

# UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE LA  
DIETA Y BIOMARCADORES DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, NUTRIENTES  
ANTIOXIDANTES E INFLAMACIÓN**

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

**CAYETANO JAVIER CARRIÓN GARCÍA**

Granada

Diciembre, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Cayetano Javier Carrión García  
ISBN: 978-84-1306-507-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/62371>



# FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral se ha realizado con el apoyo del fondo de investigación en salud, acción estrategia en salud del Ministerio de Economía y Competitividad (AES-FIS) ISCIII (PI12/00002) y cofinanciado por el Fondo Europeo de desarrollo regional (FEDER) y el grupo de investigación de la Junta de Andalucía: AGR-141, alimentos, nutrición y salud.



***A mi familia.***

*“No sufras por tu pasado, no te preocupes por tu futuro, sólo disfruta de tu presente.”*

*Anónimo.*



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a las personas que, con su ayuda, han colaborado en la realización de este trabajo, completándose una etapa muy importante de mi vida.

En primer lugar, tengo que agradecer muy especialmente a mis directores, Dr. Eduardo J. Guerra Hernández y Dra. M. Esther Molina Montes, que creyesen y confiaran en mí desde el primer momento, sin ellos, nada de esto hubiera sido posible.

Gracias, Eduardo, por haberme formado, dirigido y enseñado a desenvolverme dentro de un laboratorio, por atenderme en todas mis dudas, por tus consejos, por tu apoyo y por el trato que me has dedicado, haciéndome sentir más que tu doctorando.

Gracias, Esther, por enseñarme a interpretar, redactar e introducirme en el mundo de la bioestadística, por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas, por tu supervisión y apoyo en todo momento.

Gracias también a la Dra. Belén García-Villanova Ruiz por su orientación, seguimiento, apoyo continuo y tenerme siempre tan bien considerado.

Gracias a los responsables del estudio EPIC Granada-Guipúzcoa, a las investigadoras María José Sánchez y Pilar Amiano, por todo el apoyo que me han brindado para realizar esta Tesis Doctoral.

Agradezco a todo el profesorado del Departamento de Nutrición y Bromatología su acogida desde el primer momento, así como su interés y muestras de ánimo constantes.

Gracias al personal técnico de laboratorio y de limpieza del Departamento de Nutrición y Bromatología, en especial a Estrella, por su bondad, sencillez y cercanía, siempre con palabras que levantaban el ánimo y la confianza en uno mismo.

A mis queridos compañeros de fatigas doctorandos. Gracias Jaime, Silvia y Adelaida por vuestra amistad, por compartir conmigo tantos y tan buenos momentos dentro y fuera de la facultad, espero que haya sido sólo el aperitivo de muchas experiencias que nos quedan por vivir. Y, especialmente, a Ángela por, además de todo lo anterior, estar siempre tan pendiente y ofrecerme tu ayuda desinteresada en todo lo que pudiera necesitar, de verdad, muchas gracias “hermanita pequeña”.

A todos mis amigos de la infancia, del colegio, del instituto, de la facultad y del máster, por sus risas, sus consejos, por enseñarme a disfrutar la vida día a día y demostrarme lo que significa la palabra amistad.

Y, principalmente, a mi madre, mi padre y mis hermanos. Muchísimas gracias por haberme dado la vida, por la educación que he recibido, por ser mis mejores referentes y consejeros, por vuestro esfuerzo para darme la oportunidad de formarme lo mejor posible, por vuestro amor y, en definitiva, por ser los verdaderos culpables de que, hoy día, sea quien soy. Gracias por vuestra comprensión, apoyo, paciencia y por animarme siempre a terminar la Tesis. Sin ninguna duda, sois lo mejor que tengo en esta vida. ¡Os quiero!

A todos, muchas gracias.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINAS</b>
Índice de tablas	6
Índice de figuras	12
Abreviaturas	16
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
1.1. Antioxidantes de la dieta y salud	20
1.2. Radicales libres	22
1.2.1. Efectos nocivos de los radicales libres	23
1.3. Estrés oxidativo	25
1.4. Antioxidantes	26
1.4.1. Mecanismos de acción antioxidante	26
1.4.2. Sistemas de defensa antioxidante	27
1.5. Conceptos de capacidad antioxidante total (CAT) y capacidad antioxidante no enzimática (CANE)	35
1.6. Métodos de medida de la CAT-D en alimentos y de la CANE-P en muestras biológicas	38
1.7. Antioxidantes de la dieta y la relación con la CANE-P	41
1.7.1. Medida de CAT-D	41
1.7.2. Medida de CANE-P	42
1.7.3. La CAT-D y la CANE-P y el estrés oxidativo	43
1.8. Estudio EPIC	44
<b>2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>46</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
3.1. Objetivo general	51
3.2. Objetivos específicos	51
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>53</b>
4.1. Poblaciones de estudio	54
4.2. Extracción de sangre y medidas de CANE-P	57

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINAS</b>
4.3. Métodos de determinación de CANE en plasma	59
4.3.1. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC	59
4.3.2. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo TEAC-ABTS	62
4.3.3. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP	65
4.3.4. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo TRAP	68
4.3.5. Determinación de compuestos fenólicos totales mediante el ensayo Folin-Ciocalteu	69
4.4. Métodos de determinación de biomarcadores de nutrientes antioxidantes en plasma	71
4.4.1. Determinación de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (vitamina C)	71
4.4.2. Determinación de compuestos antioxidantes liposolubles	72
4.4.3. Determinación de carotenoides individuales	73
4.4.4. Determinación de minerales	74
4.4.5. Determinación de ácido úrico	75
4.5. Métodos de determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma	76
4.6. Métodos de determinación de biomarcadores de inflamación en plasma	77
4.7. Recogida de información de la dieta	78
4.8. Otras variables	79
4.9. Bases de datos de la CAT en alimentos	80
4.9.1. Formulario de recogida de información	80
4.9.1.1. Búsqueda bibliográfica sobre publicaciones de CAT en alimentos	80
4.9.1.2. Diseño del formulario de recogida de información de CAT en alimentos	81

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINAS</b>
4.9.1.3. Síntesis de la información de recogida en el formulario	86
4.9.2. Otras bases de datos internacionales de CAT en alimentos	90
4.9.3. Compilación de CAT-D	91
4.10. Método para la determinación de CAT del café mediante el ensayo ORAC	94
4.11. Compilación de los minerales y los carotenoides de la dieta	95
4.12. Análisis estadístico	96
4.12.1. Estudio de correlación entre CANE-P y CAT-D según bases de datos de CAT en alimentos	96
4.12.2. Estudio transversal I: Relación entre CANE-P y CAT-D	96
4.12.3. Estudio transversal II: Relación entre CANE-P y CAT-D con biomarcadores de nutrientes antioxidantes y de inflamación	98
4.12.4. Estudio transversal II y III: Otros componentes antioxidantes (minerales y carotenoides) relacionados con CANE-P y CAT-D	104
5. RESULTADOS	109
5.1. Información en el formulario de CAT en alimentos	110
5.2. Estudio transversal I	127
5.2.1. Valoración nutricional derivada del CFCA	127
5.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante en el plasma	130
5.2.3. Selección de la base de datos para la estimación de la CAT-D	131
5.2.4. Estimación de la CAT-D	133
5.2.5. Estimación de la CAT-D por grupo de alimentos	134
5.2.6. Análisis de correlación entre la CAT-D y la CANE-P	136
5.2.7. Análisis de correlación cruzado entre la CAT-D y la CANE-P	138
5.2.8. Análisis de correlación entre la CAT-D y la CANE-P por grupo de alimentos	139

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINAS</b>
5.3. Estudio transversal II	141
5.3.1 Análisis descriptivo de la población de estudio	141
5.3.2. Análisis de correlaciones entre biomarcadores y CANE-P y CAT-D	147
5.3.3. Estudio de asociación entre biomarcadores (regresión lineal multivariante)	150
5.3.4. Generación de clúster	163
5.4. Estudio transversal III	171
5.4.1. Características de la población del estudio III (n=52)	171
5.4.2. Descripción de la ingesta dietética y de los niveles en plasma de minerales y carotenoides en la población del estudio III (n=52)	171
5.4.3. Análisis de correlación entre minerales y carotenoides de la dieta y del plasma en la población del estudio III (n=52)	175
5.4.4. Descripción de los niveles en plasma de minerales y carotenoides en la población del estudio II (n=210)	178
5.4.5. Descripción de los niveles en plasma de minerales y carotenoides tras la imputación de los datos faltantes	182
5.4.6. Variables asociadas a la variabilidad de los niveles plasmáticos de minerales y carotenoides en la población del estudio II (n=210)	190
5.4.7. Comparación del perfil de minerales, carotenoides y otros biomarcadores del plasma según el grado de adherencia a la DM en la población del estudio II (n=210)	193
5.4.8. Modelo de predicción de CAT-D y CANE-P basado en co- variables de ingesta de nutrientes, biomarcadores nutricionales y estilos de vida	195
6. DISCUSIÓN	200
6.1. Formulario de CAT en alimentos (frutas)	201
6.1.1. Comparación del formulario con otras bases de datos	204
6.2. Estudio transversal I	205
6.2.1. Relaciones entre CAT-D y CANE-P	205
6.2.2. Fortalezas y limitaciones del estudio	213

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINAS</b>
6.3. Estudio transversal II	215
6.3.1. Relaciones entre CAT-D y CANE-P	216
6.3.2. Asociaciones de CAT-D y CANE-P con marcadores de nutrientes antioxidantes y de inflamación	217
6.3.3. Limitaciones y fortalezas del estudio	219
6.4. Estudio transversal II y III	221
6.4.1. Estudios de precisión para los métodos analíticos de carotenoides y minerales	221
6.4.2. Estudio de minerales en dieta y plasma	221
6.4.3. Estudio de carotenoides en dieta y plasma	224
6.4.4. Limitaciones y fortalezas del estudio	229
7. CONCLUSIONES	231
8. BIBLIOGRAFÍA	234
9. ANEXOS	256
Anexo 1. Listado de trabajos resultantes de la búsqueda bibliográfica con información relativa a las frutas	257
Anexo 2. Códigos empleados en el análisis	259
Anexo 3. Publicaciones y contribuciones a congresos	265
10. RESUMEN	266
10.1. INTRODUCCIÓN	267
10.2. OBJETIVOS	267
10.3. METODOLOGÍA	268
10.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	269
10.5. CONCLUSIONES	272

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>PÁGINAS</b>
<b>Tabla 1.</b> Contribución de grupos de alimentos y alimentos a los principales componentes del perfil antioxidante dietético de una dieta mediterránea (DM) europea.	21
<b>Tabla 2.</b> Características normalizadas de los métodos de medida de la capacidad antioxidante.	39
<b>Tabla 3.</b> Ventajas e inconvenientes de los ensayos de TEAC-ABTS, ORAC y Tp.	40
<b>Tabla 4.</b> Frutas recogidas en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.	87
<b>Tabla 5.</b> Zumos recogidos en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.	89
<b>Tabla 6.</b> Frutos secos recogidas en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.	90
<b>Tabla 7.</b> Artículos publicados sobre CAT y Tp en frutas, cultivadas o comercializadas en España, según ensayo de CAT.	111
<b>Tabla 8.</b> Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo TEAC-ABTS comercializadas en España con estandarización de unidades.	114
<b>Tabla 9.</b> Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo DPPH comercializadas en España con estandarización de unidades.	117
<b>Tabla 10.</b> Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo FRAP comercializadas en España con estandarización de unidades.	119
<b>Tabla 11.</b> Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo ORAC comercializadas en España con estandarización de unidades.	122
<b>Tabla 12.</b> Valores de Tp disponibles en bibliografía para frutas comercializadas en España con estandarización de unidades.	125
<b>TABLA 13.</b> Valoración nutricional relativa a energía, hidratos de carbono, lípidos, proteínas, fibra alimentaria, tipo de ácidos grasos y colesterol obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).	128
<b>TABLA 14.</b> Valoración nutricional relativa a vitaminas obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).	129
<b>TABLA 15.</b> Valoración nutricional relativa minerales obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).	130

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINAS

<b>Tabla 16.</b> Características socio-demográficas de la población de estudio según sexo y valores de CANE-P.	131
<b>Tabla 17.</b> Coeficientes de correlación entre CAT-D (derivada del CFCA y los R-24H) y CANE-P por grupos de alimentos (frutas y zumos) en muestra del estudio I (n=50).	132
<b>Tabla 18.</b> Valores de CAT-D derivados del CFCA y del R-24H.	134
<b>Tabla 19.</b> Coeficientes de correlación entre los valores de CAT-D (derivados del CFCA y del R-24H) y los valores de CANE-P.	137
<b>Tabla 20.</b> Coeficientes de correlación del análisis cruzado entre valores de CAT-D y CANE-P.	138
<b>Tabla 21.</b> Coeficientes de correlación entre los valores de CAT-D (derivados del CFCA y del R-24H) según grupos de alimentos y CANE-P.	140
<b>Tabla 22:</b> Características socio-demográficas y dietéticas en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.	142
<b>Tabla 23:</b> Características socio-demográficas y dietéticas en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según centro.	144
<b>Tabla 24:</b> Niveles de biomarcadores en plasma en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.	145
<b>Tabla 25:</b> Niveles de biomarcadores en plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según centro.	146
<b>Tabla 26:</b> Niveles de biomarcadores en plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.	147
<b>Tabla 27:</b> Coeficientes de correlación entre la CAT-D y todos los biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	149
<b>Tabla 28:</b> Coeficientes de correlación entre vitaminas antioxidantes de la dieta, CAT-D, CANE-P y vitaminas antioxidantes del plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	150
<b>Tabla 29:</b> Asociaciones entre el ensayo TRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	152
<b>Tabla 30:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	153

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINAS
<b>Tabla 31:</b> Asociaciones entre el ensayo TEAC-ABTS en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	155
<b>Tabla 32:</b> Asociaciones entre el ensayo ORAC en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.	156
<b>Tabla 33:</b> Asociaciones entre el ensayo TRAP de la dieta sin la contribución del café y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa en modelos de multivariantes.	158
<b>Tabla 34:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP de la dieta sin la contribución del café y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa en modelos de multivariantes.	159
<b>Tabla 35.</b> Análisis de sensibilidad eliminando los puntos influyentes basados en las distancias de Cook en modelos multivariantes para TRAP y FRAP.	161
<b>Tabla 36.</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma sin ácido úrico y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa (n=210).	162
<b>Tabla 37:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según hábito tabáquico.	166
<b>Tabla 38:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según IMC.	167
<b>Tabla 39:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según índice de adherencia a la DM.	168
<b>Tabla 40:</b> Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en el clúster-1, que mayoritariamente comprende mujeres de la cohorte EPIC-Granada, no fumadoras e inactivas (n=70; valor medio de FRAP=395 $\mu$ mol TE/L).	170
<b>Tabla 41.</b> Características socio-demográficas de la población del estudio III según sexo.	171
<b>Tabla 42.</b> Descripción de la ingesta de minerales y carotenoides según el CFCA en la población del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).	173
<b>Tabla 43.</b> Descripción de la ingesta de minerales y carotenoides según el R-24H en la población del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).	174
<b>Tabla 44.</b> Descripción de los niveles minerales y carotenoides en el plasma sanguíneo en la muestra del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).	174

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINAS
<b>Tabla 45.</b> Correlaciones (spearman) entre los niveles de minerales en dieta (derivados del CFCA) y los niveles de minerales en plasma (n=52).	175
<b>Tabla 46.</b> Correlaciones (spearman) entre los niveles de minerales en dieta (derivados del R-24H) y los niveles de minerales en plasma (n=52).	176
<b>Tabla 47.</b> Correlaciones (spearman) entre niveles de carotenoides en dieta (derivados del CFCA y del R-24H) y niveles de carotenoides en plasma (n=52).	177
<b>Tabla 48.</b> Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II (n=210).	178
<b>Tabla 49.</b> Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II según sexo (n=63 hombres; n=147 mujeres). Valores crudos, sin imputar.	181
<b>Tabla 50.</b> Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II según centro (n=105 Granada; n=105 Guipúzcoa). Valores crudos, sin imputar.	181
<b>Tabla 51.</b> Descripción de las características de la población de estudio en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050) según sexo.	186
<b>Tabla 52.</b> Descripción de las características de la población de estudio en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050) según centro.	187
<b>Tabla 53.</b> Análisis descriptivo en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050).	188
<b>Tabla 54.</b> Regresión múltiple de variables predictoras asociadas a niveles plasmáticos de minerales en plasma (transformados logarítmicamente) en el estudio II (n=210).	191
<b>Tabla 55.</b> Regresión múltiple de variables predictoras asociadas a niveles plasmáticos de carotenoides en plasma (transformados logarítmicamente) en el estudio II (n=210).	192
<b>Tabla 56.</b> Descripción de los niveles plasmáticos de minerales, carotenoides y otros biomarcadores según el grado de adherencia al índice de DM (baja, media y alta) en la población del estudio II (n=210). Valores imputados.	194
<b>Tabla 57.</b> Selección de co-variables de ingesta de nutrientes, biomarcadores nutricionales y estilos de vida y valor del área bajo la curva dado por cada set de co-variables seleccionado en el modelo.	196

---

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINAS
<b>Tabla 59.</b> Co-variables de biomarcadores nutricionales y de los estilos de vida seleccionados para predecir altos con respecto a medio/bajos niveles de FRAP en plasma con un AUC=0,9.	197
<b>Tabla 60.</b> Valores de CAT y Tp disponibles en bibliografía para frutas comercializadas en España con estandarización de unidades.	202
<b>Tabla 61:</b> Comparación de estudios que analizan correlaciones entre CAT-D y CANE-P.	208

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINAS</b>
<b>Figura 1.</b> Radicales libres y transferencia de electrones.	22
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción enzimático para disminuir las concentraciones de radicales libres.	28
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la vitamina C.	30
<b>Figura 4.</b> Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.	31
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo del proceso de selección de los 210 participantes en el estudio.	56
<b>Figura 6.</b> Centrífuga Sigma 2-16PK Sartorius, utilizada en el proceso de obtención del plasma.	57
<b>Figura 7.</b> Lector de microplaca FLUOstar Omega.	58
<b>Figura 8.</b> Reacción de la fluorescencia en el método ORAC.	59
<b>Figura 9.</b> Centrífuga Labnet Spectrafuge 24D para desproteínizar el plasma.	60
<b>Figura 10.</b> Valor de ORAC calculado mediante la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia a lo largo del tiempo entre el blanco y una muestra.	62
<b>Figura 11.</b> Reacción del radical ABTS <sup>•+</sup>	63
<b>Figura 12.</b> Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.	64
<b>Figura 13.</b> Reacción de reducción de Fe (III) a Fe (II) producida en el método FRAP.	65
<b>Figura 14.</b> Balanza de precisión Mettler AE 200 para pesaje de todos los reactivos.	66
<b>Figura 15.</b> Cinética de la oxidación de la R-PE (5 mM AAPH, en presencia de 8 $\mu$ l de plasma antes y después de adicionar una solución final de 1,8 $\mu$ M de Trolox) según Ghiselli <i>et al.</i> (2000).	68
<b>Figura 16.</b> Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrómetro de masas Acquity UHPLC BEH en tándem con espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters Co., Milford, MA).	72
<b>Figura 17.</b> Cromatograma representativo del patrón de 50 ppb de todos los carotenoides analizados.	74
<b>Figura 18.</b> Agilent 7500c ICP-MS System.	74

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINAS
<b>Figura 19.</b> Analizador bioquímico Mindray BS-200.	75
<b>Figura 20.</b> Lector con multi-detección de fluorescencia de microplacas FLx800TM (BioTek).	76
<b>Figura 21.</b> Luminex 200™ System (Luminex Corporation).	77
<b>Figura 22.</b> Architect c16000 System (Abbott Core Laboratory).	77
<b>Figura 23.</b> Formulario Access de las variables de recogida de información de la primera parte.	83
<b>Figura 24.</b> Formulario Access de las variables de recogida de información relativas relativa al ensayo de CAT del alimento. Ejemplo del formulario FRAP.	85
<b>Figura 25.</b> Tabla de los registros grabados en el formulario Access.	86
<b>Figura 26.</b> Ejemplo de diagrama de dispersión de datos que establece la relación entre la CANE-P y el resto de los biomarcadores.	99
<b>Figura 27.</b> Ejemplo de agrupación de elementos en un dendograma.	102
<b>Figura 28.</b> Ejemplo de dendograma con matriz de distancias (correlaciones).	102
<b>Figura 29.</b> Puntos influyentes para el ácido úrico en el modelo de regresión multivariante ajustado por edad, sexo y centro, según distancias de Cook. Los puntos por encima de la línea roja son puntos influyentes del biomarcador ácido úrico en el modelo.	103
<b>Figura 30.</b> Ilustración de la técnica de cross-validation (validación cruzada) para un conjunto de 20 datos, donde se llevan a cabo cuatro validaciones (four-fold), utilizando unos datos de entrenamiento diferentes, que serán analizadas por cuatro clasificadores, que posteriormente evaluarán los datos de prueba. En nuestro caso, se emplearon 5 validaciones cruzadas (five-fold) en las 210 observaciones, evaluándose también cuatro clasificadores.	108
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de contribución a la CAT-D global según grupo de alimentos (sin la contribución de la CAT del café) derivado del CFCA.	135
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de contribución a la CAT-D global según grupo de alimentos (sin la contribución de la CAT del café) derivado del R-24H.	135
<b>Figura 33.</b> Matriz de correlaciones entre todos los biomarcadores del plasma (nutrientes antioxidantes, CANE-P e inflamación) en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de las asociaciones, siendo de color rojo las correlaciones positivas y de color azul las correlaciones negativas.	148

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINAS
<b>Figura 34.</b> Análisis de agrupamiento jerárquico entre la CANE-P y los biomarcadores medidos en plasma de la población de estudio (el color rojo indica niveles altos y el azul indica valores bajos, mientras que, los datos faltantes en ciertos biomarcadores, aparecen en blanco). Distancias de Manhattan.	164
<b>Figura 35.</b> Análisis de agrupamiento jerárquico entre la CANE-P y los biomarcadores medidos en plasma de la población de estudio (el color rojo indica niveles altos y el azul indica valores bajos, mientras que, los datos faltantes en ciertos biomarcadores, aparecen en blanco). Distancias euclídeas.	165
<b>Figura 36:</b> Diagrama de cajas de minerales ( <b>A</b> ) y carotenoides ( <b>B</b> ) en dieta de la población del estudio III.	172
<b>Figura 37.</b> Diagrama de cajas y comparación de las concentraciones de minerales en plasma entre la población del estudio II y la población del estudio III.	179
<b>Figura 38.</b> Diagrama de cajas y comparación de las concentraciones de carotenoides en plasma entre la población del estudio II y la población del estudio III.	180
<b>Figura 39:</b> Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de $\beta$ -criptoxantina en los cinco ciclos de imputación múltiple.	182
<b>Figura 40:</b> Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de $\beta$ -caroteno en los cinco ciclos de imputación múltiple.	183
<b>Figura 41:</b> Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de luteína en los cinco ciclos de imputación múltiple.	184
<b>Figura 42:</b> Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de licopeno en los cinco ciclos de imputación múltiple.	185
<b>Figura 43.</b> Gráfico radial representado la variabilidad de los niveles de carotenoides en plasma de algunas variables predictoras en la muestra del estudio II (n=210).	193
<b>Figura 44.</b> Curva ROC del modelo de predicción de niveles de FRAP basado en los biomarcadores nutricionales de la firma (ácido úrico, Se, Zn, coenzima Q10 y retinol).	198
<b>Figura 45.</b> Biplot del análisis de PCA conteniendo variables de nutrientes y compuestos con potencial antioxidante de la dieta y del plasma.	199

# ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AUC: Área bajo la curva.

BEDCA: Base de datos española de composición de alimentos.

CANE: Capacidad antioxidante no enzimática.

CANE-P: Capacidad antioxidante no enzimática del plasma.

CAT: Capacidad antioxidante total.

CAT-D: Capacidad antioxidante total de la dieta.

CESNID: Centro de enseñanza superior de nutrición y dietética.

CFCA: Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

CI: Intervalo de confianza.

Coenzima Q10: Q10.

Coenzima Q9: Q9.

Cu: Cobre.

DM: Dieta mediterránea.

ECV: Enfermedad cardiovascular.

ENDB: Base de datos de nutrientes de EPIC.

EPIC: European prospective into cancer and nutrition.

ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.

EROs: Especies Reactivas de oxígeno.

FCR: Reactivo Folin-Ciocalteu.

Fe: Hierro.

FRAP: Ferric-reducing antioxidant power.

GETD: Gasto energético total diario.

GPX: Glutación peroxidasa.

GST: Glutación S-transferasa.

HAT: Hydrogen atom transfer.

HClO: Ácido hipocloroso.

IDR: Ingesta dietética de referencia.

IE: Ingesta energética.

IL-6: Interleucina-6.

IL-8: Interleucina-8.

IMC: Índice de masa corporal.

IRD: Ingesta dietética de referencia.  
LDL: Lipoproteína de baja densidad.  
LDL-ox: Lipoproteína de baja densidad oxidada.  
MDA: Malondialdehído.  
Mn: Manganeso.  
MPO: Mieloperoxidasa.  
NADPH: Nicotinamida adenindinucleotido-fosfato.  
NOS: Óxido Nítrico sintasa.  
NOX: NADP-oxidasa.  
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity.  
OS: Estrés oxidativo.  
PAI-1: Inhibidor del activador plasminógeno-1.  
PCR: Proteína C-reactiva.  
R-24H: Recuerdo de 24 Horas.  
RE: Requerimiento energético.  
Se: Selenio.  
SET: Single electron transfer.  
SOD: Superóxido dismutasa.  
TEAC-ABTS: Trolox equivalent antioxidant capacity.  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.  
Tp: Compuestos fenólicos totales.  
TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameters.  
VCEAC: Vitamin C equivalent antioxidant capacity.  
XO: Xantina oxidasa.  
Zn: Cinc.

# INTRODUCCIÓN

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antioxidantes de la dieta y salud

Los estudios que relacionan la ingesta de determinados antioxidantes dietéticos o la totalidad de estos (capacidad antioxidante total -CAT-), con algún parámetro de salud o, incluso, con la mortalidad total o mortalidad por causas específicas, son muy variados.

Un ejemplo para el primer caso es el estudio llevado a cabo en la cohorte EPIC (European Prospective into Cancer and Nutrition) perteneciente a los centros de España, que observó cómo una alta ingesta de vitamina C, carotenoides y licopeno de frutas y verduras se asociaron con la disminución del riesgo de mortalidad (HR ajustada = 0,74, IC 95%, 0,58-0,94; HR = 0,68, IC 95%, 0,53-0,87 y HR = 0,65, IC 95%, 0,51-0,84, respectivamente). Por otra parte la ingesta de flavonoides procedentes de 15 estudios de cohortes prospectivos (meta-análisis) se asoció con una disminución de un 14% en el riesgo de mortalidad por ECV (RR = 0,86, IC 95%, 0,75-0,98) comparando la categoría de mayor consumo frente a la menor (Kim y Je, 2017).

Para el segundo caso, el estudio Rotterdam (personas mayores de 55 años, n=3209) (Pantavos *et al.*, 2015) mostró que los sujetos que presentaron mayores valores de FRAP dietético (medida de CAT) presentaban una menor incidencia de cáncer de mama (HR = 0,68, IC 95%, 0,49-0,96) tras 6,5 años de seguimiento o en el estudio PREDIMED, ensayo clínico para prevención de enfermedad cardiovascular (ECV) mediante la intervención con dieta mediterránea (DM) que no encontró asociación entre la CAT de la dieta (CAT-D), medida como FRAP y el riesgo de mortalidad en 7447 sujetos (Henríquez *et al.*, 2016) tras 4,3 años de seguimiento.

Dado el efecto antagónico y de sinergia que pueden presentar los nutrientes y compuestos no nutritivos de los alimentos y, especialmente, los antioxidantes cuando se ingieren conjuntamente (Poljsak *et al.*, 2013) se han desarrollado patrones dietéticos que se han mostrado eficaces frente al estrés oxidativo. La DM es un modelo alimentario desarrollado en los países situados alrededor del mar Mediterráneo y es considerado uno de los patrones dietéticos más saludables (Trichopoulou *et al.*, 2014). Revisiones sistemáticas y meta-análisis recientes han concluido que, el seguimiento de una dieta tipo mediterránea, podría ser una buena estrategia tanto a nivel de prevención primaria como terciaria, en el tratamiento de la mayor parte de las enfermedades crónicas (Schwingshackl *et al.*, 2017;

Molendijk *et al.*, 2018; Salas-Salvadó *et al.*, 2018): Enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, diabetes y dislipemias, obesidad, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Este patrón dietético se caracteriza, principalmente, por un alto consumo de alimentos de origen vegetal entre los que destacan la ingesta de verduras, hortalizas, frutas frescas, frutos secos, legumbres y cereales preferiblemente en sus formas integrales (Martínez-González *et al.*, 2017), todos ellos ricos en compuestos bioactivos/antioxidantes. Dilis y Trichopoulou (2010) caracterizaron el perfil de antioxidantes de los alimentos ingeridos por más de 28000 sujetos, los alimentos que contribuían de forma más significativa al aporte de los principales componentes del perfil antioxidante dietético propuesto se muestran de forma resumida en la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Contribución de grupos de alimentos y alimentos a los principales componentes del perfil antioxidante dietético de una dieta mediterránea (DM) europea.

Componentes del perfil antioxidante dietético	Grupos de alimentos y alimentos
Flavonas	Vino, pimiento, naranja, melón, perejil
Flavonoles	Cebolla, calabacín, espinaca, apio, tomate, uva, eneldo, perejil
Flavanonas	Cítricos, zumos de cítricos, tomate, vino
Flavanoles	Manzana, melocotón, uvas, lentejas, higos, té, cerveza, vino
Antocianidinas	Cereza, manzana, melocotón, berenjena, plátano, fresa, vino, vinagre
Isoflavonas	Legumbres
Proantocianidinas	Uvas, melocotón, pera, vino
Vitamina C	Naranja, pimiento, tomate
Vitamina E	Aceite de oliva, aceitunas, tomate
$\beta$ -caroteno	Zanahorias, tomate, melón
Selenio	Pan, arroz, queso
TEAC-ABTS	Naranja, tomate, pimiento, vino
TRAP	Naranja, tomate, pimiento, vino
FRAP	Naranja, tomate, pan, tomate, vino
ORAC	Manzana, naranja, patata, vino
Fenoles totales	Naranja, tomate, patata

## 1.2. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas inestables (moléculas, átomos) con electrones desapareados en su último orbital que les proporciona gran reactividad química. Interactúan rápidamente con un gran número de moléculas con las que entran en contacto extrayendo o donando electrones con el fin de estabilizar sus orbitales externos convirtiendo a éstas, en radicales libres (figura 1).

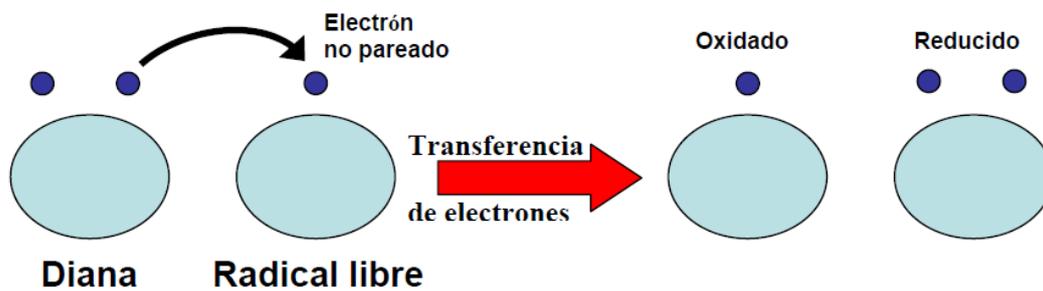


Figura 1: Radicales libres y transferencia de electrones.

Los radicales libres pueden proceder de fuentes endógenas o exógenas:

A) Las fuentes endógenas corresponden a los radicales libres generados mediante los sistemas enzimáticos presentes en los diversos compartimentos celulares. Pueden derivar del oxígeno, “Especies Reactivas de Oxígeno” (EROs), o del nitrógeno, siendo denominados, “Especies Reactivas de Nitrógeno” (ERNs) (Martínez-Cayuela, 2010). Las EROs son la clase más importante de radicales libres en los seres vivos, e incluye tanto radicales libres de oxígeno como sustancias no radicales que son agentes oxidantes. Son capaces de oxidar macromoléculas biológicas tales como, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunas de las principales EROs, productos normales del metabolismo, son: el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

Las mitocondrias, presentes en todas las células aerobias, son la fuente biológica más importante de anión superóxido, el cual puede reaccionar con la enzima superóxido dismutasa (SOD) y generar peróxido de hidrógeno o, con el óxido nítrico y dar lugar a peroxinitrito (Valko *et al.*, 2007). En la membrana celular, por acción de enzimas oxidasas, se generan radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y ácido hipocloroso (HClO) (Genestra,

2007). Además, otras enzimas oxidasas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa producen EROs durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Genestra, 2007). En el retículo endoplasmático también se producen radicales por la autooxidación de la flavoproteína citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450.

B) Las fuentes exógenas son de diversa naturaleza y de distintos orígenes. Las radiaciones ultravioleta y las ionizantes son fuentes de radicales libres por transferir su energía a componentes celulares como el agua. Los contaminantes atmosféricos, pesticidas, humo del tabaco, hidrocarburos aromáticos y metales pesados, entre otros y, algunos fármacos, pueden poseer radiales libres de manera intrínseca, como el humo del tabaco o bien, generarlos a través del metabolismo celular y de los procesos relacionados con éste (Ahmadinejad *et al.*, 2017). Otras fuentes exógenas serían los compuestos de naturaleza oxidante ingeridos con la dieta, como determinados aditivos, bebidas alcohólicas o radicales libres (peróxidos lipídicos) producidos por la oxidación de grasas y aceites de origen animal y vegetal en los procesos tecnológicos y culinarios.

### 1.2.1. Efectos nocivos de los radicales libres

La formación de radicales libres en los sistemas biológicos es continua. Muchos de los radicales son fundamentales para la actividad celular normal, facilitando determinadas funciones, entre ellas, defensivas (fagocitosis), vasodilatadoras, regulación de diversos enzimas, participación en sistemas de transducción de señales, diferenciación celular y procesos de apoptosis. Sin embargo, la excesiva producción de radicales libres o el deterioro de los sistemas de defensa hace que estos sean perjudiciales.

La acumulación de radicales libres en el organismo puede provocar daños en la estructura y en la función celular mediante la degradación oxidativa de los lípidos, de las proteínas y del ácido desoxirribonucleico (ADN) que dan como resultado una lesión celular:

- Daño oxidativo a proteínas: Los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, cisteína y metionina) son los más susceptibles a la oxidación y, muy especialmente, los aminoácidos azufrados cisteína y metionina, que poseen grupos tiol. La magnitud del daño dependerá de la función de los aminoácidos oxidados en la proteína. La oxidación genera entrecruzamiento de cadenas peptídicas, agregación, susceptibilidad a la proteólisis y, consecuentemente, fragmentación y formación de grupos carbonilo; todo lo cual produce una

modificación de la función biológica por pérdida de la actividad catalítica o de la integridad de la membrana (Winterbourn y Hampton, 2008).

- Daño oxidativo de lípidos: Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. Estos, inician y causan la peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas), particularmente de aquéllos que componen las membranas celulares. Es un proceso radicalario autocatalítico que transcurre en tres etapas: Iniciación, propagación y terminación (Halliwell y Chirico, 1993). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son oxidadas por radicales libres, y las LDL oxidadas (LDL-ox) activan a los macrófagos que las fagocitan y se convierten en células espumosas que constituyen el núcleo de la placa ateromatosa (Hulthe y Fagerberg, 2002; Libby *et al.*, 2011).

- Daño del ADN: La molécula de ADN está expuesta a lesiones a nivel molecular seguidas de procesos fisiológicos de reparación. La modificación de las bases púricas y pirimidínicas debidas a la rotura de las cadenas polipeptídicas o a la hidroxilación de las bases nitrogenadas, da lugar a la formación de cadenas cruzadas de ADN (aductos de ADN) o de ADN y proteínas; también pueden modificar la cromatina con graves consecuencias en el desarrollo de mutagénesis y carcinogénesis o de pérdida de la expresión del gen lesionado (Wagner y Cadet, 2013).

### 1.3. Estrés oxidativo

Se conoce como estrés oxidativo el daño producido por la interrelación de los radicales libres con las moléculas de su entorno. En otras palabras, el estrés oxidativo corresponde al exceso de radicales libres producido por un desequilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras. Esto producirá la oxidación de las biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y, como consecuencia, daño tisular tanto estructural como funcional (McCord, 2000).

El estrés oxidativo está asociado a una serie de procesos patológicos en el ser humano, como procesos inflamatorios, tóxicos y metabólicos, carcinogénesis, daño de isquemia-perfusión y enfermedades cardiovasculares, además de procesos fisiológicos como el envejecimiento (Escrig-Fernández, 2012). A corto plazo, puede producirse estrés oxidativo por traumas, infecciones, lesiones por calor, toxinas y por un ejercicio físico intenso. En los tejidos lesionados se incrementa la producción de enzimas generadoras de radicales libres, se produce una activación de fagocitos, liberación de iones hierro (Fe) y cobre (Cu) o alteración de las cadenas de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, produciendo un exceso de EROs.

Existen cuatro sistemas celulares básicos que pueden quedar afectados por el daño producido por los radicales libres: Respiración aeróbica, síntesis de proteínas, membrana celular y ADN celular. Los radicales libres, toman los electrones de lípidos y proteínas de la membrana celular, dañándola e impidiéndole realizar sus funciones. Dentro de la célula atacan el ADN, impidiéndole la replicación. Por otra parte, también favorecen la aparición de envejecimiento al dañar el colágeno de las células de la piel, provocando una pérdida de elasticidad. Además, por la oxidación se puede producir un anormal crecimiento de las células, al perder la capacidad de reconocer a las células vecinas, dando lugar a tumores benignos o malignos como el cáncer. La iniciación, promoción y progresión del cáncer, así como los efectos secundarios de la radiación y la quimioterapia, se han relacionado con el desequilibrio entre EROs y el sistema de defensa antioxidante (Rao *et al.*, 2006).

## 1.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o inhiben la oxidación bloqueando los radicales libres que dañan las células, proteínas, lípidos y ADN, y permiten que se recupere una estructura química estable. Los alimentos de origen vegetal mejoran la defensa antioxidante de forma directa o indirecta, activando los sistemas de detoxificación y los antioxidantes endógenos (Masella *et al.*, 2005), por lo que la dieta es de suma importancia en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

### 1.4.1. Mecanismos de acción antioxidante

Los mecanismos de acción antioxidante pueden clasificarse en 4 grandes grupos:

A) Los antioxidantes pueden interaccionar directamente con las especies reactivas, mediante un proceso denominado *scavenger*. Esto supone una estabilización a través de la cesión de un electrón a las especies reactivas, mecanismo conocido como “*single electron transfer*” (SET). Al ceder el antioxidante al electrón, se convierte en un radical de baja o nula reactividad. La estabilización puede también llevarse a cabo por transferencia de un átomo de hidrógeno. Este mecanismo se denomina “*hydrogen atom transfer*” (HAT). Los antioxidantes no enzimáticos procedentes de la dieta (compuestos fenólicos, tocoferoles, ácido ascórbico) o sintetizados en el organismo (glutatión, melatonina, ácido úrico) son los que actúan mediante estos dos mecanismos SET y/o HAT. Estos mecanismos previenen el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a sustratos biológicos (Apak *et al.*, 2016).

B) Los antioxidantes pueden actuar inhibiendo la formación de enzimas prooxidantes por inhibición de la expresión, la síntesis o la actividad de las enzimas implicadas en la formación de especies reactivas como xantina oxidasa (XO), mieloperoxidasa (MPO), NADP-oxidasa (NOX), óxido nítrico sintasa (NOS). Este mecanismo se ha observado con ciertos compuestos fenólicos, ácido fólico, antiinflamatorios no esteroideos, etc. (Halliwell, 2006).

C) Los antioxidantes pueden ejercer una acción quelante, sobre el Fe y el Cu principalmente, que en su estado reducido tienen la capacidad de, a partir del peróxido de hidrógeno, formar radicales hidroxilo (reacción de Fenton). Algunos ejemplos son los péptidos y proteínas como ferritina y ceruloplasmina y los compuestos fenólicos, entre otros (Valko *et al.*, 2007).

D) El organismo sintetiza enzimas cuya finalidad es eliminar las especies reactivas, especialmente EROs y, así, disminuir el estado redox celular, dando lugar así, al sistema antioxidante endógeno. Destacan la SOD, catalasa, glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión S-transferasa (GST) y sulfoxi-metionina-reductasa. Ciertos compuestos presentes en la dieta, como polifenoles, isotiocianatos y curcuminoides, inducen la expresión de genes que codifican la síntesis de algunas de estas enzimas. Estos compuestos son también conocidos como inductores de enzimas de biotransformación del tipo fase II, es decir, las enzimas que conjugan xenobióticos electrófilos.

### 1.4.2. Sistemas de defensa antioxidante

Los sistemas de defensa antioxidante del organismo funcionan de forma coordinada protegiendo la homeostasis celular de la alteración oxidativa producida por los radicales libres y otras especies reactivas.

Existen sistemas de defensa antioxidante primarios o preventivos y sistemas de defensa secundarios o rompedores de cadena. Los primarios actúan sobre las EROs, disminuyendo la velocidad de reacción radicalaria y, los secundarios, atrapan los radicales propagadores, deteniendo su efecto nocivo.

Los sistemas de defensa antioxidante del organismo pueden ser de origen endógeno (de naturaleza enzimática y no enzimática), o pueden ser de origen exógeno (procedentes de la dieta) (Escrig-Fernández, 2012):

- **Defensas endógenas contra la acción de los radicales libres: Mecanismos enzimáticos.** Para contrarrestar el daño producido por el estrés oxidativo, los seres vivos desarrollan una serie de mecanismos con objeto de establecer el equilibrio oxidativo. En este sentido, existen diversas enzimas cuya función primaria es disminuir las concentraciones intra e intercelulares de las EROs. Entre ellas, se encuentran la SOD, catalasa, GPX, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y otras (**figura 2**). Su función es eliminar las EROs, con el fin de evitar que, a partir de éstas, se generen otras especies más reactivas y peligrosas, como pueden ser el oxígeno singlete, radical hidroxilo y el peroxinitrito (Martínez-Cayuela, 2010):

A) **SOD.** Es una metaloenzima que cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  para producir  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Actúa a unos determinados valores de pH fisiológico. Se pueden diferenciar tres formas de

SOD: la citosólica (Cu/ZnSOD), la mitocondrial (MnSOD) y la extracelular (ECSOD) (Fattman *et al.*, 2003).

B) Catalasa. La catalasa es una hemoproteína que cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . La mayor parte de las células contienen catalasa, aunque en los animales abunda en el hígado, riñón y eritrocitos. Es una enzima intracelular localizada principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Martínez-Cayuela, 2010).

C) GPX. Son enzimas que pertenecen al grupo de las peroxidas. En su mayor parte se encuentran en el citosol y en menor medida en la matriz mitocondrial. Existen dos grandes grupos de GPXs: Uno dependiente del selenio (Se), que cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de otros hidroperóxidos orgánicos empleando el glutatión como co-sustrato y otro, la glutatión reductasa, que cataliza la reducción del glutatión oxidado usando equivalentes redox en forma de nicotinamida adenindinucleotido-fosfato (NADPH) (Martínez-Cayuela, 2010).

D) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las actividades de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa están acopladas a la producción de NADPH por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la ruta de las pentosas fosfato (Martínez-Cayuela, 2010).

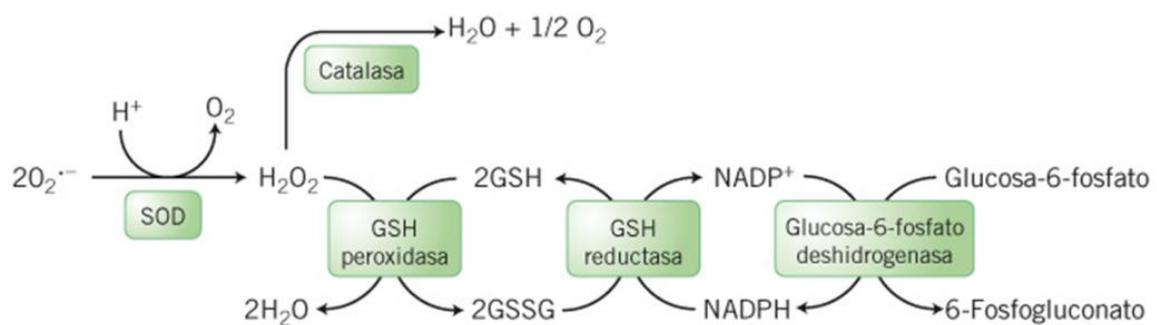


Figura 2. Mecanismo de acción enzimático para disminuir las concentraciones de radicales libres.

- Defensas endógenas contra la acción de los radicales libres: Mecanismos no enzimáticos. Además de las enzimas descritas anteriormente, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática, secuestrando los radicales libres que escapan de los enzimas antioxidantes. Dentro de este grupo, se encuentran diversas proteínas y moléculas de bajo peso molecular, como el glutatión, el ácido úrico o la taurina. Asimismo, existen también diversas moléculas pequeñas que son capaces de reaccionar no

enzimáticamente con intermediarios de radicales libres, entre los que se encuentran el ubiquinol o coenzima Q (Martínez-Cayuela, 2010):

A) Proteínas. Los metales de transición, como el Fe o el Cu, están implicados en la generación de radicales libres hidroxilo, así como en reacciones con radicales libres que convierten las especies poco reactivas en otras con más reactividad. Cuando estos metales están ligados a proteínas como la ferritina, transferrina, ceruloplasmina y albúmina, difícilmente pueden llevar a cabo esta catálisis y, por tanto, estas proteínas que reducen los niveles de iones metálicos libres, se consideran mecanismos de defensa antioxidante.

B) Glutati6n. El glutati6n constituye el tiol de bajo peso molecular m1s abundante en las c6lulas de mamíferos. Esta mol6cula puede reaccionar con los radicales libres de ox6geno de diferentes formas; mediante la acci6n de la GPX puede reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otros per6xidos, puede reaccionar directamente con radicales libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, donando un 1tomo de hidr6geno y, por 6ltimo, puede reaccionar con electr6filos para formar aductos covalentes mediante reacciones catalizadas por las glutati6n transferasas. Al igual que ocurre con las defensas antioxidantes, los niveles de glutati6n fluctúan en determinadas situaciones fisiol6gicas. Se ha comprobado que la edad reduce los niveles de glutati6n, debido a un incremento de su tasa de oxidaci6n o a una disminuci6n del recambio de glutati6n. La inhibici6n de la oxidaci6n lip6dica por el glutati6n parece estar relacionada con la regeneraci6n de vitamina E.

C) 1cido 6rico. Se produce en el organismo durante el catabolismo de las bases p6ricas. Puede actuar como antioxidante en el plasma al interaccionar con los EROs como el OH<sup>•</sup>, adem1s de acomplejar metales como el Fe o Cu y, de esta forma, preservar el ascorbato del plasma.

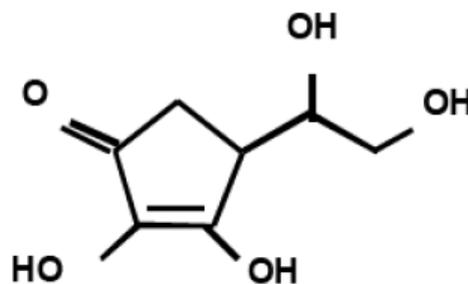
D) Taurina. Se ha demostrado el papel de la taurina como antioxidante, ya que puede reaccionar directamente con distintas EROs (HClO), convirti6ndolas en formas menos reactivas.

