertenecientes a las 60 muestras extraídas analizadas por duplicados, encontrándose zonas comunes en todos los cromatogramas. El primer pico que corresponde a un compuesto fenólico aparece entre los minutos 2 y 3, y también es común a todos los cromatogramas, además de que es el que presenta una

mayor área a lo largo del perfil en todos los cromatogramas. Debido a que es el mayor y común este se ha eliminado de los gráficos que se muestran, con el fin de ampliar el perfil base para que se aprecien mejor el resto de picos. Por tanto, el eje de ordenadas es ampliado hasta los 100 mAU, mientras que el eje de abscisas es ampliado desde los 2 minutos hasta los 35, ya que después de este tiempo no se observa nada en el perfil.

Las lentejas Guareñas; R1, R2, y algunas de las lentejas que engloban el grupo denominado OT; es el grupo de lentejas con mayor número de muestras, 30, lo que suponen un total de 60 cromatogramas. Revisados los cromatogramas pertenecientes a este grupo se seleccionan 5 tipos de cromatogramas representativos que presentan entre ellos algunas diferencias.

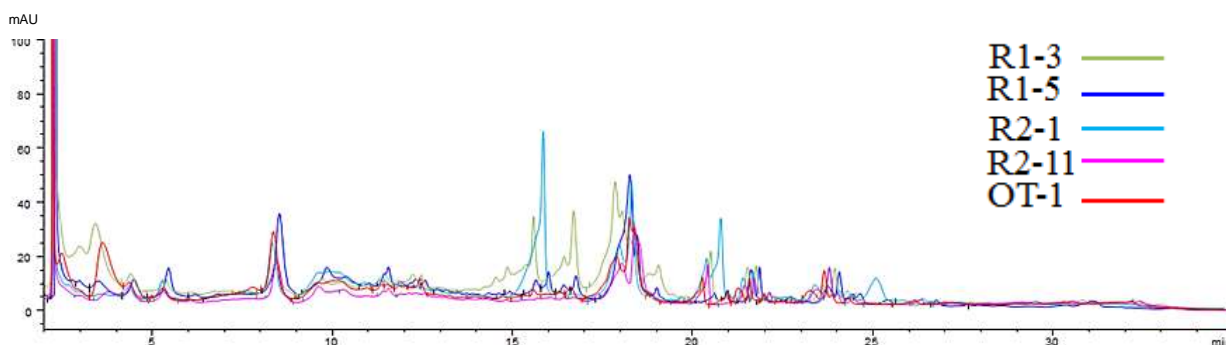


Figura 50. Comparativa de los 5 tipos de perfiles presentes en lenteja Guareña.

Haber encontrado 5 tipos de perfiles diferentes en este grupo de lentejas puede ser debido al gran número de muestras que lo engloban. Las mayores diferencias se encuentran entre el minuto 15 y 19, ya que algunos perfiles no presentan picos y otros los presentan de forma notoria. La muestra R1-3 presenta una serie de picos de tamaño considerable, mientras que la muestra R2-1 solo presenta un pico, siendo este el de mayor dimensión después del pico que aparece a los 2 minutos aproximadamente del análisis. Estos dos contrastan con los perfiles de las muestras R2-11 y OT-1 que no presentan picos en esa zona. Además entre el minuto 3 y 4 también se presentan diferencias, el perfil R1-3 y OT-1 muestran picos en ese minuto, mientras que R2-1 y R2-11 no presentan esos picos. El cromatograma representativo del grupo Guareña, siendo este escogido por su mayor repetitividad en el conjunto de las muestras, es el perteneciente a la muestra R1-5. Este cromatograma se diferencia principalmente del resto de los comparados en dos zonas, en la comprendida entre el minuto 3 y 4, y la

comprendida entre los minutos 15 y 17. Entre el minuto 3 y 4 el cromatograma representativo presenta picos de tamaño inferior a los que presentan los cromatogramas R1-3 y OT-1. Por otro lado, entre los minutos 15 y 17 no aparecen picos de grandes dimensiones en el representativo a diferencia de lo ocurrido en los cromatogramas R1.3 y R2-1.

Las muestras de la lenteja pertenecientes al tipo Rubia de La Armuña son las codificadas como ERda, y se componen de 9 muestras. A diferencia que en el caso de las lentejas tipo Guareña, en estas solo se encuentran dos tipos de perfil en los cromatogramas.

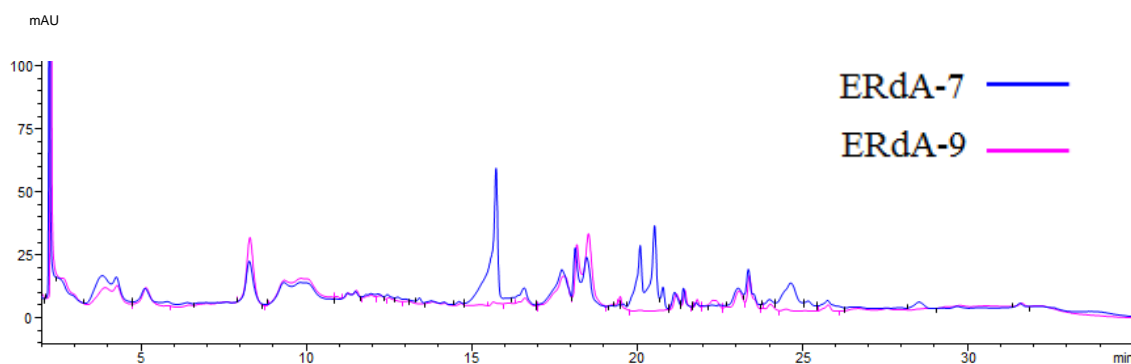


Figura 51. Comparativa de los 2 tipos de perfiles presentes en lenteja Rubia de la Armuña.

Las diferencias se encuentran en el minuto 15, en el minuto 20 y en el minuto 24. La muestra codificada como ERdA-7 presenta mayor número de picos, ya que presenta picos en los minutos anteriormente citados mientras que la muestras codificada como ERdA-9 no presenta picos en esas zonas. El perfil representativo de las lentejas Rubia de La Armuña es el perteneciente a la muestra ERdA-9. Su perfil base es similar al de la muestra R1-5, la representativa de la Guareña.

En el resto de grupos, el perfil a lo largo del cromatograma es más similar dentro de cada grupo, existiendo solo un tipo de perfil por grupo. Así los cromatogramas tipo de lentejas de tipo Castellana, Caviar, Pardina, Castellana Pelada, Crimson o roja, Rápida, Verdina, Rubia de La Armuña y Guareña son los siguientes respectivamente.

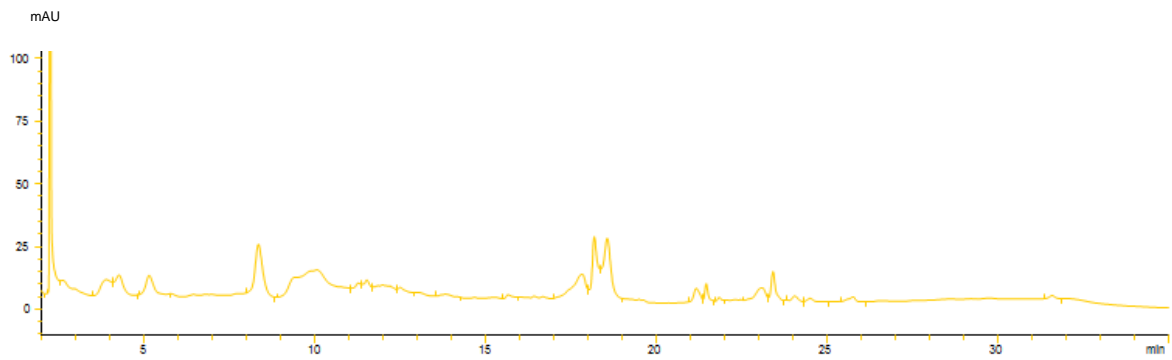


Figura 52. Cromatograma tipo de lenteja Castellana.

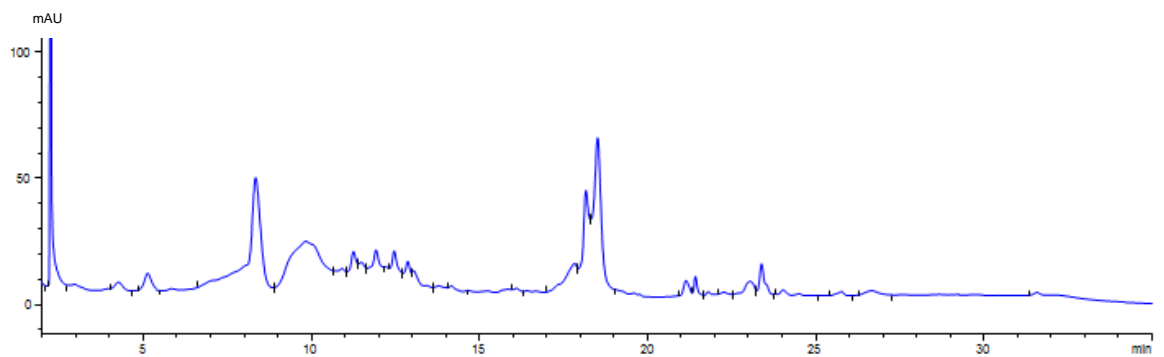


Figura 53. Cromatograma tipo de lenteja Caviar.

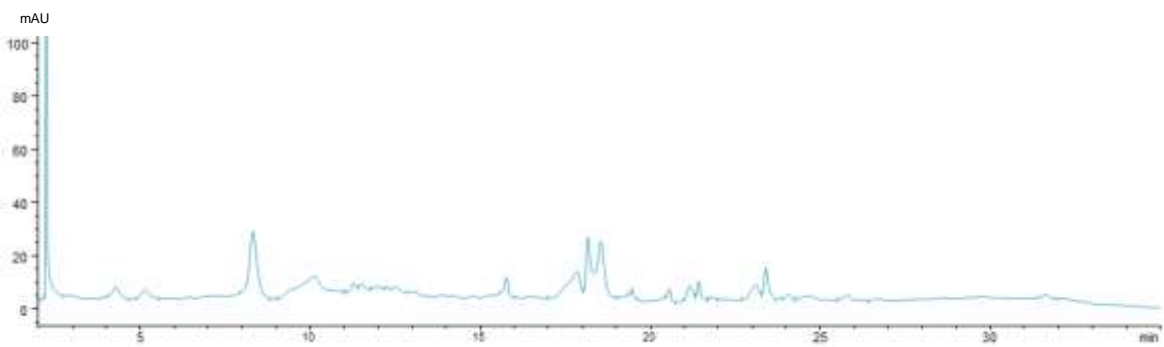


Figura 54. Cromatograma tipo de lenteja Pardina.

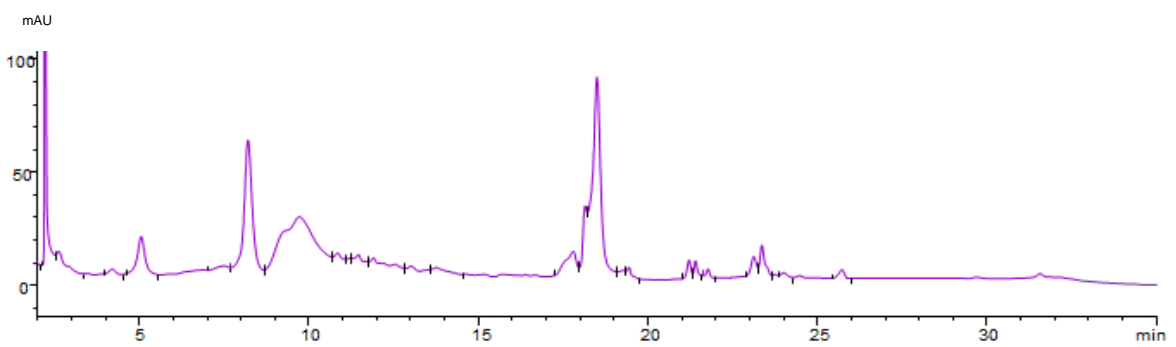


Figura 55. Cromatograma tipo de lenteja Castellana pelada.