E) Ubiquinol o coenzima Q. Se puede considerar como un antioxidante, ya que interviene en el reciclaje de la vitamina E hasta su forma reducida. Adem1s, es capaz de reaccionar con los radicales alc6xilo y per6xilo de los l6pidos, deteniendo de este modo la cadena de propagaci6n del daño peroxidativo.

**- Defensas exógenas contra la acción de los radicales libres (procedentes de la dieta).**

La mejora de la defensa antioxidante o el mantenimiento de una defensa antioxidante óptima disminuyen el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas y ralentiza el proceso de envejecimiento (Peng *et al.*, 2014). Esta situación de mayor potencial antioxidante implica un aumento de la ingesta de alimentos de origen vegetal ricos en compuestos antioxidantes. Las vitaminas (C, E y A), compuestos fenólicos y carotenoides (Bjørklund y Chirumbolo, 2017), son los principales grupos de antioxidantes presentes en alimentos vegetales. Algunos estudios han relacionado el papel de estos compuestos bioactivos con la salud, aportando suficientes evidencias sobre el papel de los antioxidantes en la prevención de enfermedades (Pellegrini *et al.*, 2018). La alta adhesión al patrón de la DM, que se caracteriza por el consumo de una amplia variedad de verduras, frutas, legumbres, frutos secos, cereales, vino tinto, zumos de cítricos y otras bebidas, (Zamora-Ros, *et al.*, 2013) hacen que este tipo de patrón dietético sea uno de los que aporten, potencialmente, mayor cantidad de estos compuestos:

A) Vitamina C. La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble y un potente agente reductor, capaz de reducir la mayoría de los radicales EROs y ERNs que se encuentran en el interior y exterior de la célula (**figura 3**). Es el antioxidante que ejerce mayor efecto protector frente a la peroxidación lipídica, debido al poder regenerador que tiene sobre el  $\alpha$ -tocoferol (Kojo, 2004). El anión ascorbato ( $AH^-$ ) es la forma predominante a pH fisiológico y actúa reduciendo los radicales superóxido, hidróxilo y los hidroperóxidos lipídicos, transformándose en deshidroascorbato (A). Los productos de oxidación de la vitamina C son regenerados de forma rápida *in vivo* por glutatión, nicotinamida adeninucleotido (NADH) y NADPH (Halliwell, 2006). La vitamina C se encuentra en alimentos de origen vegetal, frutas y hortalizas. Destacan por su contenido las hortalizas de la familia crucíferas (coles, coliflor, berro), pimientos, espinacas, tomate y de las frutas, los cítricos (naranja, mandarina, limón y pomelo), las fresas, kiwi, papaya, guayaba, mango y melón (Martínez-Cayuela, 2010).



**Figura 3.** Estructura química de la vitamina C.

B) Vitamina E. Es una vitamina antioxidante liposoluble que se encuentra en las membranas de la mayoría de las células y es especialmente abundante en el hígado, corazón, glándulas adrenales y testículos (**figura 4**). Contiene cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. El  $\alpha$ -tocoferol es el más abundante en el plasma por lo que es el principal miembro del “complejo vitamínico E”. El  $\alpha$ -tocoferol actúa como un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados presentes en lipoproteínas, membranas biológicas y tejidos, mediante la eliminación de EROs como los radicales peróxido, convirtiéndolos en hiperóxidos (Niki, 2014). La vitamina E protege a la membrana celular, así como a diversas membranas subcelulares, de los efectos de la peroxidación lipídica. Las fuentes alimentarias de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, colza, soja oliva) y productos elaborados con estos aceites, mahonesas y margarinas; frutos secos (nueces, almendras, avellanas, pistachos, piñones, cacahuetes), pipas de girasol, germen de trigo (Escrig-Fernández, 2012).

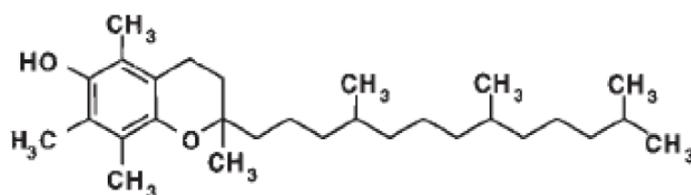


Figura 4. Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol.

Los requerimientos de vitamina E dependerán del nivel de agentes oxidantes, fundamentalmente EROs, cantidad de grasa poliinsaturada de la dieta y presencia de otros sistemas antioxidantes como GPX, ceruloplasmina y ácido ascórbico. A nivel *in vivo e in vitro*, se observa una clara sinergia con la vitamina C para aumentar la capacidad antioxidante de la vitamina E como captador de radicales peroxilo e inhibidor de la peroxidación lipídica (Niki, 2014).

C) Carotenoides. Los carotenoides son estructuralmente un grupo muy diverso de pigmentos naturales con estructura isoprenoide, constituidos generalmente por 8 unidades de isopreno, formando una larga cadena de polieno que puede contener de 2 a 15 dobles enlaces conjugados, lo que permite configuraciones *cis* y *trans*. Son compuestos lipofílicos que se encuentran en el tejido adiposo, en las lipoproteínas y en el interior de las membranas. Además, son importantes constituyentes de las membranas de los cloroplastos, orgánulos responsables de la fotosíntesis de plantas superiores, musgos, helechos y algas. Sin embargo, no pueden ser sintetizadas por los seres humanos ni por los animales.

Más de 700 carotenoides han sido identificados, 50 de ellos son constituyentes de la dieta, mientras que sólo alrededor de 20 se encuentran en la sangre y tejidos. Según su estructura química, se clasifican en carotenos (sin oxígeno) y xantofilas (con oxígeno). Los más representativos en el plasma son el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\gamma$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno, neurosporeno, fitoflueno y fitoeno (Khachik *et al.*, 2006). Aproximadamente, el 10% de ellos son provitamina A y se convierten en retinol en el organismo, fundamentalmente el  $\alpha$ -caroteno y el  $\beta$ -caroteno y algunas xantofilas como la  $\beta$ -criptoxantina. En cambio, otros carotenoides no pueden producir retinoides, como la zeaxantina y el licopeno.

La cooperación entre el ácido ascórbico (hidrófilo) y el  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno (hidrofóbicos), conduce a la protección celular sinérgica contra diferentes ERNs (Peng *et al.*, 2014). Los alimentos con mayor contenido en carotenoides son la sandía, melocotón, mandarina, naranja, pomelo, guayaba, papaya, arándanos, tomate, ciruela, albaricoque y, entre las hortalizas, la acelga, berro, col, endibia, espinaca, grelos, lechuga romana, lechuga roja, boniato, brócoli, coles de Bruselas, calabaza, zanahoria, pimiento rojo y puerro. Aunque se encuentran principalmente en los alimentos vegetales, también pueden encontrarse en alimentos de origen animal, dependiendo de la dieta con la que haya sido alimentado el ganado (Ortega *et al.*, 2010).

Un aspecto diferencial de estos compuestos es su baja biodisponibilidad y, por tanto, la gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas entre individuos es debida a diversos factores:

1) Asociación con proteínas en la matriz vegetal, su biodisponibilidad es relativamente baja (van Het Hof *et al.*, 2000).

2) La mayoría de los carotenoides se encuentran en los alimentos en su forma *-trans*. Sin embargo, los procesos culinarios pueden provocar la formación de otros isómeros (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2015).

3) También es determinante de su biodisponibilidad el perfil lipídico, el tipo de grasa o lípido (cadena-media vs. cadena-larga) y a la presencia de fibra soluble (Priyadarshani, 2017). Se recomienda, por ello, emplear aceite cuando se cocinan los alimentos que contienen estos compuestos (Rinaldi de Alvarenga *et al.*, 2017).

4) Otro factor a tener en cuenta es el consumo de provitamina A y su conversión en retinol en el organismo (la forma activa de la vitamina A), la cual está controlada por el factor de transcripción ISX que, a su vez, está bajo el control del receptor de ácido retinoico (RAR) (Wang, 2014).

5) Por último, se cree que las diferencias genéticas entre personas son también una causa de la gran variabilidad inter-individual que existe en las concentraciones de carotenoides en sangre y otros tejidos (Borel, 2012). Además, la liposolubilidad de los carotenoides hace que su volumen de distribución en el organismo sea bastante elevado, por lo que, sólo en cierta medida, las concentraciones plasmáticas reflejan los niveles tisulares (Bohn *et al.*, 2017).

D) Selenio. El selenio (Se) es un cofactor de la GPX, enzima que actúa reduciendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los hidroperóxidos lipídicos celulares por oxidación del glutatión, así como los hidroperóxidos procedentes de los fosfolípidos y colesterol. La glutatión reductasa también es seleno-dependiente y es responsable de mantener una ratio elevada de glutatión reducido/glutatión oxidado (Rayman *et al.*, 2012), siendo también cofactor de las tioredoxina reductasas que actúan protegiendo del daño oxidativo y regenerando la forma oxidada de la vitamina C (Powis *et al.*, 2000). Los alimentos de origen animal, como el pescado y mariscos, la carne y las vísceras y, los de origen vegetal, como las legumbres, frutos secos y cereales, destacan por su contenido en selenio.

E) Zinc. El cinc (Zn) actúa como cofactor de más de 300 enzimas y de 2000 factores de transcripción, algunos de los cuales están implicados en el funcionamiento de los sistemas de defensa antioxidante. Es un componente esencial de la SOD, regula la GPX e induce la síntesis de metalotioneínas, proteínas que actúan reduciendo radicales hidróxilo y secuestrando EROs, e inhibe la NADPH-oxidasa, una enzima prooxidante (Marreiro *et al.*, 2017). El Zn se encuentra, principalmente, en alimentos de origen animal, destacando los crustáceos, moluscos y el cordero; también se encuentra, aunque en menor contenido, en el cerdo, pollo y derivados lácteos, así como en los cereales integrales.

F) Los compuestos polifenólicos. Son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes de la dieta. Constituyen un amplio número de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas. Poseen estructuras con anillos aromáticos, doble enlaces conjugados y grupos hidróxilo, a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Pueden aparecer en formas libres o conjugadas (glucósidos) con uno o más restos de azúcar

unidos al grupo hidróxilo o directamente al anillo aromático, aunque también pueden encontrarse asociados a otros compuestos (Manach *et al.*, 2004). Se encuentran en grandes cantidades en alimentos como frutas, vegetales, té, vino, café y cacao. Se clasifican en cuatro grandes grupos: Ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas), estilbenos y lignanos. La estructura y cantidad de compuestos polifenólicos está estrechamente ligada a su acción biológica e influirá en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y, por tanto, en sus efectos sobre las diferentes células del organismo humano (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Su capacidad antioxidante se basa en su baja capacidad de oxidación que le da la aptitud para estabilizar los radicales libres, donando electrones o átomos de hidrógeno.

La **absorción** de compuestos antioxidantes por parte del organismo es bastante restringida. Incluso el ácido ascórbico, que es el antioxidante más soluble y que mejor se absorbe a nivel gastrointestinal, experimenta una absorción limitada. Si la dosis es baja, la absorción puede llegar a ser del 100%, pero, a medida que la ingesta aumenta, la cantidad relativa que se absorbe disminuye (Davey *et al.*, 2000).

Muchos alimentos y bebidas, especialmente los de origen vegetal, tienen un alto contenido en antioxidantes que llegan en altas cantidades al intestino grueso. Primeramente, se consideraban compuestos no absorbibles, pero después se sugirió que estos fitoquímicos no absorbidos podrían beneficiar la salud del colon, actuando quizás, como antioxidantes *in situ* o como probióticos, para la microflora del colon. La mayor parte de los fitoquímicos no absorbidos y que permanecen en el colon son compuestos polifenólicos como antocianinas, flavonoles y flavanoles (Del Río *et al.*, 2010), pero aún no se sabe si son o no bioactivos. Se sugiere que la variación en la respuesta se debe a diferencias en la composición del microbioma del colon (Benzie y Choi, 2014) y a que el microbioma no es estable, sino que se puede modificar con la dieta, antibióticos, prebióticos y probióticos (Leone *et al.*, 2013).

En general, existe un creciente pensamiento de que existe una relación simbiótica entre el microbioma del intestino delgado y, la modificación de éste, podría afectar el metabolismo, la bioactividad y la absorción de antioxidantes no absorbidos de los alimentos. De esta manera, aparece un nuevo campo de investigación en alimentos, nutrición y ciencias de la salud (Benzie y Choi, 2014).

## 1.5. Conceptos de capacidad antioxidante total (CAT) y capacidad antioxidante no enzimática (CANE)

La evaluación de la **capacidad antioxidante total (CAT)** de los alimentos ha recibido gran atención en los últimos años, ya que considera la capacidad antioxidante de los compuestos individuales y sus posibles interacciones, sinergias y reacciones redox, y pueden relacionarse con el potencial de protección que tiene la dieta frente a determinadas enfermedades crónicas, como el cáncer o procesos inflamatorios.

El uso de métodos químicos de CAT *in vitro* es bastante común en estudios nutricionales y tecnológicos (Pellegrini *et al.*, 2018), pudiéndose extraer de estos información valiosa (Granato *et al.*, 2018). La CAT mide las moléculas redox presentes en alimentos capaces de eliminar radicales libres y moléculas oxidantes no radicalarias. Este concepto proporciona una imagen más amplia que la medida de los antioxidantes individuales presentes en una muestra al considerar efectos aditivos y sinérgicos de todos los antioxidantes, por lo que puede ser más útil para estudiar globalmente el potencial antioxidante.

La utilización de esta CAT en sistemas biológicos es más controvertida, por lo que su aplicación en condiciones *in vivo* tiene restricciones (Floegel *et al.*, 2010), dado que no refleja la capacidad antioxidante de los sistemas enzimáticos del organismo por lo que se sugirió el uso del término **capacidad antioxidante no enzimática (CANE)** (Bartosz, 2010). La CANE del plasma (CANE-P) no refleja las propiedades antioxidantes completas de la sangre, a la cual contribuyen, significativamente, las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, GPX y peroxirredoxinas, entre otras) presentes en las células sanguíneas y en las células de las paredes de los vasos sanguíneos y, en los sistemas enzimáticos presentes en estas células que regeneran las formas oxidadas de los antioxidantes (Bartosz, 2010). Existen estudios que ya emplean el término CANE cuando realizan análisis en matrices biológicas (Niki, 2010; Carrión-García *et al.*, 2017) o células humanas (Santos *et al.*, 2016).

Los fluidos biológicos contienen numerosos compuestos con actividad antioxidante como urato, ascorbato, bilirrubina, grupos tioles y algunos polifenoles en la fase acuosa y  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides y algunos polifenoles en la fase lipídica. La valoración de la defensa antioxidante incluye la medida de cada uno de estos compuestos y de algunos otros que se encuentran en menores concentraciones, lo que supone tiempo, costo y, en algunos casos, limitaciones para su determinación (Sies, 2007), por lo que la medida de la CANE total se presenta como una medida rápida y probablemente útil.

Keith e Ingold desarrollaron el método denominado Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) para medir globalmente los antioxidantes de fluidos biológicos y demostraron que el urato, tocoferol y ascorbato son las moléculas que más contribuyen a los valores de TRAP, pero que la contribución de los tres compuestos combinados es de solo un 27-43% del TRAP, por lo que otros compuestos presentes en el plasma, probablemente proteínas (albúmina) también contribuyen a la capacidad antioxidante (Wayner *et al.*, 1985).

Diversos estudios han demostrado la capacidad de la dieta para modular la CANE-P de sujetos tras el consumo de alimentos ricos en antioxidantes. Los primeros estudios de intervención en los que se determinó la CANE-P antes y después de la ingestión de té y vino tinto fueron llevados a cabo por Serafini *et al.* (1994) y por Maxwell *et al.* (1994), demostrando el incremento de CANE-P tras la ingesta. En otros estudios posteriores, se observó un incremento de CANE-P tras el consumo de zumos de frutas, cebolla, lechuga, chocolate y miel (Serafini y Del Río, 2004). Los ensayos de CANE en fluidos biológicos han mostrado que los valores descienden en condiciones de estrés oxidativo e incrementan con la administración de antioxidantes (Woodford y Whitehead, 1998). Sin embargo, también se observó que, a veces, la correlación de los métodos de determinación de CANE es baja debido a que algunos antioxidantes reaccionan de forma diferente en cada ensayo; por ejemplo, los grupos tioles de las proteínas no son detectados por algunos métodos (Prior *et al.*, 2003). Además, la CANE de una solución dependerá del sustrato oxidable; *in vivo*, se producen oxidantes muy diversos, y la capacidad antioxidante de un fluido biológico, probablemente, sea distinta para cada uno de estos. Otras limitaciones serían que, en los fluidos biológicos, el urato es el principal contribuyente a la CANE de la mayoría de los ensayos (> del 50% de la CANE total). Sin embargo, es probable que su actividad antioxidante *in vivo* sea limitada (Serafini y Del Río, 2004).

Existe un gran número de publicaciones en las que no se detecta el efecto entre la intervención dietética y los valores CANE-P (Sies, 2007). Por otra parte, también se ha observado que, el consumo de alimentos ricos en flavonoides muestra un incremento de la capacidad antioxidante del plasma, lo que ha llevado a la hipótesis de que los flavonoides de la dieta juegan un papel importante como antioxidantes *in vivo*. Sin embargo, los flavonoides alcanzan concentraciones en plasma muy bajas ( $\mu$ molares) y la mayoría son metabolizados *in vivo*; además, las frutas y las verduras contienen, junto a los flavonoides, macro y micronutrientes que, directamente, o a través de su metabolismo, pueden afectar a la CANE-P (Sies, 2007). Existe la hipótesis de que el aumento de la capacidad antioxidante plasmática

observada tras el consumo de alimentos ricos en flavonoides, pudiera ser debida, no a los flavonoides, sino al ácido úrico resultante del metabolismo de la fructosa (Lotito y Frei, 2006). Por tanto, la medida de CANE-P podría ofrecer una idea engañosa de la defensa antioxidante. No obstante, el conocimiento de las limitaciones de estas metodologías, permite llevar a cabo una mejor interpretación de los resultados en aquellos estudios en los que son utilizadas.

En definitiva, es esencial disponer de un método adecuado que cuantifique de forma rápida la eficacia antioxidante de un sistema biológico y, que incluso, permita determinar su asociación con la prevención de enfermedades.

## 1.6. Métodos de medida de la CAT-D en alimentos y de la CANE-P en muestras biológicas

La determinación de la CAT en alimentos es fundamental para determinar el grado de protección a la oxidación y deterioro del alimento que provocará la disminución de la calidad y valor nutricional y, además, sirve para predecir el potencial antioxidante que posee el alimento antes de ser ingerido (Mena Guillermo, 2010). Con ello, se intenta dar una aproximación más real del efecto antioxidante global que podría ejercer *in vivo* un alimento rico en sustancias antioxidantes (Barrington *et al.*, 2009).

Los polifenoles constituyen, junto con las vitaminas A, E, C y carotenoides, los grupos más representativos de los compuestos antioxidantes de la dieta. Los polifenoles y carotenoides son más inaccesibles y forman complejos con macromoléculas de los alimentos que no permiten su extracción completa de forma directa con los disolventes utilizados en la mayoría de los ensayos. Por ello, existe un número de compuestos variable según el tipo de alimento, cereales (alto) vs fruta (bajo), que permanecen en el residuo de extracción y se denominan “no extraíbles” y, por tanto, no cuantificados en la mayoría de los trabajos, excepto que se proceda a tratamientos de hidrólisis ácida o alcalina o a hidrólisis enzimáticas (Sies, 2007).

Los ensayos de CAT y CANE se clasifican en dos grandes grupos, de acuerdo con su mecanismo de acción (Huang *et al.*, 2005):

- Ensayos basados en la transferencia del radical de hidrógeno, denominados HAT. El antioxidante y sustrato compiten por los radicales peróxido generados térmicamente por la descomposición de azo compuestos.

- Ensayos basados en la transferencia de un electrón, denominados SET. Miden la capacidad de reducción de un oxidante (que cambia de color) debido a un antioxidante. El grado de cambio de color, se correlaciona con la concentración de antioxidante en la muestra analizada.

En las últimas dos décadas, existen varios artículos de revisión de gran número de estos ensayos (Frankel *et al.*, 2000; Sánchez-Moreno, 2002; Prior *et al.*, 2005). Los ensayos más ampliamente usados son: Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC-ABTS), Ferric Reduction Antioxidant Power (FRAP), Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (TRAP), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y

Polifenoles Totales/Folin-Ciocalteu (Tp/FCR). En el apartado de metodología, se desarrollan más exhaustivamente cada uno de estos ensayos.

Es difícil decir cuál es el ensayo óptimo de medida de CAT y CANE, así como interpretar los resultados obtenidos al compararlos, ya que, cada ensayo cuenta con un agente antioxidante, un sustrato adecuado, un indicador de la oxidación y una estrategia de medida del punto final (Frankel *et al.*, 2000).

La **tabla 2** muestra las características normalizadas de los ensayos más frecuentemente utilizados de medida de CAT y CANE. Estos ensayos han sido empleados, tanto para determinar la capacidad antioxidante total en alimentos (frutas, verduras, bebidas, etc.), como en estudios *in vivo* para determinar los niveles de antioxidantes en plasma/suero y otras muestras biológicas (Prior *et al.*, 2005; Fernández-Pachón *et al.*, 2008).

**Tabla 2.** Características normalizadas de los ensayos de medida de la capacidad antioxidante.

Método	Radical	Parámetro de medida y técnica	Mecanismo	Expresión de resultados	Muestras <sup>a</sup>
TEAC	ABTS <sup>•+</sup>	- Descenso de ABTS <sup>•+</sup> - Espectrofotometría	SET/HAT	Equivalentes Trolox	1,2 y 3
ORAC	AAPH	- Inhibición descenso fluorescencia PE/FL - Fluorimetría	HAT	Equivalentes Trolox	1,2 y 3
Polifenoles solubles totales (Folin-Ciocalteu)	--	- Reducción reactivo fosfomolibdotúngstico - Espectrofotometría	SET	Equivalentes Ácido Gálico <sup>b</sup>	2 y 3
TRAP	AAPH	- Consumo de oxígeno - Electrodo de oxígeno	HAT	Equivalentes Trolox	2 y 3
DPPH	DPPH	- Descenso de DPPH - Espectrofotometría	SET/HAT	EC <sub>50</sub> (cantidad de muestra que reduce DPPH al 50%)	1 y 2
FRAP	--	- Reducción TPTZ-Fe <sup>3+</sup> a TPTZ-Fe <sup>2+</sup> - Espectrofotometría	SET	Equivalentes Fe <sup>2+</sup>	2 y 3

<sup>a</sup>1=fenoles; 2=alimentos;3=muestras biológicas.

<sup>b</sup>Patrón de referencia recomendado por Prior *et al.* (2005).

Los métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras de alimentos. Sin embargo, presentan la limitación de que los resultados no reproducen la situación fisiológica. La actividad antioxidante de un alimento *in vitro* es muy diferente de su efecto antioxidante *in vivo*, al no absorberse los compuestos en su totalidad, producirse transformaciones metabólicas de los compuestos antioxidantes en el organismo y medir otros compuestos que no existen en los alimentos. (Sies, 2007).

Actualmente, no existe un método normalizado para la media de CAT y CANE. Se recomiendan, al menos, dos ensayos que utilicen diferentes procedimientos de medida y diferentes condiciones de oxidación (Frankel *et al.*, 2000).

A continuación, en la **tabla 3**, se comparan las ventajas e inconvenientes de tres de los métodos más utilizados en muestras biológicas y de alimentos anteriormente citados (Karadag *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Ventajas e inconvenientes de los ensayos TEAC-ABTS, ORAC y Tp.

ENSAYO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TEAC-ABTS	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Económico y fácil de usar.</li> <li>2. pH estable (permite estudiar el efecto del pH sobre la CAT).</li> <li>3. Tiempo de reacción rápido.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Etapa extra necesaria para generar el radical libre a partir del ABTS radical.</li> <li>2. El radical libre generado no es estable.</li> <li>3. No estandarizado, dificultad para comparar valores entre laboratorios.</li> </ol>
ORAC	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Usa radicales libres de relevancia biológica.</li> <li>2. Estandarizado. Permite comparar valores entre laboratorios.</li> <li>3. Los resultados integran el grado y el tiempo de reacción del antioxidante.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Equipo de medida caro.</li> <li>2. Variabilidad de datos según el equipo de medida utilizado.</li> <li>3. pH sensible.</li> <li>4. Tiempos largos para cuantificar resultados.</li> </ol>
Tp	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Económico y fácil de usar.</li> <li>2. Excelente correlación con métodos de medida de CAT.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No estandarizado. Dificultad al comparar valores entre laboratorios.</li> <li>2. Interferencias (sustancias reductoras no fenólicas).</li> <li>3. No aplicable para antioxidantes lipófilicos.</li> </ol>

## 1.7. Antioxidantes de la dieta y la relación con la CANE-P

### 1.7.1. Medida de CAT-D

Se considera que la CAT-D podría solventar las limitaciones de estudios previos que han examinado asociaciones antioxidantes-enfermedad (Serafini y Del Río, 2004). En este sentido, los estudios sobre la CAT-D muestran asociaciones con determinados alimentos (Dilis y Trichopoulou, 2010; Yang *et al.*, 2011) y una reducción del riesgo de enfermedades, tales como cáncer (Serafini *et al.*, 2011; Amiano *et al.*, 2018), diabetes (Mancini *et al.*, 2018) y mortalidad total (Agudo *et al.*, 2007). Algunos estudios también han constatado que determinados estilos de vida inductores del estrés oxidativo, como el sedentarismo (Kavouras *et al.*, 2010), el tabaco y el alcohol (Agudo *et al.*, 2007) y la obesidad (Puchau *et al.*, 2010), se asocian con una baja CAT-D. En estos estudios, se ha evaluado también la contribución de determinados alimentos a la CAT-D, siendo, en general, el té y el café, seguidos de las frutas y verduras, los alimentos que mayor CAT aportan (Dilis y Trichopoulou, 2010; Yang *et al.*, 2011; Serafini *et al.*, 2012; Agudo *et al.*, 2007; Kavouras *et al.*, 2010; Puchau *et al.*, 2010). Sólo dos estudios han examinado la contribución de un patrón de dieta rico en antioxidantes a la CAT-D, encontrando que, una mayor adherencia a este tipo de patrón de dieta se relaciona con una mayor CAT-D (Puchau *et al.*, 2009; Hernández-Ruiz *et al.*, 2018). Este estudio de Puchau *et al.* (2009) incluyó 153 participantes y no consideró la influencia del tabaco sobre la CAT-D, ni patrones de dieta derivados *a priori*. Además, la CAT-D se estimó a partir de la información obtenida de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), que podría ser poco idóneo para estimar ingesta reciente de frutas y verduras, debido a la variabilidad de la ingesta según estación del año y al limitado número de ítems (Hu, 2008). Por tanto, con independencia del interés de evaluar la CAT-D y su asociación con riesgo de enfermedad, existen controversias sobre la utilidad de la medida de CAT-D, que podría no reflejar el potencial del organismo (Ghiselli *et al.*, 2000). En general, la CAT-D estimada a partir del CFCA ha mostrado una buena correlación con la medida de la CANE-P (biomarcador) en algunos estudios ( $\rho \sim 0,30$  para ORAC y TRAP) (Rautiainen *et al.*, 2008; Khalil *et al.*, 2011), pero no en otros ( $\rho \sim 0,05-0,13$  para TEAC-ABTS y FRAP) (Pellegrini *et al.*, 2007). Las discrepancias encontradas se atribuyen a los diferentes métodos y medios en que se llevaron a cabo los análisis, así como a los cuestionarios de dieta empleados (Pellegrini *et al.*, 2007). Por este motivo, es preciso validar la medida de CAT-D con la medida de CANE-P.

### 1.7.2. Medida de CANE-P

La medida de CANE-P y su relación con incidencia de enfermedades crónicas y con los estilos de vida no se ha examinado en muchos estudios (Razquin *et al.*, 2009; Leufkens *et al.*, 2012), debido a la dificultad de disponer de esta medida en poblaciones de estudio amplias. Por otro lado, el conocimiento sobre la contribución de la CAT-D a la CANE-P es limitado. Varios estudios han investigado la capacidad que poseen los alimentos ricos en antioxidantes, una vez administrados en cantidades controladas, de modular la CANE-P. Según estos estudios, la ingesta de alimentos como té, vino tinto, frutas y verduras o chocolate, se relacionan con un aumento de la CANE-P, que se mantiene elevada varias horas tras la administración (Serafini *et al.*, 2006). Algunos estudios de intervención más prolongados también mostraron un aumento significativo de CANE-P tras la administración de varias raciones de frutas y verduras (Record *et al.*, 2001), una dieta rica en antioxidantes (Razquin *et al.*, 2009), o aceite de oliva (Samaniego *et al.*, 2010), si bien en otros estudios no se observaron diferencias en los niveles de CANE-P (Dragsted *et al.*, 2004). En el marco del estudio PREDIMED (estudio de mayor duración: 3 años), único estudio que consideró un patrón de dieta, se encontró un aumento significativo de CANE-P en el grupo de intervención (Razquin *et al.*, 2009), reafirmando que el conjunto de la dieta, la variedad y la calidad, influyen sobre la CANE-P. Sin embargo, este estudio presenta como limitación la heterogeneidad de la población de estudio (187 participantes, portadores de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular-ECV). En un estudio transversal que incluyó 3042 participantes, también se examinó la adherencia a la DM y su efecto sobre la CANE-P, encontrando correlaciones positivas ( $\rho=0,24$ ) (Pitsavos *et al.*, 2005). No obstante, el cuestionario de dieta que se empleó estaba parcialmente validado, lo que pudo incurrir en errores sistemáticos en la medida de la dieta. Ningún otro estudio ha evaluado niveles de CANE-P según otros patrones o hábitos globales de dieta. Es importante destacar también que pocos estudios han evaluado la influencia de los estilos de vida sobre los niveles de CANE-P (Valtueña *et al.*, 2007; Puchau *et al.*, 2010).

Por otro lado, solamente se ha examinado la relación entre la ingesta de antioxidantes aislados y sus niveles plasmáticos (Hercberg *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010) o la relación entre la CAT-D y CANE-P (Valtueña *et al.*, 2007; Puchau *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2011; Carrión-García *et al.*, 2017) encontrando asociaciones positivas. Sin embargo, no se ha considerado el efecto combinado de los antioxidantes u otros nutrientes sobre la CANE-P, que podría ser más importante que la cantidad o el tipo de antioxidante.

### 1.7.3. La CAT-D y la CANE-P y el estrés oxidativo

Aunque se conoce que el estrés oxidativo está involucrado en la etiología de las enfermedades crónicas, siguen siendo parcialmente conocidos los mecanismos que rigen esta relación causal. Varios estudios han constatado que determinados biomarcadores de estrés oxidativo se encuentran elevados en la obesidad y en otros determinantes de enfermedad (Pitsavos *et al.*, 2005; Puchau *et al.*, 2010). El estudio de biomarcadores de estrés oxidativo (malondialdehído y peróxidos lipídicos), de inflamación (interleucinas, adiponectina, etc.) y de nutrientes antioxidantes que contrarrestan el efecto del estrés oxidativo, es fundamental para establecer esta relación (Mayne, 2003). Así, Hermsdorff *et al.* (2010) destacó que, una elevada ingesta de frutas y verduras se asoció con niveles bajos en plasma de proteína C-reactiva (PCR), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre otros biomarcadores, independientemente del género, edad, ingesta de energía, nivel de actividad física, hábito tabáquico, índice de masa corporal (IMC) y presión sanguínea (Hermsdorff *et al.*, 2010). Además de este estudio, la relación entre estos biomarcadores con la CAT-D se ha mostrado en otros estudios (Puchau *et al.*, 2010; Detopoulou *et al.*, 2010; Psaltopoulou *et al.*, 2011), pero se ha explorado en la CANE-P para pocos biomarcadores de estrés y de inflamación, como C3, IL-6, PCR o el inhibidor del activador plasminógeno-1 (PAI-1) (Puchau *et al.*, 2010; Babaei *et al.*, 2014; Romeu *et al.*, 2013; Gawron-Skarbek *et al.*, 2018).

En relación con el tabaco, por ejemplo, ningún estudio consideró la duración y/o intensidad del hábito (Pitsavos *et al.*, 2005; Razquin *et al.*, 2009; Kavouras *et al.*, 2010; Puchau *et al.*, 2010) y no todos consideraron la influencia de esta variable (Puchau *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2011). Además, muchos estudios estimaron la CAT-D a partir de un CFCA, pero pocos validaron esta medida (Rautiainen *et al.*, 2008; Razquin *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2011).

## 1.8. Estudio EPIC

El estudio EPIC (*European Prospective into Cancer and Nutrition*) es un estudio de cohortes prospectivo con más de veinte años de seguimiento, que fue diseñado para investigar la relación entre la dieta y diferentes factores de los estilos de vida con la incidencia de diferentes tipos de cáncer. El estudio también ha derivado a otros factores de riesgo, enfermedades crónicas y otros factores relacionados con los estilos de vida como la actividad física, consumo de alcohol y hábito tabáquico (González *et al.*, 2004).

El objetivo fundamental del estudio EPIC era el de mejorar el conocimiento científico sobre factores de diversa índole implicados en la etiología de cáncer, así como aportar argumentos científicos para mejorar las intervenciones en salud pública, en relación con la promoción de una mejor dieta y unos factores de los estilos de vida saludables. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC), de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Comité Ético Médico del Hospital de Bellvitge (Barcelona) en España. Los participantes dieron su consentimiento para participar en el estudio.

- EPIC Europa. El estudio EPIC es un estudio multicéntrico desarrollado en veintitrés centros pertenecientes a diez países europeos (Francia, Italia, España, Reino Unido, Holanda, Grecia, Alemania, Suecia, Dinamarca y Noruega). Este estudio cuenta con más de medio millón de participantes (521468 sujetos, siendo un 30% hombres) reclutados en la década de los noventa, en voluntarios sanos de la población general, excepto en algunos centros donde se seleccionaron otras poblaciones objetivo, siendo una de las más significativas la población vegetariana de Oxford, Reino Unido.

Los detalles respecto a los métodos de reclutamiento de participantes, recogida de datos y otros aspectos fundamentales de la metodología de este estudio, han sido descritos ampliamente en numerosas publicaciones (Slimani *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004). El reclutamiento de los sujetos, la obtención de los datos y la extracción de muestras se realizó entre 1992-1998.

En las primeras fases de reclutamiento se realizaron cuestionarios de dieta exhaustivos, cuestionarios sobre los estilos de vida, antropometría, de todos los sujetos del estudio y se tomaron muestras de sangre de gran parte de la cohorte (de 414889 sujetos).

- EPIC España. En relación con la cohorte EPIC-España, se reclutaron personas en 5 centros localizados en Asturias, Guipúzcoa, Navarra, Murcia y Granada, en los que se aplicaron los mismos cuestionarios y protocolos para la obtención de los datos. La cohorte de España reclutó un total de 41448 personas (sujetos voluntarios de edades comprendidas entre 35 a 65 años en las mujeres y de 40-65 años en los hombres), el número de participantes fue (por orden de las provincias citadas anteriormente): 8561, 8417, 8084, 8516 y 7879 personas.

# HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

## 2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Los estudios en animales de experimentación han confirmado que una dieta rica en antioxidantes modula el estrés oxidativo y, por consiguiente, procesos asociados como la inflamación (Yang *et al.*, 2010). Los estudios epidemiológicos también apoyan que, en general, los alimentos ricos en nutrientes antioxidantes disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer (Boffetta *et al.*, 2010; World Cancer Research, 2007) y otras enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación (Hung *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados de los estudios de intervención sobre administración de suplementos antioxidantes en relación con prevención del cáncer son incongruentes (Hercberg *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). El estudio que encontró una reducción del riesgo de mayor magnitud fue el estudio SUVIMAX, en el que se administró un suplemento de antioxidantes variado (vitamina C y E, caroteno, Zn) a individuos sanos, en unas dosis similares a las ingeridas con la dieta. Este estudio confirmó que la cantidad y la variedad del consumo de antioxidantes podrían ser cruciales en la relación dieta/antioxidantes-enfermedad (Hercberg *et al.*, 2006).

La CAT-D es un indicador de la eficiencia antioxidante frente al estrés oxidativo que integra la actividad de todos los antioxidantes de la dieta. Si bien se ha criticado el empleo de la CAT de los alimentos, por organismos como el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), debido a la inexistencia de estudios que hayan demostrado una correlación entre la CAT-D con los nutrientes antioxidantes o compuestos bioactivos, se considera que la CAT-D podría ser un buen indicador del potencial antioxidante de la dieta y que podría solventar las limitaciones de estudios previos que han examinado asociaciones dieta/antioxidantes-enfermedad (Serafini y del Río, 2004). En este sentido, los estudios sobre la CAT-D han cobrado gran importancia en los últimos años. Como se ha descrito anteriormente, son numerosos los estudios que han evaluado la relación entre la CAT-D con otros componentes de la dieta, estilos de vida y con el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas.

Por otro lado, se desconoce la relación entre la CAT-D con la CANE-P como medida de biodisponibilidad de la CAT-D. Si bien se ha puesto de manifiesto una correlación moderada entre ambas medidas en algunos estudios (Rautiainen *et al.*, 2008; Khalil *et al.*, 2011), sigue siendo necesario re-evaluar esta relación comparando los diferentes ensayos de CANE-P y métodos de recogida de información de dieta para la cuantificación de la CAT-D en una misma

población de estudio. De hecho, la CAT-D se ha estimado en la mayor parte de los estudios a partir de la información obtenida de un CFCA, que podría ser poco idóneo para estimar ingesta de frutas y verduras, debido a la variabilidad de la ingesta de éstas según la estación del año y al limitado número de ítems que aparecen en estos cuestionarios para seleccionarlas (Hu *et al.*, 2008). Por tanto, con independencia del interés de evaluar la CAT-D y su asociación con el riesgo de desarrollar enfermedades o de disponer de un indicador de CAT de los alimentos y de la dieta en su conjunto, hoy en día existen controversias sobre si la CAT-D puede determinar el potencial antioxidante del organismo.

Tal y como se ha descrito, varios estudios han analizado el efecto que la administración de determinados alimentos ricos en antioxidantes tiene sobre los niveles de CANE-P, pero los resultados reportados son incongruentes. La variabilidad de los niveles de CANE-P en función de la adhesión a un patrón dietético, como es el patrón de DM, solamente ha sido evaluada en el marco del estudio PREDIMED (Razquin *et al.*, 2009). Ningún otro estudio ha evaluado los niveles de CANE-P, por lo que el conocimiento sobre la contribución de la CAT-D a la CANE-P es limitado. Es importante examinar el impacto que la dieta, considerando tanto la variedad como la calidad, tiene sobre la medida de capacidad antioxidante medida en sangre.

Por otro lado, algunos estudios han examinado la relación entre la ingesta dietética de nutrientes antioxidantes aislados (Hercberg *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010) con la CAT-D y la CANE-P (Valtueña *et al.*, 2007; Puchau *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2011; Carrión-García *et al.*, 2017). Sólo un estudio, realizado en 40 mujeres postmenopáusicas, ha explorado si existe alguna relación entre la CAT-D o la CANE-P con los niveles circulantes de nutrientes antioxidantes (Wang *et al.*, 2012). El limitado tamaño de muestra de este estudio, no permitió analizar estas relaciones con suficiente potencia estadística. Tampoco se ha considerado el efecto combinado de los antioxidantes sobre la CAT-D o la CANE-P. Este efecto combinado, definido por un conjunto de nutrientes antioxidantes predictores de una alta CAT, podría ser más importante que la cantidad o el tipo de antioxidante en la dieta.

Aunque se conoce que el estrés oxidativo está involucrado en la etiología de las enfermedades crónicas, siguen siendo parcialmente conocidos los mecanismos que rigen esta relación causal. El estudio de biomarcadores de estrés oxidativo, de inflamación y de nutrientes antioxidantes que contrarrestan el efecto del estrés oxidativo, es fundamental para establecer esta relación (Mayne, 2003). La relación entre algunos de estos biomarcadores con la CAT-D se ha investigado en varios estudios (Puchau *et al.*, 2010; Detopoulou *et al.*, 2010;

Psaltopoulou *et al.*, 2011), pero se ha explorado poco en relación con la CANE-P (Puchau *et al.*, 2010).

En resumen, es preciso validar la medida de CAT-D con la medida de CANE-P y evaluar la asociación entre la capacidad antioxidante con los hábitos dietéticos y estilos de vida que mantiene la población. Los estudios previos no han evaluado en su totalidad la asociación con alimentos o nutrientes con potencial antioxidante, incluyeron un tamaño de muestra limitado o una población portadora de factores de riesgo (no sana), e incluso, incurrieron en confusión residual, al considerar un número limitado de variables confusoras y modificadoras de efecto (por ejemplo: edad, tabaco y obesidad). Se requieren, también, estudios que examinen asociaciones entre la capacidad antioxidante con biomarcadores del estado oxidativo-antioxidante e inflamación, que confirmen resultados previos y que aborden el estudio de biomarcadores que no se han considerado por el momento en ningún estudio.

Un abordaje integral del estudio de la dieta y de los estilos de vida en relación con la CAT-D y la CANE-P es clave para profundizar en el conocimiento sobre la utilidad de la capacidad antioxidante como indicador del potencial antioxidante de los alimentos y de la dieta, y su relación con la salud.

Por todo lo expuesto, las principales hipótesis que se plantean en esta Tesis Doctoral son:

1) Existe una relación entre la CAT-D, estimada a partir de datos de contenido de CAT en alimentos, y los niveles de CANE-P, lo que apoya que, la CAT-D constituye un indicador válido de exposición a una ingesta global de antioxidantes. Esta relación se mantiene al evaluar la CAT-D en términos de dieta actual (reciente) o habitual y para todos los métodos de evaluación de capacidad antioxidante (FRAP, TRAP, TEAC-ABTS y ORAC) y al considerar la CAT-D sin la contribución de la CAT del café.

2) Una elevada CAT-D y CANE-P, relacionándose ambas con un elevado potencial antioxidante de la dieta, se asocian con una mejor respuesta al estrés oxidativo (elevados niveles de biomarcadores antioxidantes y bajos niveles de biomarcadores de inflamación y de estrés oxidativo). La CAT-D y la CANE-P también se relacionan con los determinantes de salud (consumo de alcohol y de tabaco, obesidad, sedentarismo, etc.), siendo necesario considerar estas variables en las asociaciones entre capacidad antioxidante y biomarcadores. Determinados factores de los estilos de vida y de la dieta, así como biomarcadores nutrientes antioxidantes, pueden predecir los niveles de CAT-D y CANE-P.

# OBJETIVOS

---

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue validar la relación entre la CAT-D con la CANE-P y estudiar la asociación con biomarcadores de nutrientes antioxidantes, de estrés oxidativo y de inflamación.

A partir de este objetivo general, se desglosaron los objetivos específicos que, a continuación, se enumeran:

### 3.2. Objetivos específicos

1.- Elaborar un formulario (base de datos) de contenido de CAT en alimentos para cuantificar la CAT-D en términos de TRAP, FRAP, TEAC-ABTS y ORAC, recopilando de la bibliografía valores publicados en alimentos.

2.- Estimar la CAT-D a través del formulario elaborado anteriormente y de la información de dieta recogida mediante diferentes métodos de evaluación de ingesta dietética, reciente y habitual, en las poblaciones de estudio.

3.- Poner a punto los diferentes métodos analíticos para la de determinación de CANE (TRAP, FRAP, TEAC-ABTS y ORAC) y de algunos nutrientes antioxidantes (polifenoles totales (Tp),  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, Se, Cu, manganeso (Mn) y Zn en las muestras de plasma de una población de estudio sana.

4.- Determinar los niveles de CANE, así como los niveles de biomarcadores nutricionales (Tp,  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, vitaminas A, E y C, carotenos totales, Co Q9 y Co Q10, Se, Cu, Mn y Zn), biomarcadores de estrés oxidativo (MDA, LDL-ox) y de inflamación (IL-6, IL-8, PCR, TNF- $\alpha$ , PAI-I, resistina, adiponectina) en el plasma de las cohortes del estudio EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

5.- Analizar y validar la relación entre la CAT-D y la CANE-P en los estudios de la puesta a punto de métodos analíticos y EPIC, globalmente y según grupos de alimentos, y considerando posibles variaciones en las relaciones según características de las poblaciones de estudio (sexo, edad, hábito tabáquico, actividad física y otros).

6.- Establecer la contribución de los nutrientes antioxidantes (dieta y biomarcadores) a la CAT-D y CANE-P, de manera individual y global a través de un modelo de biomarcadores nutricionales predictivo de la CAT-D y CANE-P en el estudio EPIC.

7.- Examinar la asociación entre los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, estrés oxidativo y de inflamación con la CAT-D y la CANE-P en el estudio EPIC.

8.- Evaluar la influencia y el efecto modificador del hábito tabáquico y de otras variables de estilos de vida (actividad física, obesidad, y otros), sobre las asociaciones entre la CAT-D y CANE-P y los biomarcadores (nutricionales, de estrés oxidativo y de inflamación) en el estudio EPIC.

# METODOLOGÍA

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Poblaciones de estudio

Para responder a los objetivos planteados se han empleado tres poblaciones de estudio:

A) **Muestra del estudio transversal I:** La población de estudio constituye 22 hombres y 28 mujeres, con edades comprendidas entre 23-63 años, residentes en Granada. Todos los sujetos eran empleados de la Universidad de Granada o estudiantes de la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia. A cada participante se le explicó la naturaleza y propósito del estudio, obteniéndose el consentimiento informado de todos y cada uno de ellos. La recogida de información se realizó entre los meses de abril a julio del año 2013 y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada.

B) **Muestra del estudio transversal II:** La población de estudio constituye 210 participantes procedentes de dos centros de España (Granada y Guipúzcoa) pertenecientes a la cohorte EPIC del Estudio Prospectivo Europeo sobre Nutrición y Cáncer (EPIC), reclutados durante los años 1992-1996. Todos fueron sujetos de edades comprendidas entre 32-69 años que dieron su consentimiento para participar en el estudio. Éste fue aprobado por el Comité de Ética del hospital de Bellvitge (Barcelona).

Los participantes en el estudio transversal II fueron seleccionados entre 15268 sujetos que proporcionaron una muestra sanguínea y datos dietéticos completos. Como se muestra en la **figura 5**, se descartaron sujetos con valores extremos de ingesta de energía (según la relación entre ingesta energética/requerimiento energético; IE/RE), sujetos con enfermedades crónicas auto-reportadas en el reclutamiento (cáncer, diabetes, enfermedad coronaria, enfermedad cardiovascular) y factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (hipertensión e hiperlipidemia), sujetos que habían reportado una ingesta de suplementos (vitaminas y minerales), usuarios de medicamentos que pueden promover o paliar el estrés oxidativo (aspirina, antiinflamatorios no esteroideos –AINEs, paracetamol, estatinas y captopril) (Ferrari, 2012) y sujetos que no se encontraban en ayunas en el momento de la extracción de sangre (estableciendo el estado de ayunas en más de 6 horas sin ingerir alimentos). Tras aplicar estos criterios de exclusión, se contaba con un total de 3732 participantes. De estos, se eligieron de manera aleatoria y mediante un muestreo estratificado por centro, los 210 individuos definitivos, 105 pertenecientes a la cohorte EPIC-Granada y 105 a la cohorte EPIC-Guipúzcoa.

Para garantizar una muestra de estudio con una exposición a una amplia gama de antioxidantes en la dieta, también se estratificó el muestreo por los quintiles de adherencia al índice de DM propuesto por Buckland *et al.*, 2009, conocido como “relative Mediterranean Diet Scale (rMED)”. Este índice que consta de 9 componentes ajustados a la ingesta energética por 1000 kcal/día. Cada componente se divide en terciles según la distribución en la cohorte. Se asigna 2 puntos, 1 ó 0, según sea el tercil de mayor ingesta, el tercil intermedio o el tercil más bajo de consumo en el caso de los 6 componentes considerados como característicos de la DM. En el caso de los componentes no característicos de la DM, la puntuación fue a la inversa, asignándose 2 puntos en la ingesta más baja, 1 punto en la ingesta intermedia y 0 puntos a los sujetos que se situaron en la ingesta más alta. En cuanto al consumo de alcohol, se preestablece una ingesta adecuada dicotomizándose esta variable según los criterios establecidos y publicados anteriormente (Trichopoulou *et al.*, 2005). Este criterio se basa en asignar 2 puntos, si la ingesta se sitúa entre 5-25 gramos/día en el caso de las mujeres y, entre 10-50 gramos/día en el caso de los hombres, otorgándose 0 puntos en el caso de que se sitúe por encima o por debajo de las cantidades específicas prefijadas según sexo. Los componentes considerados en este índice fueron los siguientes:

- Consumo de frutas (incluyéndose los frutos secos y las semillas).
- Consumo de verduras y hortalizas (excluyéndose el consumo de patatas).
- Consumo de legumbres.
- Consumo de cereales (incluyéndose los cereales integrales, las harinas refinadas, pastas, arroz, panes y otros productos con cereales).
- Consumo de pescados y mariscos.
- Consumo de aceite de oliva.
- Consumo total de carnes (incluyéndose las carnes procesadas).
- Consumo de productos lácteos (incluyendo lácteos de todo tipo y productos lácteos de diferentes contenidos de grasa y postres con derivados lácteos).
- Consumo de alcohol específico según sexo (gramos de alcohol diarios).

Por lo tanto, la puntuación total de este índice de adhesión a DM presenta un rango entre 0 puntos (mínima adhesión) y 18 puntos (máxima adhesión).

De esta manera, se tomaron 20 individuos de cada quintil en cada centro.

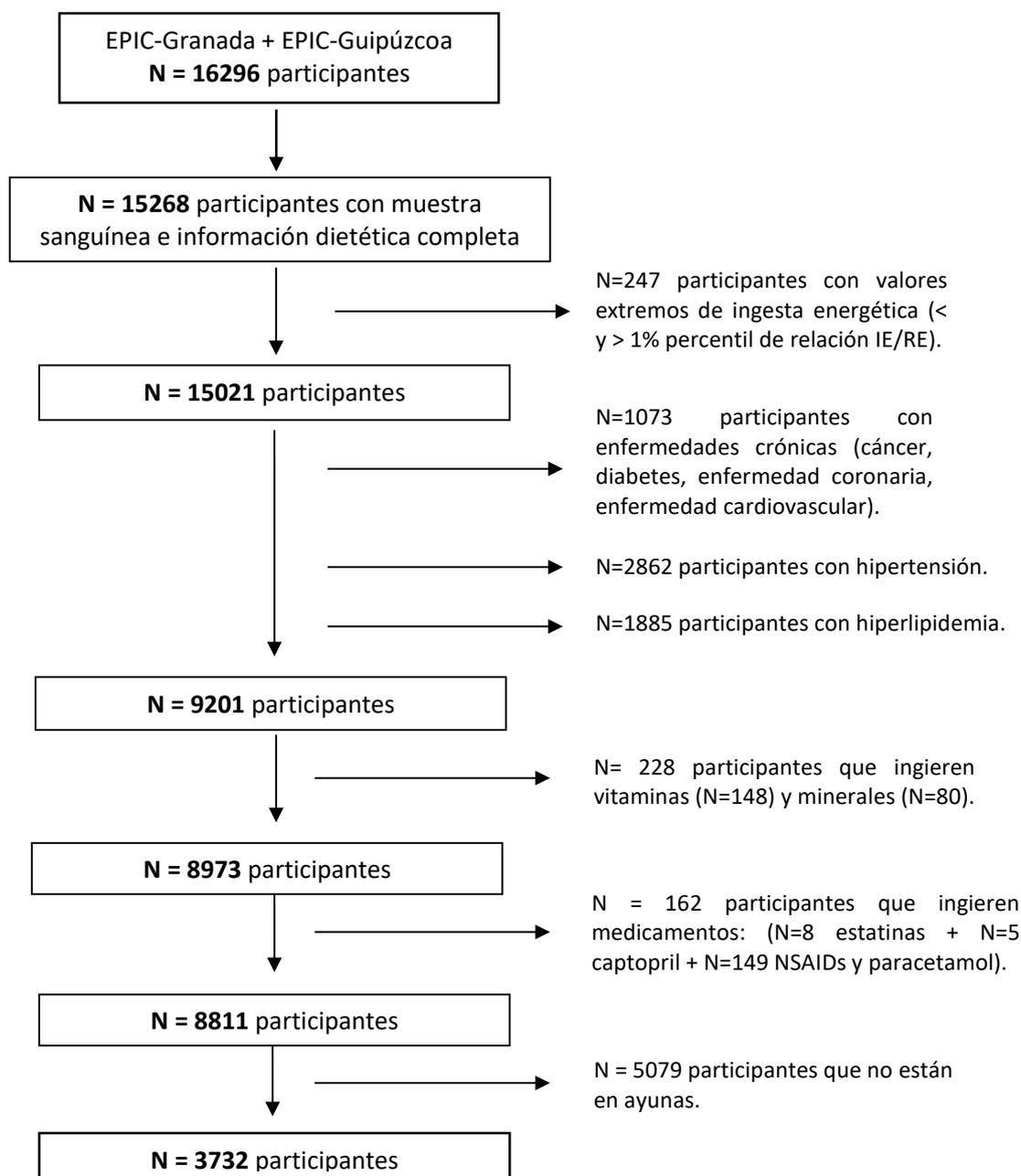


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de selección de los 210 participantes en el estudio.

C) **Muestra del estudio transversal III:** La población de estudio constituye 27 hombres y 25 mujeres, con edades comprendidas entre 23-63 años, residentes en Granada. Todos los sujetos eran empleados de la Universidad de Granada o estudiantes de la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia. A cada participante se le explicó la naturaleza y propósito del estudio, obteniéndose el consentimiento informado de todos ellos. La recogida de información se realizó entre los meses de junio a octubre del año 2015 y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada.

## 4.2. Extracción de sangre y medidas de CANE-P

- **Muestras del estudio I y III:** Las muestras de sangre de los participantes se obtuvieron entre las 8-9 a.m., tras un ayuno de 12 horas, en tubos Vacutainer con EDTA-Na. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C (**figura 6**). Una vez realizado este proceso, se separó la fracción de plasma en diferentes alícuotas (o tubos para micro-centrífuga) y se almacenaron a -80°C hasta su correspondiente análisis. Para proceder al análisis de las muestras, éstas se descongelaron en frío.



**Figura 6.** Centrífuga Sigma 2-16PK Sartorius, utilizada en el proceso de obtención del plasma.

- **Muestras del estudio II:** Se realizó una extracción de sangre a todos los participantes. Las muestras se fraccionaron en partes, concretamente en alícuotas de 28 pajuelas de 0,5 ml, de las cuales, 12, fueron pajuelas de plasma. La mitad de estas muestras se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido a -196°C en los centros de Granada y Guipúzcoa hasta la realización de los análisis correspondientes.

Todas las determinaciones de CANE-P, excepto el ensayo TRAP, se realizaron en un lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG Labtech) (**figura 7**), usando microplacas de 96 pocillos (transparentes para los métodos de absorbancia y opacas para los métodos de fluorescencia). Posee dos inyectores y posibilidad de incubación y agitación, por lo que es idóneo para realizar ensayos de antioxidantes basados en la fluorescencia (ORAC) y otros ensayos de antioxidantes como FRAP y TEAC-ABTS. Esto es debido a que incorpora un espectrómetro de Diodo Array para la medida de absorbancia, de manera que puede seleccionar cualquier longitud de onda entre 220 y 850 nm. Este intervalo también permite la

determinación de Tp (ensayo Folin-Ciocalteu-FCR). El ensayo TRAP se realizó en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-5.

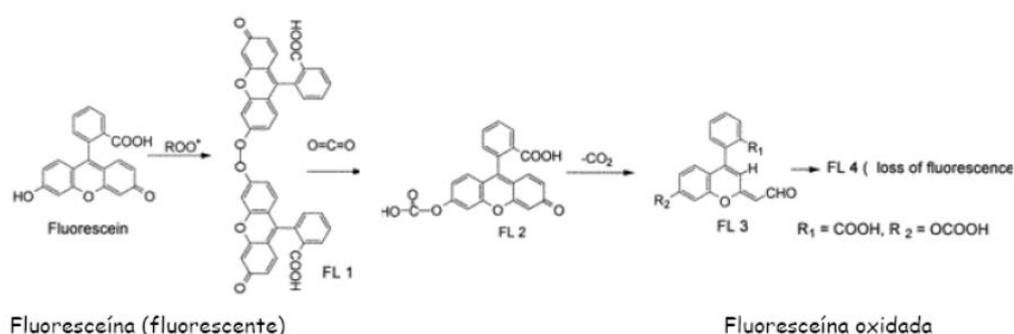


Figura 7. Lector de microplaca FLUOstar Omega.

### 4.3. Métodos de determinación de CANE en plasma

#### 4.3.1. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC

El ensayo ORAC se basa en la medición de la fluorescencia de una molécula a la que se le somete a la acción de un generador de radicales libres (Ou *et al.*, 2001). La especie reactiva es el AAPH (dihidrocloruro 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)), que sufre una descomposición térmica de sus componentes azo y genera los radicales peroxilos solubles en agua, capaces de iniciar el proceso de oxidación. A medida que la molécula fluorescente es atacada y dañada por los radicales, va perdiendo su fluorescencia (**figura 8**). La labor de los antioxidantes es la de proteger dicha molécula, inhibiendo la pérdida de intensidad de fluorescencia de forma proporcional a la capacidad antioxidante que tenga la muestra analizada. El efecto se mide por el área bajo la curva de descenso de fluorescencia (AUC) de las muestras, en comparación con un blanco exento de sustancia antioxidantes y tomando como antioxidante de referencia el Trolox (Prior *et al.*, 2005).



**Figura 8.** Reacción de la fluorescencia en el método ORAC.

Preparación de soluciones:

- Solución reguladora de fosfato 75 mM pH 7,4 (tampón fosfato). Para 1000 ml, se disolvieron 26,8605 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,4 y se completó hasta 1 litro.
- Solución de AAPH 40 mM. Para 10 ml, se disolvieron 0,1085 g de dihidrocloruro 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) en 10 ml de tampón fosfato 75 mM pH 7,4.
- Solución de fluoresceína patrón 7,0 mM. Para 10 ml, se disolvieron 0,0263 g de fluoresceína en 10 ml de tampón fosfato 75 mM pH 7,4.

- Solución diaria de trabajo de fluoresceína 70 nM. Para 50 ml, se diluyeron 10  $\mu$ l de la solución patrón de fluoresceína 7,0 mM en 10 ml de tampón fosfato 75 mM pH 7,4. De ahí se tomaron 500  $\mu$ l y se llevaron hasta 50 ml con la misma disolución reguladora de fosfato.
- Solución de Trolox para la curva patrón. La solución madre se preparó disolviendo 0,01 g de Trolox en 5 ml de metanol y 5 ml de agua destilada. A partir de esta solución, se hicieron varias diluciones que fueron los distintos puntos de la recta con unas concentraciones de 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 200  $\mu$ M.

#### Preparación de las muestras:

Para la realización de este estudio mediante el método ORAC, se llevó a cabo el análisis de la capacidad antioxidante del plasma con proteínas y sin éstas (desproteínizado). La preparación de las muestras fue, por ello, diferente para cada técnica:

- ORAC con proteínas: Las alícuotas de plasma almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en frío. Una vez descongeladas, se prepararon dos diluciones diferentes de cada muestra de plasma de cada sujeto.
- ORAC sin proteínas: A 25  $\mu$ l del plasma de las alícuotas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se le añadió 125  $\mu$ l de ácido perclórico 0,5 M para su desproteínización. A continuación, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 5 minutos (**figura 9**). Tras estos 5 minutos, se trasvasaron, a otros tubos para micro-centrífuga, 100  $\mu$ l del sobrenadante, a los que se le adicionaron 400  $\mu$ l de tampón fosfato 75 mM a pH 7,4.



**Figura 9.** Centrífuga Labnet Spectrafuge 24D para desproteínizar el plasma.

#### Preparación de la placa:

La medida se realizó en el lector de microplaca FLUOstar Omega BMG Labtech (**figura 7**) programado a 37°C y a una longitud de excitación de 490 nm y 545 nm de emisión. En la placa se adicionaron las siguientes cantidades de cada una de las soluciones y muestras:

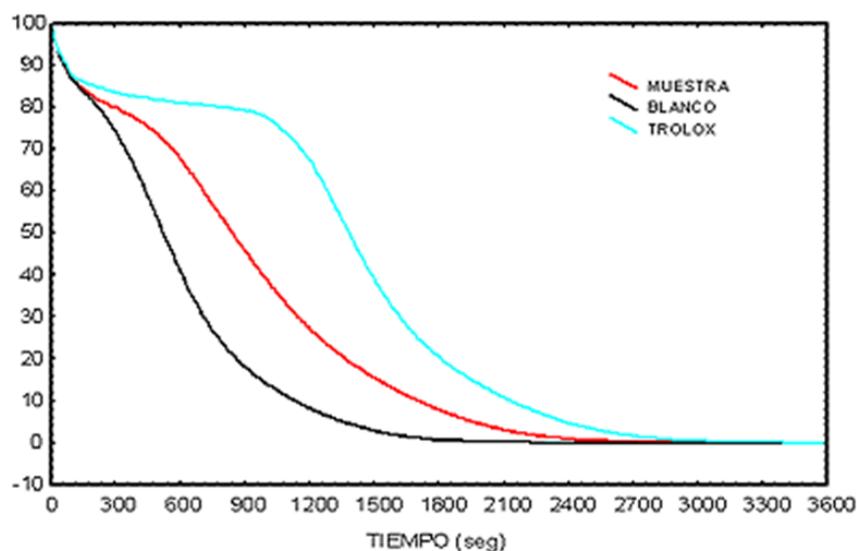
- 75 µl de blanco (tampón fosfato), Trolox o plasma con micropipeta. Se adicionaron las diferentes diluciones de Trolox por duplicado y, de menor a mayor concentración. El blanco, también por duplicado, se adicionó antes y después del Trolox. A continuación, las muestras se colocaron por triplicado (cada una de las dos diluciones de plasma con proteínas y la única dilución de plasma para las muestras desproteinizadas).
- Calcular la ganancia: Una vez adicionados el Trolox, blanco y las muestras, en otros 3 pocillos, se añadieron 112,5 µl de tampón fosfato 75 mM pH 7,4 y, 75 µl de fluoresceína 70 nM. Se midió la ganancia en los 3 pocillos, se calculó la media y se introdujo el valor en el software del lector.
- Una vez calculada la ganancia, con micropipeta multicanal, se añadieron 75 µl de fluoresceína 70 nM a cada uno de los 96 pocillos y se agitó la placa durante 5 segundos.
- Inmediatamente después, también con la micropipeta multicanal, se adicionaron 37,5 µl de AAPH 300 mM a toda la placa y se introdujo rápidamente en el lector para su lectura, midiéndose la fluorescencia cada 210 segundos durante 37 ciclos.

#### Obtención del valor de ORAC:

El valor de ORAC se calcula con una ecuación del tipo ( $y = 0,07134x + 1,14421$ ,  $R^2 = 0,99464$ ), donde “y” es la concentración de Trolox (µM) y “x” es el área neta bajo la curva corregida (**figura 10**). El área bajo la curva (AUC) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$AUC = 1 + (F_1/F_0 + F_2/F_0 + \dots + F_{37}/F_0)$ ; donde  $F_0$  es la intensidad de fluorescencia inicial leída en el minuto 0,  $F_1$  es la fluorescencia leída a los 210 segundos (3,5 minutos) y  $F_{37}$  la intensidad de fluorescencia leída a los 37 ciclos (129,5 minutos). El área neta bajo la curva corregida se calcula restándole el valor obtenido para el blanco. Los valores de ORAC se expresan en equivalentes de Trolox utilizando la curva y los resultados finales se expresan en micromoles equivalentes de Trolox por litro de plasma (µmol TE/L).

Los valores de ORAC con proteínas finales corresponden a la media de las dos diluciones realizadas y, éstas a su vez, son la media de las tres réplicas para cada dilución. Y los valores de ORAC sin proteínas finales corresponden con la media de las tres réplicas de la única dilución elaborada.



**Figura 10.** Valor de ORAC calculado mediante la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia a lo largo del tiempo entre el blanco y una muestra.

#### 4.3.2. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo TEAC-ABTS

Este método se fundamenta en el atrapamiento del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], por parte de las sustancias antioxidantes. Este radical es un compuesto cromóforo muy estable, soluble en agua y con un máximo de absorción de 340 nm. Se siguió el procedimiento descrito por Re *et al.* (1999) y Pulido *et al.* (2003).

El radical (**figura 11**) catiónico es de color verde-azulado, con un espectro de absorción en el intervalo UV-V. El radical se forma en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable y, al añadir la sustancia antioxidante, la concentración del radical disminuye, pudiéndose medir el descenso de la absorbancia producida a 730nm.

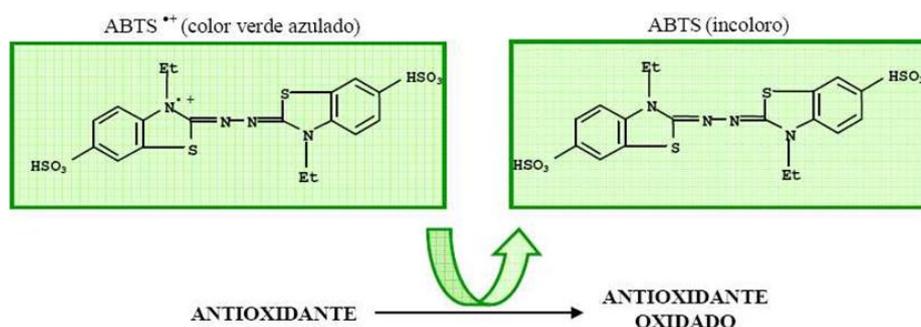


Figura 11. Reacción del radical ABTS<sup>•+</sup>

Preparación de soluciones:

- Solución de ABTS 7mM. Para 10 ml, se disolvieron 0,0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS en 10 ml de agua destilada.
- Solución de persulfato potásico 2,45 mM. Para 100 ml, se disolvieron 0,0662 g del reactivo en 100 ml de agua destilada.
- Solución reguladora de fosfato 5mM pH 7,4 (tampón fosfato). Para 1000 ml, se disolvieron 0,89 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,4 y se completó hasta 1 litro.
- Preparación del radical ABTS<sup>•+</sup>. Se mezclaron a partes iguales la solución de ABTS 7 mM y la de persulfato potásico 2,45 mM. Se dejó reposar en oscuridad durante 16 horas para la formación del radical, siendo, esta solución, estable durante 1 semana.
- Solución diaria de trabajo de ABTS<sup>•+</sup>. La solución madre de ABTS<sup>•+</sup> se diluyó en tampón fosfato 5 mM hasta obtener una absorbancia de 0,7 ± 0,02 a 730 nm en el espectrofotómetro (**figura 12**) lo cual se consiguió, aproximadamente, mezclando 40 µl de ABTS<sup>•+</sup> por cada 3 ml de tampón fosfato.

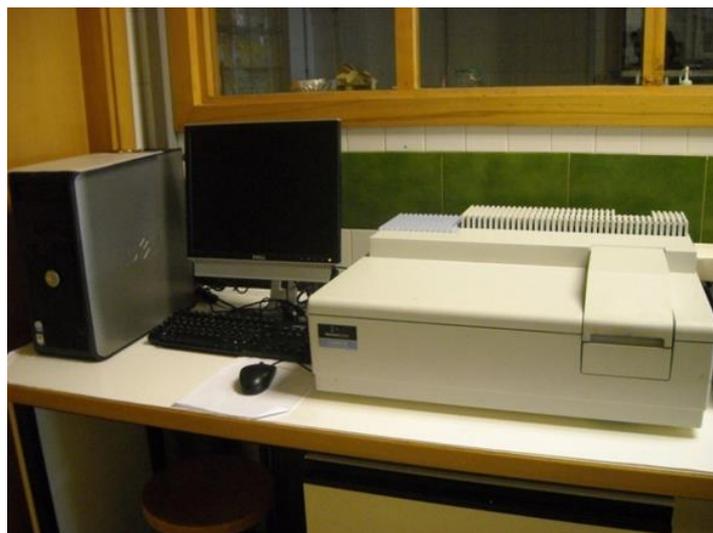


Figura 12. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.

- Solución de Trolox para la curva patrón. La solución madre se preparó disolviendo 0,01 g de Trolox en 5 ml de metanol y 5 ml de agua destilada. A partir de esta solución, se hicieron varias diluciones que fueron los distintos puntos de la recta con unas concentraciones de 20, 40, 80, 120, 160, y 200  $\mu\text{M}$ .

Preparación de la placa:

La medida se realizó en el lector de microplaca FLUOstar Omega BMG Labtech (**figura 7**) programado a 30°C durante 30 minutos, midiéndose la absorbancia a 730 nm. En la placa, se adicionaron las siguientes cantidades de cada una de las soluciones y muestras:

- 30  $\mu\text{l}$  de blanco (agua destilada), Trolox o plasma con la micropipeta. Al igual que en el ensayo anterior, el Trolox (de menor a mayor concentración) y el blanco (antes y después de las concentraciones de Trolox) se adicionaron por duplicado. Por su parte, las muestras de plasma se adicionaron por triplicado (cada una de las dos diluciones).
- Se llenó el inyector con la solución del radical ABTS<sup>•+</sup> para que el lector adicionara 270  $\mu\text{l}$  de la misma a cada pocillo de la placa, tomando lecturas de la absorbancia a 730 nm cada minuto.

Obtención del valor de TEAC-ABTS:

La curva patrón se construyó representando las absorbancias de las diferentes disoluciones de Trolox (a las cuales se les restó el valor de la absorbancia del blanco) (valor y)

frente a sus correspondientes concentraciones (valor  $x$ ). El valor de TEAC-ABTS en las muestras se calculó con una ecuación del tipo ( $y = -0,00273x + 0,02248$ ,  $R^2 = 0,99726$ ), donde “ $y$ ” es la absorbancia de la muestra de plasma (a la que también se le restó el valor de la absorbancia del blanco) y “ $x$ ” el valor buscado.

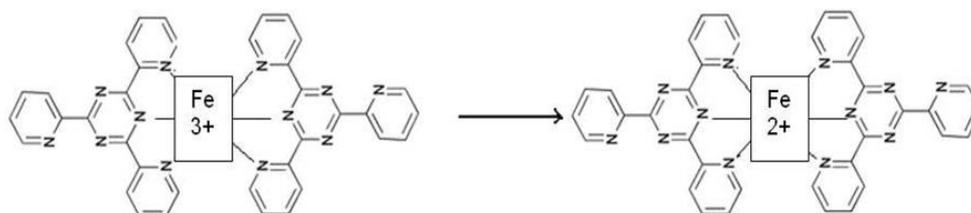
Los valores de TEAC-ABTS se expresan en equivalentes de Trolox utilizando la curva y los resultados finales se expresan en micromoles equivalentes de Trolox por litro de plasma ( $\mu\text{mol TE/L}$ ).

Los valores de TEAC-ABTS finales corresponden a la media de las dos diluciones realizadas y, éstas a su vez, son la media de las tres réplicas de cada dilución.

### 4.3.3. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP

El análisis de FRAP fue introducido por Benzie y Strain (1996 y 1999) y Pulido *et al.*, (2000) para medir la actividad antioxidante total de forma indirecta y se compara con la capacidad antioxidante del Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid).

Se basa en el poder de reducción del Fe (III) a Fe (II) por las sustancias antioxidantes. El complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), incoloro, es reducido al complejo ferroso coloreado (**figura 13**) que se mide a 595 nm (Pulido *et al.*, 2000).



**Figura 13.** Reacción de reducción de Fe (III) a Fe (II) producida en el método FRAP.

Los antioxidantes que reaccionan en el ensayo FRAP son los que, bajo las condiciones de la reacción, pueden reducir la sal Fe (III)-TPTZ a su forma coloreada azul Fe (II)-TPTZ. En estos se incluyen el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido úrico, bilirrubina y compuestos fenólicos como las catequinas y otros flavonoides de origen vegetal (Benzie y Devaki, 2017).

Preparación de soluciones:

- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM. Para 100 ml, se diluyeron 535  $\mu$ l de HCl (37%) en 100 ml de agua destilada.
- Solución de TPTZ 10 mM. Para 10 ml, se pesaron en balanza de precisión (**figura 14**) 0,0312 g del reactivo y se disolvieron en 10 ml de HCl 40 mM. Esta solución se puede utilizar durante 1 semana, siempre que esté almacenada en oscuridad.



Figura 14. Balanza de precisión Mettler AE 200 para pesaje de todos los reactivos.

- Solución de cloruro férrico ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 20 mM. Para 25 ml, se disolvieron 0,1352 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  en 25 ml de agua destilada. Esta solución, también se puede utilizar durante 1 semana, mientras sea almacenada en oscuridad.
- Solución de tampón acetato 0,3 mM pH 3,6. Para 250 ml, se disolvieron 0,0061 g de AcONa en 200 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 3,6 con HCl 40 mM y se completó hasta 250 ml con agua destilada.
- Solución diaria de trabajo de FRAP. Se mezclaron 2,5 ml de la solución de TPTZ 10 mM con 2,5 ml de la solución de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  20 mM y 25 ml de tampón acetato 0,3 mM pH 3,6.
- Solución de Trolox para la curva patrón. La solución madre se preparó disolviendo 0,01 g de Trolox en 5 ml de metanol y 5ml de agua destilada. A partir de esta solución, se hicieron varias diluciones que fueron los distintos puntos de la recta con unas concentraciones de 20, 40, 80, 120, 160, 200, 320, 360 y 400  $\mu$ M.
- Solución de sulfato ferroso ( $Fe^{2+}$ ) para la curva patrón. La solución madre se preparó disolviendo 0,0160 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en 25 ml de HCl 0,01N. A partir de esta solución, se hicieron varias diluciones que fueron los distintos puntos de la recta con unas concentraciones de 115, 172,5, 230, 460, 690, 920 y 1150  $\mu$ M.

#### Preparación de la placa:

La medida se realizó en el lector de microplaca FLUOstar Omega BMG Labtech (**figura 7**) programado a 37°C durante 30 minutos, midiéndose la absorbancia a 595 nm. En la placa, se adicionaron las siguientes cantidades de cada una de las soluciones y muestras:

- 20 µl de blanco (agua destilada), Trolox, sulfato ferroso o plasma con la micropipeta. Al igual que en el ensayo anterior, el Trolox o sulfato ferroso (de menor a mayor concentración) y el blanco (antes y después de las concentraciones de Trolox) se adicionaron por duplicado. Por su parte, las muestras de plasma se adicionaron por triplicado (cada una de las dos diluciones).
- Se llenó el inyector con la solución FRAP para que el lector adicionara 280 µl de la misma a cada pocillo de la placa, tomando lecturas de la absorbancia a 595 nm cada minuto. Se consideró como resultado la lectura final.

#### Obtención del valor de FRAP:

La curva patrón se construyó representando las absorbancias de las diferentes disoluciones de Trolox o sulfato ferroso (a las cuales se les restó el valor de la absorbancia del blanco) frente a sus correspondientes concentraciones. El valor de FRAP en las muestras (expresado como equivalente de Trolox) se calculó con una ecuación del tipo ( $y = 0,00264x + 0,01699$ ,  $R^2 = 0,99927$ ) donde “y” es la absorbancia de la muestra de plasma (a la que también se le restó el valor de la absorbancia del blanco) y “x” es el valor buscado. Por otro lado, el valor FRAP en las muestras (expresado como equivalente de hierro) se calculó con una ecuación del tipo ( $y = 0,00116x + 0,00396$ ,  $R^2 = 0,99979$ ), donde “y” es la absorbancia de la muestra de plasma (a la que también se le restó el valor de la absorbancia del blanco) y “x” el valor buscado.

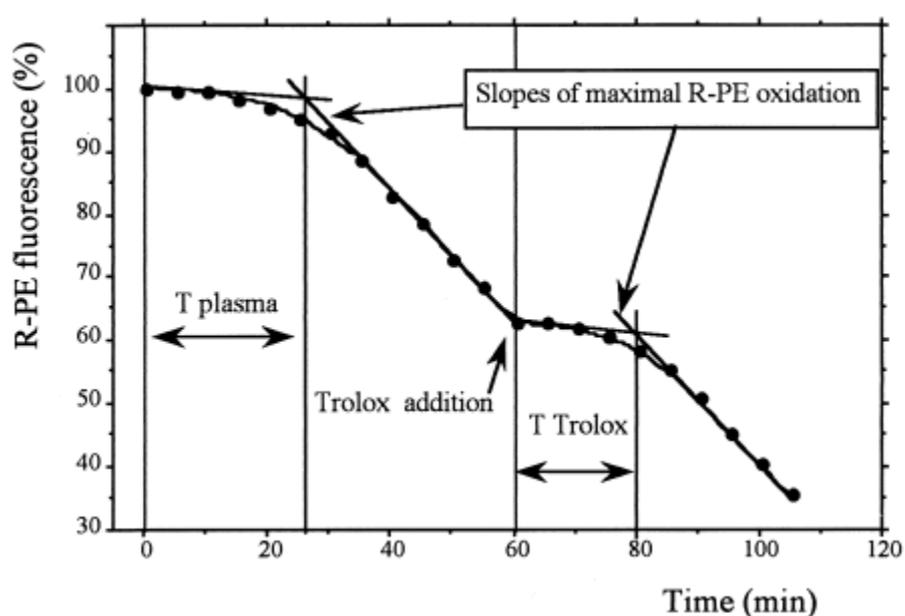
Los valores de FRAP se expresan en equivalentes de Trolox utilizando la curva y los resultados finales se expresan en micromoles equivalentes de Trolox por litro de plasma (µmol TE/L). Los valores de FRAP también se expresan en equivalentes de sulfato ferroso utilizando la curva y los resultados finales se expresan en micromoles equivalentes de sulfato ferroso por litro de plasma (µmol Fe<sup>2+</sup>/L).

Los valores de FRAP finales corresponden a la media de las dos diluciones realizadas y, éstas a su vez, son la media de las tres réplicas para cada dilución elaboradas.

#### 4.3.4. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo TRAP

El ensayo TRAP se basa en la medición de la fluorescencia de una molécula a la que se le somete a la acción de un generador de radicales libres (Ghiselli *et al.* 1995) de forma semejante al ensayo ORAC. En este caso la especie generadora de radicales libres es la misma, pero la molécula fluorescente es la R-ficoeritrina (R-PE) y para evitar interferencias de proteínas y lípidos se mide también la capacidad antioxidante del Trolox en la misma muestra.

Un total de 8  $\mu$ l de plasma se llevan a un volumen final de 2,0 ml con una disolución 15 nM de R-PE en 75 mM de tampón fosfato a un pH 7,0 y la solución resultante se mantiene a 37°C durante 5 minutos. La reacción de oxidación se inició añadiendo 25  $\mu$ l de una disolución de AAPH de 300 mM para alcanzar una concentración de 4,0 mM y, el descenso de la fluorescencia de R-PE se controló cada 5 minutos en un espectrofotómetro de luminiscencia a una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 575 nm. Cuando la fluorescencia de la P-RE es aproximadamente el 50% del valor inicial, se adicionan 30  $\mu$ l de Trolox 120  $\mu$ M y la reacción continúa hasta que la pérdida de fluorescencia sea, de nuevo lineal, tal y como se muestra en la **figura 15** tomada de Ghiselli *et al.* (2000).



**Figura 15.** Cinética de la oxidación de la R-PE (5 mM AAPH, en presencia de 8  $\mu$ l de plasma antes y después de adicionar una solución final de 1,8  $\mu$ M de Trolox), según Ghiselli *et al.* (2000).

La fase de retardo se calcula extrapolando la pendiente de la máxima oxidación de la R-PE antes y después de adicionar el Trolox hasta la intersección de las pendientes de las fases de inducción del plasma y el Trolox. Ambas pendientes en la oxidación máxima de la R-PE son las mismas en cualquier ensayo. Los valores de CANE-P se obtienen comparando las fases de retardo del plasma respecto a la del Trolox:

$$C_{Trolox}/T_{Trolox} = X/T_{Plasma}$$

donde  $C_{Trolox}$  es la concentración adicionada de Trolox,  $T_{Trolox}$  es la fase de retardo inducida por el Trolox,  $X$  es la CANE-P, and  $T_{Plasma}$  es la fase de retardo inducida por el plasma. El valor resultante de  $X$  es multiplicado por 2,0 (factor estequiométrico del Trolox) y por el factor de dilución del plasma. Los valores son expresados como micromoles de radical peroxilo atrapados en un litro de plasma ( $\mu\text{M}$ ).

#### 4.3.5. Determinación de compuestos fenólicos totales mediante el ensayo Folin-Ciocalteu

Este método permite realizar la medida del contenido de Tp (Singleton *et al.*, 1999).

Preparación de soluciones:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu. Sigma-Aldrich.
- Solución de carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 10%. Para 100 ml, se disolvieron 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 100 ml de agua bidestilada.
- Solución de ácido gálico para la curva patrón. La solución madre se preparó disolviendo 0,01 g de ácido gálico en 10 ml de agua bidestilada. A partir de esta solución, se hicieron varias diluciones que fueron los distintos puntos de la recta, con unas concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm.

Preparación de la placa:

La medida se realizó en el lector de microplaca FLUOstar Omega BMG Labtech (**figura 7**) programado a 37°C durante 60 minutos, midiéndose la absorbancia a 725 nm y tomando como resultado la lectura final. En la placa, se adicionaron las siguientes cantidades de cada una de las soluciones y muestras:

- 30 µl de blanco (agua bidestilada), ácido gálico o plasma con la micropipeta. Al igual que en los ensayos anteriores, en este caso, el ácido gálico (de menor a mayor concentración) y el blanco (antes y después de las concentraciones de Trolox) se adicionaron por duplicado. Y las muestras de plasma se adicionaron por triplicado (cada una de las dos diluciones).
- A continuación, se adicionaron 190 µl de agua bidestilada a cada uno de los 96 pocillos con la pipeta multicanal.
- Y, posteriormente, en el lector de fluorescencia, se llenó un inyector con reactivo de Folin-Ciocalteu y, un segundo inyector, con la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%. Del primero, el lector adicionó 15 µl, mientras que del carbonato sódico, el lector adicionó 60 µl a toda la placa.

Obtención del valor de fenoles totales:

La curva patrón se construyó representando las absorbancias de las diferentes diluciones de ácido gálico (a las cuales se les restó el valor de la absorbancia del blanco) frente a sus correspondientes concentraciones. El valor de fenoles totales en muestra se calculó con una ecuación del tipo ( $y = 0,00855x + 0,00087$ ,  $R^2 = 0,99839$ ) donde “y” es la absorbancia de la muestra de plasma (a la que también se le restó el valor de la absorbancia del blanco) y “x” el valor buscado.

Los valores de Tp se expresan en partes por millón de ácido gálico utilizando la curva y, los resultados finales, se expresan en miligramos de ácido gálico por litro de plasma (mg GAE/L).

Los valores de Tp finales corresponden a la media de las dos diluciones realizadas y, éstas a su vez, son la media de las tres réplicas para cada dilución elaboradas.

## 4.4. Métodos de determinación de biomarcadores de nutrientes antioxidantes en plasma

### 4.4.1. Determinación de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (vitamina C)

La determinación se realizó siguiendo la técnica descrita por Lykkesfeldt (2007) con ligeras modificaciones. Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Un total de 50  $\mu$ l de plasma se mezclaron, a igual volumen, con ácido meta-fosfórico al 10% que contiene 10 mmol/L de disodio-EDTA, centrifugándose a 4°C durante 10 minutos a 11200 rpm. Una cantidad de 75  $\mu$ l de sobrenadante se almacenaron en viales topacio a -80°C hasta su análisis. La cuantificación se realizó en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrómetro de masas Acquity UHPLC BEH system, en tándem con un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters Co., Milford, MA), como se puede observar en la **figura 16**, equipados con una columna Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm 1,8  $\mu$ m). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Solvente A: Agua/ácido fórmico al 0,1%		
Solvente B: Metanol/ácido fórmico al 0,1%		
Flujo de la fase móvil: 0,450 ml/min		
Volumen de inyección: 5 $\mu$ l		
Tiempo	% Solvente A	% Solvente B
Inicial	99,0	1,00
1,50	99,0	1,00
1,60	95,0	5,00
3,00	80,0	20,0
5,50	45,0	55,0
5,60	45,0	55,0
5,80	2,00	98,0
7,50	2,00	98,0

Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: Polaridad ES-; capilar 1,80-1,89 (kV); temperatura de la fuente 150°C; temperatura de desolvatación 450°C; flujo del gas de cono 150-148 (L/Hr); flujo del gas de desolvatación 800-794 (L/Hr); flujo del gas de colisión 0,15-0,14 (mL/Min); flujo del gas nebulizador 7,00 (Bar). Para realizar la cuantificación se

realizó una curva patrón de ácido ascórbico (Sigma Aldrich) y ácido dehidroascórbico (Sigma Aldrich) a concentraciones de 0,25 ppm a 8,00 ppm y 0,05 ppm a 1,60 ppm, respectivamente. Los valores obtenidos en las muestras se interpolaron en las siguientes ecuaciones: Ácido ascórbico:  $y=16832x$ ; ácido dehidroascórbico:  $y=358x+21,231x$ .



**Figura 16.** Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrómetro de masas Acquity UHPLC BEH en tándem con espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters Co., Milford, MA).

#### 4.4.2. Determinación de compuestos antioxidantes liposolubles

Las concentraciones de retinol,  $\alpha$ -tocoferol, carotenos totales, Coenzima Q9 y Coenzima Q10 fueron determinadas también mediante cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrómetro de masas Acquity UHPLC BEH system, en tándem con un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters Co., Milford, MA) (**figura 16**), pero en esta ocasión, equipados con una columna Acquity UPLC HSS BEH C18 (2,1 x 100 mm 1,7  $\mu$ m) siguiendo el método desarrollado por Battino *et al.* (2004) con ligeras modificaciones. Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Un total de 50  $\mu$ l de plasma fueron mezclados con 150  $\mu$ l de 2-propanol que contiene 0,0625% de BHT, centrifugándose a 4°C durante 10 minutos a 11200 rpm y 150  $\mu$ l de sobrenadante se evaporaron con nitrógeno y se almacenaron en viales topacio a -80°C hasta su análisis. La muestra se reconstituyó con 150  $\mu$ l de 2-propanol y se inyectaron 5  $\mu$ l. La fase móvil consistió en 0,1% de ácido fórmico en metanol (v/v) y el flujo fue de 0,700 ml/min. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: Polaridad API+; corona 0,70-0,45 ( $\mu$ A); corona 3,0-2,2 (kV); temperatura de la fuente 125°C; temperatura de sonda 500°C; flujo del gas de cono 150-144 (L/Hr); flujo del gas de desolvatación 710-707 (L/Hr); flujo del gas de colisión 0,18-0,17 (mL/Min); flujo del gas nebulizador 7,00 (Bar). Para realizar la cuantificación se realizó una curva patrón con los siguientes patrones de Sigma

Aldrich y concentraciones: Retinol (de 0,125 ppm a 1,50 ppm),  $\alpha$ -tocoferol (de 0,25 ppm a 3 ppm), Co Q9 (0,016 ppm a 0,20 ppm), Co Q10 (0,125 ppm a 1,50 ppm) y carotenos totales (de 0,125 ppm a 1,50). Los valores obtenidos en las muestras se interpolaron en las siguientes ecuaciones: Retinol  $y=4,35275x-0,19473$ ;  $\alpha$ -tocoferol  $y=7,03469x-0,51642$ ; CoQ9  $y=1,61951x-0,00418$ ; CoQ10  $y=2,15347x-0,16221$ ; carotenos totales  $y=0,55106x+0,00044$ .

#### 4.4.3. Determinación de carotenoides individuales

Las concentraciones de licopeno, luteína,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina fueron determinadas también mediante cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrómetro de masas Acquity UHPLC BEH system, en tándem con un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters Co., Milford, MA) (**figura 16**), pero en esta ocasión, equipados con una columna C30 YMC Carotenoid (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm, Waters, DE, USA). La técnica empleada es una adaptación de la técnica de determinación de vitaminas liposolubles del apartado anterior. Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Un total de 50  $\mu$ l de plasma fueron mezclados con 150  $\mu$ l de 2-propanol que contiene 0,0625% de BHT y equinona 0,52  $\mu$ M como patrón interno, centrifugándose a 4°C durante 10 minutos a 11200 rpm y, 150  $\mu$ l de sobrenadante se evaporaron con nitrógeno y almacenados en viales topacio a -80°C hasta su análisis. La muestra se reconstituyó con 150  $\mu$ l de 2-propanol. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Solvente A: 5% metanol en agua y 0,1% de ácido fórmico		
Solvente B: Metil tert-butiléter (MTBE)		
Flujo de la fase móvil: 1,00 ml/min		
Volumen de inyección: 10 $\mu$ l		
Tiempo	% Solvente A	% Solvente B
Inicial	60,0	40,0
30	0,00	100,0
30,1	60,0	40,0

Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: Fuente de ionización Unispray (US); modo de ionización positivo; temperatura de la fuente 150°C; temperatura de desolvatación 650°C; flujo del gas de cono 150 (L/Hr); flujo del gas de desolvatación 500 (L/Hr); flujo del gas de colisión 0,15 (mL/Min); flujo del gas nebulizador 7,00 (Bar). En la **figura 17** se representa un cromatograma representativo de 50 ppb de todos los patrones analizados.

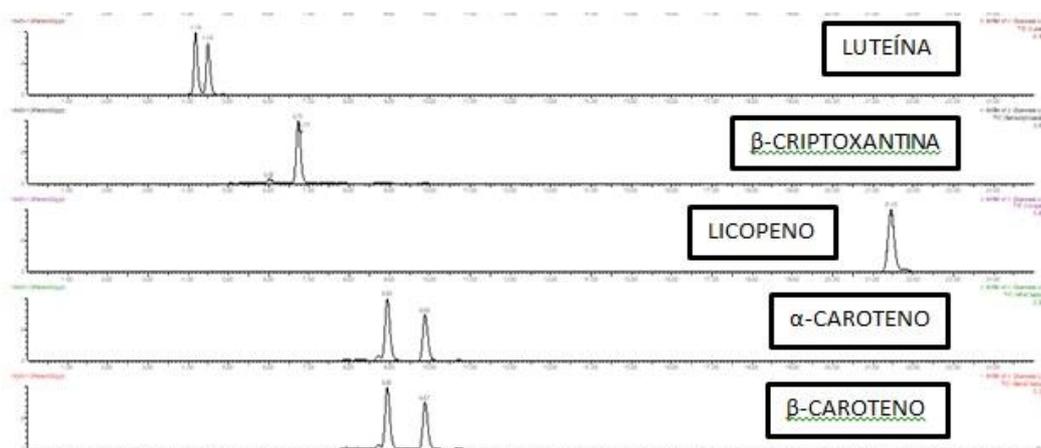


Figura 17. Cromatograma representativo del patrón de 50 ppb de todos los carotenoides analizados.

Para realizar la cuantificación se realizó una curva patrón con los siguientes patrones:  $\beta$ -caroteno (Sigma Aldrich) y  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno, luteína y licopeno (CaroteNature-GmbH) a concentraciones de 2 a 1000 ppb para todos los carotenoides. Los valores obtenidos en las muestras se interpolaron en las siguientes ecuaciones:  $\beta$ -caroteno  $y=9,30E-07x+0,070$ ;  $\beta$ -criptoxantina  $y=8,851E-07x+0,015$ ;  $\alpha$ -caroteno  $y=1,39E-06x+0,061$ ; luteína  $y=1,17E-06x+0,043$ ; licopeno  $y=7,19E-08+0,010x$ .

#### 4.4.4. Determinación de minerales.

La determinación del contenido total en plasma de Mg, Ca, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Y, Mo, Cd y Pb fue realizada mediante espectrofotometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS; Agilent 7500, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipado con un nebulizador tipo Meinhard (Glass Expansion, Romainmotier, Suiza) y con una celda de colisión de He (figura 18).



Figura 18. Agilent 7500c ICP-MS System.

Se usó un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) para obtener agua desionizada (18 MΩ). Todos los reactivos utilizados (solución de hidróxido de amonio, butanol, EDTA, triton X-100), fueron de grado analítico. Se preparó una solución estándar de 100 µg/L de Li, Mg, Sc, Co, Y, In, Ce, Ba, Pb, Bi y U en HNO<sub>3</sub> al 1% (v/v) a partir de 1000 mg/L de solución estándar multi-elemento (Merck) y usada para la optimización diaria de los parámetros de ICP. Las soluciones estándar para cada elemento para ICP-MS que contienen 1000 µg/ml de Mg, Ca, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Y, Mo, Cd y Pb también fueron de la casa Merck.

Para la determinación de las concentraciones totales de los metales, el plasma fue previamente tratado con una solución básica de hidróxido de amonio, butanol, EDTA y triton X-100. Las curvas de calibración se prepararon usando Ga como estándar interno en una dilución de 1000 mg/L al 1% de HNO<sub>3</sub>.

#### 4.4.5. Determinación de ácido úrico

La determinación de ácido úrico en plasma se llevó a cabo mediante un procedimiento colorimétrico directo a una longitud de onda de 520 nm usando el kit de análisis de BIOLABO que utiliza el tampón BUF (formado por los ácidos diclorohidroxibenzeno sulfonato + hexacianoferrato (II) de potasio + 3-DDAPS + EDTA) y las enzimas (peroxidasa + aminoantipirina + uricasa) en el analizador químico clínico Mindray BS-200 (**figura 19**) siguiendo el procedimiento de Fossati *et al.* (1980).



**Figura 19.** Analizador bioquímico Mindray BS-200.

#### 4.5. Métodos de determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma.

La determinación de las concentraciones de la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL-ox) se llevó a cabo mediante un enzoinmunoensayo para la determinación cuantitativa de autoanticuerpos contra la forma LDL-ox en suero (ELISA) de Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG. Para la cuantificación se empleó un lector con multi-detección de fluorescencia de microplacas FLx800TM diseñado por BioTek (**figura 20**).



**Figura 20.** Lector con multi-detección de fluorescencia de microplacas FLx800TM (BioTek).

Se parte de una cantidad de 50  $\mu$ l de muestra y, una vez diluidas ésta, se prepara la placa y se realiza el análisis, midiendo la absorbancia a 450 nm tras tres periodos de incubación distintos (1,5 horas / 30 minutos / 15 minutos). Los resultados se calculan restando el valor del blanco a todos los demás valores, realizando una curva a partir de los estándares.

La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó con el kit de ensayo Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) OxiSelect™ de Cell Biolabs Inc., para la detección y el control de la peroxidación lipídica. El aducto MDA-TBA formado por la reacción del MDA de las muestras de plasma, se midió fluorométricamente con un lector multi-detección de fluorescencia de microplacas FLx800TM de BioTek (**figura 20**) a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión. La placa se prepara con 150  $\mu$ l de plasma con BHT y la recta de calibrado de MDA se realizó con concentraciones de 0  $\mu$ M a 125  $\mu$ M.

## 4.6. Métodos de determinación de biomarcadores de inflamación en plasma

Todos los biomarcadores fueron analizados mediante Luminex 200™ System (Luminex Corporation), (**figura 21**). Concretamente, la adiponectina, el PAI-1 y la resistina, se midieron con el kit Millipore's MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1. Las muestras sanguíneas fueron diluidas en proporción 1:400 en el tampón de ensayo incluido en el kit. Interleucina 6 y 8 (IL-6, IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), se midieron usando el kit de Millipore's MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2.