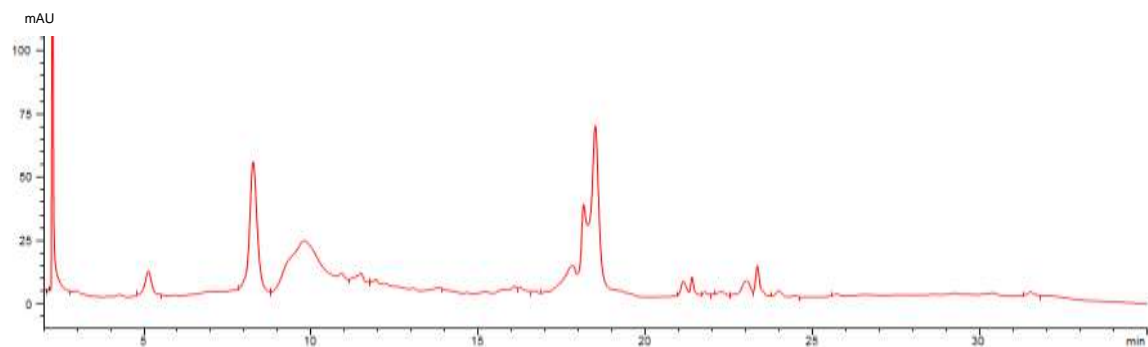


Figura 56. Cromatograma tipo de lenteja roja.

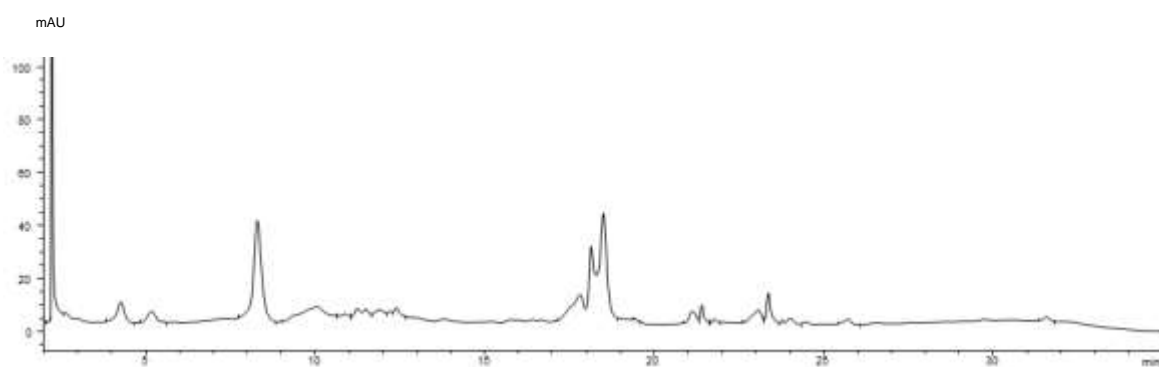


Figura 57. Cromatograma tipo de lenteja rápida.

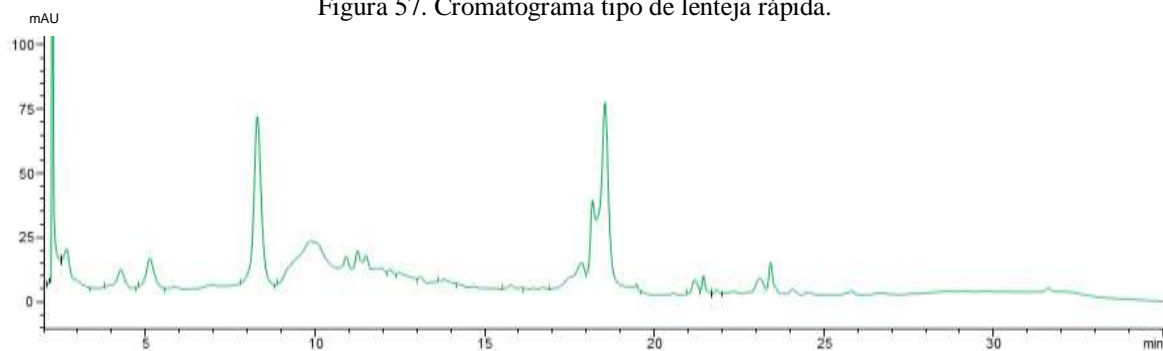


Figura 58. Cromatograma tipo de lenteja Verdina.

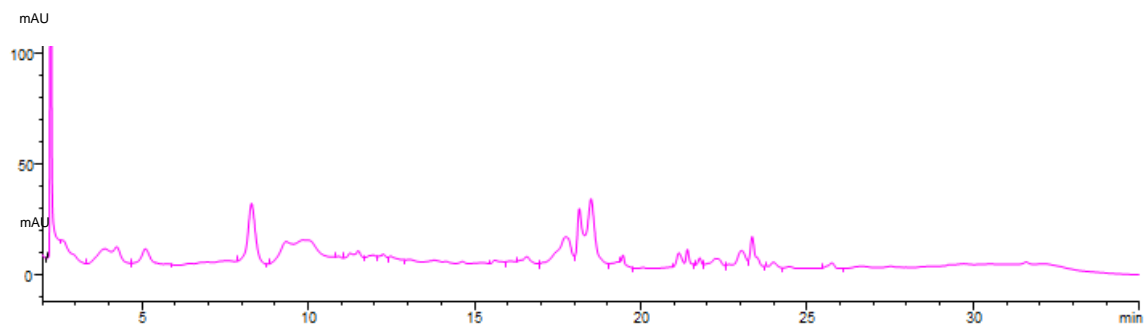


Figura 59. Cromatograma tipo de lenteja Rubia de La Armuña.

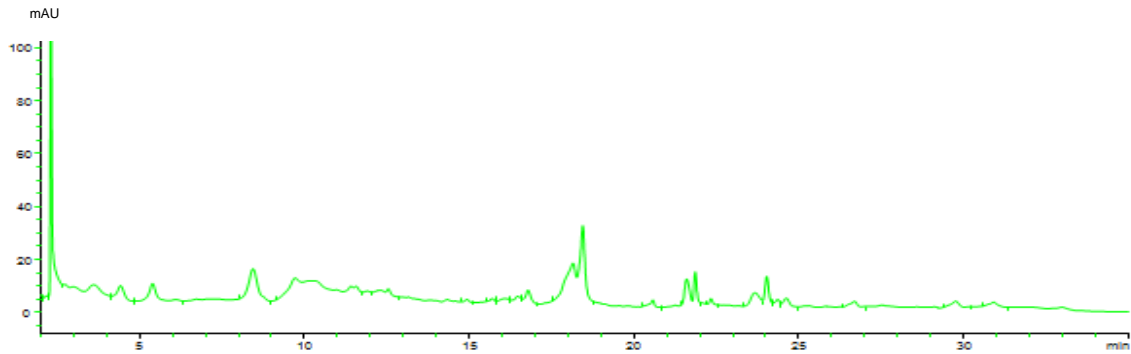


Figura 60. Cromatograma tipo de lenteja Guareña.

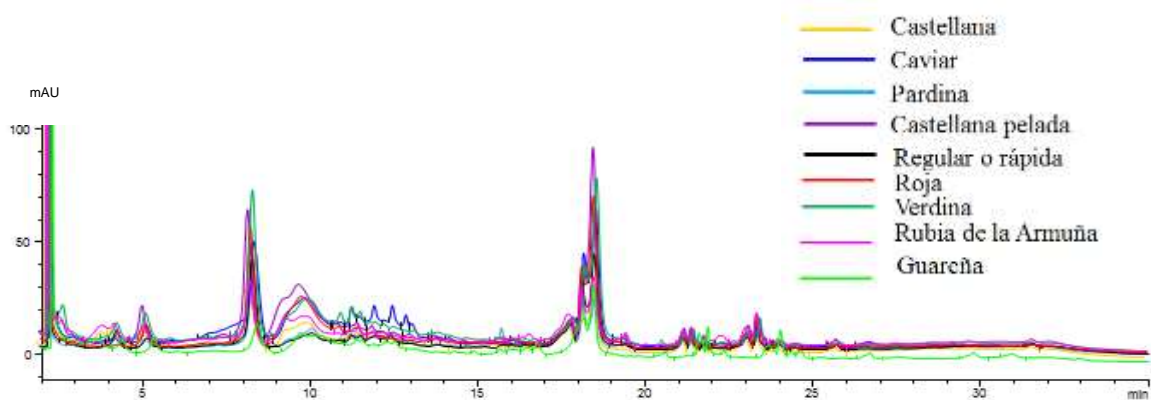


Figura 61. Comparativa de los cromatogramas de los 9 tipos de lenteja estudiados.

Los cromatogramas representativos de los diferentes tipos de lentejas son muy similares, y los mayores cambios se producen en el tamaño de los picos. Destaca un pico en el minuto 15 en lentejas Pardinas que no aparece en el resto de cromatogramas representativos. Este mismo pico fue observado en algunas lentejas del tipo Guareña y Rubia de La Armuña, pero en estas de mayor tamaño. Por tanto, el cromatograma que presenta más número de picos no es ninguno de los representativos, sino que es uno de los tipos expuestos con anterioridad en la comparativa de las lentejas del tipo Rubia de La Armuña, la muestra ERdA-7. Este cromatograma nos ayudará a la hora de nombrar cada uno de los picos presentes en los diferentes cromatogramas.



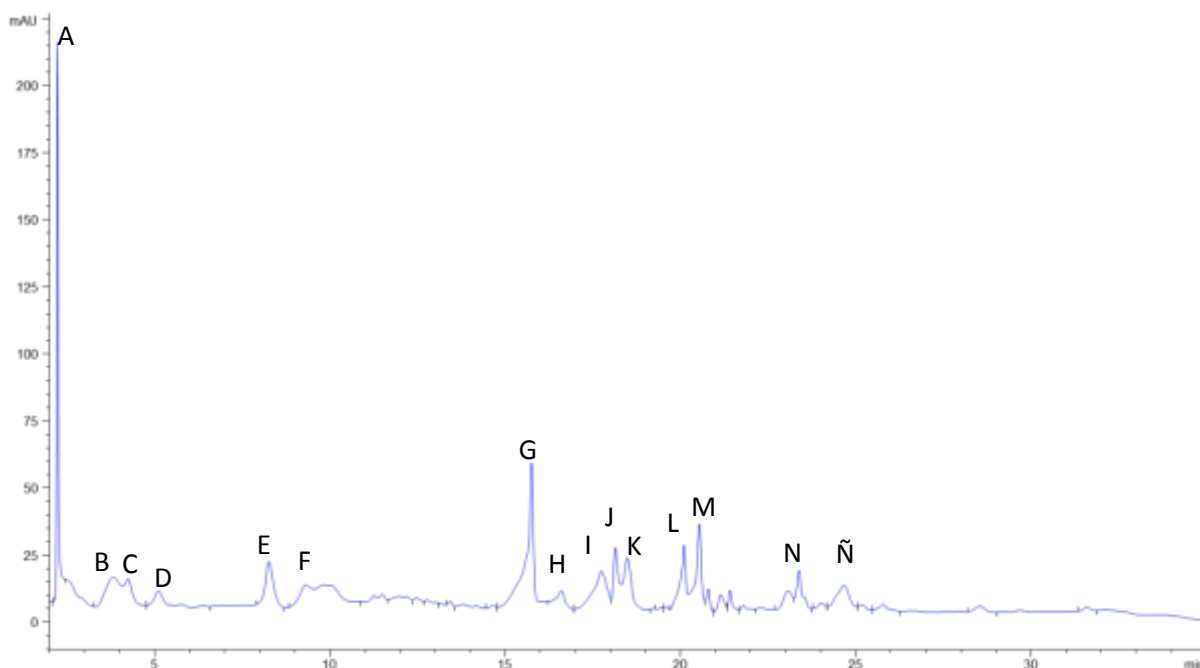


Figura 62. Cromatograma de la muestra ERdA-7 y los picos identificados. Tiempos de retención: pico A (Rt: 2,242), pico B (Rt: 3,827), pico C (Rt: 4,261), pico D (Rt: 5,15), pico E (Rt:8,273), pico F (9,808), pico G (Rt: 15,757), pico H (Rt: 16,583), pico I (Rt: 17,757), pico J (Rt: 18,153) , pico K (Rt: 18,493), pico L (Rt: 20,106), pico M (Rt: 20,541), pico N (Rt: 23,373), pico Ñ (Rt: 24,65).