**Figura 21.** Luminex 200™ System (Luminex Corporation).



**Figura 22.** Architect c16000 System (Abbott Core Laboratory).

La determinación de la PCR se realizó mediante el ensayo MULTIGENT PCR Vario (PCR<sub>Va</sub>) en la plataforma Architect c16000 System desarrollado y validado por Abbott (**figura 22**). Este ensayo permite la determinación cuantitativa de la concentración de PCR mediante inmunoturbidimetría. Se trata de un inmunoensayo en el cual, la reacción antígeno-anticuerpo ocurre entre la PCR presente en la muestra y el anticuerpo anti-PCR que está unido a una partícula de látex. Al darse la reacción antígeno-anticuerpo, se produce aglutinación, que es detectada mediante cambios de absorbancia a 572 nm, los cuales son proporcionales a la concentración de PCR presente en la muestra. Las muestras de plasma sanguíneo fueron diluidas en una solución salina a un factor de dilución 1:2.

#### 4.7. Recogida de información de la dieta

A) **Estudio transversal I y III:** La recogida de información de dieta se llevó a cabo mediante un recuerdo de 24 horas (R-24H) y CFCA. El R-24H, en el que se detallaron todos los alimentos y bebidas ingeridas el día antes de la extracción de sangre, fue cumplimentado mediante una entrevista personal tras la extracción de la muestra sanguínea, pudiéndose determinar los tamaños de porción de alimento ingerido de cada participante, según los pesos y medidas caseras y raciones habituales de consumo de Carbajal y Sánchez-Muñiz (2003) y según la guía para estudios dietéticos de Ruiz y Artacho (2010). Posteriormente, se les facilitó el CFCA y se explicó su cumplimentación. El CFCA se recogió unos días después personalmente, lo que permitió corregir algunos datos introducidos de forma incorrecta. Dicho cuestionario validado incluye 136 ítems de diferentes alimentos donde los sujetos debían señalar sus hábitos dietéticos a lo largo del año anterior (De la Fuente-Arrillaga *et al.*, 2010). Para la transformación de los alimentos en energía y nutrientes ingeridos (estudio transversal I - piloto-) se usó el programa "NUTRIRE" (Ruiz y Artacho, 2013). Los datos obtenidos con este software se complementaron con información nutricional referente a la composición de alimentos comerciales. La ingesta nutricional fue comparada teniendo en cuenta la ingesta dietética de referencia (IDR) publicada por el Instituto de Medicina (IOM) (The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, Institute of Medicine, 2010). Y para la transformación en nutrientes antioxidantes (minerales y carotenoides en estudio transversal III) se utilizaron las tablas de composición de alimentos del Centro de Enseñanza Superior de Nutrición y Dietética (CESNID), las tablas de composición de alimentos de Mataix *et al.* (2009) y la base de datos de carotenoides de Beltrán *et al.* (2012).

B) **Estudio transversal II:** La recogida de información relacionada con el consumo alimentario se llevó a cabo mediante el método de historia dietética (EPIC Group of Spain, 1997). En ésta, se incluyeron aspectos como tamaños de raciones, ingestas ocasionales, diferencias estacionales y variaciones entre días laborales y fines de semana. De esta manera, más de 600 alimentos fueron introducidos en la base de datos de nutrientes de EPIC (ENDB) (Slimani *et al.*, 2007).

## 4.8. Otras variables

A) **Estudio transversal I y III:** Durante las entrevistas personales, también se recopiló información relativa al sexo (masculino, femenino), edad, consumo de tabaco (fumador, ex-fumador, no fumador), consumo de alcohol (sí, no), medidas antropométricas (altura, peso), historial médico (diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer), consumo de suplementos (sí, no) o medicamentos (sí, no) y, por último, sobre el nivel diario de actividad física (sedentario, ligera actividad, activo o muy activo). El gasto energético total diario (GETD) se estimó usando el método PAL propuesto por “The Institute of Medicine of the National Academies, Food and Nutrition Board” (2005).

B) **Estudio transversal II:** La información relativa a otras variables fue recogida mediante cuestionarios y protocolos validados y estandarizados (EPIC Group of Spain, 2004). En estos se incluyeron variables sociodemográficas relacionadas con los estilos de vida, como el historial de consumo de tabaco (variable categórica; no fumador, exfumador, fumador), actividad física (variable categórica; inactivo, moderadamente inactivo, moderadamente activo, activo, según lo establecido por Haftenberger et al. (2002) y otras variables como la edad (variable continua; años), sexo (variable dicotómica; hombre, mujer), centro de reclutamiento (variable categórica; Granada, Guipúzcoa), talla (variable continua; m), peso (variable continua; kg), IMC (variable continua;  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y circunferencia de cintura (variable continua; cm). Cabe destacar que las variables antropométricas de peso, talla y circunferencia de cintura se midieron físicamente y siguiendo procedimientos estandarizados en EPIC-España (EPIC Group of Spain, 2004). Para la clasificación del IMC en las categorías de peso normal ( $<18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ ), sobrepeso ( $\geq 18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$  y  $<30 \text{ kg}/\text{m}^2$ ) y obesidad ( $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ ), se emplearon los puntos de corte de la OMS. Con la medida de la circunferencia de cintura, se definió la presencia de obesidad abdominal ( $\geq 102 \text{ cm}$  en hombres y  $\geq 88 \text{ cm}$  en mujeres) en base a los puntos de corte ATP III. Como se ha descrito anteriormente, la adherencia a la DM se estableció en base al índice rMED propuesto por Buckland et al. (2009), en escala continua y en los niveles de baja (0-6 puntos), media (6-12 puntos) y alta adherencia (12-18 puntos).

## 4.9. Bases de datos de la CAT en alimentos

### 4.9.1. Formulario de recogida de información

#### 4.9.1.1. Búsqueda bibliográfica sobre publicaciones de CAT en alimentos

Con objeto de generar una base de datos de valores de CAT y de contenido en Tp de alimentos consumidos o producidos en España, se realizó una búsqueda bibliográfica, hasta Junio de 2015, de estudios que habían analizado CAT y Tp en estos alimentos, a través de cualquiera de los ensayos de CAT (TRAP, FRAP, ORAC, TEAC-ABTS, DPPH) y de Tp (FCR). La búsqueda se llevó a cabo en los buscadores bibliográficos PubMed/Medline, Embase y Web of Science, empleando la combinación de los siguientes términos:

*“(spain OR espagne OR espana OR spagna) OR (spain[ad] OR espagne[ad] OR espana[ad] OR spanien[ad] OR spagna[ad])”.*

Esta combinación fue cruzada con cada uno de los siguientes términos, tanto palabras clave como términos MESH, a través del operador boleano AND:

*Antioxidants/analysis [MESH]*

*“radical scavenger”*

*“ABTS”*

*“DPPH”*

*“dietary antioxidants”*

*“FRAP”*

*“TRAP”*

*“antioxidant capacity”*

*“ORAC”*

*“Total Polyphenols”*

El resultado de la búsqueda dio lugar a un listado numeroso de artículos que se revisó para descartar aquéllos que no contuvieran información de utilidad, aplicando los siguientes criterios de exclusión:

- Ensayos de CAT distintos a los considerados (TRAP, TEAC-ABTS, FRAP, DPPH, ORAC y Tp).
- Productos no comercializados en España.
- Productos cultivados sólo con fines científicos.
- Artículos que sólo analizaban subproductos (cáscara, piel o semillas).

- Artículos que expresaban los resultados en porcentaje de inhibición.

#### 4.9.1.2. Diseño del formulario de recogida de información de CAT en alimentos

Con objeto de recopilar la información sobre CAT y Tp reportada en estos artículos para cada alimento, se diseñó un formulario de recogida de datos para los diferentes ensayos de CAT y Tp en la herramienta Access (Office Windows). En este formulario, se implementaron las siguientes variables para la recogida de información:

- **Identificador (ID).** Es la clave única, es decir, este número no se repite y se va generando por sí mismo y de manera consecutiva.
- **Alimento.** Se refiere al nombre del alimento, tal y como aparece en la publicación/fuente de información.
- **Grupo de alimentos.** Es el grupo de alimentos al que pertenece el alimento de la publicación. Estos grupos están basados en la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA).
- **Alimentos del grupo.** Se elige el alimento al que corresponde al de la publicación, de acuerdo con el grupo de alimento anteriormente elegido, también de la base de datos BEDCA.
- **Otros alimentos.** Para definir manualmente el alimento, en caso de que no se encuentre descrito anteriormente.
- **Grupos de alimento.** NIVEL 1 y NIVEL 2, definidos según la clasificación de alimentos del estudio EPIC (ENDB) (Slimani *et al.*, 2007) para facilitar, posteriormente, la unión con esta base de datos.
- **Porción comestible.** Con objeto de indicar si sólo la parte comestible del alimento ha sido analizada.

- **Método de cocción** o elaboración culinaria. Se definieron las siguientes opciones:

1.- Al horno.	15.- Tostado.
2.- Barbacoa.	16.- Recalentado.
3.- Hervido.	17.- Estofado.
4.- Al vapor.	18.- Empanado y al horno.
5.- Escaldado.	19.- Empanado y frito.
6.- Escalfado.	20.- Rebozado y frito.
7.- Asado.	21.- Microondas.
8.- Frito.	22.- Rebozado y al horno.
9.- Salteado.	23.- Enharinado y frito.
10.- Fritura profunda.	24.- Cocinado con grasa.
12.- Fritura superficial.	25.- Cocinado sin grasa.
13.- Gratinado.	26.- Crudo.
14.- A la parrilla.	27.- No especificado.

- **Método de conservación.** Se definieron las siguientes opciones:

1.- Fresco, crudo.	7.- Marinado.
2.- Enlatado.	8.- Curado.
3.- Congelado.	9.- Reconstituido / preparado (té, café, etc...).
4.- Seco o en copos / deshidratado.	10.- Tratado térmicamente (UHT, pasteurización, etc...).
5.- En salazón.	11. No especificado.
6.- Ahumado.	_____

- **Año.** Año de publicación del artículo en el que se encuentra la información del alimento.
- **Primer autor.** Se refiere al primer autor del artículo en el que se encuentra la información grabada para el alimento en cuestión.
- **DATA\_Src.** Se elige el ID del artículo en el que se encuentra la información grabada para el alimento en cuestión. Dicho ID es el perteneciente a una tabla Excel en la que están registrados todos los artículos seleccionados en la búsqueda bibliográfica.

- **Tipo de publicación.** Las opciones definidas son: Artículo, Comunicación de Congreso, Tesis, Material Propio, Libro o Monografía.
- **Fuente de datos:** Si la información se obtiene directamente del artículo, se consideró “fuente directa”. Si, por ejemplo, se tuvo que recoger a partir de alguna extrapolación en un gráfico, fórmula matemática, etc..., se definió como “fuente indirecta”.
- **País.** País de origen del alimento.
- **Observaciones.** Para realizar anotaciones, haciendo referencia a ambigüedades en la información, dificultades, información adicional relevante, etc.

En la **figura 23** se muestra una captura de pantalla del formulario de recogida de información de estas variables, donde se puede observar el grado de detalle de la información recopilada para cada alimento seleccionado.

**Figura 23.** Formulario Access de las variables de recogida de información de la primera parte.

A continuación, se implementaron variables de valores de CAT específicamente para cada uno de los ensayos considerados. Así, según el ensayo de CAT señalado (parte inferior del formulario de la **figura 23**), se disponía de la siguiente información:

- **ID.** Es el mismo que el mencionado anteriormente, único para cada alimento.

- **MN.** Valor (medio) de CAT dado en el artículo.
- **MD.** Desviación estándar (si se ofrece el dato en el artículo).
- **MI.** Valor mínimo.
- **MX.** Valor máximo, para disponer de información sobre la variabilidad de la medida.
- **P75, P25... Percentiles**, en caso de que esta información esté disponible.
- **Unidades.** Se definieron las siguientes unidades:

1.- mmol Fe/kg.	7.- mmol eq. vit C/100 g.
2.- mmol Trolox/kg.	8.- mg eq. Trolox/100 g.
3.- mmol TE/100 g.	9.- mmol Trolox/100 g.
4.- mg GAE/100 g.	10.- mmol Fe/100 g.
5.- Antioxidant in mmol/100 g.	11.- $\mu$ M sulfato ferroso/100 g.
6.- AA%.	12. No especificadas.

- **Método analítico.** Se definieron los siguientes métodos:

1.- Espectrofotometría.	4.- HPLC.
2.- Espectrómetro de luminiscencia.	5.- No especificado.
3.- Fluorimetría.	_____

- **Otro método analítico.** En caso de no encontrarse en el listado anterior, se introdujo manualmente.
- **Método de extracción.** Se definieron los siguientes métodos:

1.- Agua / 2-propanol.	5.- Metanol.
2.- 2-propanol.	6.- Acetona.
3.- Metanol / Ácido fórmico.	7. No especificado.
4.- Metanol / Agua (80:20).	_____

- **Otro método de extracción.** En caso de no encontrarse en el listado anterior, se introdujo manualmente.

En la **figura 24** se muestra una captura de pantalla del formulario de recogida de información de estas variables, para cada uno de los ensayos de CAT. Como se ha indicado anteriormente, para cada ensayo de CAT, se diseñó un formulario específico en el que se distinguió entre CAT libre, combinado y total y, para el ensayo ORAC, se distinguió entre ORAC hidrofílico y ORAC lipofílico.

**Figura 24.** Formulario Access de las variables de recogida de información relativas al ensayo de CAT del alimento. Ejemplo del formulario FRAP.

Una vez diseñado el formulario de recogida de información, se procedió a la grabación de los datos de las 203 publicaciones seleccionadas. Como resultado, se obtuvo un total de 1197 registros, distribuidos en grupos de alimentos de la siguiente forma:

- Verduras crudas y cocinadas (varios tipos de procesos culinarios): 419 registros (de las que crudas son 205 registros).
- Patatas y tubérculos: 1 registro.
- Frutas: 296 registros.
- Frutos secos y semillas: 19 registros.
- Legumbres: 54 registros.
- Lácteos y derivados: 7 registros.
- Cereales: 59 registros.
- Carnes y productos cárnicos: 6 registros.

- Pescados y mariscos: 2 registros.
- Grasas y aceites: 10 registros.
- Azúcares: 46 registros.
- Pastelería: 1 registro.
- Bebidas no alcohólicas: 145 registros.
- Bebidas alcohólicas: 56 registros.
- Condimentos/salsas: 68 registros.
- Misceláneas (como mojo picón, albahaca): 8 registros.

En la **figura 25** se muestra, en una captura de pantalla, una parte de los registros grabados.

FOOD	GRUPO_ALI	ALIMENTOS_GRUPO	G_ALIMENTI	G_ALIMENTO_EPIC2	PORCION_C	METODO_COCCIO	METODO_CONSEI
Artichoke	V	Alcachofa, cruda / Artichoke, frozen	E02 Vegetable	E0200 Vegetables n.s.	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Arugula	V	Rucula / Arugula	E02 Vegetable	E0201 Leafy vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Asparagus	V	Espárrago, verde / Asparagus, green	E02 Vegetable	E0208 Stalk vegetables, spro	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Avocado	F	Aguaate / Avocado	E04 Fruit	E040104 Stone fruits	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Beet	V	Remolacha, en conserva / beetroot	E02 Vegetable	E0203 Root vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Beetroot (red cooked)	V	Remolacha, en conserva / beetroot	E02 Vegetable	E0203 Root vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Broccoli	V	Brécol, crudo / Broccoli, raw	E02 Vegetable	E0204 Cabbages	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Cabbage (green)	V	Repollo / Cabbage	E02 Vegetable	E0204 Cabbages	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Cabbage (savoy)	V	Col rizada, cruda / Savoy cabbage, raw	E02 Vegetable	E0204 Cabbages	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Carrot	V	Zanahoria, cruda / Carrot, raw	E02 Vegetable	E0203 Root vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Cauliflower	V	Coliflor, congelada, cruda / Cauliflo	E02 Vegetable	E0204 Cabbages	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Celery	V	Apio, crudo / Celery, raw	E02 Vegetable	E0208 Stalk vegetables, spro	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Chicory	V	Achicoria, cruda / Chicory, raw	E02 Vegetable	E0201 Leafy vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Cucumber	V	Pepino / Cucumber	E02 Vegetable	E0202 Fruiting vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Eggplant	V	Berenjena / Aubergine	E02 Vegetable	E0202 Fruiting vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Endive	V	Endibia / Endive	E02 Vegetable	E0201 Leafy vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Fennel	M	Hinojo / Fennel	E15 Condimen	E1503 Spices, herbs and flav	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Green bean	V	Judía verde, congelada, cruda / Gre	E02 Vegetable	E0206 Grain and pod vegetat	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Leek	V	Puerro, crudo y congelado / Leek, raw	E02 Vegetable	E0208 Stalk vegetables, spro	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Lettuce (green)	V	Lechuga / Lettuce	E02 Vegetable	E0201 Leafy vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Mushroom	V	Seta / Mushroom	E02 Vegetable	E0205 Mushrooms	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Onion (yellow)	V	Cebolla / Onion	E02 Vegetable	E0207 Onion, garlic	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Pepper (chili)	V	Pimiento rojo, crudo / Red pepper	E02 Vegetable	E0202 Fruiting vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Pepper (red bell)	V	Pimiento rojo, crudo / Red pepper	E02 Vegetable	E0202 Fruiting vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c
Potato	V	Papa, cruda / Potato, raw	E02 Vegetable	E0202 Fruiting vegetables	98 No aplicabl	97 raw - crudo	01 fresh / fresco, c

Figura 25. Tabla de los registros grabados en el formulario Access.

### 4.9.1.3 Síntesis de la información recogida en el formulario

A partir de estas tablas, recogidas en la **figura 25**, se diseñaron otras tablas a través de consultas en Access en las que se recogió la información de relevancia relacionada con valores de CAT y Tp de los alimentos y unidades de expresión, considerando métodos, antioxidantes de referencia y factores que pueden condicionar el valor de la CAT y Tp como procesos culinarios y condiciones de conservación. A modo de ejemplo, se muestra a continuación, en las **tablas 4, 5 y 6**, la consulta de los grupos de frutas, zumos y frutos secos del método TEAC-ABTS, con la información más relevante.

**Tabla 4.** Frutas recogidas en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.

REF. <sup>1</sup>	id	ALIMENTO	MÉTODO DE CONSERVACIÓN <sup>2</sup>	TEAC-ABTS					
				VALOR TOTAL	SD TOTAL	UNIDADES <sup>3</sup>	MÉTODO ANALÍTICO <sup>4</sup>	AUTOR MÉTODO	SOLVENTES <sup>5</sup>
62 <sup>6</sup>	943	Mezcla Frutas	01	10,2	0,4	Otros	02	Re <i>et al.</i> 1999	Otros
75	768	Aguacate	01	1	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	769	Albaricoque	01	15	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	770	Arándano	01	187	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	779	Caqui	01	406	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	772	Cereza	01	80	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	773	Chirimoya	01	32	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	05
75	774	Ciruela Claudia	01	119	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	775	Frambuesa	01	90	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	776	Fresa	01	130	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	777	Granada	01	40	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	778	Grosella	01	41	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	771	Higo	01	4	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	05
75	780	Kiwi	01	35	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	781	Madroño	01	163	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	782	Manzana Golden	01	34	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	783	Manzana Granny Smith	01	34	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	785	Manzana Red Delicious	01	55	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	784	Manzana Renette	01	118	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	786	Melocotón	01	24	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	787	Membrillo	01	153	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	788	Mora	01	192	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	789	Níspero	01	26	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	790	Pera Blanquilla	01	3	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04

75	791	Pera Conferencia	01	9	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	792	Piña	01	33	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	793	Plátano	01	25	0	μmol TE/g	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	794	Uva blanca	01	15	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
75	795	Uva tinta	01	24	0	Otros	02	Rice-Evans & Miller, 1994	04
112	979	Cereza	01	50,03	1,32	mg eq AA/100g	02	Cano <i>et al.</i> 1998	Otros
138	1388	Melocotón con piel	01	170	0	mg eq. Trolox/100g	02	Díaz Mula <i>et al.</i> 2008	Otros
138	1387	Melocotón sin piel	01	38	0	mg eq. Trolox/100g	02	Díaz Mula <i>et al.</i> 2008	Otros
138	1390	Nectarina con piel	01	200	0	mg eq. Trolox/100g	02	Díaz Mula <i>et al.</i> 2008	Otros
138	1389	Nectarina sin piel	01	48	0	mg eq. Trolox/100g	02	Díaz Mula <i>et al.</i> 2008	Otros
150	1376	Uvas moscatel	01	4	0	Otros	Otros	Alonso, 2002	04
169	1422	Uvas blancas	01	20,5	0	Otros	02	Cano <i>et al.</i> 1998	Otros
169	1423	Uvas tintas	01	73,1	0	Otros	02	Cano <i>et al.</i> 1998	Otros
169	1424	Uvas tintas	01	43,1	0	Otros	02	Cano <i>et al.</i> 1998	Otros
177	1406	Ciruela amarilla sin piel	01	1000	0	mg TE/kg peso fresco	02	Arnao <i>et al.</i> 2001	Otros
177	1404	Ciruelas negras sin piel	01	1180	0	mg TE/kg peso fresco	02	Arnao <i>et al.</i> 2001	Otros

<sup>1</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado.

<sup>2</sup>01 = Fresco, crudo.

<sup>3</sup>Otros. Por ejemplo, μmol trolox equivalentes/g producto seco (porción comestible).

<sup>4</sup>02 = Espectrofotometría - Diode array spectrophotometer; Otros. Por ejemplo, método electroquímico en referencia 150.

<sup>5</sup>03 = Metanol/Fórmico; 04 = Metanol; Otros. Por ejemplo, tampón fosfato + etil-acetato en referencia 177 o 50 mM tampón fosfato en referencia 112.

<sup>6</sup>Referencia 50 (Saura-Calixto y Goñi, 2006) obtienen el valor de CAT para el ensayo TEAC-ABTS de una mezcla de frutas consumidas en la dieta española (naranja, mandarina, plátano, manzana, pera, melocotón, albaricoque, fresa, melón, sandía, ciruela, cereza, uva, kiwi, aceituna, granada, mango, piña, pomelo, caqui y chirimoya).

**Tabla 5.** Zumos recogidos en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.

REF. <sup>1</sup>	id	ALIMENTO	MÉTODO DE CONSERVACIÓN <sup>2</sup>	TEAC-ABTS					
				VALOR TOTAL	SD TOTAL	UNIDADES	MÉTODO ANALÍTICO <sup>3</sup>	OTRO MÉTODO	SOLVENTES <sup>4</sup>
34	1001	Naranja	N.A.	2494	34	μmol eq. Trolox/l	02	Re et al. 1999	Otros
44	1079	Granada	01	39,7	1,8	mmol TE/L	02	Re et al. 1999	04
52	1080	Uva, naranja y albaricoque	10	5756	185	μM Trolox	02	Re et al. 1999	Otros
62	958	Naranja natural	01	249	3,4	μmol trolox/g	02	Re et al. 1999	05
152	1427	Limón natural	01	74,7	3,1	mg TE/100 ml	02	Arnao et al. 2001	Otros
152	1426	Mandarina natural	01	77,1	3,2	mg TE/100 ml	02	Arnao et al. 2001	Otros
152	1425	Naranja natural	01	88,4	4,1	mg TE/100 ml	02	Arnao et al. 2001	Otros
173	1413	Limón natural	01	67,22	0	mg TE/100 ml	02	Cano et al. 1998	Otros
173	1415	Mandarina natural	01	70,91	0	mg TE/100 ml	02	Cano et al. 1998	Otros
173	1412	Naranja natural	01	86,36	0	mg TE/100 ml	02	Cano et al. 1998	Otros
173	1414	Uvas blancas natural	01	75,25	0	mg TE/100 ml	02	Cano et al. 1998	Otros
187	1394	Granada	10	28,73	1,97	mmol Trolox/L	02	Llorach et al. 2004	Otros
187	1393	Granada natural	01	30,22	1,1	mmol Trolox/L	02	Llorach et al. 2004	Otros
199	1392	Granada	01	23,78	4,88	mmol Trolox/L	02	Re et al. 1999	Otros

<sup>1</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado.

<sup>2</sup>01 = Fresco, crudo; 10 = Tratado (UHT, pasteurización, etc.). N.A. = No aplicable.

<sup>3</sup>02 = Espectrofotometría - Diode array spectrophotometer.

<sup>4</sup>04 = Metanol; 05 = Metanol/Agua (80:20); Otros. Por ejemplo, etil-acetato, n-hexano, diclorometano en referencia 34 o etil-acetato en referencia 152 o, como en el caso de las referencias 52, 173, 187 y 199, ningún solvente.

**Tabla 6.** Frutos secos recogidas en el formulario Access de valores publicados de CAT con el método TEAC-ABTS, según referencias.

REF. <sup>1</sup>	id	ALIMENTO	MÉTODO DE CONSERVACIÓN <sup>2</sup>	TEAC-ABTS					
				VALOR TOTAL	SD TOTAL	UNIDADES	MÉTODO ANALÍTICO <sup>3</sup>	OTRO MÉTODO	SOLVENTES <sup>4</sup>
50	1273	Almendra	01	25,9	1,1	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1277	Anacardo	01	13,1	0,6	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1271	Avellana	01	36,7	3,2	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1275	Cacahuete	01	13,7	2,7	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1270	Nuez	01	213,1	14,7	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1276	Piñón	01	7,4	0,4	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
50	1272	Pistacho	01	33,5	3,2	mmol Trolox/kg	02	Serpen <i>et al.</i> 2007	Otros
62 <sup>5</sup>	942	Mezcla Frutos Secos	01	33,6	0,8	µmol trolox/g	02	Re <i>et al.</i> 1999	Otros
72	1048	Nuez	01	153,8	16,2	µmol Trolox/g dm	02	Re <i>et al.</i> 1999	Otros
86	968	Mezcla frutos secos	01	33,6	0,8	µmol trolox/g	02	Re <i>et al.</i> 1999	05
120	1269	Nuez	01	165,18	19,3	µmol Trolox/g dm	02	Re <i>et al.</i> 1999	Otros

<sup>1</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado.

<sup>2</sup>01 = Fresco, crudo.

<sup>3</sup>02 = Espectrofotometría - Diode array spectrophotometer.

<sup>4</sup>05 = Metanol/Agua (80:20); Otros. Por ejemplo, metanol/agua + acetona/agua en las referencias 62, 72 y 120, o ninguno, como en la referencia 50.

<sup>5</sup>Referencia 50 (Saura-Calixto y Goñi, 2006) obtienen el valor de CAT para el ensayo TEAC-ABTS de una mezcla de frutos secos consumidos en la dieta española (almendra, cacahuete, nuez, avellana y pistacho).

#### 4.9.2. Otras bases de datos internacionales de CAT en alimentos

A) Pellegrini *et al.* (2003 y 2006) aportaron los datos de CAT de alimentos consumidos en Italia (frescos o comercializados) basados en los datos de consumo de alimentos del proyecto EPIC de la cohorte de la provincia de Varese. Las muestras fueron analizadas mediante los métodos FRAP, TRAP y TEAC-ABTS. El trabajo de Pellegrini *et al.* (2003) incluye los datos correspondientes a las verduras y hortalizas, frutas comerciales o silvestres, zumos de frutas, bebidas (alcohólicas y estimulantes) y aceites. La publicación de Pellegrini *et al.* (2006), incluye el resto de los alimentos de origen vegetal, especias, frutos secos, legumbres, cereales y derivados y dulces (chocolate, mermelada, miel y helados).

B) Carlsen *et al.* (2010) realizaron una base de datos con 3100 alimentos de origen animal y vegetal, procedentes de comercios locales y supermercados de Escandinavia, USA, Europa, África, Asia, y Sudamérica. Todos los alimentos fueron analizados mediante el método FRAP. Las tablas incluyen 24 categorías de alimentos incluyendo, además, suplementos dietéticos y vitaminas.

C) USDA (2007 y 2010) aportaron los datos de CAT de un gran número de alimentos de origen vegetal (frescos, congelados o procesados) mediante el método ORAC y los correspondientes Tp. USDA (2007) incluye la información correspondiente a 277 alimentos y USDA (2010), incorpora 49 nuevos alimentos lo que supone una base de datos de 326 alimentos comercializados en Estados Unidos. (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2010).

#### 4.9.3. Compilación de CAT-D

Con objeto de estimar la CAT-D en las poblaciones de estudio a partir de las bases de datos comentadas anteriormente, en primer lugar se procedió a la estandarización de los valores mediante la transformación de las unidades de expresión de cada uno de los ensayos de CAT, quedando éstas de la siguiente manera:  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco para los ensayos TEAC-ABTS, DPPH y ORAC;  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco y  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$  de producto fresco para el ensayo FRAP y,  $\text{mg GAE}/100\text{ g}$  de producto fresco para el ensayo Tp. El objetivo principal de esta transformación es adaptar las unidades a las que aparecen en las guías y tablas de composición de alimentos, en las cuales, los valores de los diferentes compuestos se expresan por cada 100 gramos de alimento de porción comestible.

En segundo lugar, la estimación de CAT-D se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Se han seleccionado los datos de CAT correspondientes a los ensayos ORAC, TRAP, FRAP y TEAC-ABTS y Tp (método FCR).

- Los alimentos de origen vegetal se han clasificado en 11 categorías (legumbres, frutas, zumos de frutas, frutos secos, verduras y hortalizas, aceites y grasas, bebidas estimulantes, bebidas refrescantes, bebidas alcohólicas, azúcares y la categoría denominada cereales y derivados).

- Los alimentos seleccionados de las diferentes tablas de CAT y Tp se corresponden con los reportados por las personas entrevistadas en las encuestas del R-24H y del CFCA para el estudio transversal I y, con los recogidos en la historia de dieta (EPIC Group of Spain, 2004) para el estudio transversal II.

- Los datos de CAT y Tp seleccionados corresponden en todos los casos a productos frescos o crudos. No se han considerado valores de CAT y Tp según procesado de los alimentos dado que esta información no se recogió en las encuestas de dieta.

- Se han seleccionado los datos de CAT y Tp de productos comerciales en los casos en los que los productos reportados por los entrevistados se correspondían con los registrados en la base de datos, o en los que los productos coincidían con los mismos ingredientes (ej. Zumos de frutas).

- Las tablas de Carlsen *et al.* (2010) y de USDA (2007 y 2010) reportan numerosos datos de CAT para algunos alimentos (pera Alcolina, pera Limonera...); en estos casos se ha realizado una media con aquellas variedades comúnmente consumidas en España.

- Para los alimentos cuyo dato de CAT o Tp no está disponible, se empleó el valor de un alimento similar o comparable (por ejemplo, para la acelga se optó por el valor promedio combinado entre las endivias, el puerro, el apio y las espinacas). Por otro lado, cuando existían varias posibilidades para un mismo alimento, se asignó el valor promedio de éstas (por ejemplo, para la manzana se determinó el valor promedio combinado entre las variedades Golden Delicious, Red Delicious y Granny Smith).

Asimismo, se han calculado los valores de CAT por diferentes grupos de alimentos: Frutas y zumos, vegetales, cereales, legumbres, frutos secos, bebidas alcohólicas, té, refrescos, grasas totales y dulces.

Es importante destacar que el café posee un gran valor de CAT debido a su alto contenido en fenoles totales, pero a su vez, presenta una baja biodisponibilidad debido a la alta concentración de productos de Maillard, los cuales inhiben la absorción de dichos fenoles totales (Olthof *et al.*, 2001). Por ello, para la estimación de los valores de CAT de la dieta se consideró, por un lado, la contribución de la CAT del café y, por otro lado, la CAT de la dieta sin tener en cuenta la contribución de la CAT del café.

Se compilaron 103 alimentos (el 75,7% del total de alimentos del CFCA), mientras que en la base de datos del R-24H, se han compilado un total de 80 alimentos (58,8% del total de

alimentos) (Carrión-García *et al.*, 2017). Considerando los valores de CAT publicados por Pellegrini *et al.* (2003 y 2006), completando con Carlsen *et al.* (2010) en los casos en los que la información no estaba disponible en la anterior (por ejemplo, granada, guisantes enlatados, judías pintas, etc.), en la base de datos del CFCA del estudio transversal I. En el caso del estudio transversal II (correspondiente a la muestra del estudio EPIC), se compilaron 210 alimentos y, cuando el dato para alguno de estos no estaba disponible, se asignó el valor del alimento más próximo comparable (Agudo *et al.*, 2007; Serafini *et al.*, 2012).

#### 4.10. Método para la determinación de CAT del café mediante el ensayo ORAC

Realizada la búsqueda bibliográfica pertinente y, comprobada la falta de datos para valores de CAT en el café mediante el método ORAC, realizamos dicho ensayo en tres tipos diferentes de café (café expreso, café descafeinado expreso y café soluble). Se prepararon tres soluciones de 100 ml de agua caliente con un contenido de 14 g de café (2 g en el caso del café soluble). A partir de éstas se preparó una placa de 96 pocillos en la que se añadieron 20 µl de las diferentes diluciones de café, que se mezclaron con 100 µl de fluoresceína 7 mM en tampón fosfato 75 mM pH 7,4 y 75 µl de AAPH 40 mM en tampón fosfato a 37°C. La ganancia fue determinada mediante un blanco de fluoresceína 7 mM en el lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG Labtech) a 37°C (**figura 7**). Finalmente, se empleó tampón fosfato 75 mM como blanco y diluciones de 25 µM a 200 µM de Trolox para la construcción de la recta patrón. Los valores de ORAC finales se calcularon según Ou *et al.* (2001) y se expresaron en µmol TE/100 ml. El análisis para cada tipo de café se realizó por triplicado, resultando un coeficiente de variación para las medidas del ensayo ORAC de 2,7%. Los valores de ORAC para cada tipo de muestra de café fueron: 21900 µmol TE/100 ml para el café descafeinado expreso, 20500 µmol TE/100 ml para el café expreso y 7120 µmol TE/100 ml para el café soluble.

#### 4.11. Compilación de los minerales y los carotenoides de la dieta

Con objeto de estimar los niveles de minerales y de carotenoides de la dieta se confeccionó una base de datos a partir de los valores publicados en bibliografía en las tablas de composición de alimentos del CESNID, las tablas de composición de alimentos de Mataix *et al.*, (2009) y la base de datos de carotenoides de Beltrán *et al.* (2012). En primer lugar, todos los valores se calcularon en función de las unidades estándar de dichas tablas de composición de alimentos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de porción comestible).

A partir de estos, en segundo lugar, se obtuvieron los valores totales de ingesta de minerales e ingesta de carotenoides siendo expresados en las unidades  $\text{mg}/\text{día}$  y/o  $\mu\text{g}/\text{día}$ , según el nutriente antioxidante.

La estimación de las cantidades se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Los alimentos seleccionados de las diferentes tablas de composición de alimentos se corresponden con los registrados por las personas entrevistadas en las encuestas del CFCA y del R-24H para el estudio transversal III y, con los recogidos en la historia de dieta (EPIC Group of Spain, 2004) para el estudio transversal II.

- Los datos de minerales y carotenoides seleccionados corresponden en todos los casos a productos frescos o crudos.

- Mediante el programa estadístico R Studio se diseñó una matriz de datos para, a partir de los valores de las tablas de composición de alimentos y la ingesta ( $\text{gramos}/\text{día}$ ) reportada por los individuos, estimar los valores de minerales y carotenoides de la dieta.

## 4.12. Análisis estadístico

### 4.12.1. Estudio de correlación entre CANE-P y CAT-D según bases de datos de CAT en alimentos

Se realizó un estudio de las correlaciones CAT-D estimadas con las diferentes bases de datos (formulario, Pellegrini *et al.* (2003 y 2006), Carlsen *et al.* (2010), y Ruiz *et al.* (2018)) y CANE-P. Este análisis se aplicó de manera exploratoria al grupo de las frutas (este grupo fue el más numeroso y disponía de información completa en estas bases de datos). Se realizaron correlaciones de Spearman, dada la distribución no-normal de las variables (prueba Shapiro-Wilk; valor  $p < 0,05$ ), entre la CANE-P y la CAT-D de las frutas estimada a partir de los datos de: i) formulario elaborado; ii) Pellegrini *et al.* (2003 y 2006), completando con Carlsen *et al.* (2010), para la ciruela amarilla, manzana Granny Smith sin piel, manzana Red Delicious sin piel, manzana Golden Delicious sin piel, granada, nectarina y pomelo (únicamente en el ensayo FRAP); iii) Ruiz *et al.* (2018). Estos análisis proporcionaron información sobre el coeficiente de correlación  $\rho$ , como medida de asociación o interdependencia entre las dos variables. El estadístico  $\rho$  viene dado por la expresión:

$$\rho = 1 - \frac{6 - \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

donde D es la diferencia entre los correspondientes valores ordenados de “x” – “y”, y N es el número de parejas de datos. Valores +1 y -1 indican asociaciones positivas y negativas, respectivamente. Se considera que la correlación es fuerte cuando  $\rho$  adopta valores entre  $\pm 1$  y  $\pm 0,8$ , moderada para valores entre  $\pm 0,7$  y  $\pm 0,6$ , moderadamente-débil entre  $\pm 0,5$  y  $\pm 0,3$ , y débil para valores entre  $\pm 0,2$  y  $\pm 0,1$ . Valores de cero y  $p\text{-valor} > 0,05$  son indicativos de ausencia de correlación.

### 4.12.2. Estudio transversal I: Relación entre CANE-P y CAT-D

Se han usado estadísticos descriptivos para variables categóricas (frecuencias y porcentajes) y para variables continuas (medias y desviación típica). Las diferencias entre sexos se analizaron usando el test de la t de Student o su equivalente no paramétrico (el test de Wilcoxon) para las variables continuas y el test de chi-cuadrado para las variables categóricas.

El test t para muestras independientes se basa en comprobar si existen diferencias significativas en las medias entre las muestras X1 y X2 (hipótesis nula,  $H_0$ =no existen diferencias), según la expresión:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{x1x2} \sqrt{\frac{2}{n}}}$$

donde  $S_{x1x2}$  es un estimador de la desviación estándar común de ambas muestras.

El test de la chi-cuadrado para la comparación de proporciones (frecuencias) entre dos grupos, los contrastes de hipótesis se basan en la comparación de las frecuencias observadas en la muestra con aquéllas que cabría esperar (frecuencias esperadas), según la expresión:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

Cuando lo observado y lo esperado se diferencian mucho, es decir, existe una diferencia significativa entre las frecuencias observadas y las esperadas, el valor del chi-cuadrado será mayor y se rechaza la  $H_0$ , aceptándose la alternativa ( $H_1$ ). Además, será más probable hallar significación estadística (*p*-valor más bajo).

El ajuste por energía de los factores dietéticos, incluyendo los valores de CAT-D, se realizó mediante el método residual como propone Willet *et al.* (1997), a través de la adición al modelo de los factores dietéticos y CAT-D (según método de CAT-D, con y sin la contribución de la CAT del café) ajustados por los residuales obtenidos en la regresión lineal entre la ingesta energética total y la ingesta dietética de CAT-D o de los factores dietéticos. En los modelos ajustados por ingesta de energía, por lo tanto, se consideraron tanto el factor dietético y CAT-D ajustado por energía total como la ingesta energética total. Este ajuste es conveniente teniendo en cuenta que altos niveles de ingesta de energía se relacionan con una alta CAT-D, e incluso con una baja capacidad antioxidante en el plasma (Prior *et al.*, 2007).

Las medias geométricas, ajustes por edad, sexo (para los análisis que combinaron hombres y mujeres) e ingesta de energía, se calcularon usando el modelo lineal generalizado (media = ordenada al origen). Concretamente, en el modelo lineal:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + e$$

donde  $\beta_0$  es el término constante, equivalente al valor de la media cuando  $Y=0$ .

En estos modelos, las variables con los valores de CAT-D y CANE-P fueron transformados a su logaritmo natural para aproximarlos a una distribución normal. Los coeficientes de correlación de Spearman entre los valores de CAT-D y CANE-P se calcularon para los ensayos de CANE-P y para los valores de CAT-D derivados del CFCA y del R-24H, tanto con la contribución de la CAT del café como sin la contribución de la CAT del café.

Además, los coeficientes de correlación parcial de Spearman, ajustados por edad, sexo (para los análisis que combinaron hombres y mujeres) e ingesta de energía, se emplearon para determinar estas correlaciones, bajo la influencia de estas variables. Los análisis de correlación se realizaron también en algunos subgrupos (por ejemplo, no fumadores, personas con peso normal y no consumidores de suplementos), si bien no fue posible aplicarlos en otros (como por ejemplo, fumadores y obesos), debido al pequeño tamaño de la muestra en los subgrupos.

Todos los análisis se realizaron mediante la versión 12.0 del programa estadístico STATA (Stata Corp., College Station, TX, USA). Se consideraron tests estadísticos bilaterales, y los *p-valores* < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

#### **4.12.3. Estudio transversal II: Relación entre CANE-P y CAT-D con biomarcadores de nutrientes antioxidantes y de inflamación**

Se han usado estadísticos descriptivos para variables categóricas (frecuencias y porcentajes) y para variables continuas (medianas y rango intercuartílico (IQR), es decir, percentiles 25 y 75, en el caso de variables de distribución no-normal, o bien, media y desviación estándar (SD), en el caso de variables de distribución normal). Las diferencias entre sexos y centros se analizaron usando el test de la *t* de Student o su equivalente no paramétrico (el test de Wilcoxon) para las variables continuas y el test de chi-cuadrado para las variables categóricas.

Para valorar la distribución de los datos relacionados con la dieta y los biomarcadores del plasma (variables continuas), se realizaron la prueba de Shapiro-Wilk, y se analizó la distribución en términos de asimetría (skewness) y curtosis (kurtosis). Como procedimientos gráficos se inspeccionó la distribución de estas variables mediante diagramas de cajas “boxplots” y gráficos cuantil-cuantil (Q-Q). Estas pruebas evidenciaron que un elevado número de variables no seguían una distribución normal, por lo que los valores de éstas se aproximaron a la distribución normal mediante una transformación logarítmica. Ésta es una

condición necesaria para la aplicación de modelos de regresión lineal, ya que, la mayoría de estas variables constituyeron la variable dependiente “y” en el modelo de regresión.

Para los valores por debajo del límite de detección se adoptó el valor del límite de detección, dividido por 2. En el caso de que más del 10% de los valores estuvieran por debajo de este límite, estos valores fueron eliminados, es decir, fueron considerados como valores faltantes.

Mediante el coeficiente de correlación de Spearman, *rho* (debido a la distribución no-normal de las variables), se exploró la dirección y la magnitud de la relación entre CANE-P y el resto de biomarcadores (nutrientes antioxidantes e inflamación) (figura 26).

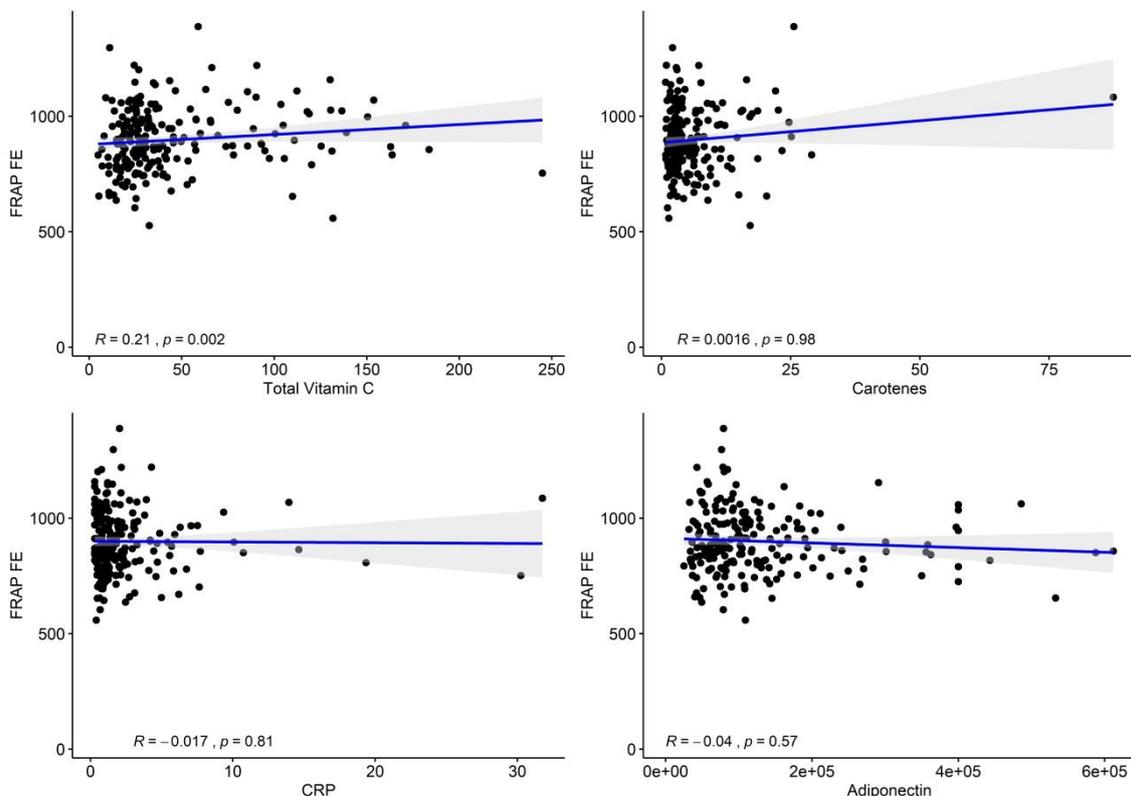


Figura 26. Ejemplo de diagrama de dispersión de datos que establece la relación entre la CANE-P y el resto de los biomarcadores.

De la misma manera, se exploraron las correlaciones con la CAT-D. Además, se creó un gráfico *heat map* (gráfico de calor) para visualizar las correlaciones entre todos los biomarcadores y la CANE-P o CAT-D.

Se construyeron modelos de regresión lineal multivariante para examinar la relación entre la CANE-P y los biomarcadores seleccionados (considerados las variables independientes “x”), utilizando su transformación log2 para estimar el efecto de un aumento por duplicidad de

cada uno de los biomarcadores sobre el valor de la CANE-P (variable dependiente “y”) en los diferentes modelos. Previamente, se comprobó que los residuos se distribuían normalmente con objeto de cumplir una de las asunciones del modelo de regresión lineal. Se verificó también la asunción de no-colinealidad entre las variables independientes. Así, en los modelos de regresión lineal se ha considerado según la siguiente expresión:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + e$$

donde Y = variable dependiente, explicada

X = variables independientes, explicativas

$\beta$  = parámetros que miden la influencia que las variables explicativas tienen sobre Y

Para detectar posibles asociaciones no lineales, se aplicaron polinomios fraccionales (paquete *mfp* en programa estadístico *R*). Para ello, se analiza, en el modelo, el ajuste de las variables con funciones polinómicas de diferente grado. De este modo, se verificó que todas las asociaciones eran lineales (potencia fraccionaria = 1).

Se consideraron dos modelos de regresión lineal para cada ensayo de CANE-P (las variables dependientes). En cada modelo, se ha estimado el coeficiente  $\beta_1$  y sus intervalos de confianza al 95%, así como el coeficiente de determinación  $R^2$ . Este coeficiente se interpreta como la proporción de la varianza de la variable dependiente que es explicada por las variables independientes. En el “modelo 1”, se controló por edad (variable continua en años), sexo (hombres, mujeres) y centro (Granada, Guipúzcoa). En el “modelo 2”, además de las variables anteriores, se controló por aquéllas que pueden afectar al potencial antioxidante del plasma, como son, el IMC (variable continua expresada en  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), nivel de actividad física (inactivo, moderadamente inactivo o activo y activo) y hábito tabáquico (no fumadores, exfumadores y fumadores). La ingesta energética total no tuvo influencia en estos modelos, por lo que no se consideró en el modelo. Estos mismos modelos de regresión se aplicaron para evaluar la asociación entre la CAT-D y los biomarcadores. En este último caso, para tener en cuenta la influencia de la ingesta de energía en la dieta, se consideró un “modelo 3” de regresión lineal multivariante, en el que, además de las variables de los “modelos 1 y 2”, se controló por ingesta de energía total (variable continua,  $\text{kcal}/\text{día}$ ).