Se han observado 15 picos, nombrados con letras desde la A hasta la Ñ. Todos los picos son identificados a 280nm. Los picos identificados a 330nm coincidían con algunos de los ya identificados a 280nm, pero presentaban menor área que los identificados a 280nm. La duración del análisis cromatográfico es de 50 minutos, pero a partir de los 25 minutos no se encuentra ningún pico. El pico con mayor área es el A. Los picos E, I, J y K son los picos de mayor tamaño en casi todos los cromatogramas después del A, existiendo por tanto tres puntos dominantes, el pico A, el pico E y la zona del pico I, J y K ambos consecutivos. Mientras que los picos G y H no aparecen en la mayoría de los cromatogramas.

Aguilera et al., (2010) realizan un estudio los de fenoles individuales en lentejas de la variedad Pardina. El cromatograma de lentejas crudas presenta mayor cantidad de picos que en nuestro perfil, de los cuales identifica 29 picos.

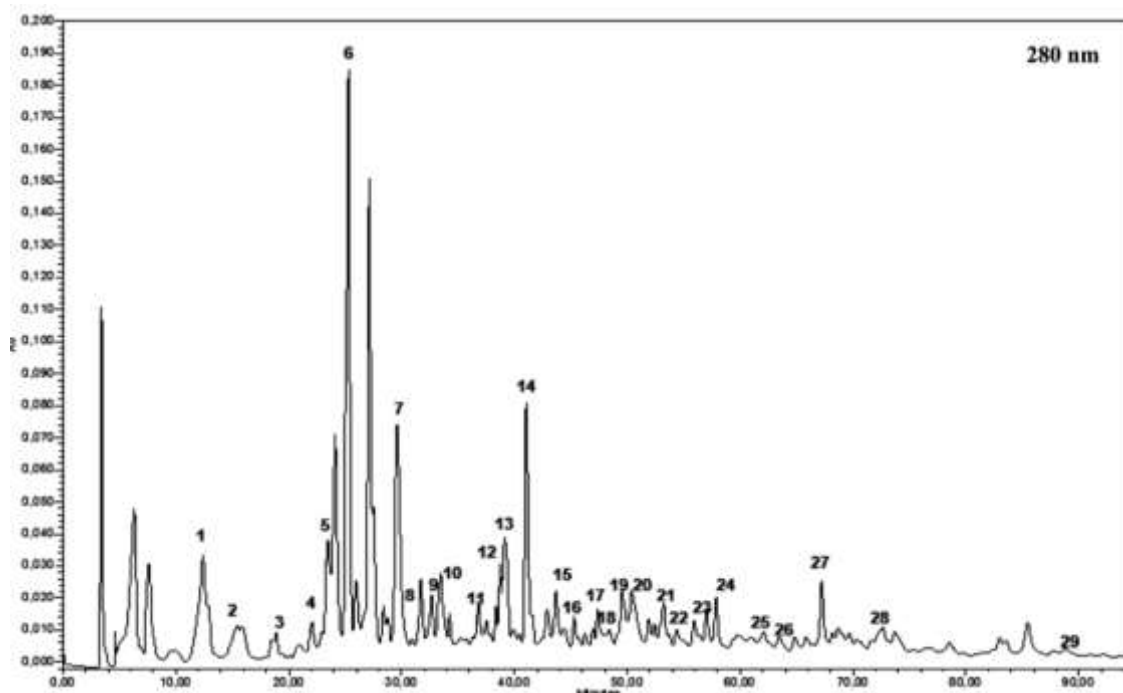


Figura 63. Cromatograma obtenido con HPLC a 280nm. (Aguilera., et al, 2010).

El análisis cromatográfico tiene una duración de 90 minutos, la mayor concentración de picos se encuentra entre los 20 y 60 minutos del análisis, en los que identifica 21 de los 29 picos. En la zona de máxima concentración se observan los 3 picos con mayor concentración. Apenas existen similitudes entre este perfil y el nuestro, ya que en el nuestro la zona de mayor concentración se encuentra en el principio del análisis. La única similitud es la existencia de 3 picos que destacan sobre el resto.

Fратиanni et al., (2014), realizan un estudio en el cual comparan el contenido de fenoles individuales de dos ecotipos de lentejas, además de otras leguminosas. A diferencia que en nuestro estudio, y el realizado por Aguilera et al., (2010), el análisis se realiza mediante UPLC, un tipo de cromatografía líquida que reduce los tiempos de análisis y el gasto de fase móvil.

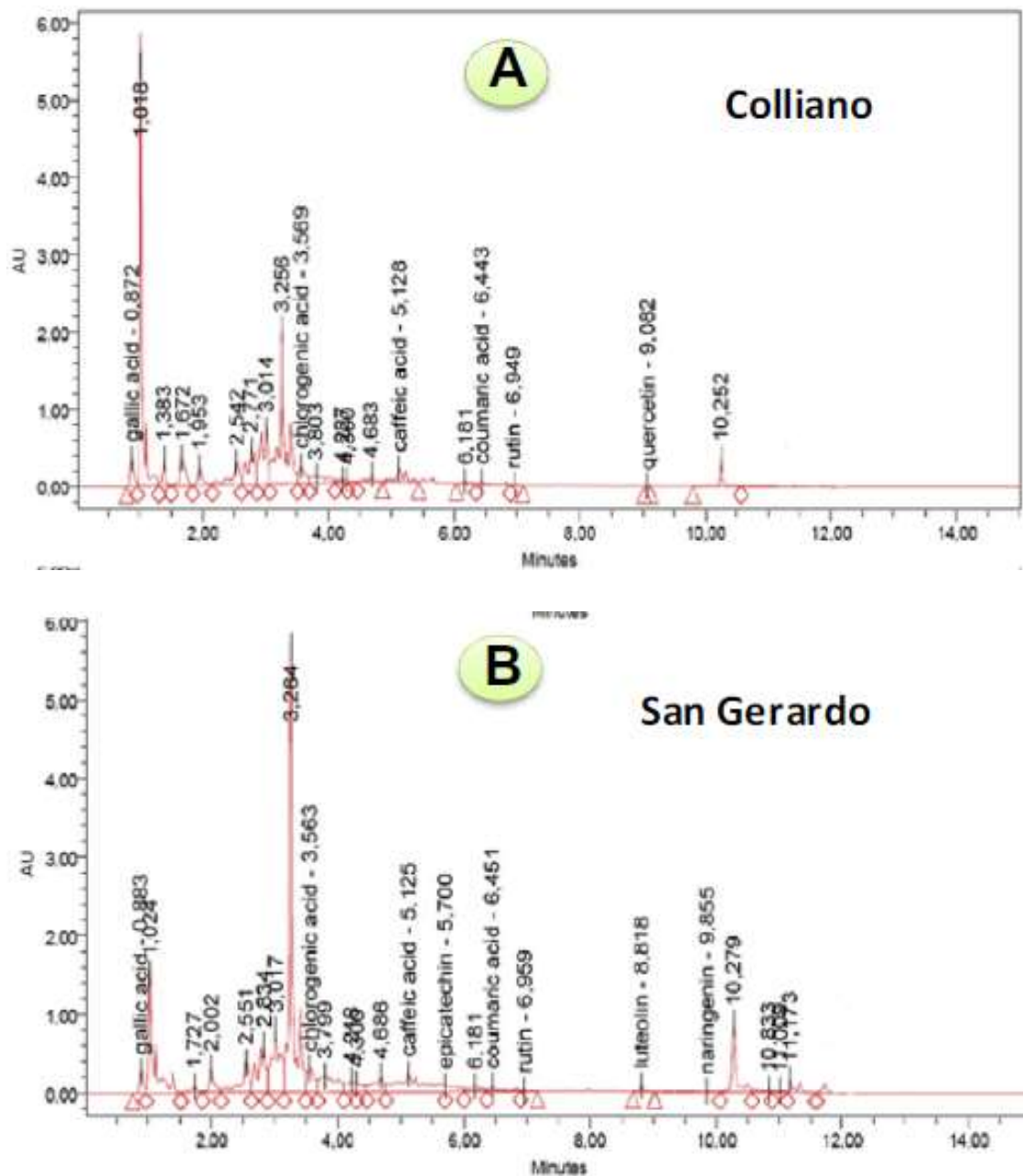


Figura 64. Arriba (A) cromatograma de lenteja Colliano, abajo (B) cromatograma de lenteja San Gerardo. Cromatogramas obtenidos con UPLC (Fратиани et al., 2014).

Los perfiles cromatográficos obtenidos en este estudio presentan una cantidad de picos inferior que los encontrados Aguilera et al., (2010). Todos los picos aparecen antes del minuto 12. Aunque encuentran gran número de picos, solo identifican 10 de ellos en total, de los cuales 6 están presentes en lentejas Colliano, y 8 en lentejas San Gerardo. Los dos perfiles son similares, presentando la zona de máxima concentración de compuestos fenólicos en la primera mitad del análisis, al igual que lo ocurrido en nuestro caso. Además ambas presentan un pico de gran dimensión nada más empezar el

análisis, al igual que en nuestro perfil, siendo mayor en lentejas del tipo Colliano que en lentejas San Gerardo. Uno de los inconvenientes del estudio realizado por Fratianni et al., (2014) es que quedan muchos compuestos sin identificar.

## 2.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La lenteja es la leguminosa con mayor contenido fenólico total y presenta gran diversidad de sustancias fenólicas, enmarcadas en grupos de fenoles como ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, proantocianidinas, catequinas, flavonas y flavanonas (Aguilera et al., 2010).

Tanto Aguilera et al., (2010), como Fratianni et al., (2014) usan estándares conocidos para la identificación de los picos presentes a lo largo del perfil del cromatograma. Los picos son identificados principalmente por dos factores, el tiempo de retención y el espectro de absorción UV de los estándares con el de los picos del cromatograma. Además es frecuente la combinación del análisis cromatográfico con la espectrofotometría de masas HPLC-MS. La espectrofotometría de masas es utilizada con objeto de confirmar las sustancias fenólicas identificadas en el cromatograma anteriormente utilizando el tiempo de retención y el espectro de absorción UV (Aguilera, et al., 2010).

Es común que aparezcan más sustancias fenólicas que estándares empleados como le sucede a Fratianni et al., (2014), ya que los fenoles pueden estar combinados con otros compuestos, lo que hace que varíe notablemente el tiempo de retención en comparación con los estándares empleados.

Aguilera et al., (2010) agrupa los compuestos encontrados según al grupo de polifenoles al que pertenece. En esa agrupación de pueden observar similitudes en el espectro de absorción UV de los diferentes grupos. Así los ácidos hidroxibenzoicos pueden presentar uno o dos picos. Uno de los máximos tiene una  $\lambda$  máxima aproximada a 260nm, mientras que el otro en el caso de los que tienen dos máximos presenta una  $\lambda$  máxima inferior a 300nm. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos también pueden presentar uno o dos máximos, presentando el primer máximo una  $\lambda$  máxima aproximada a los 300nm, y el otro maximo en los que presentan dos con una  $\lambda$  máxima aproximada de 230nm. Los derivados de catequinas y proantocianidinas también pueden presentar

uno o dos máximos, presentando el común una  $\lambda$  máxima de 279nm, y el otro una  $\lambda$  máxima de 232nm. Otro grupo, los flavonoles, siguen la dinámica de los grupos anteriores pudiendo presentar uno o dos máximos, el máximo común entre los que presentan uno y dos máximos presenta una  $\lambda$  máxima aproximada a 350nm, y otro máximo con una  $\lambda$  máxima aproximada a 265nm. Por último, el grupo de flavonas y flavanonas también puede presentar uno o dos máximos, uno con una  $\lambda$  máxima que puede variar entre 285nm y 350nm, y otro que puede variar 240nm y 265nm. Esta información se resume en la tabla siguiente:

Tabla 33. Resumen de  $\lambda$  max de los espectros de absorción UV de los grupos de fenoles en el estudio realizado por Aguilera et al., (2010).

<b>GRUPO</b>	<b><math>\lambda</math> Max máximo 1</b>	<b><math>\lambda</math> Max máximo 2 (opcional)</b>
Hidroxibenzoicos	$\approx$ 260nm	<300nm
Hidroxicinámicos	$\approx$ 300nm	$\approx$ 230nm
Catequinas y proantocianidinas	279nm	232nm
Flavonoles	$\approx$ 350nm	$\approx$ 265nm
Flavonas y flavanonas	285nm-350nm	240nm-265nm

Además de los espectros de absorción UV de los diferentes grupos, de este estudio podemos sacar algunas conclusiones del orden en la que sale cada uno de los compuestos. Los ácidos hidroxibenzoicos salen en primer lugar, seguidos por los ácidos hidroxicinámicos. Después de los ácidos hidroxicinámicos aparecen los flavonoles. Las catequinas y proantocianidinas aparecen a lo largo de todo el cromatograma. Las flavonas aparecen en la parte final.

Sánchez (2017) en su trabajo sobre la caracterización fenólica de la lenteja, realiza una recopilación bibliográfica de los estándares usados para cada grupo de fenoles presentes mayoritariamente en lentejas. Así los estándares usados para cada grupo de fenoles (Sánchez, 2017):

- Estándares de ácidos fenólicos: Los ácidos fenólicos se dividen en dos grandes grupos, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Para ácidos hidroxibenzoicos los estándares usados son p-hidroxibenzoico, protocateico (Aguilera, et al, 2010; Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007; Amarowicz, et al, 2010), gálico (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007), vainillínico

- (Amarowicz, et al, 2010). Para ácidos hidroxycinámicos los estándares usados son trans-p-cumárico (Aguilera, et al, 2010; Amarowicz, et al, 2010), trans-p-hidroxycinámico, trans-ferúlico, trans-cinámico (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007).
- Estándares de estilbenos: trans-reservatrol (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007).
  - Estándares de taninos condensados o proantocinidinas: proantocianidina B2 (Aguilera, et al, 2010; Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007), proantocianidina B1 y B3 (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007).
  - Estándares de flavan 3-ol: catequina y epicatequina (Aguilera, et al, 2010; Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007; Amarowicz, et al, 2010).
  - Estándares de flavonoles: myricetin-3-ramnosido (Aguilera, et al, 2010; Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007), kemferol-3-O rutinosido (Aguilera, et al, 2010; Amarowicz, et al, 2010), kemferol-3-O-glucosido, kemferol 3-O-robinosido-7-O ramnosido (Aguilera, et al, 2010), quercentina-ramnosido (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007), dihidroquercetin, quercetina, quercetina-3-o-glucosido, quercetin-3-o-galactosido, quercetin-3-o-rutinosido (Amarowicz, et al, 2010).
  - Estándares de flavonas: apigenín metileter, luteolín 3-7-diglucosido (Aguilera, et al, 2010), luteolin-7-glucosido, luteolina, apigenin-7-apioglucosido y apigenin-7-glucosido (Dueñas, et al, 2002; Dueñas, et al, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior, los estándares comerciales escogidos para la comparación de los máximos, además de la forma del espectro con los picos nombrados desde la A a la Ñ en nuestro cromatograma son ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, catequina, rutina, kemferol y quercetina.

Una vez escogidos los estándares a emplear, la identificación se realizará mediante la comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción UV, tanto la forma del espectro como la longitud máxima de absorción, de los picos encontrados en el cromatograma de lentejas y los estándares.

Comparados ambos factores, el tiempo de retención de los picos del cromatograma con espectro UV similar al de los patrones, no coinciden. Esto puede ser debido a que los compuestos fenólicos utilizados como estándares son compuestos fenólicos puros

mientras que los fenoles encontrados en las lentejas suelen estar unidos a otros compuestos o formando derivados de estos, como dímeros o trímeros, viendo por tanto su tiempo de retención modificado y no coincidente con el de la sustancia pura.

Teniendo en cuenta que no disponemos de espectrómetro de masas para confirmar las sustancias encontradas, además que los compuestos fenólicos utilizados como estándares son compuestos fenólicos puros y los fenoles encontrados en las lenteja suelen estar unidos a otros compuestos o formando derivados de estos, se ha realizado una tentativa de identificación por grupos de los picos presentes en el perfil de nuestro cromatograma, siguiendo la clasificación realizada por Aguilera et al., (2010) en su estudio, en vez de realizarlo por sustancias individuales. Por tanto clasificaremos las sustancias como ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, proantocianidinas y catequinas, y por último flavonas y flavanonas.

- Pico A: Es el único de los picos donde el tiempo de retención coincide con uno de los patrones teniendo ambos el espectro UV similar. Presenta un espectro con una  $\lambda_{max}=266\text{nm}$ , el cual coincide con el del estándar de ácido gálico. Al igual que Fratianni, et al, (2014) obtenemos este pico al inicio del cromatograma. Se trata de un ácido hidroxibenzoico.

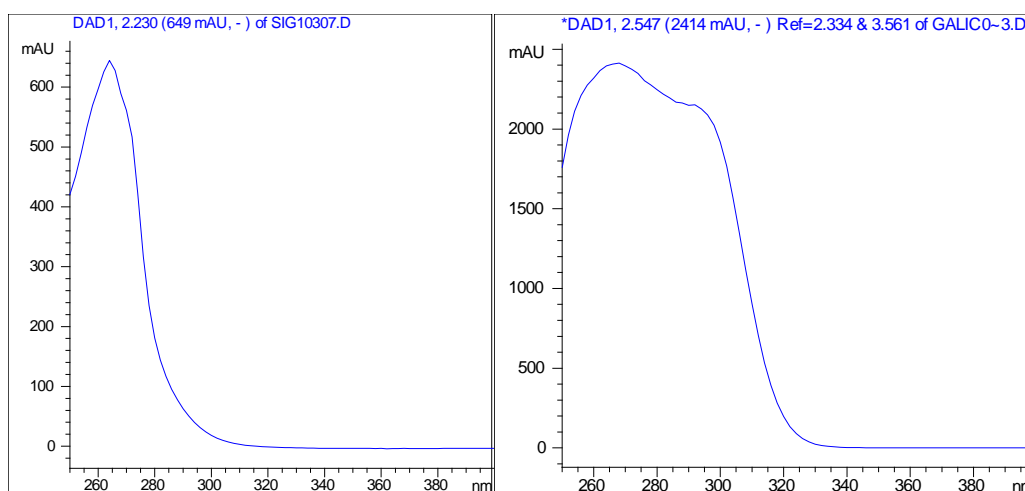


Figura 65. A la izquierda espectro del pico A de la muestra. A la derecha espectro del patrón del ácido gálico.

- Pico B: Presenta un espectro con una  $\lambda_{max}=266\text{nm}$ . Debido a la forma del espectro, además de encontrarse en la zona inicial del cromatograma y su espectro máximo de absorción también se trata de un ácido hidroxibenzoico.

- Pico C: Presenta un espectro con  $\lambda_{\max}=276\text{nm}$ , y un hombro a  $\lambda=250\text{nm}$ . El espectro máximo de absorción concuerda con una catequina o proantocianidina en comparación con los datos extraídos del estudio realizado por Aguilera et al., (2010), además de que la zona de aparición concuerda con la descrita en dicho trabajo. Con ello concluimos que se trata de una catequina o proantocianidina.
- Pico D: Presenta un espectro con una  $\lambda_{\max}=266\text{nm}$ . Al igual que el pico B, debido a la forma del espectro y encontrarse en la zona inicial del perfil, además y de su  $\lambda$  máxima se trata de un ácido hidroxibenzoico.
- Pico E: Presenta un espectro con 2 máximos,  $\lambda_{\max}=266$  y  $\lambda_{\max}=346$ . El espectro coincide con la forma del Kemferol, además del primer máximo del estándar con 2 máximos a  $\lambda_{\max}=266$  y  $\lambda_{\max}=366$ . Por tanto puede ser un derivado de este y lo englobamos como flavonol.

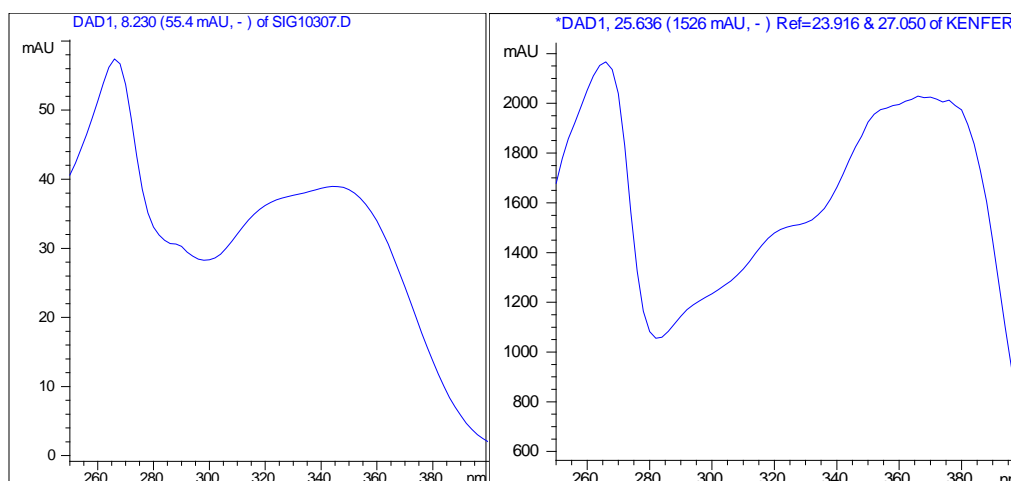


Figura 66. A la izquierda espectro del pico E de la muestra. A la derecha espectro del patrón del Kemferol.

- Pico F: Presenta un espectro con  $\lambda_{\max}=270\text{nm}$ , y un hombro a  $\lambda=288\text{nm}$ . Su espectro coincide con el del estándar de ácido cumárico,  $\lambda_{\max}=270\text{nm}$  y un hombro  $\lambda=288\text{nm}$ , pero tiempo de retención no coincide con el del estándar, tratándose por tanto de un derivado de este. Pertenecen al grupo de ácidos hidroxicinámicos.
- Pico G: Presenta dos máximos  $\lambda_{\max}= 254\text{nm}$ , y  $\lambda_{\max} =274\text{nm}$ . El espectro máximo de absorción concuerda con un derivado de catequina o



proantocianidina en comparación con los datos extraídos del estudio realizado por Aguilera et al., (2010) y el segundo máximo es muy similar al de nuestro patrón de catequina,  $\lambda_{\max}=278\text{nm}$ . Asimismo la zona de aparición concuerda con la descrita. Con ello concluimos que se trata de una catequina o proantocianidina.