Los coeficientes de correlación de Spearman se utilizaron para crear una estructura jerárquica, tipo agrupamiento aglomerativo no supervisado mediante el método *hierarchical clustering*. Previamente, se escalaron los valores de los biomarcadores para estandarizar su media como:

$x(\text{escalado}) = \frac{x(i) - \text{media}(x)}{SD(x)}$ , siendo SD la desviación estándar

De esta forma, las variables se pudieron organizar en grupos por semejanzas entre cada par de biomarcadores (paquete R *heatmap*), resultando agrupaciones homogéneas que, a su vez, fueron diferentes e independientes a otras agrupaciones. Más específicamente, se creó una jerarquía de grupos entre los valores de la CANE-P y los diferentes biomarcadores basada en una matriz de distancias (entre cada par de biomarcadores, dos a dos y, para cada uno de los sujetos) de tipo Manhattan (McLachlan, 1992):

$$d(x,y) = \sum_i |x_i - y_i|$$

Previamente, se exploraron también otras definiciones de distancias, como las de tipo Euclidean. Dadas las distribuciones de las variables, se consideró más conveniente la aplicación de distancias tipo Manhattan para establecer la matriz de distancias. Esta matriz de distancias determinó las medidas de similitud utilizadas por el algoritmo de agrupamiento jerárquico. Los dos grupos más “similares”, es decir, más cercanos en distancias, se fueron uniendo en cada paso de iteración por el algoritmo. En cada iteración, se recalcula una matriz de distancias y se repite el proceso, hasta agrupar todos los elementos.

De esta manera, los pares de biomarcadores más cercanos (máxima similitud) se unieron en clústeres (grupos). Para calcular la similitud entre dos grupos, se empleó el método de Ward, que estima una función de las distancias entre los pares de elementos (cuadrado de la distancia entre dos elementos en la matriz Manhattan). Así, en cada paso, el algoritmo encuentra el par de elementos que llevan al incremento mínimo del total de la varianza en el clúster generado. Los grupos unidos, minimizan la distancia máxima dentro del grupo. Este valor es, a su vez, la “altura” a la que los dos grupos se unieron, lo cual se muestra a través de un dendograma (**figura 27**), con la altura representada en el eje “y”. Cuanto menor es el valor del eje “y”, menor es la distancia entre los grupos y más fuerte es su relación.

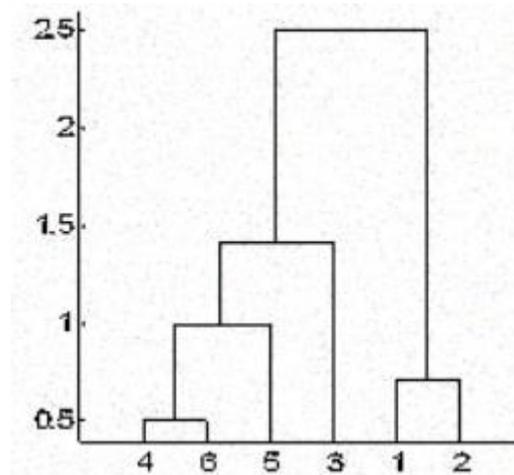


Figura 27. Ejemplo de agrupación de elementos en un dendograma.

Por ejemplo, los elementos 4 y 6 de la **figura 27** son los primeros que se combinan en un clúster o grupo, debido a que se encuentran más próximos (distancia más corta), seguido de los elementos 1 y 2, que conforman otro clúster. Los elementos 5 y 3 se unen posteriormente al primer clúster, finalizando así el algoritmo. El número de grupos a generar se puede predefinir a conveniencia del investigador, o bien, optimizarse a través del algoritmo, como se hizo en la presente Tesis Doctoral.

El dendograma se puede acompañar de la matriz de distancias (o correlaciones) en formato de *heatmap* (**figura 28**), donde se indican, con gradientes de colores, los valores de los elementos que se encuentran por encima o por debajo del valor medio (en este caso, los niveles medios de cada biomarcador).

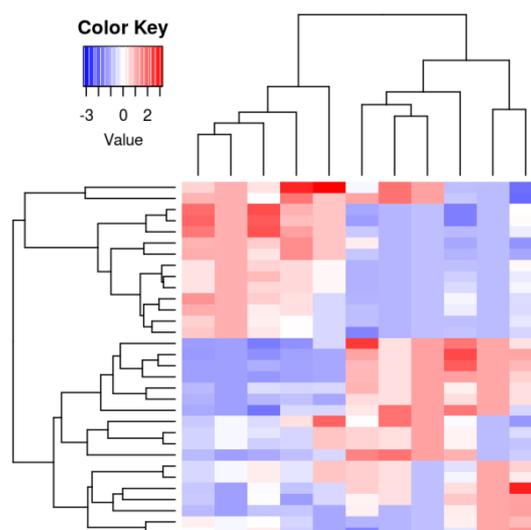
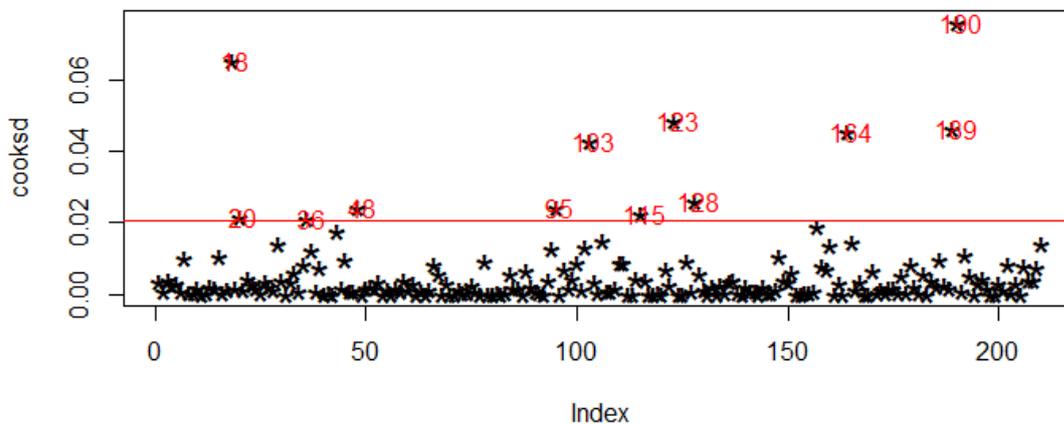


Figura 28. Ejemplo de dendograma con matriz de distancias (correlaciones).

En cada clúster/grupo se analizan características por covariables: sexo, edad, centro, IMC, nivel de actividad física y hábito tabáquico. Asimismo, de cada clúster se extrajeron los participantes contenidos en el mismo, para analizar sus características y las asociaciones entre la CANE-P y los biomarcadores.

También se evaluaron diferencias entre los estratos formados por covariables (sexo, centro, edad –menor y mayor a 65 años, nivel de actividad física –inactivo y moderadamente inactivo, activo y moderadamente activo, IMC, hábito tabáquico –no fumador, fumador y exfumador, índice de adherencia a la DM “rMED” –baja, medio y alto, y circunferencia de cintura –normal y obesidad abdominal), mediante análisis estratificados y de interacción. Para ello, en el modelo de regresión se introdujo el término “biomarcador\*covariable”, comparándose los modelos de regresión con y sin el término de interacción, a través de la prueba de razón de verosimilitudes conocida como *likelihood ratio test* (LRT). Dado que se evidenció una interacción por centro, se realizó un ajuste por centro en los modelos con efectos aleatorios por centro (paquete *lm4* en programa estadístico *R*). Se comprobó también la ausencia de interacción por tanda de los análisis de biomarcadores.

Como análisis de sensibilidad, para comprobar la robustez de los resultados, se evaluó la influencia de los valores extremos y puntos influyentes de los biomarcadores sobre los resultados obtenidos (**figura 29**). Estos puntos se identificaron en modelos multivariados a través de las distancias de Cook (Cook, 1977). Estas distancias se calculan a través del cambio que se produce en el modelo de regresión cuando se excluye cada uno de los puntos extremos.



**Figura 29.** Puntos influyentes para el ácido úrico en el modelo de regresión multivariante ajustado por edad, sexo y centro, según distancias de Cook (cooksd). Los puntos por encima de la línea roja son puntos influyentes del biomarcador ácido úrico en el modelo.

En los análisis de regresión multivariante de cada biomarcador se compararon los resultados obtenidos tras excluir estos puntos influyentes con respecto a los resultados obtenidos en todo el conjunto de datos. Para completar este análisis de sensibilidad, también se analizó la asociación entre los datos del ensayo FRAP sin la contribución del ácido úrico y los biomarcadores, para evaluar las asociaciones independientemente del efecto del ácido úrico. Y, con la misma finalidad, se analizó la asociación entre ORAC sin proteínas y los biomarcadores, para evaluar las asociaciones independientemente del efecto de las proteínas.

Todos los análisis se realizaron con la versión 12.0 del programa estadístico STATA (StataCorp, College Station, TX, USA) y la versión 3.5.1 del programa estadístico R. Los  $p$ -valores  $< 0,05$  (nivel de confianza del 95%) se consideraron estadísticamente significativos.

#### **4.12.4. Estudio transversal II y III: Otros componentes antioxidantes (minerales y carotenoides) relacionados con CANE-P y CAT-D**

Se han empleado estadísticos descriptivos para variables categóricas (frecuencias y porcentajes) y para variables continuas (medianas y rango intercuartílico (IQR), es decir, percentiles 25 y 75, en el caso de variables de distribución no-normal, o bien, media y desviación estándar (SD), en el caso de variables de distribución normal. Las diferencias entre sexos y centros se analizaron usando el test de la  $t$  de Student o su equivalente no paramétrico (el test de Wilcoxon) para las variables continuas y el test de chi-cuadrado para las variables categóricas.

En el estudio transversal III, de la puesta a punto de los métodos de determinación de minerales y carotenoides en las muestras de plasma, se estimó el coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (debido a la distribución no-normal de las variables) para evaluar la dirección y magnitud de la relación entre la ingesta dietética de minerales (Mn, Fe, Se, Cu, Zn) y los niveles plasmáticos de los mismos. De la misma manera, se evaluó la correlación entre la ingesta dietética de carotenoides ( $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína y licopeno) y sus niveles plasmáticos. No se exploraron estas correlaciones en el estudio EPIC (estudio transversal II) debido a que no se disponía de información de ingesta dietética de estos minerales y carotenoides.

En el estudio transversal II, se evaluaron los factores que afectan a variabilidad de los niveles de los carotenoides analizados a través de la estimación del coeficiente de determinación  $R^2$  en modelos de regresión lineal multivariantes. En estos modelos, se consideró como variable dependiente cada uno de los carotenoides (en escala logarítmica para aproximar la distribución normal) y como variables independientes los factores que podrían afectar a los niveles de carotenoides según (sexo, edad, centro, estación del año en que se reclutó al sujeto –recolección de datos de dieta, estilos de vida y muestra biológica, nivel de adherencia a la DM rMED, IMC, nivel de actividad física, ingesta de fibra y de aceite de oliva) (Al-Delaimy *et al.*, 2004 y Burrows *et al.*, 2017). Se comprobó también la ausencia de interacción por tanda de los análisis de biomarcadores. El coeficiente  $R^2$  consiste en la suma de cuadrados de una variable independiente dadas otras variables independientes en el modelo por la suma de cuadrados residual del modelo excluyendo la variable independiente en cuestión y multiplicando por 100 para obtener la expresión en porcentaje (Kleinbaum *et al.*, 1988). El coeficiente de determinación  $R^2$  para estos modelos de regresión multivariante fue calculado dividiendo la suma total de cuadrados no corregidos por la suma total de cuadrados corregida del modelo. Mediante gráficos radiales se exploraron las diferencias en los niveles de carotenoides según las covariables mencionadas anteriormente. Asimismo, se exploraron posibles grupos/clústeres de biomarcadores (por ejemplo, según tanda de análisis u otras características) mediante análisis de componentes principales (paquete *R* factoextra) en gráficos de tipo biplot.

En las determinaciones de carotenoides en plasma se decidió descartar los valores de una tanda de análisis debido a que los niveles de carotenoides medidos fueron implausibles. El número de medidas de carotenoides que se conservaron fue de 170. Además, se encontró que un elevado número de muestras presentaban valores por debajo del límite de detección de algún carotenoide. En este caso, se desecharon los valores de carotenoides cuando más del 40% de las muestras presentaban este valor del límite de detección. Para recuperar los valores faltantes de carotenoides en el análisis estadístico, manteniendo así el tamaño de la muestra, se empleó el método de imputación múltiple de datos “MICE” (Rubin, 1987; Little y Rubin, 1987), conocido como *multivariate imputation by chained equations*, implementado en el paquete *R* mice. Como se describe en el apartado de resultados, se asumió que la distribución de datos faltantes siguió un patrón aleatorio (missing at random – MAR), tras comprobar que algunas variables se asociaron a la presencia de datos faltantes en el carotenoide (variable Y: 0 = dato completo, 1 = dato faltante). Se imputaron los datos faltantes de todos los carotenoides, excepto del  $\alpha$ -caroteno debido a que la proporción de datos faltantes fue

excesivamente elevada (>90%). A pesar de que la proporción de datos faltantes fue considerable en  $\beta$ -caroteno y licopeno (>40%), se consideró viable la imputación de estos datos (Madlye-Dowed *et al.*, 2019). El modelo de imputación (regresión mediante imputación) elegido fue el de la regresión lineal (método pmm, predictive mean matching, en paquete mice). Este método consiste en que las observaciones completas son utilizadas en un modelo de regresión donde la variable incompleta es la dependiente y las variables explicativas son algunas de variables completas. En el modelo de imputación se consideraron los carotenoides y otras variables explicativas (sexo, centro, edad, hábito tabáquico, IMC, nivel de actividad física, estación del año, tanda, CAT-D y CANE-P, ingesta dietética de nutrientes antioxidantes, etc.) y un total de 10 iteraciones. El proceso de imputación se puede resumir en los siguientes pasos que tienen lugar en cada iteración:

- 1) Imputación simple (temporal) basada en la media para los valores incompletos de una variable
- 2) Se restablecen los valores faltantes de la variable previamente imputada
- 3) Los valores observados de la variable provenientes del paso anterior se introducen en el modelo de regresión (variable dependiente) con las otras variables explicativas. En nuestro caso, se empleó un modelo de regresión lineal
- 4) Los valores faltantes de la variable son reemplazados por los valores predichos (valores imputados) del modelo de regresión. Estos valores imputados serán considerados en la imputación de otras variables, considerándose esta variable imputada como variable explicativa en el modelo.
- 5) Los pasos 2 a 4 se repiten para cada variable con datos faltantes, siendo estas repeticiones las iteraciones o ciclos de imputación.

Una vez finalizada la imputación, se obtienen una serie de conjuntos de datos imputados. Se establecieron 5 conjuntos de datos imputados. Las estimaciones de cada set de imputación se combinaron mediante la función “pool”, basada en las reglas de Rubin (Rubin, 1987) y siguiendo las bases de la imputación MICE. Esta función se aplicó en los modelos de regresión lineal empleados para estimar el coeficiente  $R^2$ . Para la visualización de los datos faltante, antes y después de la imputación se emplearon los paquetes *R* VIM y lattice. Ambos, permiten visualizar el patrón de datos faltantes y la distribución de los valores observados e imputados en cada conjunto de datos imputado.

Con objeto de definir una firma de marcadores con capacidad predictiva de un alto estado de CANE-P y/o CAT-D en el estudio transversal II, se dicotomizaron los niveles de CANE-

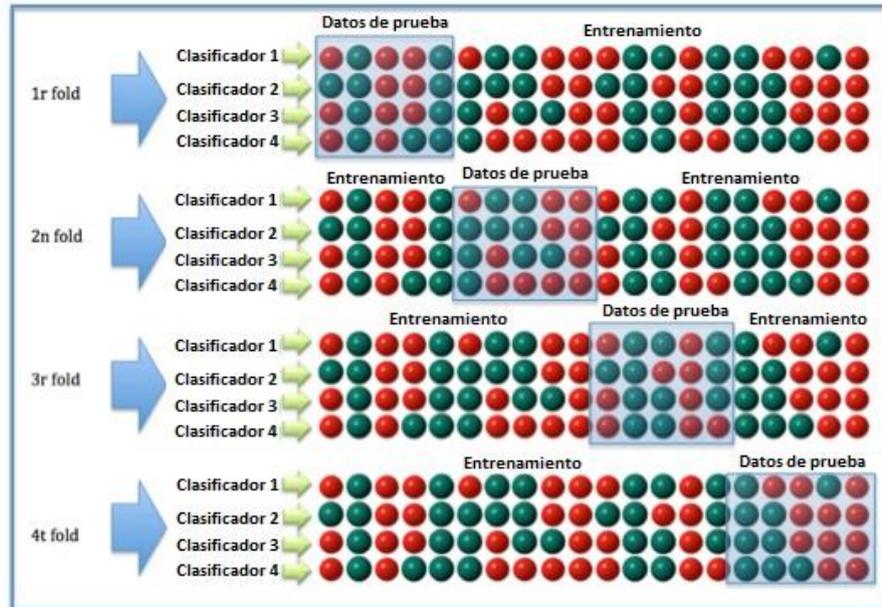
P y CAT-D en altos niveles (por encima del tercer tercil) con respecto a niveles medios y bajos (terciles segundo y primero) como categoría de referencia. Para la selección de las variables de la firma (marcadores) se empleó el método LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*), como método de regresión logística penalizada (paquete R *glmnet*). Este método de regresión ayuda a controlar el sobreajuste debido a la consideración de un gran número de variables predictoras (explicativas) en el modelo introduciendo restricciones al tamaño de los coeficientes estimados  $\beta = (\beta_1, \dots, \beta_p)$ , de forma que estos son contraídos hacia cero en función de un parámetro de restricción (Tibshirani, 1996). Así, siendo  $\beta$  el vector de coeficientes, el método LASSO lo estima minimizando el siguiente problema de mínimos cuadrados penalizados:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \mathbf{x}'_i \beta)^2 + \lambda \sum_{j=1}^p |\beta_j|$$

, donde  $\lambda$  se refiere al parámetro de penalización

El parámetro de penalización elegido fue de 0,2 y 0,5. El método LASSO se empleó en un contexto de validación cruzada (*cross-validation*), que consiste en dividir los datos disponibles en  $K$  submuestras ( $N=5$ ; *five-fold*), de forma que se utilizan  $K-1$  submuestras para ajustar el modelo (*training set*) y la restante para la evaluación del mismo. Este proceso se repitió 50 veces ( $N$  iteraciones = 50). Esta técnica permite reducir el sobreajuste, problema recurrente que indica que el modelo se ajusta muy bien a nuestros datos pero predice mal nuevos conjuntos de datos. No obstante, no fue posible realizar un estudio de validación externa en el estudio transversal III debido a que no se pudo estimar la CANE-P en los sujetos de esta población de estudio. Finalmente, se analizó la capacidad discriminativa de la firma de marcadores de nutrientes antioxidantes, biomarcadores y variables de los estilos de vida ( $N$  variables > 80) a través del estimador del AUC (área bajo la curva), la sensibilidad y especificidad. En nuestro caso, el AUC estima la probabilidad de discriminar adecuadamente entre valores altos y medio-bajos de CANE-P y CAT-D, mientras que la sensibilidad y especificidad hacen referencia a la proporción de sujetos correctamente clasificados en el grupo de alta y baja-media CANE-P y/o CAT-D, respectivamente. Para la selección de variables de la firma con LASSO se evaluó la capacidad predictiva de las 5 (clasificador 1), 10 (clasificador 2), 15 (clasificador 3) y 20 (clasificador 4) variables predictoras más seleccionadas por el algoritmo. En la **figura 30** se ilustra el procedimiento de la validación cruzada, similar al que se ha empleado. Se seleccionó el modelo de variables que dieron el AUC más elevado ( $AUC > 0,8$ , valor considerado como bueno-aceptable). Con este modelo y los parámetros del AUC se

obtuvieron las curvas ROC (*receiver operating curve*, paquete *R* *ROCR*), que representan la sensibilidad de la firma frente al valor que se obtiene al restarle la especificidad a la unidad (1-especificidad).



**Figura 30:** Ilustración de la técnica de cross-validation (validación cruzada) para un conjunto de 20 datos, donde se llevan a cabo cuatro validaciones (four-fold), utilizando unos datos de entrenamiento diferentes, que serán analizadas por cuatro clasificadores, que posteriormente evaluarán los datos de prueba. En nuestro caso, se emplearon 5 validaciones cruzadas (five-fold) en las 210 observaciones, evaluándose también cuatro clasificadores.

Se muestran ejemplos de los códigos empleados en el análisis estadístico de los datos en el **Anexo 2**.

# RESULTADOS

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Información en el formulario de CAT en alimentos

Se decidió explorar en primer lugar los datos de las frutas para la compilación de la CAT-D a través del formulario para las diferentes poblaciones de estudio, ya que, como se describe en Pellegrini *et al.* (2018), el grupo de alimentos de las frutas es uno de los que más porcentaje de CAT aporta al total de la CAT-D, tras el café o las bebidas alcohólicas; estos últimos grupos de alimentos fueron consumidos en un bajo porcentaje en los individuos del estudio I. Este grupo fue además el que contó con el mayor número de registros en el formulario.

La búsqueda bibliográfica sobre publicaciones de CAT y Tp en alimentos consumidos en España, dio lugar a un total de 203 trabajos, de los cuales 15 (**anexo 1**) son para el grupo de las frutas. A continuación, la **tabla 7** recoge, de manera simplificada, la información de la que se dispone para el grupo de las frutas.

**Tabla 7.** Artículos publicados sobre CAT y Tp en frutas, cultivadas o comercializadas en España, según ensayo de CAT.

Frutas	ABTS	FRAP	TRAP	ORAC	DPPH	TP	Referencias <sup>1</sup>
Aguacate	x				x	x	75, 28, 109
Albaricoque	x						75
Arándano	x						75
Caqui	x						75
Carambola					x	x	28
Cereza	x				x	x	75, 112, 28
Chayote					x	x	28
Chirimoya	x						75
Ciruela amarilla	x					x	177
Ciruela roja	x				x	x	177, 75, 28
Frambuesa	x						75
Fresa	x	x			x	x	75, 91
Granada	x				x		75, 88
Grosella roja	x						75
Higo	x						75
Kiwi	x				x	x	75,28
Madroño	x						75
Mango					x	x	28
Manzana	x		x				75, 203
Membrillo	x						75
Melocotón	x		x		x	x	75, 28, 203, 138
Naranja					x	x	28, 142
Nectarina	x				x	x	28, 138
Níspero	x						75
Papaya					x	x	28
Paraguaya					x	x	28
Pera	x	x				x	75, 203
Piña	x						75
Plátano	x						75
Sandía					x	x	159
Tamarillo					x	x	28
Uva blanca	x					x	75, 150, 169
Uva roja o negra	x	x				x	75, 72, 150, 169
Mezcla de frutas	x	x				x	62

<sup>1</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

A partir de la información mostrada en esta tabla, se realizó un exhaustivo trabajo de exclusión de aquellos artículos que no tenían una información de utilidad, considerando los criterios descritos con anterioridad en el apartado 4.9.1.1. De esta manera, a continuación, se muestran en diferentes tablas, según el ensayo de CAT (TEAC-ABTS, DPPH, FRAP y ORAC) y contenido en Tp, los datos seleccionados como útiles (**tablas 8, 9, 10, 11 y 12**). En cada tabla, se hace alusión a la referencia de la que procede la información de la fruta, así como los valores con las unidades originales del artículo y la transformación que se realizó a las unidades con las que, posteriormente, se trabajó en la compilación de la CAT-D de la población del estudio transversal I (piloto). Asimismo, se comentan los aspectos más relevantes que se pueden observar en las diferentes tablas:

## A) Valores de CAT para frutas analizadas con ensayo TEAC-ABTS:

### Métodos analíticos aplicados.

En España, el **TEAC-ABTS** es el ensayo más empleado para la determinación de CAT de los alimentos, como puede observarse en la **tabla 8**, encontrando un total de 32 frutas (algunas de ellas con distintas variedades) en 9 artículos diferentes. El método analítico desarrollado ha variado en estos artículos entre: Rice-Evans y Miller (1994); Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan y Milner (1993) según describen Laporta, Pérez-Fons, Mallavia, Caturla y Micol (2007) (Laporta *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 1993); Re *et al.* (1999); Laporta *et al.* (2007); y Oboh y Ademosun (2012).

### Disolventes de extracción empleados.

Como disolventes de extracción destacan el metanol frío, evaporado y reconstituido con agua de la referencia 75 (García Alonso *et al.*, 2004) y la extracción con metanol o la disolución de metanol-agua del resto de referencias. El tipo de solvente puede afectar la transferencia de electrones y la transferencia de átomos de hidrógeno, lo cual es el aspecto clave en la medida de capacidad antioxidante (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006). Además, los extractos orgánicos acuosos no sólo pueden contener antioxidantes, sino que también, otros compuestos de los alimentos no antioxidantes que pueden interferir en los ensayos de capacidad antioxidante.

### Variabilidad en cuanto a valores y unidades de expresión.

Otro dato a destacar en esta **tabla 8** es la variabilidad encontrada entre estudios en cuanto a valores (tanto para una misma fruta como para variedades dentro de una misma fruta) y unidades de expresión de estos (como por ejemplo:  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ;  $\text{mmol TE}/100 \text{ g DW}$ ;  $\text{mmol TE}/\text{kg FW}$ ;  $\mu\text{M TE/g DW}$ ;  $\text{mmol TE}/100 \text{ g FW}$ ;  $\text{mM TE}/100 \text{ g FW}$ ).

Para poder disponer de una serie de datos de utilidad y que puedan ser comparables, en la **tabla 8** se ha incluido una columna en la que, las unidades empleadas por cada autor en su estudio, se han transformado a  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco, ya que es la unidad empleada por guías y tablas de composición de alimentos. Así, destaca el aguacate que, una vez transformadas las unidades y valores originales del estudio correspondiente, se observa cómo la CAT de esta fruta varía entre 21 y 463  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco.

No sólo se aprecia esta variabilidad entre distintos autores que analizan una misma fruta, sino que también, se encontraron artículos que analizan distintas variedades de una misma fruta, obteniendo valores distintos según sea la variedad de ésta. En este sentido, en la **tabla 8**, la azofoifa presenta unos valores de CAT comprendidos entre 5247 y 10421  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco para cuatro variedades diferentes. Finalmente, resaltan el níspero y la sandía por su bajo contenido en CAT para este ensayo, ambas con 54  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco y, la azofoifa, por su altísimo contenido en CAT para este mismo ensayo, 10421  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco.

*Observaciones relativas a algunas referencias.*

Por otro lado, los valores correspondientes a las frutas del artículo de la referencia 204 (Morales-Soto *et al.*, 2014) se corresponden a valores medios tras la realización de análisis de muestras de dichas frutas recogidas en distintas épocas del año. Esta característica de la época del año, así como el momento de maduración del fruto, el origen y las variedades, son aspectos que influyen en el contenido de CAT de las distintas frutas.

El artículo cuya referencia es el número 217 (Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017) analiza 20 variedades diferentes de granada, pero sólo 4 de ellas son comercializadas en la provincia de Alicante. Por este motivo, en la **tabla 8** sólo aparecen los valores correspondientes a estas variedades.

Finalmente, Saura-Calixto y Goñi (2006), en la referencia 62, obtienen el valor de CAT para el ensayo TEAC-ABTS de una mezcla de frutas consumidas en la dieta española, donde se incluyen: Naranja, mandarina, plátano, manzana, pera, melocotón, albaricoque, fresa, melón, sandía, ciruela, cereza, uva, kiwi, aceituna, granada, mango, piña, pomelo, caqui y chirimoya.

**Tabla 8.** Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo TEAC-ABTS comercializadas en España con estandarización de unidades.

REF. <sup>a</sup>	FRUTAS	TEAC-ABTS (Unidades artículo original)	TEAC-ABTS (Unidades Transformadas en $\mu\text{mol TE}/100\text{g FW}^*$ )
75 <sup>1</sup>	Aguacate	1 $\mu\text{mol TE/g DW}^*$	21
75 <sup>1</sup>	Albaricoque	13 $\mu\text{mol TE/g DW}$	165
75 <sup>1</sup>	Arándano	187 $\mu\text{mol TE/g DW}$	3179
75 <sup>1</sup>	Caqui	407 $\mu\text{mol TE/g DW}$	8140
75 <sup>1</sup>	Cereza	83 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1560
75 <sup>1</sup>	Chirimoya	33 $\mu\text{mol TE/g DW}$	825
75 <sup>1</sup>	Ciruela Claudia	117 $\mu\text{mol TE/g DW}$	2059
75 <sup>1</sup>	Frambuesa	87 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1392
75 <sup>1</sup>	Fresa	130 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1261
75 <sup>1</sup>	Fresa silvestre	163 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1581
75 <sup>1</sup>	Granada	40 $\mu\text{mol TE/g DW}$	792
75 <sup>1</sup>	Grosella	43 $\mu\text{mol TE/g DW}$	740
75 <sup>1</sup>	Higo	4 $\mu\text{mol TE/g DW}$	58
75 <sup>1</sup>	Kiwi	40 $\mu\text{mol TE/g DW}$	608
75 <sup>1</sup>	Manzana: Var. Golden	37 $\mu\text{mol TE/g DW}$	607
	Var. Granny Smith	37 $\mu\text{mol TE/g DW}$	607
	Var. Reinetta	117 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1919
	Var. Red Delicious	70 $\mu\text{mol TE/g DW}$	1148
75 <sup>1</sup>	Melocotón	20 $\mu\text{mol TE/g DW}$	260
75 <sup>1</sup>	Membrillo	153 $\mu\text{mol TE/g DW}$	2417
75 <sup>1</sup>	Mora	193 $\mu\text{mol TE/g DW}$	2895
75 <sup>1</sup>	Níspero	33 $\mu\text{mol TE/g DW}$	462
75 <sup>1</sup>	Pera Blanquilla	3 $\mu\text{mol TE/g DW}$	47
75 <sup>1</sup>	Pera conferencia	10 $\mu\text{mol TE/g DW}$	158
75 <sup>1</sup>	Piña	37 $\mu\text{mol TE/g DW}$	651
75 <sup>1</sup>	Plátano	23 $\mu\text{mol TE/g DW}$	598
75 <sup>1</sup>	Uva blanca	17 $\mu\text{mol TE/g DW}$	335
75 <sup>1</sup>	Uva tinta	20 $\mu\text{mol/g DW}$	386
204 <sup>2</sup>	Aguacate: Var. Lamb-Hass	1,860 mmol TE/100g DW	391
	Var. Bacon	2,206 mmol TE/100g DW	463
204 <sup>2</sup>	Caqui	0,457 mmol TE/100g DW	87
204 <sup>2</sup>	Chirimoya	2,285 mmol TE/100g DW	571
204 <sup>2</sup>	Granada	5,021 mmol TE/100g DW	854
204 <sup>2</sup>	Limón: Var. Fino	4,838 mmol TE/100g DW	532
	Var. Primafiori	4,694 mmol TE/100g DW	516
204 <sup>2</sup>	Mango	3,714 mmol TE/100g DW	557
204 <sup>2</sup>	Melón: Var. Cantaloupe	1,629 mmol TE/100g DW	104
	Var. Galia	1,263 mmol TE/100g DW	126
	Var. Sapo	1,030 mmol TE/100g DW	82
204 <sup>2</sup>	Membrillo	0,733 mmol TE/100g DW	110
204 <sup>2</sup>	Níspero	0,430 mmol TE/100g DW	54
204 <sup>2</sup>	Sandía	0,674 mmol TE/100g DW	54
204 <sup>2</sup>	Uva tinta	4,058 mmol TE/100g DW	649
216 <sup>3</sup>	Azofaifa: Var. Grande de Albaterra	23,85 mmol TE/100g DW	5247
	Var. MSI	47,37 mmol TE/100g DW	10421
	Var. PSI	44,29 mmol TE/100g DW	9744
	Var. Dátil	34,74 mmol TE/100g DW	7643

217 <sup>3</sup>	Granada:		
	Var. MEM (dulce)	4,06 mmol TE/Kg FW	406
	Var. MEC (dulce)	4,24 mmol TE/Kg FW	424
	Var. WOND (ácida)	3,84 mmol TE/Kg FW	384
218 <sup>4</sup>	Var. SM (ácida)	2,89 mmol TE/Kg FW	289
	Mango:		
	Var. Keitt	61,4 µM TE/g DW	921
	Var. Osteen	59,2 µM TE/g DW	888
221 <sup>3</sup>	Var. Sensación	102,3 µM TE/g DW	1535
	Pomelo	1,99 mM TE/100g FW	1990
227 <sup>3</sup>	Manzana Golden Delicious	33,92 µmol TE/g DW	441
228 <sup>5</sup>	Lima	6,14 mmol TE/100g DW	614
	Limón	9,00 mmol TE/100g DW	990
	Mandarina	6,47 mmol TE/100g DW	1100
	Naranja	4,83 mmol TE/100g DW	580
	Pomelo	8,69 mmol TE/100g DW	695
62 <sup>6</sup>	MEDIA DE FRUTAS DE LA DIETA ESPAÑOLA	10,2 µmol TE/g DW	204

\*DW: Peso seco; FW: Peso fresco.

<sup>a</sup> Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

<sup>1</sup> Método: Rice-Evans y Miller (1994). Disolventes de Extracción: Metanol frío, evaporado y reconstituido con agua.

<sup>2</sup> Método: Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan y Milner (1993) según describen Laporta, Pérez-Fons, Mallavia, Caturla y Micol (2007) (Laporta *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 1993). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>3</sup> Método: Re *et al.* (1999). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (80:20) 1% HCl.

<sup>4</sup> Método: Laporta *et al.* (2007). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>5</sup> Método: Oboh y Ademosun (2012). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (70:30).

<sup>6</sup> Método: Re *et al.* (1999). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (50:50) y Acetona/Agua (70:30).

## B) Valores de CAT para frutas analizadas con ensayo DPPH:

### Métodos analíticos empleados.

El **DPPH** es un ensayo poco utilizado para la determinación de CAT de los alimentos en España. Como puede observarse en la **tabla 9** sólo se han encontrado 5 estudios y valores para 13 frutas. El método analítico seguido en dos de los artículos seleccionados es el de Brand-Williams *et al.* (1995), mientras que el empleado en los otros tres artículos es el de Llorach *et al.* (2008), Bondet *et al.* (1997) y Huang *et al.* (2005).

### Disolventes de extracción empleados.

Como disolventes de extracción se han empleado metanol/agua (80:20) al 1% HCl en la referencia 217 (Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017), metanol en la referencia 221 (García-Martínez *et al.*, 2018) y metanol/agua (80:20) y (70:30) en las referencias 227 (Fernández-Jalao *et al.*, 2019) y 228 (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014), respectivamente. Los diferentes disolventes empleados en este ensayo presentan la misma problemática que la comentada anteriormente para el ensayo TEAC-ABTS.

### Variabilidad en cuanto a valores y unidades de expresión.

Otro dato a destacar en esta **tabla 9** es, también, la variabilidad encontrada entre estudios para el ensayo DPPH en cuanto a valores (tanto para una misma fruta como para variedades dentro de una misma fruta) y unidades de expresión de estos (como por ejemplo: mmol TE/kg FW; mg TE/g DW, mM TE/100 g DW;  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ; mmol TE/100 g DW;), a pesar de disponer únicamente de 13 frutas diferentes analizadas a través de este ensayo de CAT. Para poder disponer de una serie de datos de utilidad y que puedan ser comparables, en la **tabla 9** se ha incluido una columna en la que, las unidades empleadas por cada autor en su estudio, se han transformado a  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco, como ya se ha hecho referencia para el ensayo TEAC-ABTS. Así, se observa que el pomelo, una vez transformadas las unidades y valores originales del estudio correspondiente, presenta una CAT que varía entre 214 y 422  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco.

No sólo se aprecia esta variabilidad entre distintos autores que analizan una misma fruta, sino que también, hay artículos que analizan distintas variedades de una misma fruta, obteniendo valores distintos según sea la variabilidad de ésta. En este sentido, en la **tabla 9** se puede ver cómo la granada presenta unos valores de CAT comprendidos entre 641 y 753  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco para cuatro variedades diferentes, dos de ellas ácidas y otras dos dulces. La fruta con menor CAT es la naranja con 185  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco y la fruta con mayor CAT es nectarina con 8788  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco.

### Observaciones relativas a algunas referencias.

Las observaciones referentes a la referencia 217 (Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017), ya se han comentado anteriormente en el ensayo TEAC-ABTS.

Por otro lado, existe otro artículo (Morillas-Ruiz *et al.*, 2012), no mostrado en la **tabla 9**, el cual analiza 13 frutas mediante el ensayo DPPH, pero los valores originales se muestran en el trabajo, principalmente, en forma de gráfica y, las unidades en que se expresan los resultados (mmol TE/g) no coinciden con las utilizadas ( $\mu\text{mol TE/100 g}$ ) en el estudio de análisis de CAT en frutas realizado por este grupo de investigación (Ruiz *et al.*, 2018). Además, si estos valores expresados en mmol TE/g, se transformaran a  $\mu\text{mol TE/100 g}$ , resultarían ser miles de veces mayores a los rangos en los que se mueven los datos para este ensayo. Este error detectado, se confirma también con los datos aportados en el artículo de Shaheen *et al.* (2016), que es un estudio de revisión de evaluación de la potencialidad funcional de una

selección de alimentos comúnmente consumidos en Bangladesh y en el que encontramos información de diversas frutas analizadas por el ensayo DPPH.

**Tabla 9.** Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo DPPH comercializadas en España con estandarización de unidades.

REF. <sup>a</sup>	FRUTAS	DPPH (Unidades artículo original)	DPPH (Unidades Transformadas en μmol TE/100 g FW*)
217 <sup>1</sup>	Granada:		
	Var. MEM (dulce)	7,53 mmol TE/kg FW	753
	Var. MEC (dulce)	6,77 mmol TE/kg FW	677
	Var. WOND (ácida)	6,41 mmol TE/kg FW	641
	Var. SM (ácida)	6,90 mmol TE/kg FW	690
220 <sup>2</sup>	Albaricoque	31,93 mg TE/g DW*	1531
	Cereza	18,83 mg TE/g DW	1128
	Ciruela	63,13 mg TE/g DW	2522
	Melocotón Royal Glory	22,72 mg TE/g DW	908
	Nectarina	133,30 mg TE/g DW	8788
	Paraguayaya	80,44 mg TE/g DW	3375
221 <sup>3</sup>	Pomelo	2,14 mM TE/100g DW	214
227 <sup>4</sup>	Manzana var. Golden Delicious	24,56 μmol TE/g DW	319
228 <sup>5</sup>	Lima	2,53 mmol TE/100g DW	253
	Limón	3,92 mmol TE/100g DW	510
	Mandarina	2,50 mmol TE/100g DW	425
	Naranja	1,54 mmol TE/100g DW	185
	Pomelo	4,22 mmol TE/100g DW	422

\*DW: Peso seco; FW: Peso fresco.

<sup>a</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

<sup>1</sup>Método: Brand-Williams *et al.* (1995). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20) 1% HCl.

<sup>2</sup>Método: Llorach *et al.* (2008). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>3</sup>Método: Bondet *et al.* (1997). Disolventes de extracción: Metanol.

<sup>4</sup>Método: Brand-Williams *et al.* (1995). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>5</sup>Método: Huang *et al.* (2005). Metanol/Agua (70:30).

### C) Valores de CAT para frutas analizadas con ensayo FRAP:

#### Métodos analíticos empleados.

En la **tabla 10** se observa el número de frutas encontradas en bibliografía con valores útiles para el ensayo **FRAP**, 26 (algunas de ellas cuentan, además, con distintas variedades), en un total de 9 artículos distintos. El método analítico empleado ha variado entre: Benzie y Strain (1996); Benzie y Strain (1999); Al-Duais *et al.* (2009); y Thaipong *et al.* (2006).

#### Disolventes de extracción empleados.

Como disolventes de extracción, se han utilizado metanol/agua (50:50) y HCl en la referencia 91 (Jiménez-Escrig, 2007), metanol en las referencias 205 (Halvorsen *et al.*, 2002) y 221 (García-Martínez *et al.*, 2018), metanol/agua (80:20) en las referencias 204 (Morales-Soto

*et al.*, 2014), 218 (López-Cobo *et al.*, 2017), 220 (Redondo *et al.*, 2017) y 227 (Fernández-Jalao *et al.*, 2019), metanol/agua (70:30) en la referencia 228 (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014) y metanol/agua (80:20) al 1% de HCl en la referencia 216 (Wojdylo *et al.*, 2016). En este ensayo, los diferentes disolventes empleados también influyen en los valores, al igual que en el resto de ensayos, por lo que también en el FRAP es complicado comparar valores entre frutas que no se hayan analizado empleando los mismos disolventes.

#### Variabilidad en cuanto a valores y unidades de expresión.

En cuanto a los valores y unidades de expresión, ocurre lo mismo que en los ensayos analizados anteriormente, es decir, existe una gran variabilidad. Así, las unidades de expresión originales de las referencias encontradas para el FRAP varían entre:  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ;  $\text{mmol eq. FeSO}_4/100 \text{ g DW}$ ;  $\text{mmol Fe}^{2+}/100 \text{ g FW}$ ;  $\text{mmol TE}/100 \text{ g DW}$ ;  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g DW}$ ;  $\text{mg TE/g DW}$ ; y  $\text{mM TE}/100 \text{ g FW}$ . De nuevo, para disponer de valores útiles y adaptados a las guías y tablas de composición de alimentos, las unidades se unificaron en  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco, para aquéllas en las que el Trolox es el antioxidante de referencia y,  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco, para aquéllas otras en las que el sulfato ferroso es el antioxidante de referencia. Hecha la transformación, se observa que las frutas con menor nivel de CAT son la manzana variedad Golden Delicious con  $254 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco y la sandía amarilla con  $40 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco, mientras que, las frutas con mayor nivel de CAT son la azofoifa variedad MSI con  $7660 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco y la granada con  $11330 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco.

Además, es destacable la variabilidad de valores para una misma fruta pero analizada por autores distintos, como por ejemplo la granada con  $11330 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco obtenidos en la referencia 205 (Halvorsen *et al.*, 2002) y  $906 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco obtenidos en la referencia 204 (Morales-Soto *et al.*, 2014). Pero también, destaca la variabilidad de valores entre variedades de una misma fruta, como por ejemplo la azofoifa, cuya variedad Grande de Albaterra posee  $3885 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco y la variedad MSI con  $7660 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de producto fresco y, el mango, cuya variedad Osteen posee  $1412 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco y la variedad Sensación  $2624 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  de producto fresco.

#### Observaciones relativas a algunas referencias.

Las observaciones correspondientes a la referencia 204 (Morales-Soto *et al.*, 2014) y a la 62 (Saura-Calixto y Goñi, 2006) se han comentado anteriormente en el ensayo TEAC-ABTS.

**Tabla 10.** Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo FRAP comercializadas en España con estandarización de unidades.

REF. <sup>a</sup>	FRUTAS	FRAP (Unidades artículo original)	FRAP (Unidades Transformadas en µmol TE/100g FW*)	FRAP (Unidades Transformadas en µmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW)
91 <sup>1</sup>	Fresa	99,10±5,77 µmol TE/g DW*	793	-
204 <sup>3</sup>	Aguacate: Variedad Lamb-Hass	1,20 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	252
	Variedad Bacon	1,68 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	352
204 <sup>3</sup>	Caqui	0,70 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	133
204 <sup>3</sup>	Chirimoya	2,453 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	613
204 <sup>3</sup>	Granada	5,33 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	906
204 <sup>3</sup>	Limón: Variedad Fino	12,8 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	1408
	Variedad Primafiori	12,4 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	1364
204 <sup>3</sup>	Mango	3,89 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	597
204 <sup>3</sup>	Melón: Variedad Cantaloupe	2,23 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	143
	Variedad Galia	2,09 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	209
	Variedad Sapo	1,90 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	152
204 <sup>3</sup>	Membrillo	1,55 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	233
204 <sup>3</sup>	Níspero	0,60 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	75
204 <sup>3</sup>	Sandía	0,73 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	58
204 <sup>3</sup>	Uva tinta	14,3 mmol eq. FeSO <sub>4</sub> /100g DW	-	2288
205 <sup>2</sup>	Ciruela roja	1,42 mmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	-	1420
205 <sup>2</sup>	Granada	11,33 mmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	-	11330
205 <sup>2</sup>	Naranja	1,50 mmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	-	1500
205 <sup>2</sup>	Sandia: Roja	0,06 mmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	-	60
	Amarilla	0,04 mmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	-	40
216 <sup>4</sup>	Azofaifa: Var. Grande de Albaterra	17,66 mmol TE/100g DW	3885	-
	Var. MSI	34,82 mmol TE/100g DW	7660	-
	Var. PSI	33,38 mmol TE/100g DW	7344	-
	Var. Dátil	34,31 mmol TE/100g DW	7548	-
218 <sup>5</sup>	Mango: Var. Keitt	116,9 µmol FeSO <sub>4</sub> /g DW	-	1754
	Var. Osteen	94,1 µmol FeSO <sub>4</sub> /g DW	-	1412
	Var. Sensación	174,9 µmol FeSO <sub>4</sub> /g DW	-	2624
220 <sup>6</sup>	Albaricoque	20,73 mg TE/g DW	994	-
	Cereza	17,50 mg TE/g DW	1049	-
	Ciruela	19,49 mg TE/g DW	779	-
	Melocotón Royal Glory	22,10 mg TE/g DW	883	-
	Nectarina	30,42 mg TE/g DW	2005	-
	Paraguaya	21,33 mg TE/g DW	895	-
221 <sup>7</sup>	Pomelo	1,61 mM TE/100g FW	1610	-
227 <sup>8</sup>	Manzana Golden Delicious	19,57 µmol TE/g DW	254	-
228 <sup>9</sup>	Lima	7,35 mmol TE/100g DW	735	-
	Limón	7,53 mmol TE/100g DW	828	-
	Mandarina	5,13 mmol TE/100g DW	872	-
	Naranja	5,95 mmol TE/100g DW	714	-
	Pomelo	7,07 mmol TE/100g DW	566	-
62 <sup>10</sup>	MEDIA DE FRUTAS DE LA DIETA ESPAÑOLA	25,5 µmol TE/g DW	510	-

\*DW: Peso seco; FW: Peso fresco.

<sup>a</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

<sup>1</sup>Método: Benzie y Strain (1996) modificado por Pulido *et al.* (2000). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (50:50) y HCl.

<sup>2</sup>Método: Benzie y Strain (1996). Disolventes de extracción: Metanol.

<sup>3</sup>Método: Benzie y Strain (1999). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>4</sup>Método: Benzie y Strain (1996). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20) 1% de HCl.

<sup>5</sup>Método: Al-Duais *et al.* (2009). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>6</sup>Método: Thaipong *et al.* (2006). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>7</sup>Método: Benzie y Strain (1999). Disolventes de extracción: Metanol.

<sup>8</sup>Método: Benzie y Strain (1996). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>9</sup>Método: Benzie y Strain (1996). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (70:30).

<sup>10</sup>Método: Benzie y Strain (1996) modificado por Pulido *et al.* (2000). Disolventes de Extracción: Metanol/Agua (50:50) y Acetona/Agua (70:30).

#### D) Valores de CAT para frutas analizadas con ensayo ORAC:

##### Métodos analíticos empleados.

El ensayo **ORAC** es, junto con el ensayo TRAP, el menos utilizado en España para la determinación de CAT en alimentos; únicamente se encontraron 3 artículos con datos útiles en la búsqueda bibliográfica, tal y como se puede observar en la **tabla 11**. Entre estos 3 artículos, hay un total de 16 frutas distintas (algunas de ellas con distintas variedades). El método analítico empleado ha sido Ou *et al.* (2001) y Ou *et al.* (2001) modificado por Laporta *et al.* (2007).

##### Disolventes de extracción empleados.

Como disolventes de extracción se emplearon metanol/agua (80:20) en la referencia 204 (Morales-Soto *et al.*, 2014), metanol/agua (80:20) con 1% de ácido acético en la referencia 215 (Wojdylo *et al.*, 2016) y metanol/agua (70:30) en la 218 (López-Cobo *et al.*, 2017). De nuevo los variados disolventes empleados en este ensayo influyen en los resultados y ofrecen dificultad a la hora de comprar valores entre frutas. Además impiden la comparación con los datos de las bases de datos americana (USDA) que utiliza otros disolventes.

##### Variabilidad en cuanto a valores y unidades de expresión.

En referencia a los valores y a las unidades de expresión, a diferencia del resto de ensayos de CAT, en el ORAC en la **tabla 11** no se observa tanta variabilidad, pero esto es debido, fundamentalmente, a que hay un menor número de frutas analizadas por este ensayo (y sólo el limón se repite) y un menor número de estudios que llevan a cabo este ensayo. En este sentido, las unidades en las que se muestran los valores en los estudios originales son mmol TE/100 g DW, habiéndose transformado éstas en  $\mu\text{mol TE/100 g}$  de producto fresco. Y,

respecto a los valores, el limón presenta un contenido en CAT de 254  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco para la variedad Primafiori y 350  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco para la variedad Fino, mientras que, en variedad Verna presenta un valor de 3439  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco.

Además, la fruta que presenta un menor contenido en CAT en el ensayo ORAC es el melón variedad Sapo con 28  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco y, la que presenta un mayor contenido en CAT, es la mandarina con 5389  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  de producto fresco.

*Observaciones relativas a algunas referencias.*

Las observaciones correspondientes a la referencia 204 (Morales-Soto *et al.*, 2014) ya se han comentado anteriormente en el ensayo TEAC-ABTS.

**Tabla 11.** Valores de CAT disponibles en bibliografía para frutas analizadas con ensayo ORAC comercializadas en España con estandarización de unidades.

REF. <sup>a</sup>	FRUTAS	ORAC (Unidades artículo original)	ORAC (Unidades Transformadas en μmol TE/100g FW*)
204 <sup>1</sup>	Aguacate:		
	Var. Lamb-Hass	1,885 mmol TE/100g DW*	396
	Var. Bacon	0,506 mmol TE/100g DW	107
204 <sup>1</sup>	Caqui	0,283 mmol TE/100g DW	54
204 <sup>1</sup>	Chirimoya	1,060 mmol TE/100g DW	265
204 <sup>1</sup>	Granada	1,119 mmol TE/100g DW	190
204 <sup>1</sup>	Limón:		
	Var. Fino	3,184 mmol TE/100g DW	350
	Var. Primafiori	2,305 mmol TE/100g DW	254
204 <sup>1</sup>	Mango	0,629 mmol TE/100g DW	94
204 <sup>1</sup>	Melón:		
	Var. Cantaloupe	0,448 mmol TE/100g DW	29
	Var. Galia	0,343 mmol TE/100g DW	34
	Var. Sapo	0,353 mmol TE/100g DW	28
204 <sup>1</sup>	Membrillo	0,442 mmol TE/100g DW	66
204 <sup>1</sup>	Níspero	0,495 mmol TE/100g DW	62
204 <sup>1</sup>	Sandía	0,470 mmol TE/100g DW	38
204 <sup>1</sup>	Uva roja	2,838 mmol TE/100g DW	454
215 <sup>2</sup>	Breva:		
	Var. Colar	1,06 mmol TE/100g DW	191
	Var. Verdal	1,05 mmol TE/100g DW	189
	Higo:		
	Var. Colar	0,92 mmol TE/100g DW	166
	Var. Verdal	0,94 mmol TE/100g DW	169
	Var. Calabacita	0,65 mmol TE/100g DW	117
	Var. Tiberio	0,46 mmol TE/100g DW	83
	Var. De Rey	0,63 mmol TE/100g DW	113
	Var. Cuello Dama Blanca	0,67 mmol TE/100g DW	121
	Var. San Antonio	1,01 mmol TE/100g DW	182
	Var. Cuello Dama Negra	1,33 mmol TE/100g DW	239
	Var. Granito	0,90 mmol TE/100g DW	162
	Var. Campera	0,75 mmol TE/100g DW	135
228 <sup>3</sup>	Lima	45,12 mmol TE/100g DW	4512
	Limón	31,26 mmol TE/100g DW	3439
	Mandarina	31,70 mmol TE/100g DW	5389
	Naranja	19,44 mmol TE/100g DW	2333
	Pomelo	46,33 mmol TE/100g DW	3706

\*DW: Peso seco; FW: Peso fresco.

<sup>a</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

<sup>1</sup>Método: Ou *et al.* (2001) modificado por Laporta *et al.* (2007). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>2</sup>Método: Ou *et al.* (2001). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20) 1% ácido acético.

<sup>3</sup>Método: Ou *et al.* (2001). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (70:30).

### E) Valores de CAT para frutas analizadas con ensayo TRAP:

En lo que respecta al **TRAP**, sólo se ha encontrado un artículo en bibliografía (Gorinstein *et al.*, 2002) que analizara frutas por medio de este ensayo para determinar valores de CAT. Las frutas analizadas fueron: Manzana variedad Golden Delicious, melocotón variedad Catherina, y pera variedad Blanquilla. Sin embargo, los valores que aporta este estudio no son

de utilidad para valorar la CAT en la presente Tesis Doctoral, ya que las unidades empleadas en este método de quimioluminiscencia (Gorinstein *et al.*, 2001) son mmol/ml, que difieren de las empleadas normalmente en el resto de ensayos de CAT.

## **F) Valores de $T_p$ para frutas:**

### Métodos analíticos empleados.

Además de los ensayos de CAT, como se puede observar en la **tabla 12** relativo al ensayo de  $T_p$ , se seleccionaron un total de 8 artículos y una Tesis Doctoral con 23 frutas distintas (algunas de ellas con distintas variedades). El método analítico ha variado en estos artículos entre: Singleton y Rossi (1965); Montreau (1972); Singleton *et al.* (1999); y Lima *et al.* (2005).

### Disolventes de extracción empleados.

Como disolventes de extracción, en estos estudios se han empleado: acetona/agua (80:20) en la referencia 28 (Morillas-Ruiz y Delgado-Alarcón, 2012); metanol, etanol, acetato de etilo en la referencia 54 (Gorinstein *et al.*, 2002); metanol/agua (50:50) y HCl en la referencia 91 (Jiménez-Escrig, 2007); metanol/agua (80:20) y 2nM NaF en la referencia 217 (Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017); etanol/agua (80:20) y HCl en la referencia 219 (Pereira *et al.*, 2017); metanol/agua (80:20) en la referencia 220 (Redondo *et al.*, 2017) y 227 (Fernández-Jalao *et al.*, 2019); metanol/agua (50:50) + HCl y acetona/agua (70:30) en la Tesis Doctoral de Barea-Álvarez (2015); y metanol/agua y acetona/agua en la referencia 62 (Saura-Calixto y Goñi, 2015). Al igual que en los ensayos de determinación de CAT, en la determinación del contenido en  $T_p$  también juega un papel importante el disolvente empleado, ya que el aspecto clave en este ensayo, igual que en los de CAT, es la transferencia de electrones y la transferencia de átomos de hidrógeno (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006) y en el tipo y cantidad de compuestos extraídos.

### Variabilidad en cuanto a valores y unidades de expresión.

Al igual que ocurre en los ensayos de CAT, en el de  $T_p$  también existe variabilidad de valores y unidades de expresión en los diferentes artículos encontrados. Las diferentes unidades en las que expresan estos estudios los valores obtenidos son:  $\mu\text{g GAE/g FW}$ ;  $\text{g GAE/kg FW}$ ;  $\mu\text{mol GAE/g DM}$ ;  $\text{mg GAE/100 g DW}$ ;  $\text{mg GAE/100 g FW}$ ;  $\text{mg GAE/g DW}$ ;  $\text{mg GAE/g FW}$ .

También para los Tp se ha decidido incluir en la **tabla 12** una columna en la que, los datos originales de los artículos se han transformado en mg GAE/100g de producto fresco y así, disponer de todos los valores en las unidades que aparecen en las guías y tablas de composición de alimentos. En cuanto a la variabilidad de valores para una misma fruta, se destaca la manzana Golden Delicious, para la que, una vez transformados, los valores difieren entre los 62 y 690 mg GAE/100 g de producto fresco.

Por otro lado, la fruta que presenta un menor contenido en Tp, según la **tabla 12**, es el higo con 28,04 mg GAE/100 g de producto fresco como media entre 9 variedades analizadas y, como fruta con mayor nivel de Tp, se encuentra la nectarina, con 708 mg GAE/100 g de producto fresco.

#### Observaciones relativas a algunas referencias.

La Tesis Doctoral de Barea-Álvarez (2015) aporta el contenido en Tp de frutas tropicales nacionales, cultivadas en la costa de Granada-Málaga (**tabla 12**, primer dato numérico) y el contenido en Tp de las mismas frutas tropicales no nacionales, cultivadas fuera de España (**tabla 12**, segundo dato numérico).

Las observaciones de la referencia 217 (Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017) y de la referencia 62 (Saura-Calixto y Goñi, 2006) ya se han analizado en el ensayo TEAC-ABTS.

**Tabla 12.** Valores de Tp disponibles en bibliografía para frutas comercializadas en España con estandarización de unidades.

REF. <sup>a</sup>	FRUTAS	Tp (Unidades artículo original)	Tp (Unidades Transformadas en mg GAE /100 g FW)
28 <sup>1</sup>	Aguacate	597,96 µg GAE/g FW	59,8
28 <sup>1</sup>	Carambola	1140,26 µg GAE/g FW	114
28 <sup>1</sup>	Cereza Napoleón	994,08 µg GAE/g FW	99,4
28 <sup>1</sup>	Chayote	487,64 µg GAE/g FW	48,8
28 <sup>1</sup>	Ciruela roja	1700,48 µg GAE/g FW	170
28 <sup>1</sup>	Kiwi	1298,90 µg GAE/g FW	130
28 <sup>1</sup>	Mango	971,52 µg GAE/g FW	97,2
28 <sup>1</sup>	Naranja Bahía	1511,26 µg GAE/g FW	151
28 <sup>1</sup>	Papaya	977,16 µg GAE/g FW	97,7
28 <sup>1</sup>	Tamarillo	2010,40 µg GAE/g FW	201
54 <sup>2</sup>	Manzana Golden Delicious	6.9 g GAE/kg FW	690
54 <sup>2</sup>	Melocotón Catherina	2.4 g GAE/kg FW	240
54 <sup>2</sup>	Pera Blanquilla	2.1 g GAE/kg	210
91 <sup>3</sup>	Fresa	82,78 µmol GAE/g DW	110
217 <sup>4</sup>	Granada:		
	Var. MEM (dulce)	1331 mg GAE/100g DW	226
	Var. MEC (dulce)	1283 mg GAE/100g DW	218
	Var. WOND (ácida)	1463 mg GAE/100g DW	249
219 <sup>5</sup>	Higo:		
	Var. Cuello Dama Blanco	24,3 mg GAE/100g FW	24,3
	Var. Blanca Bétera	26 mg GAE/100g FW	26
	Var. Banane	25 mg GAE/100g FW	25
	Var. Tres Voltas L'Any	28,5 mg GAE/100g FW	28,5
	Var. Brown Turkey	24,5 mg GAE/100g FW	24,5
	Var. San Antonio	23,3 mg GAE/100g FW	23,3
	Var. De Rey	30 mg GAE/100g FW	30
220 <sup>6</sup>	Albaricoque	9,32 mg GAE/g DW	112
	Cereza	13,29 mg GAE/g DW	199
	Ciruela	25,70 mg GAE/g DW	424
	Melocotón Royal Glory	15,79 mg GAE/g DW	158
	Nectarina	67,43 mg GAE/g DW	708
	Paraguaya	35,03 mg GAE/g DW	350
227 <sup>7</sup>	Manzana Golden Delicious	3,42 mg GAE/g DW	62
Tesis Doctoral <sup>8</sup>	Aguacate:		
	Var. Hass	0,33 / 3,35 mg GAE/g FW	33,6 / 335
	Var. Bacon	0,28 / 3,35 mg GAE/g FW	28,5 / 335
	Caqui	2,46 / 1,02 mg GAE/g FW	246,3 / 102,1
	Carambola	1,07 / 1,16 mg GAE/g FW	107,4 / 116,9
	Chirimoya	1,44 / 1,03 mg GAE/g FW	144 / 103,1
	Kiwi	0,38 / 0,34 mg GAE/g FW	38,4 / 34,5
	Mango	0,37 / 0,40 mg GAE/g FW	37,7 / 40,2
62 <sup>9</sup>	MEDIA DE FRUTAS DE LA DIETA ESPAÑOLA	538 mg GAE/100 g DW	108

\*DW: Peso seco; FW: Peso fresco.

<sup>a</sup>Referencia del estudio correspondiente según listado anexo 1.

<sup>1</sup>Método: Singleton y Rossi (1965). Disolventes de extracción: Acetona/Agua (80:20).

<sup>2</sup>Método: Singleton y Rossi (1965). Disolventes de extracción: Metanol, Etanol: Etil-acetato.

<sup>3</sup>Método: Montreau (1972). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (50:50) + HCl.

<sup>4</sup>Método: Singleton *et al.* (1999). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20) 2nM NaF.

<sup>5</sup>Método: Lima *et al.* (2005). Disolventes de extracción: Etanol/Agua (80:20) 1% HCl.

<sup>6</sup>Método: Singleton y Rossi (1965). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>7</sup>Método: Singleton y Rossi (1965) adaptado por Bobo-García *et al.* (2015). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (80:20).

<sup>8</sup>Método: Singleton *et al.* (1999). Disolventes de extracción: Metanol/Agua (50:50) + HCl y Acetona/Agua (70:30).

<sup>9</sup>Método: Montreau (1972). Disolventes de extracción: Metanol/Agua y Acetona/Agua.

## 5.2. Estudio transversal I

### 5.2.1. Valoración nutricional derivada del CFCA

La población de estudio, compuesta por 22 hombres y 28 mujeres, se dividió en tres grupos de edad (grupo de personas jóvenes entre 23-35 años; personas de mediana edad entre 36 a 49 años; y personas mayores entre 50 y 63 años) para realizar la valoración nutricional a partir de la información recogida en el CFCA, comparando la ingesta de los nutrientes con sus respectivas IDR.

La **tabla 13** recoge la valoración nutricional relativa ingesta de energía, hidratos de carbono, lípidos y ácidos grasos, proteínas, fibra alimentaria, y colesterol. En cuanto a la energía, los hombres jóvenes mostraron una mayor ingesta de energía diaria (2417 kcal) y los hombres de mediana edad una menor ingesta de energía (1762 kcal). Atendiendo a los macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) los mismos grupos de personas presentaron mayores y menores niveles de ingesta, respectivamente. Las IDR de las proteínas fueron cubiertas en hombres y mujeres de todos los grupos de edad, mientras que, sólo las mujeres de mediana edad y mayores, cubrieron las recomendaciones de fibra.

La información correspondiente a ingesta de vitaminas se muestra en la **tabla 14**. Todos los grupos de personas superan las IDR de vitaminas, excepto en los siguientes casos:

- La vitamina D en las mujeres y hombres mayores.
- La vitamina E en todos los grupos de personas, no alcanzando el 50% de la IDR en la mayoría de estos.
- El ácido fólico se encontró, aproximadamente, en el 80% de la IDR en todos los grupos de personas, aunque en los hombres de mediana edad, se quedó por debajo del 60% de la IDR.

Finalmente, las recomendaciones de minerales aparecen en la **tabla 15**. Hay que indicar que el programa informático utilizado subestima la ingesta de yodo, por ello, ninguno de los grupos de personas alcanzó la IDR del mismo. En relación al Fe y al magnesio (Mg), algunos grupos de personas que no llegaron a la IDR de los mismos, así, las mujeres jóvenes y de mediana edad, se quedaron por debajo de la IDR de Fe y, todos los grupos de edad de los hombres (principalmente el de mediana edad), tampoco alcanzaron la IDR para este mineral. Las recomendaciones del resto de minerales se cumplieron de manera generalizada.

**TABLA 13.** Valoración nutricional relativa a energía, hidratos de carbono, lípidos, proteínas, fibra alimentaria, tipo de ácidos grasos y colesterol obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).

Grupos de edad	ENERGÍA (kcal)	HIDRATOS DE CARBONO (g)	LÍPIDOS (g)	PROTEÍNAS (g)	FIBRA ALIMENTARIA (g)	AG. SATURADOS (g)	AG. MONOINSATURADOS (g)	AG. POLIINSATURADOS (g)	COLESTEROL (mg)
Mujeres jóvenes <sup>1</sup>	1950	253	66,7	79,0 (172%)	22,8 (91,2%)	19,3	28,0	8,25	289
Hombres jóvenes <sup>1</sup>	2417	287	90,4	98,3 (176%)	25,3 (66,5%)	26,1	39,0	11,2	403
Mujeres mediana edad <sup>2</sup>	2257	261	83,4	103 (223%)	33,9 (136%)	22,4	36,0	11,2	383
Hombres mediana edad <sup>2</sup>	1762	217	60,8	73,6 (132%)	18,3 (48,2%)	19,6	24,6	6,38	259
Mujeres mayores <sup>3</sup>	1859	223	71,5	77,1 (168%)	27,4 (130%)	15,8	29,2	12,8	247
Hombres mayores <sup>3</sup>	1930	241	63,7	79,3 (142%)	24,8 (79,7%)	17,8	27,8	7,63	271

<sup>1</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 23 y 35 años.

<sup>2</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 36 y 49 años.

<sup>3</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 50 y 63 años.

**TABLA 14.** Valoración nutricional relativa a vitaminas obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).

Grupos de edad	VIT_D (µg)	VIT_E (mg eq)	VIT_C (mg)	VIT_A (µg eq)	VIT_B1 (mg)	VIT_B2 (mg)	VIT_B6 (mg)	VIT_B12 (µg)	NIACINA (mg)	AC. FÓLICO (µg)
Mujeres jóvenes <sup>1</sup>	6,29 (127%)	5,43 (36,2%)	277 (370%)	2308 (330%)	2,55 (205%)	2,91 (265%)	1,90 (148%)	3,98 (171%)	26,1 (186%)	308 (76,8%)
Hombres jóvenes <sup>1</sup>	9,87 (197%)	7,11 (47,4%)	239 (266%)	2606 (290%)	2,07 (173%)	2,57 (198%)	2,25 (173%)	6,50 (271%)	27,1 (169%)	329 (82,2%)
Mujeres mediana edad <sup>2</sup>	9,23 (185%)	8,72 (58,3%)	331 (442%)	3458 (494%)	2,17 (197%)	2,87 (261%)	2,25 (173%)	6,88 (287%)	29,6 (211%)	379 (94,7%)
Hombres mediana edad <sup>2</sup>	6,74 (135%)	4,77 (31,8%)	179 (199%)	1872 (208%)	1,62 (135%)	2,11 (162%)	1,65 (127%)	5,21 (217%)	20,0 (125%)	236 (59,1%)
Mujeres mayores <sup>3</sup>	4,14 (41,4%)	5,78 (38,6%)	310 (413%)	2428 (347%)	1,92 (174%)	3,30 (300%)	2,29 (153%)	4,15 (173%)	25,2 (180%)	360 (89,9%)
Hombres mayores <sup>3</sup>	6,66 (72,6%)	5,87 (39,1%)	281 (313%)	3361 (373%)	1,91 (160%)	2,13 (164%)	2,16 (133%)	5,43 (226%)	21,6 (135%)	304 (76,0%)

<sup>1</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 23 y 35 años.

<sup>2</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 36 y 49 años.

<sup>3</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 50 y 63 años.

**TABLA 15.** Valoración nutricional relativa minerales obtenida de la encuesta de frecuencia de consumo en mujeres y hombres según grupos de edad y sus recomendaciones (IDR%).

Grupos de edad	CALCIO (mg)	FÓSFORO (mg)	MAGNESIO (mg)	HIERRO (mg)	YODO (µg)	SELENIO (µg)	ZINC (mg)
Mujeres jóvenes <sup>1</sup>	1088 (109%)	1371 (196%)	304 (97,3%)	12,9 (71,5%)	42,0 (28,0%)	85,4 (155%)	12,1 (134%)
Hombres jóvenes <sup>1</sup>	1118 (112%)	1606 (229%)	836 (82,1%)	14,8 (185%)	65,4 (40,3%)	113 (205%)	13,2 (120%)
Mujeres mediana edad <sup>2</sup>	1356 (136%)	1866 (266%)	424 (132%)	15,9 (88,5%)	57,9 (38,6%)	131 (237%)	14,4 (160%)
Hombres mediana edad <sup>2</sup>	968 (96,7%)	1263 (181%)	248 (59,1%)	10,9 (137%)	56,3 (37,5%)	83,5 (152%)	9,50 (86,3%)
Mujeres mayores <sup>3</sup>	1175 (98,0%)	1460 (208%)	361 (113%)	13,9 (115%)	44,0 (29,4%)	66,4 (121%)	8,97 (99,8%)
Hombres mayores <sup>3</sup>	1068 (107%)	1395 (199%)	310 (73,8%)	12,9 (161%)	65,8 (43,9%)	93,1 (169%)	10,3 (93,8%)

<sup>1</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 23 y 35 años.

<sup>2</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 36 y 49 años.

<sup>3</sup>Mujeres y hombres con edades comprendidas entre 50 y 63 años.

### 5.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante en el plasma

En la **tabla 16** se muestran los valores medios de CANE-P obtenidos tras su determinación, así como las características de la población de estudio. La mayoría de los participantes eran no fumadores y físicamente inactivos. En general, los hombres tenían un mayor IMC que las mujeres ( $p=0,04$ ), aunque su gasto energético total diario fue superior ( $p<0,001$ ). La ingesta media de energía y la ingesta de nutrientes antioxidantes no variaron significativamente entre hombres y mujeres. Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en los valores medios de CANE-P para los métodos ORAC sin proteínas ( $p=0,02$ ) y para FRAP ( $p<0,001$ ).

**Tabla 16.** Características socio-demográficas de la población de estudio según sexo y valores de CANE-P.

Variables	Todos (n=50)	Hombres (n=22)	Mujeres (n=28)	p-valor <sup>3</sup>	
	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>		
Edad (años)	40,5 (12,4)	43,5 (10,7)	38,2 (13,4)	0,07	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,5 (3,66)	25,7 (2,61)	23,6 (4,11)	0,04	
GETD <sup>1</sup> (Kcal/día)	2402 (506)	2860 (367)	2042 (232)	<0,001	
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>		
Hábito tabáquico					
No fumador	42 (84,0)	21 (95,4)	21 (75,0)	0,05	
Fumador	8 (16,0)	1 (4,6)	7 (25,0)		
Actividad física					
Sedentario	36 (72,0)	13 (59,1)	23 (82,1)	0,07	
Activo	14 (28,0)	9 (40,9)	5 (17,9)		
Consumo de alcohol					
No consumidor	8 (16,0)	4 (18,2)	4 (14,3)	0,83	
Consumidor	42 (84,0)	18 (81,8)	24 (85,7)		
	<b>Media (SD)</b>	<b>Media G. (SD)<sup>2</sup></b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	
<b>CANE-P</b>					
ORAC (μmol TE/L)	21271 (2695)	20010 (1455)	21291 (2785)	21256 (2673)	0,96
ORAC <sub>sin proteínas</sub> (μmol TE/L)	2223 (329)	2081 (181)	2353 (354)	2121 (273)	0,02
Tp (mg GAE/L)	1685 (153)	1595 (82,1)	1652 (149)	1711 (153)	0,17
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	1701 (211)	1644 (82,1)	1824 (194)	1604 (171)	<0,001
TEAC-ABTS (μmoles TE/L)	8669 (1071)	9317 (483)	8670 (867)	8669 (1224)	0,10

<sup>1</sup>Gasto Energético Total Diario

<sup>2</sup>Media Geométrica obtenida usando modelo lineal generalizado ajustando por edad, sexo e ingesta de energía.

<sup>3</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de la t de Student y test de Wilcoxon para variables continuas y test de la chi-cuadrado para variables categóricas.

### 5.2.3. Selección de la base de datos para la estimación de la CAT-D

Con el fin de valorar si existen diferencias en la CAT-D según la base de datos empleada para su estimación, se realizó, en primer lugar, un estudio descriptivo de ingesta de CAT (media y desviación estándar) en el grupo de las frutas para el estudio transversal I (piloto). El análisis se centró en las frutas ya que es el grupo de alimentos que mayor cantidad de compuestos fenólicos contiene y, por tanto, el que mayor porcentaje de CAT aporta a la dieta, después del grupo de las bebidas no alcohólicas (Zamora Ros *et al.*, 2016).

En la **tabla 17** se muestra el estudio de correlaciones realizado entre la CAT-D estimada a través de las distintas bases de datos utilizadas (Pellegrini *et al.*, 2003; Carlsen *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018; formulario de CAT en alimentos) y con información dietética derivada del CFCA y R-24H, y la CANE-P de la población que formó parte del estudio I (n=50) de puesta a punto de los métodos de CANE-P (estudio piloto).

**Tabla 17.** Coeficientes de correlación entre CAT-D (derivada del CFCA y los R-24H) y CANE-P por grupos de alimentos (frutas y zumos) en muestra del estudio I (n=50).

Variables de CAT-D (grupo frutas y zumos) y variables de CANE-P	rho <sup>1</sup>	p-valor
<b>CAT-D derivada del CFCA – CANE-P</b>		
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,14	0,325
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,16	0,273
FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,16	0,258
FRAP (Formulario) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,17	0,238
TEAC-ABTS (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	0,03	0,830
TEAC-ABTS (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	0,01	0,926
TEAC-ABTS (Formulario) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	-0,02	0,888
Tp (USDA) – Plasma TPC (mg GAE)	0,10	0,489
Tp (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma TPC (mg GAE)	0,03	0,841
Tp (Formulario) – Plasma PT (mg GAE)	0,12	0,397
<b>CAT-D derivada del R-24H – CANE-P</b>		
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,30	0,034
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,23	0,105
FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,19	0,189
FRAP (Formulario) – Plasma FRAP (Fe <sup>2+</sup> )	0,30	0,034
TEAC-ABTS (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	0,19	0,178
TEAC-ABTS (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	0,18	0,214
TEAC-ABTS (Formulario) – Plasma TEAC-ABTS (TE)	0,06	0,693
Tp (USDA) – Plasma Tp (mg GAE)	0,15	0,291
Tp (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Plasma Tp (mg GAE)	0,05	0,710
Tp (Formulario) – Plasma Tp (mg GAE)	0,07	0,638
<b>CAT-D derivada del CFCA – CAT-D derivada del R-24H</b>		
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003)	0,53	<0,001
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010)	0,52	<0,001
FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018)	0,50	<0,001
FRAP (Formulario) – FRAP (Formulario)	0,36	0,009
TEAC-ABTS (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – TEAC-ABTS (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003)	0,51	<0,001
TEAC-ABTS (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – TEAC-ABTS (Ruiz <i>et al.</i> , 2018)	0,60	<0,001
TEAC-ABTS (Formulario) – TEAC-ABTS (Formulario)	0,52	<0,001
Tp (USDA) – Tp (USDA)	0,53	<0,001
Tp (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – Tp (Ruiz <i>et al.</i> , 2018)	0,54	<0,001
Tp (Formulario) – Tp (Formulario)	0,44	0,001
<b>Correlaciones entre las distintas fuentes de información</b>		
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – CFCA	0,93	<0,001
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – CFCA	0,93	<0,001
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Formulario) – CFCA	0,85	<0,001
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – CFCA	0,91	<0,001
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – FRAP (Formulario) – CFCA	0,75	<0,001
FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – FRAP (Formulario) – CFCA	0,79	<0,001
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – R-24H	0,97	<0,001
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – R-24H	0,94	<0,001
FRAP (Pellegrini <i>et al.</i> , 2003) – FRAP (Formulario) – R-24H	0,70	<0,001
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – R-24H	0,96	<0,001
FRAP (Carlsen <i>et al.</i> , 2010) – FRAP (Formulario) – R-24H	0,54	<0,001
FRAP (Ruiz <i>et al.</i> , 2018) – FRAP (Formulario) – R-24H	0,54	<0,001

<sup>1</sup>Correlación de Spearman (método no paramétrico).

En el estudio de correlación realizado entre las bases de datos utilizadas (Pellegrini *et al.*, 2003; Carlsen *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018; formulario de CAT en alimentos), para la estimación de la CAT-D, se observaron correlaciones positivas entre la CAT del grupo de las frutas y zumos y la CANE-P en todas las bases datos. La fuerza de las correlaciones varió

ligeramente entre una y otra base de datos y se encontraron relaciones estadísticamente significativas sólo para el ensayo FRAP, estimado con la base de datos de Pellegrini *et al.* (2003) y el formulario ( $\rho=0,3$ ;  $p=0,03$ ), con la información de las frutas registradas en el R-24H. Además, la correlación entre la CAT-D estimada con las diferentes bases de datos resultó estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ).

La base de datos de Pellegrini *et al.* (2003) recoge un mayor número de frutas que el formulario (datos considerados útiles) y también, mayor número del resto de alimentos, por lo que se optó emplear la base de datos de Pellegrini *et al.* (2003 y 2006) para estimar la CAT-D, tanto global como por grupo de alimentos, completada con Carlsen *et al.* (2010) en algunos alimentos para los que no existía valor en la base de datos anterior. Finalmente, hay que indicar que Pellegrini *et al.*, había validado anteriormente su base de datos con indicadores en plasma (Pellegrini *et al.*, 2007).

#### 5.2.4. Estimación de la CAT-D

La **tabla 18** recoge los valores medios y las diferencias entre mujeres y hombres para los valores de CAT-D, tanto con la información derivada del CFCA como del R-24H. Las bases de datos utilizadas para la cuantificación de la CAT-D fueron: USDA 2007 y 2010 para el ensayo ORAC; Pellegrini *et al.* 2003 y 2006, y Carlsen *et al.* 2010 para el ensayo FRAP; y Pellegrini *et al.* 2003 y 2006 para el ensayo TEAC-ABTS. Como se aprecia en dicha tabla, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres y hombres en la ingesta dietética ( $p>0,05$ ).

**Tabla 18.** Valores de CAT-D derivados del CFCA y del R-24H.

Variables	Todos (n=50)		Hombres (n=22)	Mujeres (n=28)	p-valor <sup>3</sup>
<b>Características dietéticas<sup>1</sup></b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media G. (SD)<sup>2</sup></b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	
Ingesta de energía (kcal/día)	2022 (539)	2153 (275)	2009 (615)	2032 (483)	0,88
Fibra (g/día)	25,3 (10,2)	14,0 (2,60)	22,9 (7,91)	27,2 (11,5)	0,21
Vitamina E (mg Eq/día)	6,25 (2,81)	4,95 (1,65)	5,86 (2,03)	6,55 (3,30)	0,70
Vitamina C (mg/día)	273 (149)	126 (47,6)	237 (123)	300 (163)	0,18
Vitamina A (µg Eq/día)	2691 (1551)	1586 (599)	2681 (1352)	2699 (1715)	0,86
Magnesio (mg/día)	328 (107)	210 (28,6)	297 (93,4)	352 (112)	0,07
Hierro (mg/día)	13,4 (4,05)	11,3 (1,28)	12,8 (3,92)	13,9 (4,16)	0,45
Selenio (µg/día)	96,1 (42,7)	113 (34,2)	95,4 (37,1)	96,6 (47,3)	0,84
Zinc (mg/día)	11,6 (4,37)	14,2 (2,88)	10,8 (3,81)	12,3 (4,73)	0,45
<b>CAT-D derivado del CFCA</b>					
ORAC <sub>total</sub> (µmol TE/día)	28505 (15925)	10190 (2512)	29369 (16052)	27825 (16087)	0,76
ORAC <sub>sin café</sub> (µmol TE/día)	17954 (8766)	7788 (2411)	18148 (7968)	17801 (9487)	0,61
Tp <sub>total</sub> (mg GAE/día)	1906 (839)	855 (160)	1916 (753)	1898 (915)	0,77
Tp <sub>sin café</sub> (mg GAE/día)	1730 (782)	818 (159)	1727 (651)	1732 (883)	0,61
FRAP <sub>total</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> /día)	19978 (11732)	6701 (1747)	19388 (10497)	20442 (12790)	0,91
FRAP <sub>sin café</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> /día)	13419 (9076)	5432 (1491)	12329 (5750)	14276 (11048)	0,91
TEAC-ABTS <sub>total</sub> (µmol TE/día)	7100 (3874)	2792 (680)	7159 (3589)	7055 (4149)	0,82
TEAC-ABTS <sub>sin café</sub> (µmol TE/día)	5246 (3153)	2436 (661)	5163 (2368)	5311 (3697)	0,64
<b>CAT-D derivado del R-24H</b>					
ORAC <sub>total</sub> (µmol TE/día)	22877 (14759)	7449 (3003)	25004 (12883)	21205 (16114)	0,58
ORAC <sub>sin café</sub> (µmol TE/día)	15253 (8768)	6278 (3776)	16811 (8486)	14030 (8943)	0,24
Tp <sub>total</sub> (mg GAE/día)	1466 (832)	722 (273)	1608 (746)	1355 (892)	0,12
Tp <sub>sin café</sub> (mg GAE/día)	1336 (788)	775 (351)	1468 (722)	1233 (835)	0,12
FRAP <sub>total</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> /día)	13971 (10446)	3370 (1467)	14481 (8319)	13570 (11993)	0,47
FRAP <sub>sin café</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> /día)	9572 (7336)	3065 (1355)	9525 (5349)	9609 (8684)	0,27
TEAC-ABTS <sub>total</sub> (µmol TE/día)	5083 (3538)	1226 (485)	5330 (3118)	4890 (3882)	0,43
TEAC-ABTS <sub>sin café</sub> (µmol TE/día)	3828 (2694)	1052 (392)	3921 (2334)	3755 (2986)	0,45

<sup>1</sup>Datos dietéticos derivados del CFCA.

<sup>2</sup>Media Geométrica obtenida usando modelo lineal generalizado ajustando por edad, sexo e ingesta de energía.

<sup>3</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de la t de Student y test de Wilcoxon para variables continuas y test de la chi-cuadrado para variables categóricas.

### 5.2.5. Estimación de la CAT-D por grupo de alimentos

En las **figuras 31 y 32** se muestra la contribución de la CAT-D de grupos de alimentos a la CAT-D global, tanto para el CFCA (**30**) como para el R-24H (**31**). Como se observa, el grupo de frutas y zumos y el grupo de vegetales son los que mayor aportación mostraron a la CAT-D global. Los porcentajes de contribución a la CAT-D considerando el CFCA fueron:  $ORAC_{\text{frutas\&zumos}} = 39,8\%$  y  $ORAC_{\text{vegetales}} = 21,1\%$ ;  $Tp_{\text{frutas\&zumos}} = 39,1\%$  y  $Tp_{\text{vegetales}} = 17,3\%$ ;  $FRAP_{\text{frutas\&zumos}} = 32,2\%$  y  $FRAP_{\text{vegetales}} = 16,3\%$ ;  $TEAC-ABTS_{\text{frutas\&zumos}} = 32,5\%$  y  $TEAC-ABTS_{\text{cereales}} = 14,1\%$ . Un patrón similar se observó para los porcentajes de contribución a la CAT-D en el R-24HR:  $ORAC_{\text{frutas\&zumos}} = 33,1\%$  y  $ORAC_{\text{vegetales}} = 26,0\%$ ;  $Tp_{\text{frutas\&zumos}} = 28,8\%$  y  $Tp_{\text{vegetales}} = 23,2\%$ ;  $FRAP_{\text{frutas\&zumos}} = 35,7\%$  y  $FRAP_{\text{vegetales}} = 21,6\%$ ;  $TEAC-ABTS_{\text{frutas\&zumos}} = 37,1\%$  y  $TEAC-ABTS_{\text{cereales}} =$

20,0%. La contribución de la CAT de los vegetales a la CAT-D global fue, en general, más elevada en el R-24H que en el CFCA.

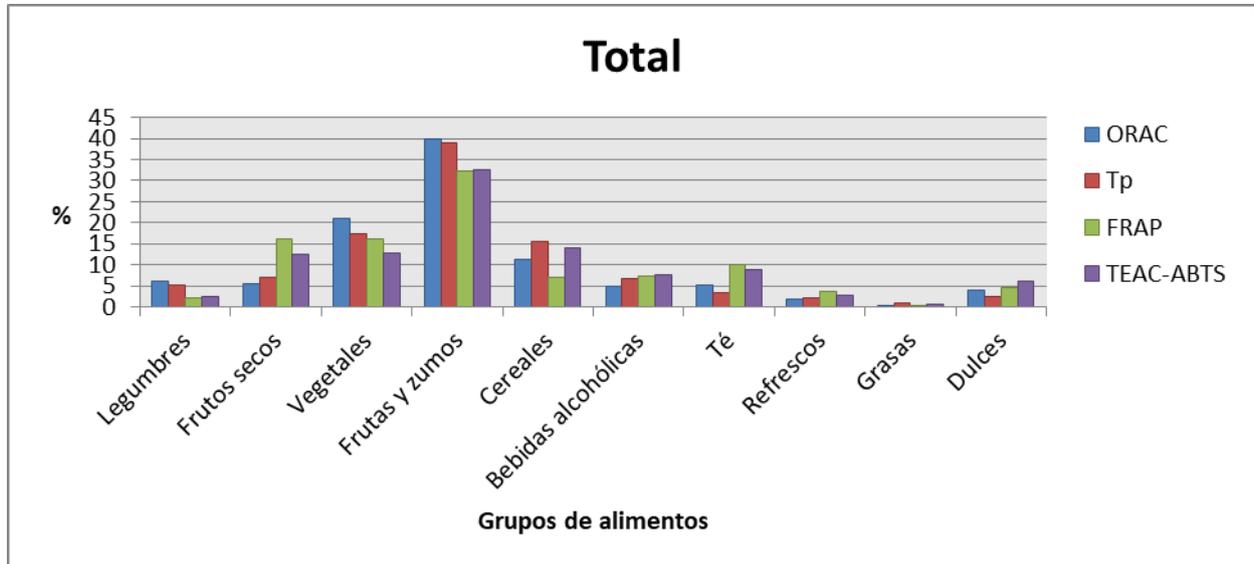


Figura 31. Porcentaje de contribución a la CAT-D global según grupo de alimentos (sin la contribución de la CAT del café) derivado del CFCA.

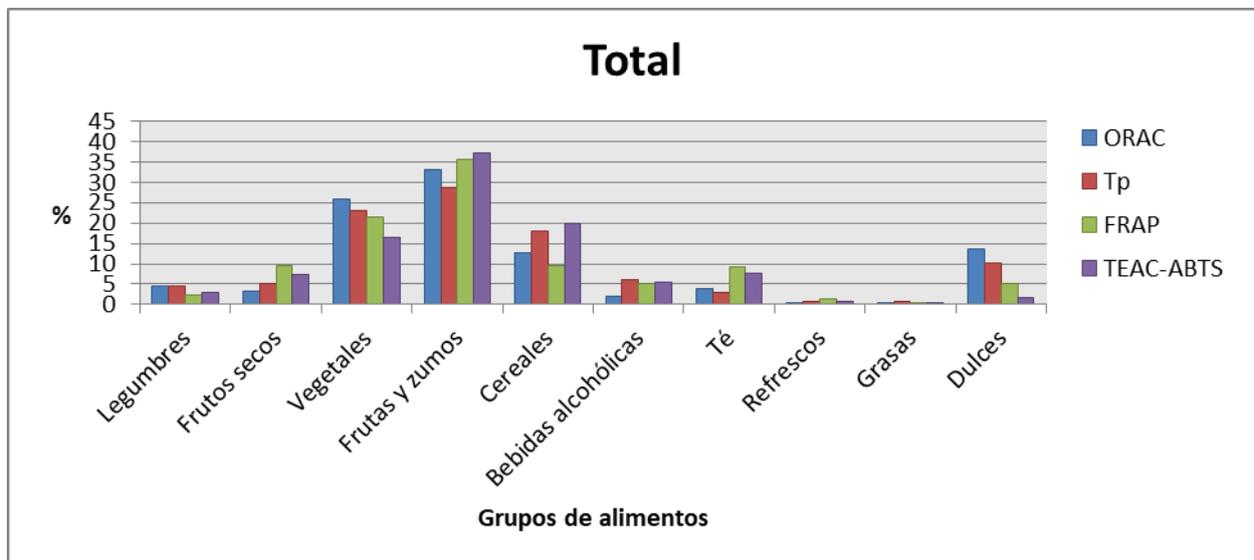


Figura 32. Porcentaje de contribución a la CAT-D global según grupo de alimentos (sin la contribución de la CAT del café) derivado del R-24H.

### 5.2.6. Análisis de correlación entre la CAT-D y la CANE-P

En la **tabla 19** se muestran los resultados del análisis de correlación entre los valores de CAT-D obtenidos en el CFCA y R-24H y la CANE-P. Se observaron correlaciones estadísticamente significativas para el ensayo FRAP (teniendo en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,30$  y  $p=0,04$ ; sin tener en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,31$  y  $p=0,03$ ). También se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre los valores de CAT-D obtenidos del R-24H para el ensayo ORAC y los valores de CANE-P para el ensayo ORAC sin proteínas (teniendo en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,36$  y  $p=0,01$ ; sin tener en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,31$  y  $p=0,03$ ) y entre los valores de CAT-D obtenidos del R-24H para el ensayo FRAP y los valores de CANE-P para el ensayo FRAP (teniendo en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,30$  y  $p=0,04$ ).

Las correlaciones entre los valores de CAT-D obtenidos a través del CFCA para el ensayo FRAP y la CANE-P en términos de FRAP, se mantuvieron estadísticamente significativas tras ajustar por ingesta de energía total, sexo y edad (teniendo en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,39$  y  $p=0,01$ ; sin tener en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,31$  y  $p=0,03$ ). Lo mismo se observó para los valores de CAT-D obtenidos a través del R-24H y los valores de CANE-P para el ensayo FRAP (sin tener en cuenta la contribución del café:  $\rho=0,30$  y  $p=0,03$ ). Los coeficientes de correlación también alcanzaron la significación estadística entre los valores de CAT-D en el R-24H para el ensayo ORAC y los valores de CANE-P para el ensayo ORAC sin proteínas cuando se tuvo en cuenta la contribución del café ( $\rho=0,35$  y  $p=0,01$ ).

Finalmente, también se observaron coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p<0,001$ ) entre los valores de CAT-D estimados mediante el CFCA y los valores de CAT-D estimados mediante el R-24H. Los coeficientes de correlación fueron del rango  $0,54$  a  $0,69$ , dependiendo del tipo de ensayo para medir la CAT. Estos coeficientes de correlación se mantuvieron estadísticamente significativos tras ajustar por ingesta de energía total, sexo y edad, en un rango de  $0,54$  a  $0,71$ .

Los coeficientes de correlación entre los valores de CAT-D y CANE-P para el ensayo FRAP, sin tener en cuenta la contribución del ácido úrico, fueron de magnitud similar ( $\rho\sim 0,27$ ).

**Tabla 19.** Coeficientes de correlación entre los valores de CAT-D (derivados del CFCA y del R-24H) y los valores de CANE-P.

Variables	rho <sup>1</sup>	rho <sup>2</sup>	rho <sup>3</sup>
<b>CAT-D derivado del CFCA – CANE-P</b>			
ORAC (μmol TE/día) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0,11	0,10	0,10
ORAC sin café (μmol TE/día) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0,04	0,03	0,03
ORAC (μmol TE/día) – Plasma ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	0,21	0,27	0,27
ORAC sin café (μmol TE/día) – Plasma ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	0,08	0,12	0,12
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,21	0,15	0,15
Tp sin café (mg GAE /día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,16	0,11	0,11
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – Plasma FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,30*	0,39*	0,39*
FRAP sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – Plasma FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,31*	0,31*	0,31*
TEAC-ABTS (μmol TE/día) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0,06	0,12	0,12
TEAC-ABTS sin café (μmol TE/día) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	-0,01	0,09	0,09
<b>CAT-D derivado del R-24H – CANE-P</b>			
ORAC (μmol TE/día) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0,18	0,16	0,16
ORAC sin café (μmol TE/día) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0,25	0,15	0,15
ORAC (μmol TE/día) – Plasma ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	0,36*	0,35*	0,35*
ORAC sin café (μmol TE/día) – Plasma ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	0,31*	0,27	0,27
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,01	-0,03	-0,03
Tp sin café (mg GAE /día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,03	-0,03	-0,03
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – Plasma FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,26	0,28	0,28
FRAP sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – Plasma FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,30*	0,30*	0,30*
TEAC-ABTS (μmol TE/día) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0,12	0,07	0,07
TEAC-ABTS sin café (μmol TE/día) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0,23	0,14	0,14
<b>CAT-D derivado del CFCA – CAT-D derivado del R-24H</b>			
ORAC CFCA (μmol TE/día) – ORAC R-24H (μmol TE/día)	0,69**	0,67**	0,67**
ORAC sin café CFCA (μmol TE/día) – ORAC sin café R-24H (μmol TE/día)	0,61**	0,71**	0,71**
Tp CFCA (mg GAE/día) – Tp R-24H (mg GAE/día)	0,64**	0,69**	0,69**
Tp CFCA sin café (mg GAE /día) – Tp R-24H sin café (mg GAE/día)	0,60**	0,70**	0,70**
FRAP CFCA (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – FRAP R-24H (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	0,62**	0,57**	0,57**
FRAP CFCA sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día) – FRAP R-24H sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	0,56**	0,62**	0,62**
TEAC-ABTS CFCA (μmol TE/día) – TEAC-ABTS R-24H (μmol TE/día)	0,62**	0,60**	0,60**
TEAC-ABTS CFCA sin café (μmol TE/día) – TEAC-ABTS R-24H sin café (μmol TE/día)	0,54**	0,54**	0,54**

<sup>1</sup>Correlación de Spearman (método no paramétrico).

<sup>2</sup>Correlación parcial ajustada por ingesta de energía (kcal/día).

<sup>3</sup>Correlación parcial ajustada adicionalmente por: sexo y edad (años).

 \*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0,001$ ).

En los análisis estratificados realizados según IMC, nivel de actividad física, hábito tabáquico y consumo de suplementos nutricionales, se observaron correlaciones de CAT-D y CANE-P similares en el ensayo FRAP en los siguientes grupos: Sujetos con normopeso ( $n=29$ ; CANE-P y CAT-D del CFCA  $\rho=0,31$ ,  $p=0,1$ ), sujetos con sobrepeso u obesidad ( $n=21$ ), sujetos sedentarios ( $n=36$ , CANE-P y CAT-D del CFCA  $\rho=0,30$ ,  $p=0,1$ ) o físicamente activos ( $n=14$ ), sujetos no fumadores ( $n=42$ , CANE-P y CAT-D del CFCA  $\rho=0,26$ ,  $p=0,1$ ) o sujetos no consumidores de suplementos ( $n=48$ , CANE-P y CAT-D del CFCA  $\rho=0,31$ ,  $p=0,3$ ).