- Pico H: Presenta dos máximos  $\lambda_{\max}=254\text{nm}$ , y  $\lambda_{\max}=276\text{nm}$ . Tanto la forma del espectro como los máximos son muy similares al pico G. Por tanto se trata de una catequina o proantocianidina.
- Pico I: Presenta dos máximos  $\lambda_{\max}=254\text{nm}$ , y  $\lambda_{\max}=276\text{nm}$ . El perfil del espectro no es tan similar como lo son los dos picos anteriores, pero el espectro máximo de absorción concuerda con el de una catequina o proantocianidina.
- Pico J: Presenta un espectro con  $\lambda_{\max}=276$ , y un hombro a  $\lambda=256\text{nm}$ . Este pico sigue la dinámica de los tres anteriores. Se trata de una catequina o proantocianidina.
- Pico K: Presenta un espectro con  $\lambda_{\max}=300\text{nm}$ . No puede tratarse de un flavonol debido a la forma de su espectro. Debido al máximo de su espectro, concuerda con un ácido Hidroxicinámico. Además los ácidos hidroxicinámicos se encuentran hasta la mitad del estudio realizado por Aguilera et al., (2010), y en nuestro caso este pico se encuentra antes de la mitad. Se trata de un ácido hidroxicinámico.
- Pico L: Presenta un espectro con  $\lambda_{\max}=258\text{nm}$ . No puede tratarse de un ácido hidroxibenzoico por la zona en la que aparece, y su espectro máximo no concuerda con el resto de tipos. No podemos concluir a qué tipo de compuestos pertenece.
- Picos M, N y Ñ: Presentan unos máximos de absorción de  $\lambda_{\max}=278\text{nm}$ ,  $\lambda_{\max}=274\text{nm}$ , y  $\lambda_{\max}=276\text{nm}$  respectivamente. Entre los tres picos presentan unos perfiles de los espectros muy similares. Presentan un espectro máximo muy similar al de la catequina, pero sus espectros son muy diferentes al del estándar y

otros compuestos derivados de ellos. No podemos concluir de qué tipo de compuestos se tratan.

Una vez realizada la identificación se agrupan los diversos picos en función del grupo al que estos pertenecen, para su unificación.

Tabla 34. Tabla resumen de los grupos a los que pertenecen los diferentes picos identificados.

Pico	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácidos hidroxicinámicos	Catequinas y proantocianidinas	Flavonoles
Pico A	X			
Pico B	X			
Pico C			X	
Pico D	X			
Pico E				X
Pico F		X		
Pico G			X	
Pico H			X	
Pico I			X	
Pico J			X	
Pico K		X		

El grupo al que pertenecen más compuestos es el de catequinas y proantocianidinas con 5 picos, seguido de ácidos hidroxibenzoico con 3 picos, de ácidos hidroxicinámicos con 3 picos, mientras que de flavonoles solo hay un pico, y ninguno de flavonas.

La existencia de un mayor número de picos de un grupo no implica que este sea el que más aporte a la composición fenólica de las lentejas, ya que eso es dependiente de su concentración. El área que cada pico presenta en el cromatograma está relacionada con su concentración. Utilizando una regresión lineal con las curvas de calibración de las diferentes sustancias se relaciona el área encerrado bajo la curva y la concentración.

Debido a que los compuestos encontrados no coinciden con los estándares empleados, no se puede averiguar la concentración de cada sustancia, y por tanto solo se puede comparar el área bajo la curva.

### 2.3. CONTENIDO FENÓLICO INDIVIDUAL

Como ya hemos visto en la comparación de cromatogramas, todas las muestras de lentejas no presentan el mismo tipo de perfil, además de no presentar el mismo tamaño de los picos comunes, es decir la misma área.

Una vez realizada la identificación por grupos de fenoles, además de obtener el área de cada pico tras el análisis de las 60 muestras de lentejas por duplicado, mediante un estudio estadístico se pretende averiguar la existencia o no de diferencias significativas, en el área bajo la curva de los principales grupos de fenoles, en función de:

- La variedad. Entre Guareña, Rubia de La Armuña, Castellana, Verdina, Pardina, Castellana Pelada, Crimson o Roja, Caviar y Rápida. Trataremos Guareñas y Rubias de la Armuña como variedades distintas con el fin de estudiar si hay diferencias entre ellas.
- El ecotipo cultivado dentro de la IGP lenteja de la Armuña, Guareña o Rubia de La Armuña.
- La generación; si se trata de semilla certificada de primera generación (Guareña 14-15) o de segunda generación (Guareña 13-14).
- Los tipos de Guareña. Guareña microjaspeada, Guareña jaspeada o Guareña sin jaspedo.
- La influencia de la IGP, Guareña cultivada dentro de la IGP o fuera de la IGP.
- La influencia de la selección de semilla. Semilla seleccionada por el ITACYL o usada año tras año por el agricultor.
- La influencia del tipo de suelo.

Previo al análisis estadístico se procede a la suma del área de todos los picos del mismo grupo dentro de cada muestra, comparando así el área bajo la curva de los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles.

### 2.3.1. INFLUENCIA DE LAS VARIEDADES

Partimos de nueve tipos o variedades de lentejas, que presentan diferencias tanto en tamaño como color y forma. Además de esas diferencias, se pretende averiguar si existen diferencias en cuanto a la composición fenólica individual.

Fратиanni et al. (2014) realizan un estudio en el que comparan dos tipos de lentejas, Colliano y San Gerardo. En dicho estudio encuentran diferencias en el contenido fenólico individual entre los dos tipos de lenteja, tanto en los compuestos identificados como en la concentración de dichos compuestos. En lentejas Colliano identifica 6 tipos de compuestos mientras que en lentejas San Gerardo identifica 8 fenoles individuales. En otro estudio, Xu y Chang (2010) comparan 11 variedades de lenteja, en las que identifican los mismos compuestos fenólicos en todas las variedades, observando diferencias significativas en la concentración de dichos compuestos entre las diferentes variedades que conforman el estudio.

No se han encontrado los mismos picos en todas las lentejas. En las lentejas Guareñas cultivadas dentro de la IGP no se ha encontrado el pico I, mientras que este si se ha encontrado en las Guareña cultivadas fuera. Las muestras de Rubia de la Armuña presentan todos los picos identificados (A-K), al igual que la lenteja Pardina. Las muestras de las variedades regular y Castellana pelada no presentan los picos B, G y H, mientras que la Castellana no presenta únicamente el pico G. La Caviar o Beluga no presenta los picos B y G, siendo por tanto similar a la regular y Castellana pelada, tampoco presenta el pico B la lenteja Crimson o roja. La lenteja Verdina es diferente a las anteriores ya que el pico que no presenta es el H. Aunque existen diferencias entre las variedades, todas presentan los picos de mayor área, que son el A, E, F, J y K.

Se realiza una comparación estadística del área bajo la curva que presenta cada sustancia, agrupadas en cuatro grupos de fenoles, entre las variedades de lentejas analizadas.

Tabla 35. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las variedades de lentejas. Las diferencias estadísticas se leen en vertical.

Variedad	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácidos hidroxicinámicos	Catequinas y proantocianidinas	Flavonoles
Rápida o regular	536,95 <sub>a</sub>	922,45 <sub>abc</sub>	682,45 <sub>a</sub>	636,85 <sub>bc</sub>
Caviar	843,40 <sub>ab</sub>	1813,28 <sub>cd</sub>	751,20 <sub>a</sub>	993,57 <sub>de</sub>
Pardina	1040,71 <sub>ab</sub>	679,95 <sub>a</sub>	868,82 <sub>a</sub>	328,54 <sub>a</sub>
Roja o Crimson	1097,77 <sub>ab</sub>	3050,51 <sub>e</sub>	781,10 <sub>a</sub>	1083,133 <sub>e</sub>
Guareña	1118,73 <sub>ab</sub>	942,57 <sub>abc</sub>	830,82 <sub>a</sub>	364,75 <sub>ab</sub>
Castellana pelada	1121,77 <sub>ab</sub>	2368,07 <sub>de</sub>	588,20 <sub>a</sub>	788,63 <sub>cd</sub>
Castellana	1188,70 <sub>ab</sub>	870,15 <sub>ab</sub>	809,65 <sub>a</sub>	347,41 <sub>a</sub>
Verdina	1295,23 <sub>ab</sub>	1646,61 <sub>bcd</sub>	920,80 <sub>a</sub>	863,43 <sub>cde</sub>
Rubia Armuña	1755,56 <sub>b</sub>	1258,75 <sub>abc</sub>	1080,17 <sub>a</sub>	374,52 <sub>ab</sub>

Los ácidos hidroxicinámicos son los que mayor área presenta en 5 de las 9 variedades de lentejas, como son la lenteja regular, Caviar, Crimson, Castellana pelada y Verdina. En las muestras de lenteja Pardina, Guareña, Castellana y Rubia de La Armuña predominan los ácidos hidroxibenzoicos. Aguilera et al. (2010) realiza una agrupación por tipo de compuesto similar a la realizada en este estudio para lenteja del tipo Pardina, pero identifica más picos, obteniendo como resultado que las catequinas y proantocianidinas es el grupo con mayor contenido, seguido de los flavonoides y de los ácidos hidroxibenzoicos. La identificación de picos no es la única diferencia, ya que en este estudio la comparativa es de áreas y en el realizado por Aguilera et al. (2010) compara la concentración de los compuestos.

La lenteja de tipo rápida es la que menor contenido de ácidos hidroxibenzoicos presenta, mientras que la lenteja tipo de La Armuña es la que más presenta triplicando a la anterior. En este grupo de fenoles aparecen diferencias significativas entre la lenteja de tipo regular o rápida y la lenteja Rubia de La Armuña, mientras que el resto de grupos de lentejas no presentan diferencias entre ellas ni con las otras dos.

Los ácidos hidroxicinámicos presentan más diferencias que el grupo anterior. La lenteja tipo Pardina es la que menor contenido de este tipo de compuestos presenta, seguida de la de tipo Castellana. Por otro lado, la Castellana pelada es la segunda que más contenido de estos compuestos presenta, siendo la que mayor contenido presenta la lenteja Crimson o roja. Este tipo de compuestos aparece en mayor medida en lentejas desprovistas de su envoltura, por tanto están presentes mayoritariamente en el cotiledón de las lentejas. Es notorio que la Castellana pelada presente un área bajo la curva casi 3 veces superior para este grupo que la castellana sin pelar. Según Dueñas et al. (2002) en

el cotiledón se encuentran los compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos estando los hidroxicinámicos en mayor concentración. Por tanto al ser el total de la muestra de la lenteja Castellana pelada cotiledón, los ácidos hidroxicinámicos aparecen más concentrados.

Las Catequinas y proantocianidinas son el grupo de fenoles analizado más estable en el conjunto de todas las variedades de lentejas, ya que en este grupo no se aprecian diferencias significativas. La lenteja Castellana pelada es la que menor contenido de este grupo presenta, mientras que la Rubia de La Armuña es la que mayor cantidad de este tipo de compuestos presenta, igual que se observaba para los ácidos hidroxibenzoicos. En este es en el único de los grupos donde la Castellana presenta menor contenido que la Castellana, esto es debido a que las catequinas y proantocianidinas son mucho más abundantes en los tejidos externos (Dueñas et al., 2002).

Los flavonoles detectados en este estudio corresponden tan solo a un pico, el pico E. Por tanto en este grupo se estudia la variabilidad de dicho pico. El hecho de que su área venga determinada por un solo pico, hace que en muchas ocasiones este grupo sea el que menor área presenta. Al igual que en el caso de ácidos hidroxicinámicos la variabilidad de este grupo es alta, ya que existen diferencias significativas y se forman varios subgrupos. La lenteja Pardina es la que menor área presenta, seguida con valores muy similares por la Castellana, Guareña, y Rubia de La Armuña. La que mayor área presenta es la lenteja Crimson, seguida de la Caviar. Las variedades que presentan los valores máximos y mínimos para este grupo de compuestos fueron los mismos que para ácidos hidroxicinámicos. Destaca de nuevo que la Castellana pelada presenta un área de casi el doble que la Castellana, siendo las diferencias estadísticamente significativas, en este caso su área está por debajo de la presentada por la Caviar; aunque sin diferencias significativas entre ambas como en el caso de los ácidos hidroxicinámicos.

Al igual que en el caso de fenoles totales y capacidad antioxidante si se encuentran diferencias significativas en los grupos de fenoles exceptuando el grupo de catequinas y proantocianidinas, por tanto la variedad si influye en el contenido fenólico de la lenteja, y por ello en su capacidad antioxidante.

### 2.3.2. INFLUENCIA DEL ECOTIPO

Como ya se mencionó en el apartado de fenoles totales y capacidad antioxidante, la IGP lenteja de La Armuña está compuesta por dos tipos de lentejas, la lenteja Guareña y la lenteja Rubia de La Armuña. La primera se ha obtenido a partir de una selección en masa por tamaño y producción del ecotipo lenteja Rubia de La Armuña.

Se realiza una comparación estadística entre lentejas Guareña y Rubia de La Armula del área bajo la curva que define cada sustancia, agrupadas en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles.

Tabla 36. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas Guareña y Rubia de La Armuña cultivadas dentro de la IGP.

Grupo de fenol	Variedad	Media	Desviación típica	Significación
Ácidos Hidroxibenzoicos	Guareña	1094,74 <sub>a</sub>	588,11	0,001
	Rubia Armuña	1755,56 <sub>b</sub>	902,65	
Ácidos Hidroxicinámicos	Guareña	934,65 <sub>a</sub>	585,36	0,03
	Rubia Armuña	1258,75 <sub>b</sub>	320,44	
Catequinas y proantocianidinas	Guareña	772,33 <sub>a</sub>	468,57	0,013
	Rubia Armuña	1080,17 <sub>b</sub>	325,14	
Flavonoles	Guareña	333,95 <sub>a</sub>	117,04	0,177
	Rubia Armuña	374,52 <sub>a</sub>	72,76	

Los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayor contenido presentan en ambos tipos de lentejas, seguidos por los ácidos hidroxicinámicos, por las catequinas y proantocianidinas, y en último lugar y por tanto que menor área presentan los flavonoles. Además en todos los tipos de compuestos la lenteja Rubia de La Armuña presenta mayor área que la lenteja Guareña.

Tanto en ácidos hidroxibenzoicos, como en ácidos hidroxicinámicos, y catequinas y proantocianidinas presentan diferencias significativas. Contrasta con el caso anterior el grupo formado por catequinas y proantocianidinas, en el cual no se apreciaban diferencias significativas entre las diferentes variedades de lenteja debido al mayor número de muestras y por tanto mayor varianza.

En flavonoles no existen diferencias significativas, ambas muestras presentan un contenido bajo de este grupo de fenoles.

Por tanto el ecotipo influye en el contenido de fenoles individuales, en concreto en los siguientes grupos, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, y catequinas y proantocianidinas; mientras que no influye en los flavonoles.

Esto contrasta con los resultados obtenidos para fenoles totales y capacidad antioxidante, donde no existían diferencias significativas, al igual que en ácidos grasos (del Río, 2017), aunque si influye en otras características como grasa, fibra y contenido de magnesio (Morales-Corts, 2016).

### 2.3.3. INFLUENCIA DE LA GENERACIÓN

En este apartado se pretende averiguar el comportamiento de las semillas de primera generación y de segunda generación en cuanto al contenido fenólico individual.

Para averiguar si existen diferencias significativas entre ambos tipos de lentejas se realiza un estudio estadístico en el que se comparan las áreas de los diferentes grupos de fenoles. Cada grupo se compone por el sumatorio del área bajo la curva de los diferentes picos pertenecientes a dicho grupo.

Tabla 37. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas de primera y segunda generación.

Grupo de fenol	Variedad	Media	Desviación típica	Significación
Ácidos Hidroxibenzoicos	Guareña R1	1135,00 <sub>a</sub>	734,07	0,633
	Guareña R2	1050,82 <sub>a</sub>	383,55	
Ácidos Hidroxicinámicos	Guareña R1	968,29 <sub>a</sub>	533,35	0,689
	Guareña R2	897,95 <sub>a</sub>	648,07	
Catequinas y proantocianidinas	Guareña R1	799,48 <sub>a</sub>	559,06	0,686
	Guareña R2	742,71 <sub>a</sub>	355,55	
Flavonoles	Guareña R1	311,28 <sub>a</sub>	98,12	0,173
	Guareña R2	358,69 <sub>a</sub>	132,59	

En la tabla anterior se muestran los valores medios de los diferentes grupos de fenoles en lentejas Guareña de primera y segunda reproducción.



La lenteja Guareña de primera reproducción, R1, presenta mayor área en la mayoría de los grupos, siendo mayor en ácidos hidroxibenzoicos, en ácidos hidroxicinámicos, y catequinas y proantocianidinas. La lenteja Guareña de segunda reproducción, R2, presenta mayor área de flavonoles.

No existen diferencias significativas entre ambos tipos de lentejas en ninguno de los grupos de fenoles detectados en este estudio. Anteriormente ya se observó que hubo diferencias significativas debido a esta variable en los fenoles totales y a la actividad antioxidante por lo que este resultado difiere de lo ya comentado, ya que los otros métodos cuantifican más cosas. También se encontraran diferencias significativas en otros estudios donde se comparan otras cualidades nutricionales en el mismo tipo de lentejas, como contenido de hierro, proteínas y ácidos grasos (Morales-Corts, 2016; del Río 2017).

Como ya se alegara en el caso de fenoles totales, no solo son diferentes en cuanto a la generación, sino que también han sido cultivadas en años diferentes, y por tanto la aparición o no de diferencias significativas puede deberse a ambas variables, sin saber si estas afectan sinérgicamente o antagónicamente.

#### **2.3.4. DIFERENCIAS ENTRE GUAREÑA, JASPEADA Y MICROJASPEADA**

En este apartado se pretende averiguar si el jaspeado de lentejas provoca cambios en el contenido de fenoles individuales. Previamente ya se había observado que no hubo diferencia en polifenoles totales ni en actividad antioxidante para este factor. Para ello se compara estadísticamente el área bajo la curva de los diferentes picos agrupados en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles.

Tabla 38. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de lentejas Guareña sin jaspeado, Guareña jaspeadas y Guareña microjaspeada. Las diferencias estadísticas se leen en vertical.

<b>Variedad</b>	<b>Ácidos Hidroxibenzoicos</b>	<b>Ácidos Hidroxicinámicos</b>	<b>Catequinas y proantocianidinas</b>	<b>Flavonoles</b>
Jaspeada	863,90 <sub>a</sub>	599,45 <sub>a</sub>	1011,75 <sub>a</sub>	350,85 <sub>a</sub>
Microjaspeada	865,80 <sub>a</sub>	978,00 <sub>a</sub>	922,20 <sub>a</sub>	387,85 <sub>a</sub>
Guareña	1094,74 <sub>a</sub>	934,65 <sub>a</sub>	772,32 <sub>a</sub>	333,95 <sub>a</sub>

Al igual que en todo el estudio, para el análisis de subconjuntos homogéneos se ha usado la herramienta pos hoc Tukey-b.

La lenteja de tipo jaspeada es la que menor contenido presenta de ácidos hidroxibenzoicos, pero de forma muy similar al presente en lentejas microjaspeadas. También es la que menor contenido presenta de ácidos hidroxicinámicos, mientras que es la que mayor contenido presenta en catequinas y proantocianidinas.

La lenteja microjaspeada es la que mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos presenta, al igual que en flavonoles.

La lenteja sin jaspeado presenta mayor contenido en ácidos hidroxibenzoicos, pero a su vez es la que menor contenido muestra en catequinas y proantocianidinas, y flavonoles.

Entre los tres tipos de lenteja no existen diferencias significativas en ninguno de los cuatro grupos de fenoles detectados en este estudio, como son ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles. Por tanto el jaspeado o moteado no influye en el contenido fenólico individual de las lentejas, al igual que tampoco influía en el contenido fenólico total y en la capacidad antioxidante.

Este resultado contrasta con los resultados obtenidos por del Río (2017) quien señala diferencias significativas entre estos tres tipos de lentejas para los ácidos grasos saturados totales, revelando una influencia significativa de este factor sobre la composición nutricional.

### 2.3.5. INFLUENCIA DE LA IGP

Con este estudio se pretende averiguar si existen diferencias significativas en el contenido de sustancias fenólicas individuales entre lentejas Guareña cultivadas dentro de la IGP y lentejas del mismo tipo cultivadas fuera de la IGP. Las lentejas cultivadas fuera de la IGP, han sido cultivadas en las provincias de Albacete, Burgos, Guadalajara y Valladolid.

Para ello se compara estadísticamente el área encerrada bajo la curva de los picos agrupados por grupos de fenoles, de lentejas Guareña cultivadas dentro de la IGP y cultivadas fuera de esta.

Tabla 39. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas Guareña cultivadas dentro y fuera de la IGP.

Grupo de fenol	Variedad	Media	Desviación típica	Significación
Ácidos Hidroxibenzoicos	Guareña cultivada dentro	1094,74 <sub>a</sub>	588,11	0,291
	Guareña cultivada fuera	1330,64 <sub>a</sub>	828,42	
Ácidos Hidroxicinámicos	Guareña cultivada dentro	934,65 <sub>a</sub>	585,36	0,590
	Guareña cultivada fuera	1040,55 <sub>a</sub>	406,42	
Catequinas y proantocianidinas	Guareña cultivada dentro	772,33 <sub>a</sub>	468,57	0,094
	Guareña cultivada fuera	1045,46 <sub>b</sub>	413,93	
Flavonoles	Guareña cultivada dentro	333,95 <sub>a</sub>	117,04	0,002
	Guareña cultivada fuera	504,58 <sub>b</sub>	261,73	

Los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayor contenido presentan, seguidos por los ácidos hidroxicinámicos, por las catequinas y proantocianidinas, y por último y con menor contenido los flavonoles.

Las Guareñas cultivadas dentro de los márgenes de la IGP presentan un menor contenido de fenoles individuales en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles, es decir, en todos los grupos de fenoles analizados. Esto coincide con el contenido fenólico total, que también era superior en lentejas cultivadas fuera de la IGP.

Sin embargo, solo existen diferencias significativas entre lentejas cultivadas dentro y fuera de la IGP en el contenido de flavonoles. El resto de grupos no presenta diferencias

significativas, aunque si presentan diferencias el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

### 2.3.6. INFLUENCIA DE LA SELECCIÓN DE SEMILLA

En este apartado se pretende averiguar cómo influye en el contenido fenólico individual la selección de semillas puras. Por ello se compara semilla seleccionada por el ITACYL para el ecotipo Rubia de la Armuña, y semilla de la misma variedad que se ha usado por el agricultor durante años, ambas cultivadas dentro de los márgenes de la IGP lenteja de La Armuña.

Como en los casos anteriores, se compara estadísticamente el área bajo la curva de los diferentes picos, agrupados en función del grupo fenólico al que pertenecen, pero en este caso entre lentejas seleccionadas y usadas por el agricultor de la variedad Rubia de La Armuña.

Tabla 40. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de las lentejas seleccionadas y usadas por el agricultor de la variedad Rubia de La Armuña.

Grupo de fenol	Variedad	Media	Desviación típica	Significación
Ácidos Hidroxibenzoicos	Seleccionada	1359,53 <sub>a</sub>	720,18	0,033
	Propia del agricultor	2250,59 <sub>b</sub>	898,77	
Ácidos Hidroxicinámicos	Seleccionada	1318,26 <sub>a</sub>	395,78	0,395
	Propia del agricultor	1184,36 <sub>a</sub>	191,26	
Catequinas y proantocianidinas	Seleccionada	980,53 <sub>a</sub>	356,61	0,151
	Propia del agricultor	1204,71 <sub>a</sub>	247,64	
Flavonoles	Seleccionada	387,61 <sub>a</sub>	81,83	0,41
	Propia del agricultor	358,15 <sub>a</sub>	60,78	

En la lenteja seleccionada por el ITACYL el contenido de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos es muy similar. Este tipo de lenteja presenta mayor contenido que la usada por el agricultor en ácidos hidroxicinámicos y flavonoles. Por otro lado, la semilla usada por el agricultor presentan mayor contenido en ácidos hidroxibenzoicos además de en catequinas y proantocianidinas.

Solo existen diferencias significativas en el contenido de ácidos hidroxibenzoicos entre lentejas seleccionadas y no seleccionadas de la variedad Rubia de La Armuña.