### 5.2.7. Análisis de correlación cruzado entre la CAT-D y la CANE-P

En la **tabla 20** se muestran las correlaciones entre los valores de CAT-D y CANE-P tras la realización de un análisis cruzado. Se observaron coeficientes de correlación positivos y estadísticamente significativos entre los valores de CANE-P para el ensayo FRAP y los valores de CAT-D obtenidos mediante el CFCA de todos los ensayos (ORAC, Tp y TEAC-ABTS) en un rango de  $\rho=0,29$  a  $0,43$ , con y sin la contribución del valor de CAT del café. Además, en los valores de CAT-D obtenidos mediante el R-24H, los coeficientes de correlación entre los valores de CANE-P (FRAP) y cada uno de los ensayos de CAT-D, fueron de una magnitud similar.

Además, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los valores de CANE-P para el ensayo ORAC sin la contribución de las proteínas y los valores de CAT-D obtenidos mediante el R-24H de todos los ensayos (Tp, FRAP y TEAC-ABTS) en un rango de  $\rho=0,29$  a  $0,40$ , con y sin la contribución del valor de CAT del café.

Finalmente, también se observan correlaciones por encima de  $\rho=0,5$  entre los valores de CANE-P del ensayo ORAC y el ensayo FRAP.

**Tabla 20.** Coeficientes de correlación del análisis cruzado entre valores de CAT-D y CANE-P.

Variables	ORAC del plasma sin proteínas		FRAP del plasma	
	$\rho^1$	$\rho^2$	$\rho^1$	$\rho^2$
<b>Ensayos CAT-D del CFCA</b>				
ORAC	-	-	0,31*	0,37*
ORAC sin café	-	-	0,34*	0,39*
Tp	0,18	0,28	0,34*	0,41**
Tp sin café	0,18	0,26	0,38*	0,42**
FRAP	0,21	0,27	-	-
FRAP sin café	0,08	0,08	-	-
TEAC-ABTS	0,20	0,28	0,34*	0,43**
TEAC-ABTS sin café	0,11	0,13	0,35*	0,39*
<b>Ensayos CAT-D del R-24H</b>				
ORAC	-	-	0,42*	0,43*
ORAC sin café	-	-	0,34*	0,40*
Tp	0,40**	0,32*	0,39*	0,43**
Tp sin café	0,39*	0,29*	0,37*	0,43**
FRAP	0,29*	0,27	-	-
FRAP sin café	0,30*	0,21	-	-
TEAC-ABTS	0,33*	0,27	0,28	0,29*
TEAC-ABTS sin café	0,32*	0,21	0,25	0,26
<b>Ensayos CANE-P</b>				
ORAC sin proteínas	-	-	0,52**	0,52**
Tp	-0,25	-0,25	0,06	0,06
FRAP	0,52**	0,52**	-	-
TEAC-ABTS	0,11	0,11	-0,04	-0,04

<sup>1</sup> Correlación de Spearman (método no paramétrico).

<sup>2</sup> Correlación parcial ajustada por ingesta de energía (kcal/día), sexo y edad (años).

\*Coeficiente de correlación significativo ( $p<0.05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p<0.001$ ).

### 5.2.8. Análisis de correlación entre la CAT-D y la CANE-P por grupos de alimentos

En la **tabla 21**, se muestran los resultados del análisis de correlación entre la CAT-D de diferentes grupos de alimentos y la CANE-P. El coeficiente de correlación fue estadísticamente significativo para la relación entre la CANE-P del ensayo FRAP y la CAT-D para el ensayo FRAP de los vegetales, tanto el obtenido por el CFCA como por el R-24H ( $\rho=0,28$  y  $p=0,05$ ). Estas correlaciones se debilitaron después del ajuste por ingesta de energía total, sexo y edad en el CFCA ( $\rho=0,27$  y  $p=0,06$ ), pero no en el R-24H ( $\rho=0,29$  y  $p=0,04$ ). En cuanto a la CAT-D del ensayo ORAC de los vegetales, derivado del R-24H, presentó una correlación estadísticamente significativa con el ensayo ORAC en plasma ( $\rho=0,30$  y  $p=0,04$ ), pero únicamente en el análisis en crudo, es decir, sin ajustar por ingesta de energía total, sexo y edad. La correlación entre la CAT-D del ensayo FRAP de frutas y zumos, estimado en el R-24H, y la CANE-P del ensayo FRAP alcanzó la significación estadística ( $\rho=0,30$  y  $p=0,03$ ) y ésta se mantuvo tras el ajuste por ingesta de energía total, sexo y edad ( $\rho=0,29$  y  $p=0,04$ ). Por el contrario, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas cuando se consideraron valores de FRAP dietético (CAT-D) estimados en el CFCA.

En cuanto a la CANE-P para el ensayo ORAC con el CAT-D para los frutos secos, se observó una correlación débil al considerar la información dietética derivada del CFCA ( $\rho=0,25$  y  $p=0,08$ ) y, también, del R-24H ( $\rho=0,26$  y  $p=0,07$ ).

El análisis de correlación ajustado por ingesta de energía total, sexo y edad entre los valores de CAT-D por grupos de alimentos y los valores de CAT-D derivados tanto del CFCA como del R-24H mostró mayores coeficientes de correlación para el grupo de las frutas y zumos ( $\rho\sim 0,5$ ), seguidas por el grupo de los vegetales (en el rango de  $\rho=0,33$  para el ensayo ORAC a  $\rho=0,53$  para el ensayo TEAC-ABTS) y el grupo de las bebidas alcohólicas ( $\rho=0,31$  para el ensayo Tp).

**Tabla 21.** Coeficientes de correlación entre los valores de CAT-D (derivados del CFCA y del R-24H) según grupos de alimentos y CANE-P.

Variables	FRUTAS & ZUMOS			FRUTOS SECOS	BEBIDAS ALCOHÓLICAS
	VEGETALES	CEREALES			
<b>CAT-D derivado del CFCA – CANE-P (crudo)</b>					
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,01	0,04	0,12	0,27	-0,02
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,03	0,04	-0,05	-0,11	0,23
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,10	0,15	0,03	-0,02	-0,09
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – Plasma FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,14	0,28*	-0,03	-0,06	0,10
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,03	-0,16	-0,03	0,01	-0,07
<b>CAT-D derivado del CFCA – CANE-P (ajustado)</b>					
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,01	0,03	0,14	0,25	-0,04
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,10	0,07	0,08	-0,01	0,24
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,09	0,15	-0,03	-0,07	-0,14
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – Plasma FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,13	0,27	0,03	-0,03	0,09
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,12	-0,13	0,05	0,04	-0,01
<b>CAT-D derivado del R-24H – CANE-P (crudo)</b>					
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,19	0,29*	0,07	-0,01	-0,01
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,15	0,20	0,24	0,04	0,07
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,15	0,07	-0,13	-0,11	0,04
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – Plasma FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,30*	0,28*	-0,10	0,07	0,08
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,19	0,03	0,08	0,07	0,02
<b>CAT-D derivado del R-24H – CANE-P (ajustado)</b>					
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,23	0,25	-0,14	0,26	-0,22
ORAC ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,18	0,15	0,06	0,25	-0,22
Tp (mg GAE/día) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0,19	0,09	-0,17	-0,03	0,04
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – Plasma FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,29*	0,29*	-0,10	0,05	0,03
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – Plasma TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,21	0,03	0,01	0,16	-0,07
<b>CAT-D derivado del CFCA – CAT-D derivado del R-24H (crudo)</b>					
ORAC CFCA ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – ORAC R-24H ( $\mu\text{mol TE/día}$ )	0,54**	0,38*	0,01	0,08	0,35*
Tp CFCA (mg GAE/día) – Tp R-24H (mg GAE/día)	0,53**	0,36*	0,17	0,08	0,53**
FRAP CFCA ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – FRAP R-24H ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ )	0,53**	0,52**	0,07	0,15	0,43*
TEAC-ABTS CFCA ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – TEAC-ABTS R-24H ( $\mu\text{mol TE/día}$ )	0,51**	0,54**	0,33*	0,12	0,46**
<b>CAT-D derivado del CFCA – CAT-D derivado del R-24H (ajustado)</b>					
ORAC CFCA ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – ORAC R-24H ( $\mu\text{mol TE/día}$ )	0,48*	0,33*	-0,04	0,18	0,06
Tp CFCA (mg GAE/día) – Tp R-24H (mg GAE/día)	0,51*	0,35*	0,10	0,12	0,31*
FRAP CFCA ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ ) – FRAP R-24H ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{día}$ )	0,51*	0,50**	0,13	0,13	0,14
TEAC-ABTS CFCA ( $\mu\text{mol TE/día}$ ) – TEAC-ABTS R-24H ( $\mu\text{mol TE/día}$ )	0,48*	0,53**	0,07	0,13	0,17

Correlación parcial ajustada por ingesta de energía (kcal/día), sexo y edad (años).

 \*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0.05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0.001$ ).

## 5.3. Estudio transversal II

### 5.3.1. Análisis descriptivo de la población de estudio

Las principales características de la población de estudio se muestran en la **tabla 22**. La mayoría de los participantes fueron mujeres jóvenes, no fumadoras y físicamente inactivas respecto a la población de hombres, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Además, el grupo de los hombres presentó una mayor circunferencia de cintura ( $p < 0,001$ ), un mayor IMC y un mayor nivel educacional que las mujeres ( $p < 0,05$ ). También se observaron diferencias significativas respecto al sexo en la ingesta de energía total ( $p < 0,001$ ) y en la ingesta de la mayoría de los nutrientes antioxidantes y valores de CAT-D. Por el contrario, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres y hombres en la ingesta de frutas, frutos secos y semillas, vegetales, bebidas azucaradas, café y té, mientras que sí se apreciaron diferencias significativas en la ingesta del resto de grupos de alimentos y bebidas alcohólicas, incluido el vino tinto.

**Tabla 22:** Características socio-demográficas y dietéticas en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.

Variables	Todos (n=210)	Hombres (n=63)	Mujeres (n=147)	p-valor <sup>2</sup>
	Mediana [IQR] <sup>1</sup>	Mediana [IQR]	Mediana [IQR]	
Edad	48,8 [41,4;55,2]	51,9 [46,6;57,1]	46,3 [39,9;53,1]	0,001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,2 [24,8;30,4]	28 [25,9;30,7]	26,4 [24,2;30,2]	0,042
Circunferencia de cintura (cm)	89,0 [79,6;97,9]	99,5 [93,5;106]	84,7 [76,5;91,0]	<0,001
Número de cigarrillos/día	10,0 [5,00;20,0]	17,5 [7,00;20,0]	9,00 [3,00;12,0]	0,103
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
Centro				<0,001
	Granada	17,0 (27,0)	88,0 (59,9)	
	Guipúzcoa	105 (50,0)	59,0 (40,1)	
Hábito tabáquico				<0,001
	No fumadores	130 (61,9)	105 (71,4)	
	Exfumadores	34,0 (16,2)	15,0 (10,2)	
	Fumadores	45,0 (21,4)	26,0 (17,7)	
Actividad física				<0,001
	Inactivos	78,0 (37,1)	73,0 (49,7)	
	Moderadamente inactivos	68,0 (32,4)	49,0 (33,3)	
	Moderadamente activos	41,0 (19,5)	17,0 (11,6)	
	Activos	23,0 (11,0)	8,00 (5,44)	
Nivel educativo				0,088
	Ninguno	72,0 (34,6)	59,0 (40,4)	
	Estudios primarios	90,0 (43,3)	56,0 (38,4)	
	Estudios secundarios	16,0 (7,70)	11,0 (7,53)	
	Estudios Profesionales	12,0 (5,80)	10,0 (6,85)	
	Estudios Universitarios	18,0 (8,70)	10,0 (6,85)	
<b>Características dietéticas<sup>3</sup></b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	
Ingesta energética (kcal/día)	1875 [1548;2310]	2432 [2175;2934]	1712 [1421;1999]	<0,001
Frutas, frutos secos y semillas (g/día)	271 [144;415]	290 [155;464]	256 [143;395]	0,22
Vegetales (g/día)	206 [123;297]	211 [118;313]	206 [132;285]	0,954
Legumbres (g/día)	37,2 [23,3;63,4]	48,0 [29,8;102]	35,0 [22,6;51,2]	0,001
Cereales (g/día)	202 [135;260]	261 [202;326]	173 [127;232]	<0,001
Carne y productos cárnicos (g/día)	101 [69,2;148]	140 [102;163]	89,6 [65,3;120]	<0,001
Pescado y marico (g/día)	54,3 [32,3;83,2]	79,7 [49,3;120]	49,3 [27,2;69,9]	<0,001
Leche y derivados lácteos (g/día)	253 [161;376]	246 [150;333]	258 [166;399]	0,232
Bebidas alcohólicas (g/día)	25,4 [0,00;184]	271 [106;506]	0,86 [0,00;54,6]	<0,001
Vino tinto (g/día)	0,00 [0,00;40,2]	100 [0,00;192]	0,00 [0,00;0,00]	<0,001
Refrescos (g/día)	158 [65,2;257]	143 [87,7;240]	175 [57,3;268]	0,575
Café (g/día)	84,4 [3,36;152]	98,3 [26,8;131]	76,8 [2,93;174]	0,901
Té (g/día)	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,684
Flavonoides (mg/día)	282 [206;462]	441 [270;641]	258 [178;375]	<0,001
β-caroteno (μg/día)	2045 [1352;3108]	2205 [1486;3770]	1970 [1325;2905]	0,258
Retinol (μg/día)	273 [173;420]	296 [221;454]	259 [162;400]	0,037
α-tocoferol (mg/día)	11,1 [7,86;15,0]	13,2 [10,9;17,7]	9,75 [7,46;13,5]	<0,001
Vitamina C (mg/día)	128 [86,7;170]	137 [93,1;184]	124 [81,0;165]	0,189
Fe (mg/día)	13,9 [10,6;17,9]	18,6 [16,2;22,0]	12,1 [9,75;15,3]	<0,001
Alcohol (g/día)	1,66 [0,01;11,8]	20,0 [6,54;40,0]	0,19 [0,00;3,34]	<0,001
TRAP (μmol TE/día)	8990 [3764;15231]	10830 [5663;16160]	8083 [3431;14836]	0,025
TRAP <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	2771 [1876;4631]	4584 [3103;7025]	2285 [1748;3548]	<0,001
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	22388 [11079;33821]	26226 [17529;36363]	19713 [9421;33458]	0,009
FRAP <sub>sin café</sub> (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	8765 [6560;13636]	14221 [10581;17979]	7720 [5948;11355]	<0,001
TEAC-ABTS (μmol TE/día)	6855 [3625;10336]	8304 [5844;11608]	6130 [3176;10050]	0,003
TEAC-ABTS <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	3083 [2321;4828]	4791 [3417;6665]	2739 [2037;4002]	<0,001
ORAC (μmol TE/día)	31501 [15818;48097]	33193 [21398;44293]	28174 [14444;49880]	0,286
ORAC <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	12042 [8597;16299]	14300 [10447;19927]	11338 [8040;15434]	<0,001
Tp <sub>sin café</sub> (mg GAE/día)	1519 [1108;2033]	1760 [1386;2511]	1433 [1056;1938]	<0,001

<sup>1</sup>IQR = P25-P75.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de la t de Student y test de Wilcoxon para variables continuas y test de la chi-cuadrado para variables categóricas.

<sup>3</sup>Datos dietéticos derivados del cuestionario de historia dietética.

Dato faltante: Hábito tabáquico (n=1).

En cambio, según el centro de reclutamiento (**tabla 23**), existió una mayor proporción de mujeres en la submuestra de la cohorte de EPIC-Granada y una mayor tasa de población sin estudios o estudios básicos, no fumadores y físicamente inactivos que en la submuestra de la cohorte de EPIC-Guipúzcoa, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Además, en EPIC-Guipúzcoa, la ingesta de energía fue significativamente mayor que en EPIC-Granada ( $p < 0,001$ ) y, como consecuencia, también se observaron ingestas significativamente mayores de nutrientes antioxidantes y de CAT-D ( $p < 0,001$ ) en EPIC-Guipúzcoa que en EPIC-Granada.

**Tabla 23:** Características socio-demográficas y dietéticas en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según centro.

Variables	Todos (n=210)	Granada (n=105)	Guipúzcoa (n=105)	p-valor <sup>2</sup>
	Mediana [IQR] <sup>1</sup>	Mediana [IQR]	Mediana [IQR]	
Edad	48,8 [41,4;55,2]	50,0 [40,1;58,7]	48,0 [41,9;52,8]	0,417
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,2 [24,8;30,4]	27,7 [25,1;31,4]	26,6 [24,3;29,2]	0,041
Circunferencia de cintura (cm)	89,0 [79,6;97,9]	89,0 [81,0;96,4]	90,3 [78,1;99,0]	0,821
Número de cigarrillos/día	10,0 [5,00;20,0]	9,50 [5,50;19,7]	15,0 [4,50;20,0]	0,214
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
Sexo				
Hombres	63,0 (30,0)	17,0 (16,2)	46,0 (43,8)	<0,001
Mujeres	147 (70,0)	88,0 (83,8)	59,0 (56,2)	
Hábito tabáquico				
No fumadores	130 (61,9)	77,0 (73,3)	53,0 (50,5)	0,003
Exfumadores	34,0 (16,2)	11,0 (10,5)	23,0 (21,9)	
Fumadores	45,0 (21,4)	17,0 (16,2)	28,0 (26,7)	
Actividad física				
Inactivos	78,0 (37,1)	53,0 (50,5)	25,0 (23,8)	<0,001
Moderadamente inactivos	68,0 (32,4)	34,0 (32,4)	34,0 (32,4)	
Moderadamente activos	41,0 (19,5)	10,0 (9,52)	31,0 (29,5)	
Activos	23,0 (11,0)	8,00 (7,62)	15,0 (14,3)	
Nivel educativo				
Ninguno	72,0 (34,6)	48,0 (46,6)	24,0 (22,9)	0,001
Estudios primarios	90,0 (43,3)	32,0 (31,1)	58,0 (55,2)	
Estudios secundarios	16,0 (7,70)	5,00 (4,85)	11,0 (10,5)	
Estudios Profesionales	12,0 (5,80)	7,00 (6,80)	5,00 (4,76)	
Estudios Universitarios	18,0 (8,70)	11,0 (10,7)	7,00 (6,67)	
<b>Características dietéticas<sup>3</sup></b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	
Ingesta energética (kcal/día)	1875 [1548;2310]	1633 [1406;1956]	2178 [1834;2591]	<0,001
Frutas, frutos secos y semillas (g/día)	271 [144;415]	254 [143;362]	304 [147;457]	0,155
Vegetales (g/día)	206 [123;297]	197 [119;271]	216 [139;327]	0,144
Legumbres (g/día)	37,2 [23,3;63,4]	35,0 [24,3;48,6]	45,1 [23,3;85,7]	0,001
Cereales (g/día)	202 [135;260]	188 [126;242,0]	213 [155;271]	0,009
Carne y productos cárnicos (g/día)	101 [69,2;148]	85,4 [60,7;112]	124 [83,3;161]	<0,001
Pescado y marico (g/día)	54,3 [32,3;83,2]	49,3 [28,3;74,1]	62,7 [43,6;109]	0,001
Leche y derivados lácteos (g/día)	253 [161;376]	260 [168;371]	250 [157;396]	0,673
Bebidas alcohólicas (g/día)	25,4 [0,00;184]	0,00 [0,00;42,9]	107 [16,1;283]	<0,001
Vino tinto (g/día)	0,00 [0,00;40,2]	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;139]	<0,001
Refrescos (g/día)	158 [65,2;257]	145 [50,0;250]	173 [103;268]	0,040
Café (g/día)	84,4 [3,36;152]	27,0 [1,29;100]	125 [57,1;196]	<0,001
Té (g/día)	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,00 [0,00;0,00]	0,964
Flavonoides (mg/día)	282 [206;462]	256 [178;379]	341 [235;476]	0,008
β-caroteno (μg/día)	2045 [1352;3108]	1829 [1301;2441]	2272 [1465;3769]	0,005
Retinol (μg/día)	273 [173;420]	231 [163;308]	343 [187;594]	<0,001
α-tocoferol (mg/día)	11,1 [7,86;15,0]	9,03 [7,11;11,5]	13,4 [9,66;17,6]	<0,001
Vitamina C (mg/día)	128 [86,7;170]	124 [83,7;170]	134 [87,5;172]	0,569
Fe (mg/día)	13,9 [10,6;17,9]	11,7 [9,52;14,3]	16,8 [13,0;19,6]	<0,001
Alcohol (g/día)	1,66 [0,01;11,8]	0,01 [0,00;2,26]	9,32 [1,39;23,1]	<0,001
TRAP (μmol TE/día)	8990 [3764;15231]	5102 [2606;10789]	12201 [7797;17526]	<0,001
TRAP <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	2771 [1876;4631]	2285 [1752;3524]	3597 [2262;5198]	<0,001
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	22388 [11079;33821]	13559 [8412;25517]	29230 [20427;38316]	<0,001
FRAP <sub>sin café</sub> (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	8765 [6560;13636]	7995 [6039;11404]	11411 [7617;15826]	<0,001
TEAC-ABTS (μmol TE/día)	6855 [3625;10336]	4465 [2826;7849]	9271 [6346;11529]	<0,001
TEAC-ABTS <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	3083 [2321;4828]	2816 [2077;3979]	4042 [2610;5657]	<0,001
ORAC (μmol TE/día)	31501 [15818;48097]	18769 [11338;38710]	41473 [27696;58649]	<0,001
ORAC <sub>sin café</sub> (μmol TE/día)	12042 [8597;16299]	10804 [7837;14300]	13765 [10049;18615]	<0,001
Tp <sub>sin café</sub> (mg GAE/día)	1519 [1108;2033]	1442 [1053;1910]	1630 [1277;2168]	0,005

<sup>1</sup>IQR = P25-P75.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según centro: Test de la t de Student y test de Wilcoxon para variables continuas y test de la chi-cuadrado para variables categóricas.

<sup>3</sup>Datos dietéticos derivados del cuestionario de historia dietética.

Dato faltante: Hábito tabáquico (n=1).

En la **tabla 24** se muestra la mediana e IQR (P25-P75) de los biomarcadores en plasma de la población de estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre mujeres y hombres en los valores de CANE-P mediante el ensayo FRAP con y sin la contribución del ácido úrico, mediante el ensayo TRAP y, también, mediante el ensayo ORAC desproteinizado. También se observan diferencias estadísticamente significativas en los carotenos totales ( $p < 0,001$ ), adiponectina ( $p = 0,014$ ), PAI-I ( $p = 0,008$ ) y resistina ( $p = 0,024$ ) entre ambos sexos.

**Tabla 24:** Niveles de biomarcadores en plasma en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.

Biomarcadores y CANE-P	Todos n=210		n	Hombres n=63		Mujeres n=147		p-valor <sup>2</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>		Mediana	[IQR]	Mediana	[IQR]	
Ácido ascórbico (μmol/L)	27,8	[20,9;46,3]	210	28,2	[23,9;54,0]	27,8	[20,4;42,7]	0,201
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00	[0,00;3,76]	210	0,00	[0,00;6,85]	0,00	[0,00;0,00]	0,007
Vitamina C total (μmol/L)	29,3	[21,4;52,5]	210	31,6	[24,3;64,3]	28,9	[20,4;44,5]	0,113
Retinol (μmol/L)	2,22	[1,85;2,73]	210	2,31	[1,94;2,81]	2,16	[1,79;2,66]	0,066
α-tocoferol (μmol/L)	28,4	[21,6;37,3]	210	27,3	[20,7;37,0]	29,4	[21,7;37,5]	0,410
Carotenos totales (μmol/L)	3,47	[2,34;6,73]	210	2,79	[1,80;4,27]	3,92	[2,62;7,65]	<0,001
Q9 (μmol/L)	0,05	[0,03;0,08]	210	0,05	[0,03;0,09]	0,05	[0,03;0,07]	0,727
Q10 (μmol/L)	1,16	[0,96;1,50]	210	1,17	[1,00;1,59]	1,15	[0,95;1,50]	0,662
Ácido úrico (mg/dl)	3,73	[3,05;4,48]	210	4,71	[3,96;5,41]	3,45	[2,92;4,03]	<0,001
FRAP (μmol TE/L)	457	[403;519]	210	528	[471;560]	428	[393;476]	<0,001
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	881	[808;982]	210	996	[910;1079]	853	[785;924]	<0,001
FRAP sin ácido úrico (μmol TE/L)	314	[267;355]	210	345	[312;387]	296	[257;341]	<0,001
FRAP sin ácido úrico (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	634	[574;699]	210	692	[630;754]	616	[556;678]	<0,001
TRAP (μmol TE/L)	976	[884;1073]	210	1034	[907;1116]	949	[867;1047]	0,001
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	3041	[2599;3677]	210	3115	[2508;3823]	3008	[2647;3384]	0,642
Tp (mg GAE/L)	1207	[1128;1276]	210	1206	[1126;1270]	1207	[1132;1277]	0,850
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1160	[946;1399]	210	1308	[1098;1555]	1124	[908;1358]	<0,001
ORAC (μmol TE/L)	14706	[12739;17005]	210	15138	[13185;17622]	14547	[12617;16648]	0,173
PCR (mg/L)	1,26	[0,76;2,38]	207	1,18	[0,76;2,15]	1,32	[0,76;2,50]	0,299
Adiponectina (μg/ml)	0,10	[0,07;0,15]	207	0,08	[0,06;0,11]	0,10	[0,07;0,17]	0,014
PAI-I (ng/ml)	20,0	[14,6;27,0]	210	22,9	[17,9;29,8]	19,4	[14,3;25,2]	0,008
Resistina (ng/ml)	14,2	[11,5;18,2]	210	13,3	[10,5;16,1]	14,4	[12,0;18,8]	0,024
TNF-α (pg/ml)	0,75	[0,58;1,00]	162	0,77	[0,62;1,06]	0,74	[0,51;0,98]	0,323
IL-8 (pg/ml)	1,08	[0,68;1,70]	146	1,09	[0,68;1,68]	1,06	[0,69;1,71]	0,850
IL-6 (pg/ml)	0,69	[0,69;0,69]	210	0,69	[0,69;0,69]	0,69	[0,69;0,69]	0,776

<sup>1</sup>IQR= P25-P75

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Según el centro de reclutamiento EPIC, se observaron diferencias estadísticamente significativas en algunos biomarcadores (como el retinol, ácido ascórbico, PCR, adiponectina, PAI-I resistina e IL-8) y en los valores de CANE-P, incluido el ácido úrico ( $p < 0,001$ ), tal y como se aprecia en la **tabla 25**.

**Tabla 25:** Niveles de biomarcadores en plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según centro.

Biomarcadores y CANE-P	Todos n=210		Granada n=105		Guipúzcoa n=105		p-valor <sup>2</sup>	
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	n	Mediana	[IQR]	Mediana		[IQR]
Ácido ascórbico (μmol/L)	27,8	[20,9;46,3]	210	24,0	[17,9;30,4]	42,1	[27,2;68,5]	<0,001
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00	[0,00;3,76]	210	0,00	[0,00;0,00]	3,49	[0,00;20,9]	<0,001
Vitamina C total (μmol/L)	29,3	[21,4;52,5]	210	24,3	[17,9;30,4]	47,4	[28,7;93,2]	<0,001
Retinol (μmol/L)	2,22	[1,85;2,73]	210	2,10	[1,72;2,45]	2,38	[1,98;2,87]	<0,001
α-tocoferol (μmol/L)	28,4	[21,6;37,3]	210	29,6	[22,9;36,2]	27,2	[20,4;39,2]	0,692
Carotenos totales (μmol/L)	3,47	[2,34;6,73]	210	3,80	[2,52;6,74]	3,18	[2,14;6,68]	0,244
Q9 (μmol/L)	0,05	[0,03;0,08]	210	0,04	[0,03;0,07]	0,05	[0,03;0,10]	0,212
Q10 (μmol/L)	1,16	[0,96;1,50]	210	1,15	[0,95;1,41]	1,17	[1,00;1,69]	0,272
Ácido úrico (mg/dl)	3,73	[3,05;4,48]	210	3,63	[3,08;4,37]	3,78	[2,97;4,84]	0,764
FRAP (μmol TE/L)	457	[403;519]	210	416	[383;478]	484	[444;543]	<0,001
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	881	[808;982]	210	860	[782;954]	917	[837;1023]	0,001
FRAP sin ácido úrico (μmol TE/L)	314	[267;355]	210	272	[249;318]	338	[309;378]	<0,001
FRAP sin ácido úrico (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	634	[574;699]	210	604	[545;680]	662	[600;730]	<0,001
TRAP (μmol TE/L)	976	[884;1073]	210	901	[852;1008]	1044	[938;1121]	<0,001
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	3041	[2599;3677]	210	2947	[2737;3230]	3152	[2403;4227]	0,150
Tp (mg GAE/L)	1207	[1128;1276]	210	1206	[1127;1261]	1209	[1130;1287]	0,533
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1160	[946;1399]	210	1077	[907;1284]	1280	[1094;1550]	<0,001
ORAC (μmol TE/L)	14706	[12739;17005]	210	14055	[11883;15971]	15463	[13995;17966]	<0,001
PCR (mg/L)	1,26	[0,76;2,38]	207	1,79	[1,04;3,13]	1,02	[0,52;1,94]	<0,001
Adiponectina (μg/ml)	0,10	[0,07;0,15]	207	0,08	[0,05;0,14]	0,11	[0,08;0,15]	0,002
PAI-I (ng/ml)	20,0	[14,6;27,0]	210	19,4	[14,3;24,3]	22,3	[15,1;30,1]	0,016
Resistina (ng/ml)	14,2	[11,5;18,2]	210	13,5	[10,8;16,7]	15,1	[12,0;19,2]	0,012
TNF-α (pg/ml)	0,75	[0,58;1,00]	162	0,80	[0,62;1,07]	0,70	[0,50;0,95]	0,058
IL-8 (pg/ml)	1,08	[0,68;1,70]	146	1,27	[0,90;2,05]	0,87	[0,60;1,31]	0,001
IL-6 (pg/ml)	0,69	[0,69;0,69]	210	0,69	[0,69;0,69]	0,69	[0,69;0,69]	0,788

<sup>1</sup>IQR= P25-P75

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Como se puede observar en las dos tablas anteriores (**tabla 24** y **tabla 25**), los biomarcadores de estrés oxidativo, LDL-ox y MDA, no se han incluido en las mismas. Esto se debe a que presentaron CVs demasiado elevados (>30%), considerándose conveniente excluirlos del estudio de correlación y asociación con el resto de biomarcadores. Además, un gran número de individuos de la población de estudio presentaba el valor del límite de detección, siendo muy reducido el número de individuos que presentaban valores dentro de los rangos normales para los biomarcadores en cuestión. Un resumen descriptivo de estos biomarcadores se muestra en la **tabla 26**.

**Tabla 26:** Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según sexo.

Biomarcadores de estrés oxidativo	Todos n=210		Hombres n=63			Mujeres n=147		p-valor <sup>2</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	n	Mediana	[IQR]	Mediana	[IQR]	
LDL-ox (mU/ml)	4398	[1762-11719]	210	3134	[1529-11719]	4840	[2123-6291]	0,674
MDA (μmol/L)	65,6	[58,7-92,5]	210	82,9	[65,4-125]	65,6	[55,6-76,2]	<0,001

<sup>1</sup>IQR= P25-P75<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

### 5.3.2. Análisis de correlaciones entre biomarcadores y CANE-P y

#### CAT-D

La **figura 33**, muestra los coeficientes de correlación entre los biomarcadores y CANE-P. El *heatmap* (mapa de calor) muestra una fuerte correlación ( $\rho > 0,6$ ) entre los valores del ensayo FRAP y el ácido úrico y correlaciones más leves entre el ensayo FRAP y el resto de ensayos de CANE-P ( $\rho > 0,3$ ). Además, se observaron correlaciones moderadamente débiles entre los niveles plasmáticos de nutrientes antioxidantes y el ensayo FRAP ( $\rho \sim 0,2$  a  $0,3$ ) y el ensayo TRAP ( $\rho \sim 0,2$  a  $0,4$ ), mientras que en el resto de ensayos de CANE-P no se apreciaron correlaciones con los nutrientes antioxidantes del plasma. Por el contrario, se encontraron correlaciones muy débiles entre algunos ensayos de CANE-P y la adiponectina ( $\rho \sim 0,1$  a  $0,2$ ) y moderadamente débiles entre algunos ensayos de CANE-P y PAI-I ( $\rho \sim 0,2$  a  $0,3$ ), pero no con el resto de biomarcadores de inflamación. Cabe destacar que los nutrientes antioxidantes se correlacionaron fuertemente entre ellos, aunque menos consistentemente con los biomarcadores de inflamación. Sin embargo, se apreció una tendencia negativa entre los nutrientes antioxidantes y los niveles de PCR e IL-8 ( $\rho \sim -0,1$  a  $-0,2$ ), es decir, altos niveles de nutrientes antioxidantes en plasma, se relacionaron con bajos niveles de PCR en plasma.

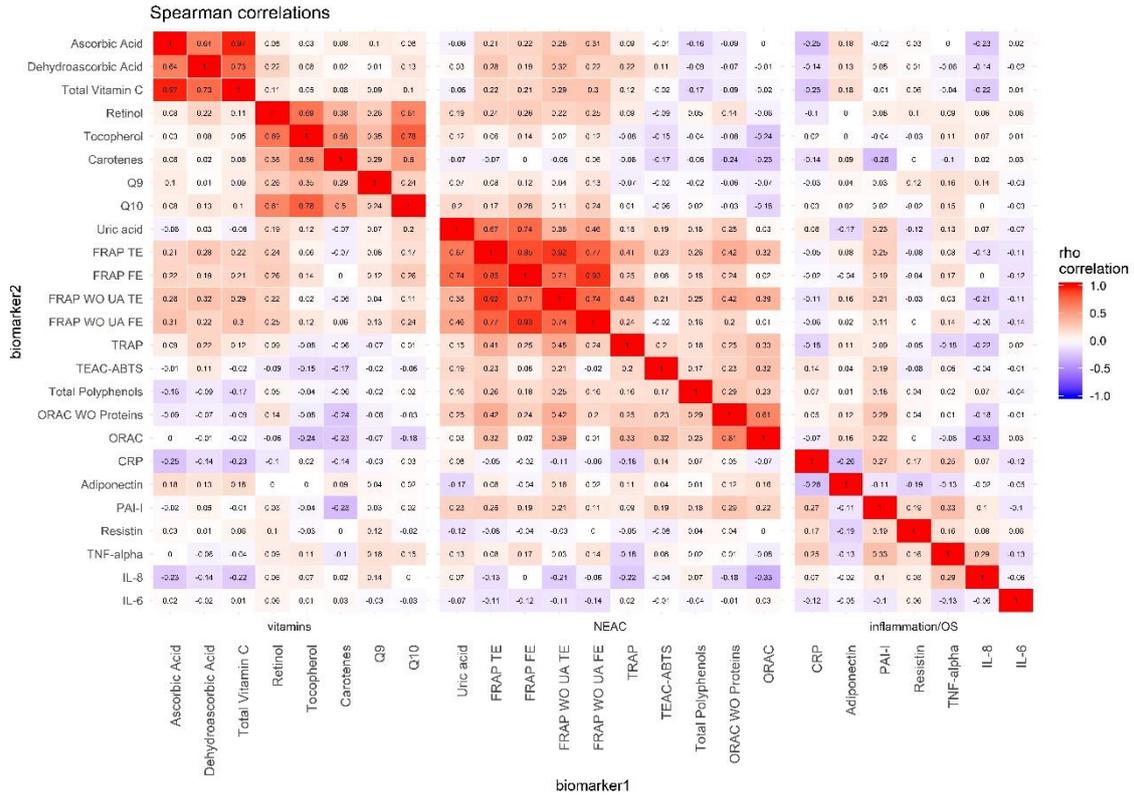


Figura 33: Matriz de correlaciones entre todos los biomarcadores del plasma (nutrientes antioxidantes, CANE-P e inflamación) en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de las asociaciones, siendo de color rojo las correlaciones positivas y de color azul las correlaciones negativas.

En cuanto a las correlaciones entre los valores de CAT-D y los biomarcadores del plasma (tabla 27), se encontraron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre el FRAP de la dieta y los valores del FRAP del plasma ( $\rho > 0,2$ ) y correlaciones más débiles entre el resto de los ensayos de CAT-D. Además, sólo se observaron altas correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre la CAT-D y el ácido ascórbico ( $\rho > 0,3$ ).

**Tabla 27:** Coeficientes de correlación entre la CAT-D y todos los biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Variables	FRAP	FRAP sin café	TRAP	TRAP sin café	TEAC-ABTS	TEAC-ABTS sin café	ORAC	ORAC sin café	Tp sin café
<b>Biomarcadores y CANE-P</b>									
Ácido ascórbico (μmol/L)	0,30**	0,16*	0,29**	0,14*	0,29**	0,15*	0,31**	0,21*	0,20*
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,30**	0,14*	0,29**	0,15*	0,29**	0,13	0,31**	0,19*	0,17*
Vitamina C total (μmol/L)	0,32**	0,16*	0,31**	0,14*	0,32**	0,15*	0,34**	0,22*	0,21*
Retinol (μmol/L)	0,05	0,02	0,05	0,02	0,05	0,02	0,04	-0,02	-0,01
α-tocoferol (μmol/L)	0,00	-0,09	0,00	-0,09	-0,01	-0,07	0,03	-0,03	0,00
Carotenos totales (μmol/L)	-0,11	-0,07	-0,12	-0,09	-0,12	-0,07	-0,03	0,08	0,12
Q9 (μmol/L)	-0,02	0,01	-0,04	-0,02	-0,02	0,04	-0,02	0,01	0,03
Q10 (μmol/L)	0,02	-0,04	0,02	-0,04	0,01	-0,03	0,03	-0,05	-0,03
Ácido úrico (mg/dl)	0,15*	0,18*	0,14*	0,16*	0,16*	0,17*	0,10	0,09	0,08
FRAP (μmol TE/L)	0,32**	0,29**	0,31**	0,27**	0,32**	0,26**	0,26**	0,20*	0,17*
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,18*	0,25**	0,17*	0,23**	0,19*	0,23**	0,11	0,15*	0,14*
FRAP sin ácido úrico (μmol TE/L)	0,35**	0,29**	0,33**	0,27**	0,34**	0,26**	0,29**	0,22*	0,19*
FRAP sin ácido úrico (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,18*	0,24**	0,16*	0,22*	0,18*	0,22*	0,10	0,13	0,13
TRAP (μmol TE/L)	0,12	0,18*	0,11	0,18*	0,10	0,14*	0,09	0,17*	0,14*
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,09	0,03	0,05	0,03
Tp (mg GAE/L)	-0,16*	-0,13	-0,14*	-0,12	-0,17*	-0,17*	-0,14*	-0,08	-0,08
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	0,22*	0,13	0,23*	0,15*	0,22*	0,12	0,17*	0,05	0,00
ORAC (μmol TE/L)	0,17*	0,15*	0,18*	0,16*	0,17*	0,14*	0,15*	0,10	0,06
PCR (mg/L)	-0,09	-0,12	-0,08	-0,09	-0,07	-0,08	-0,10	-0,10	-0,08
Adiponectina (μg/ml)	0,19*	0,00	0,20*	0,01	0,18*	-0,01	0,21*	0,04	0,03
PAI-I (ng/ml)	0,19*	0,10	0,19*	0,12	0,20*	0,11	0,14*	0,01	0,00
Resistina (ng/ml)	-0,05	-0,12	-0,03	-0,06	-0,04	-0,11	-0,03	-0,06	-0,08
TNF-α (pg/ml)	0,02	0,05	0,00	0,02	0,02	0,06	-0,04	-0,06	-0,04
IL-8 (pg/ml)	-0,15	-0,14	-0,15	-0,14	-0,14	-0,12	-0,15	-0,18*	-0,14
IL-6 (pg/ml)	-0,05	0,05	-0,06	0,07	-0,05	0,03	0,00	0,16*	0,15*
<b>CAT-D</b>									
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	-	0,42**	0,99**	0,41**	0,99**	0,42**	0,94**	0,31**	0,28**
FRAP sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	0,42**	-	0,35**	0,97**	0,47**	0,98**	0,24**	0,64**	0,64**
TRAP (μmol TE/día)	0,99**	0,35**	-	0,37**	0,98**	0,36**	0,94**	0,25**	0,21*
TRAP sin café (μmol TE/día)	0,41**	0,97**	0,37**	-	0,47**	0,96**	0,23**	0,59**	0,59**
TEAC-ABTS (μmol TE/día)	0,99**	0,47**	0,98**	0,47**	-	0,49**	0,92**	0,34**	0,31**
TEAC-ABTS sin café (μmol TE/día)	0,42**	0,98**	0,36**	0,96**	0,49**	-	0,25**	0,62**	0,63**
ORAC (μmol TE/día)	0,94**	0,24**	0,94**	0,23**	0,92**	0,25**	-	0,37**	0,34**
ORAC sin café (μmol TE/día)	0,31**	0,64**	0,25**	0,59**	0,34**	0,62**	0,37**	-	0,98**
Tp sin café (mg GAE/día)	0,28**	0,64**	0,21*	0,59**	0,31**	0,63**	0,34**	0,98**	-

Correlación de Spearman (método no paramétrico).

\*Coeficiente de correlación significativo (p&lt;0.05); \*\*Coeficiente de correlación significativo (p&lt;0.001).

Por otro lado, también se encontraron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre el CAT-D y los valores de ingesta de nutrientes antioxidantes como vitamina C, retinol, vitamina E y β-Caroteno ( $\rho \sim 0,2$  a  $0,8$ ) (tabla 28).

**Tabla 28:** Coeficientes de correlación entre vitaminas antioxidantes de la dieta, CAT-D, CANE-P y vitaminas antioxidantes del plasma en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Variables	Vitamina C <sup>1</sup>	Retinol <sup>1</sup>	Vitamina E <sup>1</sup>	β-Caroteno <sup>1</sup>
<b>Biomarcadores y CANE-P</b>				
Ácido ascórbico (μmol/L)	0,16*	0,14*	0,26**	0,25**
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,11	0,18*	0,26**	0,18*
Vitamina C total (μmol/L)	0,18*	0,16*	0,26**	0,24**
Retinol (μmol/L)	0,04	0,03	0,08	0,02
α-tocoferol (μmol/L)	0,11	-0,15*	-0,04	-0,05
Carotenos totales (μmol/L)	0,23**	-0,11	0,05	0,15*
FRAP (μmol TE/L)	0,06	0,17*	0,28**	0,00
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,06	0,12	0,20*	-0,03
FRAP sin ácido úrico (μmol TE/L)	0,09	0,18*	0,29**	0,05
FRAP sin ácido úrico (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	0,08	0,15*	0,17*	0,00
TRAP (μmol TE/L)	0,02	0,10	0,27**	0,14
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	-0,09	-0,02	0,02	-0,04
Tp (mg GAE/L)	-0,12	-0,07	-0,12	-0,20*
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	-0,13	0,12	0,09	-0,08
ORAC (μmol TE/L)	-0,02	0,07	0,19*	0,05
<b>CAT-D</b>				
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	0,19*	0,20*	0,33**	0,27**
FRAP sin café (μmol Fe <sup>2+</sup> /día)	0,52**	0,09	0,46**	0,45**
TRAP (μmol TE/día)	0,12	0,20*	0,29**	0,23*
TRAP sin café (μmol TE/día)	0,45**	0,07	0,43**	0,42**
TEAC-ABTS (μmol TE/día)	0,21*	0,20*	0,34**	0,29**
TEAC-ABTS sin café (μmol TE/día)	0,52**	0,10	0,44**	0,45**
ORAC (μmol TE/día)	0,24**	0,17*	0,33**	0,27**
ORAC sin café (μmol TE/día)	0,75**	0,01	0,54**	0,54**
Tp sin café (mg GAE/día)	0,85**	-0,03	0,52**	0,56**
<b>Vitaminas de la dieta</b>				
Vitamina C (mg/día)	-	-0,09	0,40**	0,54**
Retinol (μg/día)	-0,09	-	0,33**	0,13
Vitamina E (mg/día)	0,40**	0,33**	-	0,50**
β-Caroteno (μg/día)	0,54**	0,13	0,50**	-

Correlación de Spearman (método no paramétrico).

\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0.05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0.001$ ).

<sup>1</sup>Vitaminas de la dieta.

### 5.3.3. Estudio de asociación entre biomarcadores (regresión lineal multivariante)

Las asociaciones entre los biomarcadores del plasma y los niveles de CANE-P se muestran en la **tabla 29** para el ensayo TRAP y en la **tabla 30** para el ensayo FRAP. Se observó una asociación positiva entre el ensayo TRAP y otros ensayos de CANE-P en el modelo de regresión lineal (modelo 1) ajustado por edad, sexo y centro de reclutamiento (por ejemplo,  $\beta$  para  $\log_2 \text{FRAP} = 0,11$ ;  $p = 7,88E-03$ ), es decir, duplicidades en los valores de FRAP se asociaron en un aumento promedio de 0,11 en los valores de TRAP), pero no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con los nutrientes antioxidantes ni con los

biomarcadores de inflamación. Por el contrario, se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre FRAP y TRAP ( $\beta$  para  $\log_2$  TRAP=0,15;  $p=7,88E-03$ ), Tp ( $\beta$  para  $\log_2$ =0,26;  $p=4,20E-04$ ) y algunos nutrientes antioxidantes (para incrementos  $\log_2$  de estos valores): Ácido ascórbico ( $\beta=0,03$ ;  $p=2,38E-02$ ), retinol ( $\beta=0,08$ ;  $p=7,18E-04$ ),  $\alpha$ -tocoferol ( $\beta=0,05$ ;  $p=2,27E-03$ ), carotenos totales ( $\beta=0,02$ ;  $p=3,78E-02$ ), Q10 ( $\beta=0,06$ ;  $p=4,13E-05$ ) y ácido úrico ( $\beta=0,25$ ;  $p=2,02E-29$ ). Sin embargo, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el FRAP del plasma y los niveles de los biomarcadores de inflamación. Los resultados fueron similares al considerar en el ajuste del modelo (modelo 2) otras variables, como el IMC, la actividad física y el hábito tabáquico. Respecto al coeficiente de determinación  $R^2$  (proporción de la varianza explicada por las variables independientes), éste se situó (modelo 2) entre el 20% (por ejemplo, coenzima Q10) y el 28% (IL-8) en el ensayo TRAP, y entre el 23% (IL-8) y el 60% (ácido úrico) para el ensayo FRAP.