### 2.3.7. INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO

Como ya se ha indicado anteriormente en el caso de fenoles totales y actividad antioxidante, las lentejas procedentes de la IGP Lenteja de La Armuña han sido cultivadas en diferentes pueblos enmarcados dentro de los límites de la IGP, los cuales presentan un total de 5 tipos de suelos predominantes, luvisol gleico y cambisol calcárico, luvisol cálcico, cambisol calcárico, luvisol gleico-álbico, y vertisol pélico.

Las lentejas de las cuales se tiene conocimiento del tipo de suelo donde han sido cultivadas pertenecen a los dos tipos de lentejas cultivadas dentro de la IGP, Rubia de La Armuña y Guareña. Por tanto se evaluará la influencia del suelo en el conjunto de ambos tipos de lentejas, además de por un lado las lentejas del tipo Rubia de La Armuña y por otro lado las lentejas del tipo Guareña.

#### 2.3.7.1. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS CULTIVADAS EN LA IGP

En este apartado se pretende averiguar cómo influye el tipo de suelo en la composición fenólica individual de las lentejas. Para ello se agrupan las muestras de las lentejas Guareña y Rubia de la Armuña, en función del tipo de suelo predominante.

Tabla 41. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas Guareña y Rubia de La Armuña.

Suelo	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácidos hidroxicinámicos		Catequinas y proantocianidinas		Flavonoles	
	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.
Cambisol calcárico	1364,52 <sub>a</sub>	0,323	1083,18 <sub>ab</sub>	0,037	949,89 <sub>a</sub>	0,406	347,55 <sub>a</sub>	0,538
Luvisol cálcico	1217,93 <sub>a</sub>		847,01 <sub>ab</sub>		874,66 <sub>a</sub>		326,20 <sub>a</sub>	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	1552,15 <sub>a</sub>		1511,78 <sub>b</sub>		830,80 <sub>a</sub>		400,28 <sub>a</sub>	
Luvisol gleico-álbico	649,00 <sub>a</sub>		510,65 <sub>a</sub>		533,65 <sub>a</sub>		311,60 <sub>a</sub>	
Vertisol pélico	921,24 <sub>a</sub>		1007,11 <sub>ab</sub>		649,64 <sub>a</sub>		374,43 <sub>a</sub>	

Los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayor área presentan en la mayoría de los suelos, con excepción del vertisol pélico que presenta un mayor contenido de ácidos

hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos no presentan diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelos. Por otro lado, los flavonoles son los que menor área bajo la curva presentan en los 5 tipos de suelos predominantes en la IGP lenteja de La Armuña, y tampoco presentan diferencias significativas. Los ácidos hidroxicinámicos si presentan diferencias significativas entre el luvisol gleico-álbico y el luvisol gleico y cambisol calcárico.

Destaca que el luvisol gleico-álbico es el que menor área presenta de todos los grupos de fenoles. En el otro extremo se encuentra el luvisol gleico y cambisol calcárico, que presenta los mayores valores de área bajo la curva, exceptuando las catequinas y proantocianidinas donde se ve superado por el cambisol calcárico y el luvisol cálcico.

En el caso de fenoles totales y capacidad antioxidante si existían diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelos al analizarse conjuntamente las lentejas tipo Guareña y Rubia de La Armuña.

### 2.3.7.2. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS RUBIA DE LA ARMUÑA

En este apartado se pretende averiguar cómo influye el tipo de suelo en la composición fenólica individual de las lentejas, pero a diferencia del apartado anterior la comparación se realiza con lentejas del ecotipo Rubia de La Armuña, con la finalidad de disminuir la variabilidad. Como consecuencia de la elección de solo un tipo de lenteja no se ven representados todos los tipos de suelos que si lo hacían en el apartado anterior, existiendo en este caso datos de 4 tipos de suelos.

Tabla 42. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas del tipo Rubia de La Armuña.

Suelo	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácidos hidroxicinámicos		Catequinas y proantocianidinas		Flavonoles	
	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.
Cambisol calcárico	1828,41 <sub>a</sub>	0,408	1210,78 <sub>a</sub>	0,000	1102,26 <sub>a</sub>	0,244	375,66 <sub>a</sub>	0,969
Luvisol cálcico	1608,67 <sub>a</sub>		1059,45 <sub>a</sub>		1231,85 <sub>a</sub>		364,15 <sub>a</sub>	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	2591,60 <sub>a</sub>		1338,45 <sub>a</sub>		863,55 <sub>a</sub>		381,00 <sub>a</sub>	
Vertisol pélico	1068,75 <sub>a</sub>		1968,85 <sub>b</sub>		753,35 <sub>a</sub>		394,55 <sub>a</sub>	

A diferencia del apartado anterior, en esta situación solo aparecen 4 tipos de suelos predominantes, desapareciendo el suelo luvisol gleico-álbico, uno de los que presentaba diferencias significativas en los ácidos hidroxicinámicos en el apartado anterior.

Al igual que sucedía en el apartado anterior, los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayores valores presentan, exceptuando el vertisol pélico donde el mayor área se da en ácidos hidroxicinámicos. También se encuentran similitudes en los flavonoles, ya que en este caso son los que menor área bajo la curva presentan. Otra similitud con el apartado anterior se da en que las únicas diferencias significativas se dan en los ácidos hidroxicinámicos, pero a diferencia del caso anterior el vertisol pélico es diferente al cambisol calcárico, al luvisol cálcico y al luvisol gleico y cambisol calcárico.

El vertisol pélico es el que mayor contenido presenta tanto en ácidos hidroxicinámicos como en flavonoles, por otro lado el luvisol cálcico es el que menor contenido presenta para ambos grupos. Esta misma relación se da en el luvisol gleico y cambisol calcárico, que es el tipo de suelo con los segundos valores más altos en ambos grupos; y en el cambisol calcárico que es el que presenta los terceros valores más altos de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

### 2.3.7.3. INFLUENCIA DEL SUELO EN LENTEJAS GUAREÑA

Al igual que en el apartado anterior, en este se realiza la comparación de los resultados de fenoles individuales en función del suelo al que pertenecen, pero con él área bajo la curva obtenido de los cromatogramas de las lenteja del tipo Guareña.

Tabla 43. Valores medios de las áreas de los picos agrupados por grupo de fenoles individuales, de los diferentes suelos predominantes en la IGP de lentejas Guareña.

Suelo	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácidos hidroxicinámicos		Catequinas y proantocianidinas		Flavonoles	
	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.	Media	Sig.
Cambisol calcárico	1178,96 <sub>a</sub>	0,649	1032,15 <sub>ab</sub>	0,037	888,94 <sub>a</sub>	0,654	336,31 <sub>a</sub>	0,593
Luvisol cálcico	1087,68 <sub>a</sub>		776,19 <sub>ab</sub>		755,60 <sub>a</sub>		313,56 <sub>a</sub>	
Luvisol gleico y cambisol calcárico	1032,43 <sub>a</sub>		1598,45 <sub>b</sub>		814,43 <sub>a</sub>		409,93 <sub>a</sub>	
Luvisol gleico-álbico	649,00 <sub>a</sub>		510,65 <sub>a</sub>		533,65 <sub>a</sub>		311,60 <sub>a</sub>	
Vertisol pélico	872,07 <sub>a</sub>		686,53 <sub>ab</sub>		615,07 <sub>a</sub>		367,72 <sub>a</sub>	

Los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayor contenido presentan exceptuando el luvisol gleico y cambisol calcárico, donde es mayor el contenido de los ácidos hidroxicinámicos. En la comparativa de suelos por grupos de fenoles del conjunto de lentejas Guareña y Rubia de La Armuña, y en la misma pero de lentejas Rubia de La Armuña el único suelo que no presentaba valores más altos en ácidos hidroxibenzoicos era el vertisol pélico.

Al igual que en los dos casos anteriores, los flavonoles son los que menor área bajo la curva presentan en todos los tipos de suelos. También coinciden que el único grupo de fenoles que presenta diferencias significativas son los ácidos hidroxicinámicos, existiendo diferencias significativas entre luvisol gleico y cambisol calcárico, y luvisol gleico-álbico, al igual que donde se comparaban los tipos de suelos del conjunto de lentejas (Guareña y Rubia de La Armuña).

El suelo luvisol gleico-álbico presenta los valores más bajos en todos los grupos de fenoles. El luvisol gleico y cambisol calcárico presenta mayores valores de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, mientras que el cambisol calcárico presenta mayor área de ácidos hidroxibenzoicos, y catequinas y proantocianidinas.

En el conjunto el único grupo que se ve influenciado por el suelo son los ácidos hidroxicinámicos, aunque estos se ven influenciados de forma diferente. En el caso de las lentejas Rubia de La Armuña el vertisol pélico es diferente al resto de suelos. El vertisol pélico ya tendía a ser diferente al resto de suelos en fenoles totales y capacidad antioxidante. Por otro lado, en los resultados del conjunto de Guareña y Rubia de La Armuña, además de los resultados de lenteja Guareña, las diferencias se presentan entre los suelos luvisol gleico y cambisol calcárico, y luvisol gleico-álbico.

### **3. CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO FENÓLICO**

Los fenoles totales, son unos de los compuestos que pueden influir en la capacidad antioxidante de lentejas. Asimismo también pueden influir en la capacidad antioxidante otras sustancias, como carotenoides y vitaminas antioxidantes.



Como se puede observar a los largo de los resultados obtenidos tanto en fenoles totales como en la capacidad antioxidante, existe una relación entre estos parámetros. En las variables en las que existen diferencias significativas en relación al contenido fenólico, también se producen en la capacidad antioxidante, dándose la misma correlación en los casos donde no hay diferencias significativas. Dicho de otra forma, ambos parámetros se ven afectados por las mismas variables de las estudiadas en lentejas.

Algunos autores también han encontrado esas evidencias. Las lentejas muestran actividad antioxidante relacionada con su contenido fenólico total (Fernández-Orozco et al., 2003; Xu y Chang, 2007). Además, Han y Baik, (2008) suponen que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante de las lentejas.

La existencia de una similitud entre estas dos variables ha sido estudiada estadísticamente. Para ello, con el programa SPSS se ha calculado la correlación de Pearson, obteniéndose una  $R=0,925$ . Están significativamente correlacionados la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales obtenidos en este estudio con una  $R^2$  igual a 0,856.

Otros autores también han calculado la correlación entre la capacidad antioxidante con los datos obtenidos en su estudio. Xu y Chang (2007) calculan la correlación del contenido de fenoles totales con los diferentes métodos que han utilizado en su estudio, obteniendo correlaciones lineales significativas entre contenido de fenoles total y el ensayo DPPH, contenido de fenoles total y el ensayo FRAP, y contenido de fenoles total y el ensayo ORAC ( $R= 0,97$ ;  $0,97$ ; y  $0,55$ , respectivamente). Las correlaciones obtenidas para los ensayos DPPH y FRAP son altas, y muy similares a la obtenida en este estudio con el ensayo ABTS.

Además de la correlación de fenoles totales con la capacidad antioxidante, la correlación de grupos de fenoles con la capacidad antioxidante es interesante, porque nos indica la influencia de cada grupo en la capacidad antioxidante, viendo así cual es el grupo que mayor capacidad antioxidante presenta.

Con el programa SPSS se ha realizado una correlación estadística, calculándose la correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los cuatro grupos de fenoles. En ácidos hidroxibanzóicos se obtiene una correlación de Pearson  $R=0,457$ ; en catequinas y proantocianidinas se obtiene una correlación de Pearson de  $R=0,346$ ,

ambas con un nivel de significación del 99%. Los flavonoles presentan una correlación de Pearson  $R=0,202$  con un nivel de significación del 95%. En ácidos hidroxicinámicos no se obtiene correlación. No se ha encontrado ningún artículo que realice una correlación entre la capacidad antioxidante y grupos de fenoles similares a los escogidos en este estudio. En resumen a lo anteriormente mencionado, los ácidos hidroxibenzoicos son los que mayor correlación con la capacidad antioxidante presentan. De estos coeficientes también se desprende que hay otros compuestos fenólicos no cuantificados que contribuirían fuertemente a la capacidad antioxidante.

#### 4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El método de ultrasonidos posibilita la obtención de valores repetitivos lo que permite la posterior comparación de los datos mediante un análisis estadístico.
- El ensayo ABTS ha permitido obtener datos de forma rápida, además de que estos fueran repetitivos, lo que permite la comparación entre los diferentes parámetros que afectan a la composición de la lenteja.
- Tras el análisis estadístico de los valores de fenoles totales, capacidad antioxidante y fenoles individuales obtenidos en el vigente estudio:
  - El contenido de fenoles total, la capacidad antioxidante, los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles se ven afectados por la variedad de lenteja. Las variedades con valores más altos de capacidad antioxidante y fenoles totales son la Verdina y Castellana, y las variedades con valores más bajos son la Castellana pelada y la Crimson.
  - Las lentejas desprovistas de su envoltura contienen una menor concentración de fenoles y capacidad antioxidante, por tanto en las envolturas se concentran más compuestos fenólicos proporcionalmente al peso de esta en el conjunto de la lenteja.

- Los dos ecotipos que integran las lentejas que se pueden cultivar dentro de la IGP Lenteja de La Armuña no muestran diferencias significativas en cuanto al contenido fenólico total y capacidad antioxidante, sin embargo si hay diferencias en los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, y catequinas y proantocianidina.
  - El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en lentejas Guareñas podría verse afectado por la generación; pero no puede afirmarse porque las lentejas de primera y segunda reproducción también pueden haberse visto afectadas por las condiciones climáticas al haber sido cultivadas en campañas diferentes. Por otro lado no existen diferencias significativas entre en ninguno de los grupos de fenoles.
  - El jaspeado presente en la superficie de algunas de las lentejas Guareña, jaspeadas y microjaspeadas, no influye en el contenido fenólico total, en la capacidad antioxidante, ni en los fenoles individuales.
  - Las condiciones que se dan dentro de la IGP interfieren en el contenido fenólico total de las lentejas, en la capacidad antioxidante, y en los flavonoles ya que se encuentran diferencias significativas entre las lentejas del tipo Guareña cultivadas dentro y fuera.
  - La selección de semillas realizada por el ITACYL no influye en el contenido fenólico total, ni en la capacidad antioxidante del ecotipo Rubia de La Armuña, pero si influye en los ácidos hidroxibenzoicos.
  - No se puede afirmar que el tipo de suelo influya en la composición de fenoles totales y en la capacidad antioxidante de lentejas cultivadas dentro de la IGP, debido que en algunos casos se encuentran diferencias significativas y en otros no, además de los pocos datos existentes referentes al suelo. Pero si influye en todos los casos en los ácidos hidroxicinámicos.
- Los cromatogramas obtenidos presentan un perfil parecido en todas las muestras, lo que indica que todas las muestras de lentejas presentan una composición de sustancias fenólicas individuales muy similar, donde las principales diferencias se presentan en la concentración de cada sustancia, aunque no todos los compuestos están presentes en todas las muestras.

- Los fenoles individuales presentes en lentejas pertenecen principalmente a cuatro grupos de fenoles. Se agrupan en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y proantocianidinas, y flavonoles.
- En la composición de las lentejas predominan generalmente los compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de ácidos hidroxibenzoicos.
- La correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico es alta. La correlación analizada estadísticamente entre las dos variables posee una  $R^2$  igual a 0,856. Los ácidos hidroxibenzoicos son el grupo que mayor correlación presentan con la capacidad antioxidante y por tanto los que más aportan a esta.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, Y., Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2010). Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of Pardina lentil as affected by industrial dehydration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(18), 10101-10108.

Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S. M. P. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food chemistry*, 94(3), 327-330.

Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 865-878.

Amarowicz, R., Estrella, I., Hernández, T., Robredo, S., Troszyńska, A., Kosińska, A., & Pegg, R. B. (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food chemistry*, 121(3), 705-711.

Amarowicz, R., Karamac, M., & Shahidi, F. (2003). Antioxidant activity of phenolic fractions of lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Food Lipids*, 10(1), 1-10.

Arts, I. C., van de Putte, B. & Hollman, P. C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1746-1751.

Bengoechea, L., Hernández, T., Quesada, C., Bartolomé, B., Estrella, I., & Gómez-Cordovés, C. (1995). Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*, 41(1-2), 94-98.

Bhatty, R. S. (1988). Composition and quality of lentil (*Lens culinaris* Medik): a review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21(2), 144-160.

Box, J. D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*, 17(5), 511-525.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50-55.

Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* 80, 1033-1043.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1), 1-10.
- Del Río, N. (2017). Composición de ácidos grasos en lentejas D.O. Armuña.
- Domeño, C., Blasco, M., Sánchez, C., & Nerín, C. (2006). A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*, 569(1), 103-112.
- Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2002). Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research and Technology*, 215(6), 478-483.
- Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101(1), 90-97.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., & Spranger, M. I. (2003). Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27), 7999-8004.
- Dziedzic S.Z. and Hudson, B.J.F. (1984). *Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils*. Food Chemistry. 14: 45-51.
- Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119-127.
- Fernandez-Orozco, R., Zielinski, H., Piskula, M.K. (2003). Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds. *Nahrung/Food* 47 No. 5, pp. 291 – 299
- Forrest, G. I., & Bendall, D. S. (1969). The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Biochemical Journal*, 113(5), 741-755.
- Franco, F y Ramos, A. (1996), El cultivo de leguminosas grano en Castilla y León.
- Fратиanni, F., Cardinale, F., Cozzolino, A., Granese, T., Albanese, D., Di Matteo, M., ... & Nazzaro, F. (2014). Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *Journal of functional foods*, 7, 551-557.
- Gião, M. S., Pereira, C. I., Fonseca, S. C., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2009). Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, 117(3), 412-416.
- Han, H., & Baik, B. K. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International journal of food science & technology*, 43(11), 1971-1978.

- Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Venema, D. P. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(9), 1591-1598.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(5), 530-534.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Ioannou, M., Karathanos, V. T., Hassapidou, M., & Andrikopoulos, N. K. (2010). Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry*, *121*(3), 682-690.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328-2375.
- Luthria, D. L. (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(14), 2266-2272.
- Mathers, J. C. (2002). Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *British Journal of Nutrition*, *88*(S3), 273-279.
- Mazza, G., Cacace, J. E. & Kay, C. D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J. AOAC Int.* *87*, 129-145.
- Milder, I. E., Arts, I. C., van de Putte, B., Venema, D. P., & Hollman, P. C. (2005). Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, *93*(03), 393-402.
- Morales Corts, R (2016) Caracterización nutricional de la lenteja de la Armuña. I convocatoria de proyectos de investigación orientados a ofrecer soluciones al sector primario. Diputación de Salamanca.
- Moreno, MT. (1983), *leguminosas de grano*
- Morimoto, M., Fukumoto, H., Nozoe, T., Hagiwara, A., & Komai, K. (2007). Synthesis and insect antifeedant activity of auronones against *Spodoptera litura* larvae. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(3), 700-705.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (1989). The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chemistry*, *31*(2), 159-164.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1), 95-111.
- Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J., Bellido, A. (2010). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls, *Food Research International* *44* (2011) 436–441.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química*, *31*(2), 68-81.

- Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1984). Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates—a review. *Food Chemistry*, 13(1), 25-68.
- Rochfort, S., & Panozzo, J. (2007). Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(20), 7981-7994.
- Salminen J.P., Ossipov V., Loponen J., Haukioja E and Pihlaja K (1999). Characterisation of hydrolyzable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 864: 283-291.
- Salunkhe, D. K., Kadam, S. S., & Chavan, J. K. (1985). *Postharvest biotechnology of food legumes*.
- Sánchez, A. (2017). Caracterización fenólica de la lenteja.
- Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.
- Sarker, A., & Erskine, W. (2006). Recent progress in the ancient lentil. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01), 19-29.
- Sarker, A., Erskine, W., Abu Bakr, M., Matiur Rahman, M., Ali Afzal, M., & Saxena, M. C. (2004). Lentil improvement in Bangladesh. *A success story of fruitful partnership between the Bangladesh Agricultural Research Institute and the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. APAARI Publication*, 1, 1-38.
- Saxena, M. C. (1981). Agronomy of lentils. *Lentils. Common Wealth Agricultural Bureaux, Norwich*, 111-129.
- Schwartz, H., Sontag, G., & Plumb, J. (2009). Inventory of phytoestrogen databases. *Food Chemistry*, 113(3), 736-747.
- Shakibaei, M., Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular nutrition & food research*, 53(1), 115-128.
- Shaver, L. A., Leung, S. H., Puderbaugh, A., & Angel, S. A. (2011). Two Methods of Determining Total Phenolic Content of Foods and Juices in a General, Organic, and Biological (GOB) Chemistry Lab. *Journal of Chemical Education*, 88(4), 492-495.
- Silva-Cristobal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. A. (2010). Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties Composición química, digestibilidad de carbohidratos, y capacidad antioxidante de variedades mexicanas cocidas de frijol negro, garbanzo, y lenteja. *CyTA—Journal of Food*, 8(1), 7-14.
- Singh, S., Singh, H. D., & Sikka, K. C. (1968). Distribution of nutrients in the anatomical parts of common Indian pulses. *Cereal Chem*, 45, 13-18.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Strasburger E., et al. traducción, Ma. Jesús Fortes Fortes. *Tratado de botánica*.



- Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I. 2001. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical- scavenging activity. *J Agric Food Chem* 49:5843–7.
- Thavarajah, D., Thavarajah, P., Sarker, A., & Vandenberg, A. (2009). Lentils (*Lens culinaris* Medikus Subspecies *culinaris*): a whole food for increased iron and zinc intake. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5413-5419.
- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H. Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., & Spencer, J. P. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484(1), 100-109.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 1-34). Springer Netherlands.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Torielli, G. B., Ferrarini, R., & Giulivo, C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5531-5536.
- Wang, N., & Daun, J. K. (2006). Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 95(3), 493-502.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- Weidner, S., Powalka, A., Karamać, M., & Amarowicz, R. (2012). Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines—Comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3444-3457.
- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72(2), S159-S166.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2010). Phenolic substance characterization and chemical and cell-based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(3), 1509-1517.
- Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., & Ono, M. (2009). In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*, 16(4), 369-376.
- Yu, J., Vasanthan, T., & Temelli, F. (2001). Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4352-4358.
- Zou, Y., Chang, S. K., Gu, Y., & Qian, S. Y. (2011). Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2268-2276.

[http://biolib.mpipz.mpg.de/thome/band3/tafel\\_134.htm](http://biolib.mpipz.mpg.de/thome/band3/tafel_134.htm) Consulta 14.05.17

<http://www.fao.org/3/a-a1392s.pdf> Consulta 17.05.17

<http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf> Consulta 17.05.17

<http://www.infoagro.com/herbaceos/legumbres/lenteja.htm> Consulta 19.05.17

[http://www.itacyl.es/opencms\\_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.extranet/elements/galleri/es/galeria\\_downloads/registros/Nuevo\\_Pliego\\_L\\_ARMUxA\\_VIGENTE.pdf](http://www.itacyl.es/opencms_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.extranet/elements/galleri/es/galeria_downloads/registros/Nuevo_Pliego_L_ARMUxA_VIGENTE.pdf) Consulta 22.05.17

[http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoop131marzo2016\\_tcm7-417146.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/situacionmercadoop131marzo2016_tcm7-417146.pdf) Consulta 15.05.17

[http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/BOE\\_281\\_221104\\_tcm7-206284.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/BOE_281_221104_tcm7-206284.pdf) Consulta 22.05.17

<http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/default.aspx> Consulta 20.05.17

[http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/dol148\\_tcm7-206283.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/dol148_tcm7-206283.pdf) Consulta 20.05.17

[http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/DOUE\\_117\\_13\\_tcm7-206286.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/DOUE_117_13_tcm7-206286.pdf) Consulta 22.05.17

[http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/DOUE\\_171\\_24\\_tcm7-206285.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidadagroalimentaria/DOUE_171_24_tcm7-206285.pdf) Consulta 22.05.17