**Tabla 29:** Asociaciones entre el ensayo TRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1					Modelo 2				
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,018	-0,038	0,002	8,47E-02	0,199	-0,020	-0,040	0,001	6,16E-02	0,219
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,000	-0,001	0,001	9,33E-01	0,187	0,000	-0,001	0,001	9,71E-01	0,205
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,011	-0,029	0,007	2,22E-01	0,193	-0,013	-0,031	0,006	1,70E-01	0,212
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,010	-0,051	0,031	6,30E-01	0,188	-0,009	-0,051	0,033	6,68E-01	0,206
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,013	-0,041	0,015	3,68E-01	0,190	-0,015	-0,043	0,014	3,17E-01	0,209
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,002	-0,016	0,012	8,23E-01	0,187	-0,003	-0,017	0,012	6,90E-01	0,206
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,010	-0,024	0,004	1,80E-01	0,194	-0,011	-0,026	0,003	1,27E-01	0,214
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,001	-0,027	0,025	9,55E-01	0,187	-0,002	-0,029	0,025	9,01E-01	0,205
Ácido úrico (mg/dl)	0,042	0,000	0,084	5,33E-02	0,202	0,046	0,000	0,091	5,03E-02	0,220
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,164	0,091	0,238	<b>1,86E-05</b>	0,257	0,166	0,090	0,243	<b>3,25E-05</b>	0,271
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,110	0,030	0,190	<b>7,88E-03</b>	0,215	0,102	0,019	0,186	<b>1,73E-02</b>	0,227
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,143	0,079	0,207	<b>1,84E-05</b>	0,257	0,139	0,074	0,205	<b>4,54E-05</b>	0,269
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,083	0,010	0,155	<b>2,59E-02</b>	0,206	0,072	-0,002	0,147	5,85E-02	0,219
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,046	0,003	0,088	<b>3,80E-02</b>	0,204	0,051	0,007	0,094	<b>2,49E-02</b>	0,225
Tp (mg GAE/L)	0,144	0,018	0,269	<b>2,58E-02</b>	0,206	0,146	0,012	0,280	<b>3,45E-02</b>	0,223
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,033	-0,008	0,075	1,18E-01	0,197	0,039	-0,004	0,081	7,78E-02	0,217
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,077	0,021	0,133	<b>7,45E-03</b>	0,215	0,079	0,022	0,135	<b>7,29E-03</b>	0,233
PCR (mg/L)	-0,004	-0,016	0,009	5,78E-01	0,187	-0,004	-0,018	0,010	5,43E-01	0,205
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,006	-0,008	0,020	3,95E-01	0,195	0,007	-0,008	0,021	3,69E-01	0,216
PAI-I (ng/ml)	0,007	-0,017	0,031	5,61E-01	0,188	0,008	-0,016	0,033	5,14E-01	0,207
Resistina (ng/ml)	-0,025	-0,056	0,006	1,19E-01	0,197	-0,025	-0,057	0,007	1,24E-01	0,214
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	-0,008	-0,035	0,019	5,55E-01	0,202	-0,008	-0,036	0,019	5,55E-01	0,219
IL-8 (pg/ml)	-0,006	-0,023	0,010	4,50E-01	0,254	-0,006	-0,022	0,011	5,26E-01	0,278
IL-6 (pg/ml)	-0,001	-0,017	0,015	8,93E-01	0,187	-0,002	-0,018	0,015	8,19E-01	0,205

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

**Tabla 30:** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1				Modelo 2					
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,027	0,004	0,051	<b>2,38E-02</b>	0,247	0,027	0,003	0,050	<b>2,81E-02</b>	0,292
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,001	0,000	0,001	1,73E-01	0,235	0,001	0,000	0,001	1,64E-01	0,281
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,017	-0,004	0,038	1,07E-01	0,238	0,017	-0,004	0,038	1,21E-01	0,283
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,081	0,035	0,127	<b>7,18E-04</b>	0,270	0,080	0,033	0,127	<b>9,92E-04</b>	0,313
$\alpha$ -tocóferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,050	0,018	0,082	<b>2,27E-03</b>	0,263	0,050	0,018	0,082	<b>2,77E-03</b>	0,306
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,017	0,001	0,033	<b>3,78E-02</b>	0,244	0,017	0,001	0,034	<b>3,76E-02</b>	0,290
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,013	-0,003	0,030	1,12E-01	0,238	0,011	-0,005	0,028	1,90E-01	0,280
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,062	0,033	0,091	<b>4,13E-05</b>	0,289	0,062	0,032	0,092	<b>6,43E-05</b>	0,331
Ácido úrico (mg/dl)	0,245	0,209	0,282	<b>2,02E-29</b>	0,585	0,252	0,213	0,291	<b>1,06E-27</b>	0,603
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,149	0,040	0,257	<b>7,88E-03</b>	0,254	0,133	0,024	0,242	<b>1,73E-02</b>	0,295
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,015	-0,066	0,035	5,49E-01	0,230	-0,018	-0,068	0,033	4,90E-01	0,276
Tp (mg GAE/L)	0,262	0,119	0,406	<b>4,20E-04</b>	0,274	0,246	0,095	0,397	<b>1,65E-03</b>	0,310
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,033	-0,016	0,082	1,85E-01	0,235	0,031	-0,019	0,079	2,24E-01	0,280
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,037	-0,103	0,029	2,72E-01	0,233	-0,043	-0,109	0,023	2,02E-01	0,280
PCR (mg/L)	0,002	-0,013	0,016	8,37E-01	0,229	-0,004	-0,019	0,012	6,44E-01	0,277
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	-0,005	-0,021	0,011	5,29E-01	0,231	-0,002	-0,018	0,014	8,11E-01	0,276
PAI-I (ng/ml)	0,019	-0,009	0,046	1,88E-01	0,235	0,010	-0,018	0,039	4,68E-01	0,276
Resistina (ng/ml)	0,011	-0,026	0,047	5,73E-01	0,229	0,007	-0,030	0,043	7,24E-01	0,275
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,022	-0,009	0,053	1,68E-01	0,207	0,016	-0,015	0,047	3,14E-01	0,252
IL-8 (pg/ml)	-0,003	-0,023	0,016	7,40E-01	0,201	-0,008	-0,028	0,012	4,40E-01	0,232
IL-6 (pg/ml)	-0,016	-0,035	0,002	8,73E-02	0,239	-0,016	-0,035	0,002	8,97E-02	0,285

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log<sub>2</sub>.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

Asimismo, para el ensayo TEAC-ABTS (**tabla 31**) y para el ensayo ORAC (**tabla 32**), se obtuvieron asociaciones negativas y estadísticamente significativas con otros ensayos de CANE-P y con los nutrientes antioxidantes, algunos de ellos en TEAC-ABTS (retinol  $\beta$  para  $\log_2=-0,12$ ;  $p=9,25E-03$ ;  $\alpha$ -tocoferol  $\beta$  para  $\log_2=-0,08$ ;  $p=9,61E-03$ ; y carotenos totales  $\beta$  para  $\log_2=-0,03$ ;  $p=3,08E-02$ ;) y todos en ORAC (ácido ascórbico  $\beta$  para  $\log_2=-0,06$ ;  $p=4,20E-04$ ; ácido dehidroascórbico  $\beta$  para  $\log_2=-0,002$ ;  $p=4,19E-04$ ; vitamina C total  $\beta$  para  $\log_2=-0,06$ ;  $p=2,72E-05$ ; retinol  $\beta$  para  $\log_2=-0,12$ ;  $p=9,25E-03$ ;  $\alpha$ -tocoferol  $\beta$  para  $\log_2=-0,08$ ;  $p=9,61E-03$ ; carotenos totales  $\beta$  para  $\log_2=-0,03$ ;  $p=3,08E-02$ ; y Q10  $\beta$  para  $\log_2=-0,06$ ;  $p=5,52E-03$ ). Estas asociaciones se mantuvieron en los modelos multivariantes ajustados por IMC, actividad física y hábito tabáquico. Ambas medidas de CANE-P mostraron algunas asociaciones estadísticamente significativas con los biomarcadores de inflamación en los modelos ajustados por sexo, edad y centro. En concreto, altos niveles en plasma, tanto de TEAC-ABTS como de ORAC, se asociaron positivamente con PAI-I ( $p=3,96E-02$  y  $p=2,26E-02$ , respectivamente) y con adiponectina ( $p=0,05$  en ORAC), mientras que altos niveles de ORAC en plasma se asociaron también con un descenso en los niveles de IL-8 ( $p=3,34E-02$ ). Respecto al coeficiente de determinación  $R^2$ , éste se situó (modelo 2) entre el 6-12% en el ensayo TEAC-ABTS, dependiendo del biomarcador considerado y, entre el 13% (ácido úrico) y 20% (TEAC-ABTS) en el ensayo ORAC.

**Tabla 31:** Asociaciones entre el ensayo TEAC-ABTS en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1				Modelo 2					
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,015	-0,060	0,030	5,09E-01	0,020	-0,020	-0,065	0,025	3,92E-01	0,060
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,000	-0,002	0,001	8,05E-01	0,018	-0,000	-0,002	0,001	6,81E-01	0,058
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,009	-0,048	0,031	6,63E-01	0,018	-0,014	-0,054	0,027	5,07E-01	0,059
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,118	-0,206	-0,030	<b>9,25E-03</b>	0,049	-0,132	-0,222	-0,042	<b>4,64E-03</b>	0,094
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,081	-0,141	-0,020	<b>9,61E-03</b>	0,049	-0,084	-0,145	-0,022	<b>8,30E-03</b>	0,090
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,034	-0,064	-0,003	<b>3,08E-02</b>	0,040	-0,033	-0,065	-0,002	<b>3,68E-02</b>	0,077
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,017	-0,048	0,015	2,97E-01	0,023	-0,020	-0,051	0,012	2,18E-01	0,064
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,035	-0,092	0,022	2,31E-01	0,024	-0,037	-0,095	0,022	2,24E-01	0,064
Ácido úrico (mg/dl)	0,118	0,027	0,210	<b>1,23E-02</b>	0,047	0,113	0,014	0,211	<b>2,58E-02</b>	0,080
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,202	0,036	0,368	<b>1,82E-02</b>	0,044	0,208	0,036	0,380	<b>1,88E-02</b>	0,083
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,055	-0,234	0,124	5,49E-01	0,019	-0,065	-0,249	0,119	4,90E-01	0,059
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,141	-0,005	0,286	5,96E-02	0,034	0,153	0,006	0,300	<b>4,26E-02</b>	0,076
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,165	-0,325	-0,006	<b>4,34E-02</b>	0,037	-0,161	-0,323	0,000	5,25E-02	0,075
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,220	0,013	0,426	<b>3,80E-02</b>	0,038	0,239	0,032	0,447	<b>2,49E-02</b>	0,081
Tp (mg GAE/L)	0,309	0,033	0,585	<b>2,92E-02</b>	0,040	0,401	0,110	0,691	<b>7,44E-03</b>	0,090
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,100	0,009	0,191	<b>3,22E-02</b>	0,039	0,099	0,006	0,192	<b>3,76E-02</b>	0,077
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,233	0,113	0,354	<b>1,91E-04</b>	0,082	0,242	0,120	0,363	<b>1,28E-04</b>	0,124
PCR (mg/L)	0,034	0,007	0,062	<b>1,54E-02</b>	0,044	0,030	0,000	0,060	5,47E-02	0,080
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,011	-0,020	0,042	5,03E-01	0,021	0,011	-0,021	0,042	4,97E-01	0,064
PAI-I (ng/ml)	0,054	0,003	0,106	<b>3,96E-02</b>	0,038	0,052	-0,001	0,105	5,70E-02	0,074
Resistina (ng/ml)	-0,051	-0,119	0,018	1,50E-01	0,027	-0,054	-0,123	0,015	1,28E-01	0,068
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,006	-0,054	0,066	8,43E-01	0,025	-0,006	-0,066	0,055	8,50E-01	0,091
IL-8 (pg/ml)	0,005	-0,033	0,043	7,93E-01	0,022	0,003	-0,036	0,042	8,82E-01	0,052
IL-6 (pg/ml)	-0,002	-0,037	0,034	9,31E-01	0,017	0,005	-0,031	0,041	7,83E-01	0,057

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log<sub>2</sub>.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

**Tabla 32:** Asociaciones entre el ensayo ORAC en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1				Modelo 2					
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,060	-0,093	-0,027	<b>4,20E-04</b>	0,168	-0,058	-0,092	-0,025	<b>8,55E-04</b>	0,186
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,002	-0,003	-0,001	<b>4,19E-04</b>	0,168	-0,002	-0,003	-0,001	<b>4,97E-04</b>	0,191
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,063	-0,092	-0,034	<b>2,72E-05</b>	0,188	-0,061	-0,091	-0,031	<b>7,85E-05</b>	0,205
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,081	-0,149	-0,014	<b>1,92E-02</b>	0,139	-0,088	-0,158	-0,019	<b>1,37E-02</b>	0,165
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,080	-0,125	-0,034	<b>7,39E-04</b>	0,163	-0,083	-0,130	-0,036	<b>5,92E-04</b>	0,189
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,037	-0,060	-0,015	<b>1,55E-03</b>	0,158	-0,041	-0,065	-0,018	<b>6,67E-04</b>	0,188
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,017	-0,041	0,007	1,63E-01	0,124	-0,017	-0,041	0,007	1,74E-01	0,147
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,061	-0,104	-0,018	<b>5,52E-03</b>	0,148	-0,073	-0,117	-0,029	<b>1,47E-03</b>	0,182
Ácido úrico (mg/dl)	0,007	-0,064	0,078	8,39E-01	0,116	-0,006	-0,082	0,070	8,76E-01	0,139
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,174	0,048	0,301	<b>7,39E-03</b>	0,146	0,171	0,039	0,303	<b>1,17E-02</b>	0,167
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,076	-0,213	0,060	2,72E-01	0,121	-0,092	-0,233	0,049	2,02E-01	0,146
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,194	0,085	0,302	<b>5,88E-04</b>	0,165	0,194	0,083	0,305	<b>7,15E-04</b>	0,189
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,094	-0,216	0,028	1,32E-01	0,125	-0,099	-0,224	0,026	1,21E-01	0,150
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,215	0,059	0,371	<b>7,45E-03</b>	0,146	0,219	0,061	0,377	<b>7,29E-03</b>	0,170
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,136	0,066	0,206	<b>1,91E-04</b>	0,174	0,142	0,071	0,214	<b>1,28E-04</b>	0,201
Trp (mg GAE/L)	0,320	0,112	0,529	<b>2,88E-03</b>	0,153	0,280	0,057	0,504	<b>1,49E-02</b>	0,165
PCR (mg/L)	0,005	-0,016	0,027	6,24E-01	0,112	0,003	-0,020	0,027	7,99E-01	0,135
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,024	0,000	0,048	<b>5,01E-02</b>	0,132	0,028	0,004	0,052	<b>2,49E-02</b>	0,162
PAI-I (ng/ml)	0,046	0,007	0,085	<b>2,26E-02</b>	0,138	0,044	0,003	0,085	<b>3,49E-02</b>	0,159
Resistin (ng/ml)	-0,014	-0,067	0,039	6,06E-01	0,117	-0,014	-0,067	0,040	6,15E-01	0,140
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	-0,015	-0,059	0,029	4,96E-01	0,105	-0,017	-0,062	0,029	4,78E-01	0,130
IL-8 (pg/ml)	-0,031	-0,059	-0,003	<b>3,34E-02</b>	0,127	-0,028	-0,056	0,001	5,89E-02	0,172
IL-6 (pg/ml)	0,002	-0,025	0,029	8,78E-01	0,116	0,001	-0,027	0,029	9,47E-01	0,139

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

En cuanto al TRAP y FRAP de la dieta (**tabla 33** y **tabla 34**, respectivamente), se observó que, las asociaciones entre estos ensayos con el CANE-P y los biomarcadores, no alcanzaron la significación estadística en los modelos de regresión multivariantes. En estos modelos, al ajustar adicionalmente por ingesta de energía total (modelo 3), se observó que el impacto de esta variable en el modelo fue prácticamente despreciable (test de razón de verosimilitud al incluir esta variable:  $p > 0,05$ ), si bien el coeficiente de determinación  $R^2$  aumentó un 5% en este modelo. El coeficiente de determinación  $R^2$  se situó en torno a un 36% en el ensayo TRAP, en todos los biomarcadores y, en torno a un 39% en el ensayo FRAP, igualmente, para todos los biomarcadores.

**Tabla 33:** Asociaciones entre el ensayo TRAP de la dieta sin la contribución del café y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa en modelos de multivariantes.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1					Modelo 2					Modelo 3				
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>			
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,025	-0,075	0,125	6,26E-01	0,243	0,015	-0,084	0,115	7,62E-01	0,300	0,005	-0,091	0,100	9,22E-01	0,359
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,001	-0,004	0,002	3,85E-01	0,245	-0,001	-0,004	0,002	4,06E-01	0,302	-0,002	-0,004	0,001	3,15E-01	0,362
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,014	-0,074	0,102	7,57E-01	0,242	0,007	-0,081	0,095	8,77E-01	0,300	-0,007	-0,092	0,078	8,71E-01	0,359
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,111	-0,311	0,089	2,78E-01	0,246	-0,098	-0,299	0,104	3,43E-01	0,303	-0,099	-0,292	0,095	3,20E-01	0,362
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,073	-0,210	0,065	3,01E-01	0,246	-0,063	-0,201	0,074	3,67E-01	0,303	-0,047	-0,179	0,085	4,87E-01	0,360
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,010	-0,059	0,078	7,78E-01	0,242	0,007	-0,062	0,076	8,46E-01	0,300	-0,007	-0,074	0,060	8,38E-01	0,359
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,032	-0,101	0,038	3,75E-01	0,245	-0,030	-0,099	0,039	3,95E-01	0,302	-0,015	-0,082	0,051	6,51E-01	0,360
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,064	-0,191	0,064	3,28E-01	0,245	-0,039	-0,168	0,091	5,61E-01	0,301	-0,032	-0,156	0,092	6,14E-01	0,360
Ácido úrico (mg/dl)	-0,121	-0,329	0,087	2,56E-01	0,247	-0,017	-0,235	0,202	8,82E-01	0,300	-0,017	-0,227	0,193	8,73E-01	0,359
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,032	-0,345	0,410	8,67E-01	0,242	0,180	-0,203	0,562	3,58E-01	0,303	0,134	-0,234	0,501	4,76E-01	0,361
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,066	-0,467	0,335	7,48E-01	0,242	0,076	-0,329	0,480	7,14E-01	0,300	-0,003	-0,393	0,387	9,89E-01	0,359
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,100	-0,229	0,428	5,53E-01	0,243	0,170	-0,156	0,495	3,07E-01	0,304	0,118	-0,196	0,431	4,63E-01	0,361
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,006	-0,354	0,367	9,73E-01	0,242	0,079	-0,280	0,438	6,67E-01	0,301	-0,011	-0,358	0,336	9,49E-01	0,359
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,162	-0,304	0,629	4,96E-01	0,244	0,230	-0,231	0,691	3,30E-01	0,303	0,245	-0,197	0,686	2,79E-01	0,363
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,063	-0,150	0,275	5,62E-01	0,243	0,051	-0,161	0,263	6,40E-01	0,301	0,052	-0,151	0,256	6,16E-01	0,360
Tp (mg GAE/L)	-0,569	-1,190	0,051	7,34E-02	0,254	-0,466	-1,113	0,181	1,59E-01	0,307	-0,303	-0,930	0,324	3,45E-01	0,362
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,020	-0,186	0,227	8,48E-01	0,242	0,032	-0,174	0,238	7,64E-01	0,300	0,026	-0,171	0,224	7,95E-01	0,359
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,216	-0,061	0,494	1,28E-01	0,251	0,259	-0,015	0,533	6,56E-02	0,312	0,231	-0,033	0,495	8,76E-02	0,368
PCR (mg/L)	-0,011	-0,074	0,052	7,38E-01	0,241	-0,010	-0,078	0,057	7,66E-01	0,300	0,003	-0,063	0,068	9,41E-01	0,358
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,048	-0,022	0,119	1,83E-01	0,248	0,036	-0,034	0,107	3,12E-01	0,305	0,016	-0,052	0,084	6,49E-01	0,362
PAI-I (ng/ml)	0,046	-0,070	0,162	4,38E-01	0,244	0,091	-0,027	0,208	1,31E-01	0,308	0,082	-0,031	0,195	1,55E-01	0,365
Resistina (ng/ml)	-0,062	-0,217	0,093	4,34E-01	0,244	-0,060	-0,213	0,092	4,38E-01	0,302	-0,026	-0,174	0,121	7,28E-01	0,359
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	-0,005	-0,141	0,131	9,41E-01	0,238	-0,003	-0,137	0,131	9,64E-01	0,330	-0,020	-0,147	0,108	7,64E-01	0,398
IL-8 (pg/ml)	-0,025	-0,111	0,062	5,79E-01	0,224	-0,017	-0,105	0,071	7,03E-01	0,276	-0,006	-0,090	0,079	8,97E-01	0,349
IL-6 (pg/ml)	0,003	-0,077	0,082	9,50E-01	0,242	0,010	-0,069	0,089	8,04E-01	0,300	0,023	-0,053	0,099	5,58E-01	0,360

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Modelo 3: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física, hábito tabáquico e ingesta de energía total.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

**Tabla 34:** Asociaciones entre el ensayo FRAP de la dieta sin la contribución del café y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa en modelos de multivariantes.

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1				Modelo 2				Modelo 3						
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>			
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,043	-0,040	0,127	3,11E-01	0,252	0,037	-0,048	0,121	3,95E-01	0,291	0,026	-0,054	0,105	5,26E-01	0,380
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,001	-0,004	0,002	4,05E-01	0,250	-0,001	-0,004	0,002	4,46E-01	0,291	-0,001	-0,004	0,001	3,23E-01	0,382
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,034	-0,041	0,108	3,76E-01	0,251	0,028	-0,047	0,103	4,66E-01	0,290	0,013	-0,057	0,084	7,10E-01	0,379
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,074	-0,242	0,094	3,90E-01	0,250	-0,070	-0,241	0,102	4,27E-01	0,291	-0,070	-0,231	0,090	3,92E-01	0,381
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,046	-0,161	0,069	4,36E-01	0,250	-0,042	-0,159	0,075	4,84E-01	0,290	-0,025	-0,134	0,085	6,61E-01	0,380
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,028	-0,029	0,085	3,42E-01	0,251	0,026	-0,033	0,084	3,96E-01	0,291	0,011	-0,044	0,067	6,91E-01	0,379
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,006	-0,065	0,053	8,42E-01	0,248	-0,004	-0,063	0,055	8,85E-01	0,289	0,011	-0,044	0,067	6,92E-01	0,379
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,048	-0,155	0,059	3,80E-01	0,251	-0,032	-0,142	0,078	5,69E-01	0,290	-0,025	-0,128	0,078	6,32E-01	0,380
Ácido úrico (mg/dl)	-0,098	-0,273	0,077	2,74E-01	0,252	-0,026	-0,212	0,160	7,87E-01	0,289	-0,026	-0,200	0,148	7,69E-01	0,379
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,044	-0,273	0,361	7,85E-01	0,248	0,154	-0,171	0,479	3,54E-01	0,292	0,106	-0,199	0,411	4,97E-01	0,380
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	-0,047	-0,384	0,290	7,85E-01	0,248	0,053	-0,291	0,397	7,64E-01	0,289	-0,029	-0,353	0,294	8,59E-01	0,379
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,107	-0,168	0,383	4,47E-01	0,250	0,161	-0,115	0,438	2,54E-01	0,293	0,107	-0,154	0,367	4,23E-01	0,381
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	0,016	-0,287	0,319	9,19E-01	0,248	0,067	-0,238	0,372	6,68E-01	0,289	-0,028	-0,315	0,260	8,51E-01	0,379
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,093	-0,299	0,485	6,43E-01	0,249	0,139	-0,253	0,531	4,88E-01	0,290	0,154	-0,213	0,521	4,11E-01	0,381
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,066	-0,112	0,244	4,69E-01	0,250	0,058	-0,122	0,238	5,29E-01	0,290	0,060	-0,109	0,228	4,90E-01	0,380
Tp (mg GAE/L)	-0,550	-1,069	-0,030	<b>3,95E-02</b>	0,263	-0,461	-1,010	0,088	1,01E-01	0,298	-0,290	-0,810	0,230	2,75E-01	0,383
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,022	-0,195	0,152	8,06E-01	0,248	-0,015	-0,190	0,160	8,68E-01	0,289	-0,021	-0,184	0,144	8,07E-01	0,379
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,156	-0,077	0,390	1,91E-01	0,254	0,193	-0,040	0,427	1,06E-01	0,298	0,164	-0,055	0,383	1,44E-01	0,386
PCR (mg/L)	-0,022	-0,074	0,030	4,11E-01	0,252	-0,020	-0,077	0,037	4,95E-01	0,292	-0,007	-0,060	0,047	8,07E-01	0,381
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,031	-0,028	0,090	3,03E-01	0,255	0,022	-0,038	0,081	4,78E-01	0,294	-0,000	-0,056	0,056	9,97E-01	0,384
PAI-I (ng/ml)	0,031	-0,067	0,128	5,41E-01	0,249	0,065	-0,035	0,165	2,04E-01	0,294	0,056	-0,038	0,150	2,43E-01	0,383
Resistina (ng/ml)	-0,103	-0,232	0,027	1,22E-01	0,256	-0,100	-0,229	0,029	1,32E-01	0,297	-0,064	-0,186	0,058	3,03E-01	0,382
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,011	-0,102	0,125	8,46E-01	0,244	0,010	-0,102	0,123	8,57E-01	0,318	-0,007	-0,111	0,098	9,04E-01	0,419
IL-8 (pg/ml)	-0,020	-0,092	0,052	5,86E-01	0,236	-0,016	-0,090	0,058	6,71E-01	0,278	-0,005	-0,074	0,064	8,88E-01	0,371
IL-6 (pg/ml)	-0,010	-0,077	0,057	7,75E-01	0,248	-0,004	-0,071	0,063	9,11E-01	0,289	0,009	-0,054	0,072	7,71E-01	0,379

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Modelo 3: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física, hábito tabáquico e ingesta de energía total.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

En los análisis de sensibilidad realizados, para comprobar la robustez de los resultados obtenidos, se observaron resultados similares después de eliminar de las asociaciones los valores influyentes en los biomarcadores (**tabla 35**) y después de descontar la contribución del ácido úrico en la medida de FRAP (**tabla 36**). Respecto al coeficiente de determinación  $R^2$ , éste se situó (modelo 2) en el ensayo TRAP, entre el 20-31%, dependiendo del biomarcador considerado y, para el ensayo FRAP, entre el 32-64% eliminando los puntos influyentes, y entre el 18-32% descontando la contribución del ácido úrico, igualmente, dependiendo del biomarcador considerado.

**Tabla 35.** Análisis de sensibilidad eliminando los puntos influyentes basados en las distancias de Cook en modelos multivariantes para TRAP y FRAP.

Biomarcadores y CANE-P	N <sup>1</sup>	TRAP					FRAP				
		$\beta$ coeff	CI 95%		p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%		p-valor	R <sup>2</sup>
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	202	-0.025	-0.046	-0.004	<b>2.02E-02</b>	0.232	0.027	0.006	0.048	<b>1.33E-02</b>	0.335
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	200	0.000	-0.001	0.001	9.57E-01	0.204	0.001	0.000	0.001	1.61E-01	0.336
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	202	-0.016	-0.035	0.003	9.28E-02	0.221	0.018	-0.001	0.036	7.07E-02	0.325
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	201	-0.012	-0.056	0.031	5.80E-01	0.220	0.059	0.017	0.102	<b>6.99E-03</b>	0.361
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	200	-0.017	-0.048	0.013	2.61E-01	0.221	0.045	0.016	0.075	<b>3.15E-03</b>	0.367
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	199	-0.004	-0.019	0.011	6.10E-01	0.217	0.022	0.007	0.036	<b>3.56E-03</b>	0.351
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	201	-0.011	-0.025	0.004	1.52E-01	0.220	0.015	0.000	0.029	5.19E-02	0.333
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	201	-0.006	-0.035	0.024	7.03E-01	0.216	0.058	0.029	0.087	<b>1.02E-04</b>	0.372
Ácido úrico (mg/dl)	198	0.074	0.026	0.122	<b>2.68E-03</b>	0.246	0.230	0.195	0.265	<b>3.93E-27</b>	0.636
FRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	200	0.187	0.104	0.270	<b>1.82E-05</b>	0.305	-	-	-	-	-
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	204	0.127	0.029	0.224	<b>1.16E-02</b>	0.232	-	-	-	-	-
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	204	0.149	0.079	0.219	<b>4.84E-05</b>	0.272	-	-	-	-	-
FRAP sin ácido úrico ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ )	204	0.077	-0.010	0.163	8.29E-02	0.218	-	-	-	-	-
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	201	-	-	-	-	-	0.127	0.029	0.224	<b>1.16E-02</b>	0.363
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	201	0.074	0.030	0.118	<b>1.10E-03</b>	0.243	-0.013	-0.059	0.033	5.85E-01	0.331
Tp (mg GAE/L)	201	0.160	0.022	0.297	<b>2.44E-02</b>	0.233	0.198	0.060	0.337	<b>5.52E-03</b>	0.350
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	203	0.039	-0.004	0.081	7.46E-02	0.226	0.031	-0.012	0.074	1.56E-01	0.335
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	199	0.068	0.010	0.126	<b>2.37E-02</b>	0.240	-0.040	-0.098	0.017	1.72E-01	0.354
PCR (mg/L)	199	0.001	-0.014	0.016	9.16E-01	0.205	-0.004	-0.019	0.012	6.46E-01	0.326
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	199	0.006	-0.012	0.025	4.96E-01	0.220	-0.001	-0.019	0.018	9.33E-01	0.331
PAI-I (ng/ml)	201	0.014	-0.013	0.042	3.06E-01	0.207	-0.010	-0.037	0.018	4.99E-01	0.328
Resistina (ng/ml)	199	-0.031	-0.064	0.001	6.26E-02	0.212	-0.004	-0.036	0.029	8.32E-01	0.354
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	152	-0.025	-0.056	0.008	1.36E-01	0.261	0.040	0.009	0.070	<b>1.27E-02</b>	0.382
IL-8 (pg/ml)	137	-0.007	-0.025	0.011	4.31E-01	0.308	-0.003	-0.021	0.015	7.54E-01	0.337
IL-6 (pg/ml)	200	-0.003	-0.020	0.015	7.73E-01	0.210	-0.019	-0.037	-0.002	<b>2.98E-02</b>	0.347

<sup>1</sup>Número de observaciones de cada biomarcador tras eliminar los puntos influyentes (N incluyendo puntos influyentes en **tabla 25**).

Asociaciones entre CANE-P ensayo TRAP y ensayo FRAP y biomarcadores en la submuestra de la cohorte EPIC-Granada-Guipúzcoa (n=210).

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log<sub>2</sub>.

Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

**Tabla 36.** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma sin ácido úrico y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa (n=210).

Biomarcadores y CANE-P	$\beta$ coeff	Modelo 1				$R^2$	$\beta$ coeff	Modelo 2			
		CI 95%	p-valor	$R^2$	CI 95%			p-valor	$R^2$		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.044	0.018	0.070	<b>8.97E-04</b>	0.212	0.043	0.017	0.069	<b>1.37E-03</b>	0.237	
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.001	0.000	0.001	1.76E-01	0.175	0.001	0.000	0.001	1.58E-01	0.205	
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.031	0.008	0.054	<b>7.89E-03</b>	0.196	0.031	0.007	0.054	<b>1.09E-02</b>	0.223	
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.076	0.024	0.128	<b>4.49E-03</b>	0.200	0.080	0.027	0.133	<b>3.66E-03</b>	0.230	
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.050	0.014	0.085	<b>6.46E-03</b>	0.198	0.050	0.014	0.087	<b>7.30E-03</b>	0.226	
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.021	0.004	0.039	<b>1.90E-02</b>	0.190	0.021	0.003	0.040	<b>2.35E-02</b>	0.217	
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.016	-0.002	0.034	8.62E-02	0.180	0.014	-0.004	0.033	1.34E-01	0.206	
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.061	0.028	0.093	<b>3.18E-04</b>	0.219	0.064	0.030	0.097	<b>2.78E-04</b>	0.249	
Ácido úrico (mg/dl)	0.152	0.102	0.203	<b>1.71E-08</b>	0.288	0.162	0.108	0.216	<b>2.12E-08</b>	0.315	
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0.139	0.018	0.260	<b>2.59E-02</b>	0.188	0.120	-0.004	0.243	5.85E-02	0.211	
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0.057	-0.113	-0.002	<b>4.34E-02</b>	0.184	-0.056	-0.113	0.000	5.25E-02	0.212	
Tp (mg GAE/L)	0.250	0.089	0.411	<b>2.67E-03</b>	0.204	0.244	0.072	0.415	<b>5.88E-03</b>	0.227	
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0.010	-0.044	0.065	7.08E-01	0.169	0.011	-0.044	0.067	6.93E-01	0.197	
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0.056	-0.129	0.017	1.32E-01	0.177	-0.059	-0.133	0.015	1.21E-01	0.206	
PCR (mg/L)	-0.005	-0.021	0.011	5.52E-01	0.165	-0.008	-0.025	0.010	4.09E-01	0.196	
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	-0.004	-0.022	0.014	6.63E-01	0.164	-0.003	-0.021	0.016	7.81E-01	0.193	
PAI-I (ng/ml)	0.002	-0.028	0.033	8.77E-01	0.168	-0.001	-0.032	0.031	9.69E-01	0.197	
Resistina (ng/ml)	0.017	-0.023	0.058	4.06E-01	0.171	0.015	-0.026	0.056	4.66E-01	0.199	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0.022	-0.012	0.057	2.07E-01	0.152	0.020	-0.015	0.056	2.68E-01	0.186	
IL-8 (pg/ml)	-0.007	-0.028	0.014	5.00E-01	0.166	-0.011	-0.033	0.011	3.35E-01	0.183	
IL-6 (pg/ml)	-0.016	-0.037	0.005	1.32E-01	0.177	-0.017	-0.038	0.004	1.14E-01	0.207	

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

### 5.3.4. Generación de clúster

Para la realización del agrupamiento jerárquico basado en niveles de biomarcadores y características de los sujetos, se exploraron distancias Manhattan (**figura 34**) y Euclídeas (**figura 35**). Este análisis reveló la existencia de grupos/clústeres de sujetos y de biomarcadores similares. En base a los clústeres de biomarcadores generados, se consideró más conveniente la aplicación de distancias Manhattan (clúster de vitamina C, nutrientes antioxidantes, inflamación, CANE-P) que Euclídeas (similar a Manhattan, pero separando marcadores de inflamación). Considerando el agrupamiento jerárquico con distancias Manhattan, se obtuvieron los siguientes resultados:

En el dendograma se aprecian 5 agrupaciones: 2 grupos de antioxidantes, 1 grupo de biomarcadores de inflamación y 2 grupos de CANE-P. Estas agrupaciones se correlacionaron con algunas características de los sujetos de estudio, dando lugar a 5 patrones de agrupación. En general, no se aparecieron agrupaciones en función del hábito tabáquico, obesidad o nivel de actividad física, pero sí en función del centro de reclutamiento y del sexo. Curiosamente, los sujetos de Guipúzcoa y Granada se ubicaron en agrupaciones (o clústeres) separadas, mientras que hubo otras dos agrupaciones que presentaron un patrón mixto:

- En la primera agrupación (clúster 1), aparecieron, principalmente, mujeres de la cohorte EPIC-Granada, presentando valores de CANE-P y de nutrientes antioxidantes por debajo de los valores medios.

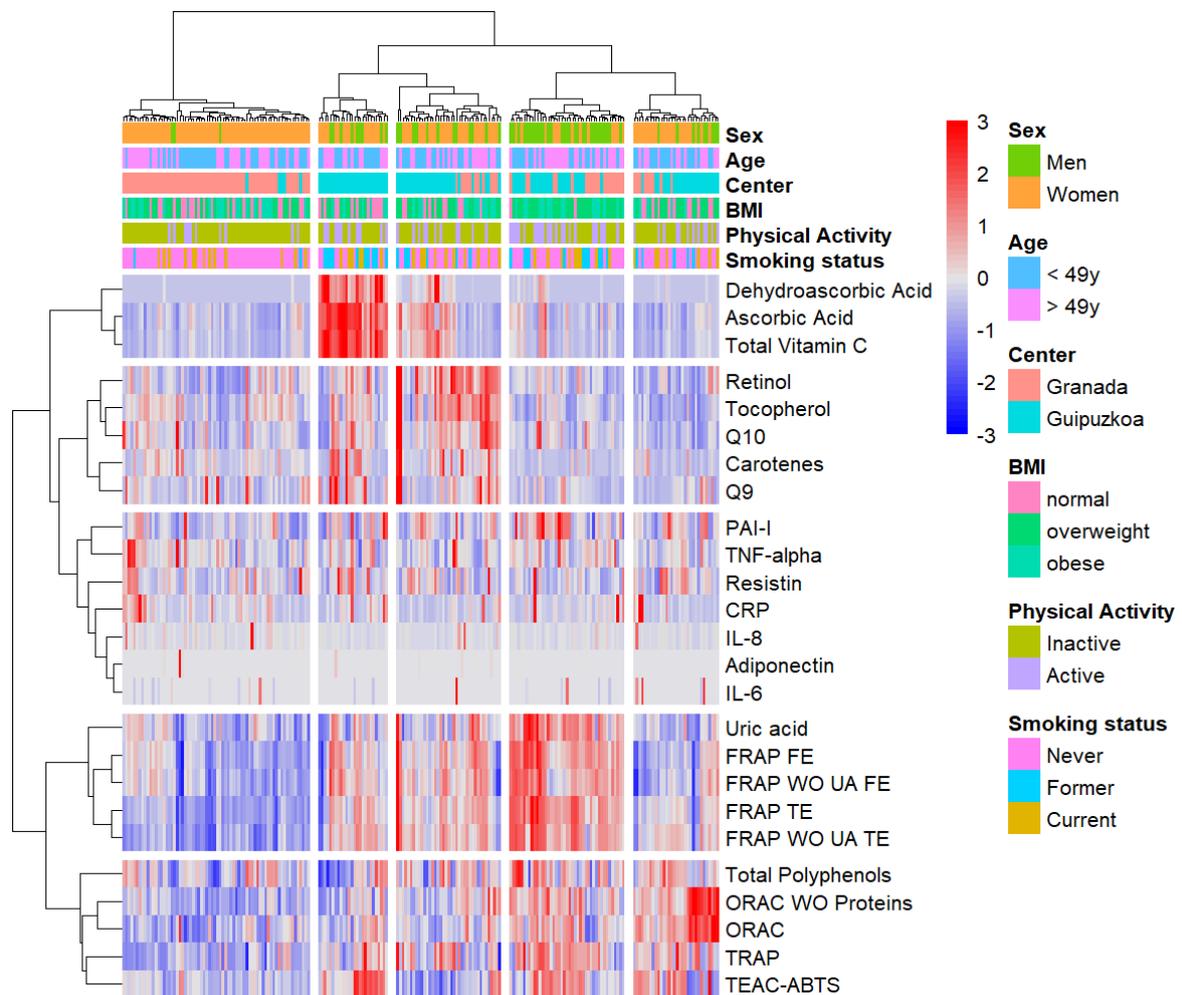
- La segunda agrupación (clúster 2) presentó un patrón opuesto y comprendió a hombres y mujeres de la cohorte EPIC-Guipúzcoa.

- El tercer grupo (clúster 3) incluyó sujetos de ambos centros con valores de CANE-P por encima de la media pero con valores variables de vitamina C en plasma.

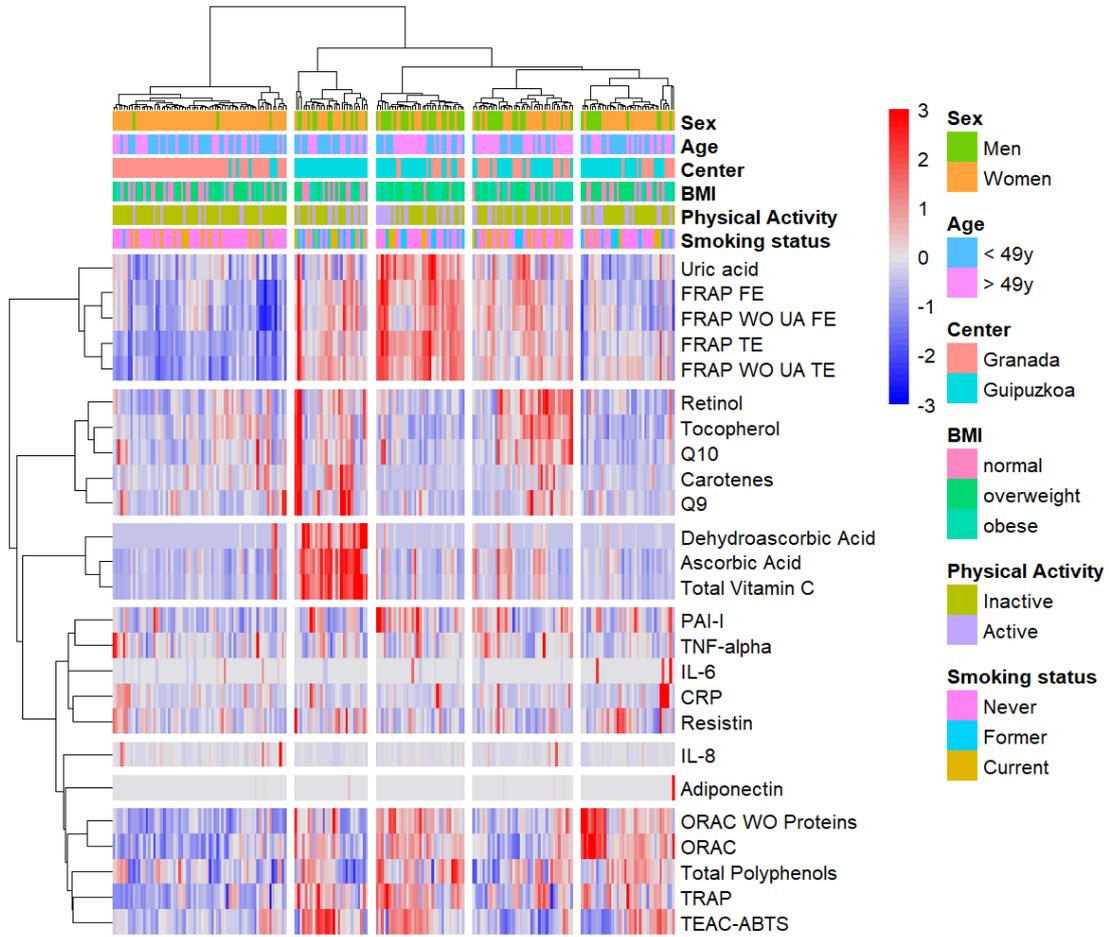
- En el cuarto grupo (clúster 4), mientras que los niveles de nutrientes antioxidantes fueron bajos (por debajo de los valores medios), los valores de CANE-P fueron altos (por encima de los valores medios).

- Finalmente, en la quinta agrupación (clúster 5), una característica destacable fueron los altos niveles de ORAC y TEAC-ABTS en comparación con los bajos niveles de FRAP y de nutrientes antioxidantes.

En definitiva, no hubo un patrón de características claro entre los sujetos de estas agrupaciones, de hecho, no se observaron diferencias entre los estratos según hábito tabáquico (**tabla 37**), IMC (**tabla 38**), índice de adherencia a la DM (**tabla 39**) y otras covariables, entre las que se incluyen el nivel de actividad física y la circunferencia de cintura ( $p$  de interacción  $>0,05$ ). En general, no se observaron patrones definidos, es decir, clústeres de sujetos relacionados con los biomarcadores de inflamación, si bien, todos los biomarcadores de inflamación conformaron una agrupación separada del resto de biomarcadores.



**Figura 34:** Análisis de agrupamiento jerárquico entre la CANE-P y los biomarcadores medidos en plasma de la población de estudio (el color rojo indica niveles altos y el azul indica valores bajos, mientras que, los datos faltantes en ciertos biomarcadores, aparecen en blanco). Distancias de Manhattan.



**Figura 35:** Análisis de agrupamiento jerárquico entre la CANE-P y los biomarcadores medidos en plasma de la población de estudio (el color rojo indica niveles altos y el azul indica valores bajos, mientras que, los datos faltantes en ciertos biomarcadores, aparecen en blanco). Distancias euclídeas.

**Tabla 37:** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según hábito tabáquico.

Biomarcadores y CANE-P	No fumadores (n=130)				Fumadores alguna vez (n=79)					
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,019	-0,009	0,047	1,91E-01	0,323	0,042	0,000	0,083	5,24E-02	0,268
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,000	-0,001	0,001	8,88E-01	0,314	0,001	0,000	0,003	<b>1,87E-02</b>	0,287
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,009	-0,016	0,035	4,77E-01	0,316	0,034	-0,002	0,070	7,16E-02	0,263
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,041	-0,015	0,098	1,56E-01	0,325	0,143	0,062	0,224	<b>9,12E-04</b>	0,341
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,024	-0,016	0,063	2,52E-01	0,321	0,088	0,034	0,143	<b>2,14E-03</b>	0,325
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,009	-0,012	0,030	3,87E-01	0,318	0,030	0,003	0,057	<b>3,38E-02</b>	0,276
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,012	-0,007	0,031	2,07E-01	0,322	0,011	-0,025	0,047	5,51E-01	0,231
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,047	0,009	0,084	<b>1,64E-02</b>	0,345	0,083	0,034	0,133	<b>1,49E-03</b>	0,332
Ácido úrico (mg/dl)	0,263	0,217	0,309	<b>2,50E-20</b>	0,662	0,239	0,168	0,311	<b>8,03E-09</b>	0,521
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,045	-0,092	0,182	5,24E-01	0,316	0,269	0,091	0,448	<b>4,20E-03</b>	0,313
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,004	-0,064	0,073	9,07E-01	0,313	-0,041	-0,123	0,041	3,29E-01	0,238
Tp (mg GAE/L)	0,314	0,134	0,493	<b>8,33E-04</b>	0,374	0,133	-0,136	0,402	3,36E-01	0,238
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,067	0,007	0,126	<b>2,97E-02</b>	0,340	-0,048	-0,134	0,037	2,73E-01	0,241
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,001	-0,081	0,083	9,78E-01	0,313	-0,115	-0,227	-0,004	<b>4,60E-02</b>	0,270
PCR (mg/L)	0,004	-0,017	0,025	7,00E-01	0,316	-0,013	-0,038	0,013	3,33E-01	0,239
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	-0,011	-0,028	0,007	2,38E-01	0,324	0,030	-0,009	0,069	1,40E-01	0,253
PAI-I (ng/ml)	0,012	-0,022	0,046	4,89E-01	0,316	0,006	-0,049	0,060	8,42E-01	0,228
Resistina (ng/ml)	0,001	-0,052	0,053	9,78E-01	0,313	0,008	-0,047	0,062	7,86E-01	0,228
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,011	-0,031	0,052	6,13E-01	0,313	0,013	-0,039	0,064	6,32E-01	0,185
IL-8 (pg/ml)	-0,012	-0,037	0,012	3,17E-01	0,285	0,000	-0,039	0,039	9,95E-01	0,162
IL-6 (pg/ml)	-0,017	-0,046	0,013	2,64E-01	0,320	-0,014	-0,040	0,013	3,12E-01	0,239

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, IMC y actividad física.

Dato faltante: Hábito tabáquico (n=1).

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

p de interacción por hábito tabáquico > 0,05.

**Tabla 38:** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según IMC.

Biomarcadores y CANE-P	Normopeso & Sobrepeso (n=152)					Obesos (n=58)				
	$\beta$ coeff	CI 95%		p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%		p-valor	R <sup>2</sup>
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,029	0,000	0,058	5,19E-02	0,240	0,026	-0,015	0,066	2,17E-01	0,486
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,001	0,000	0,001	3,06E-01	0,225	0,002	0,000	0,003	<b>4,86E-02</b>	0,511
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,017	-0,009	0,043	2,04E-01	0,228	0,027	-0,010	0,064	1,59E-01	0,491
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,095	0,038	0,153	<b>1,47E-03</b>	0,274	0,065	-0,017	0,147	1,29E-01	0,494
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,065	0,026	0,104	<b>1,26E-03</b>	0,275	0,029	-0,028	0,086	3,27E-01	0,480
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,021	0,001	0,040	<b>3,72E-02</b>	0,243	0,016	-0,020	0,051	3,96E-01	0,477
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,015	-0,005	0,035	1,48E-01	0,231	0,006	-0,026	0,038	7,07E-01	0,471
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,084	0,049	0,119	<b>4,74E-06</b>	0,328	0,023	-0,035	0,082	4,38E-01	0,476
Ácido úrico (mg/dl)	0,262	0,220	0,304	<b>1,13E-23</b>	0,619	0,198	0,117	0,279	<b>1,60E-05</b>	0,641
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,135	-0,008	0,277	6,56E-02	0,238	0,171	0,003	0,338	5,21E-02	0,510
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,004	-0,060	0,067	9,04E-01	0,220	-0,036	-0,128	0,057	4,53E-01	0,475
Tp (mg GAE/L)	0,272	0,088	0,455	<b>4,35E-03</b>	0,263	0,272	-0,011	0,556	6,57E-02	0,506
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,025	-0,036	0,085	4,26E-01	0,223	0,068	-0,016	0,152	1,17E-01	0,496
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,040	-0,119	0,041	3,35E-01	0,225	0,008	-0,121	0,137	9,07E-01	0,469
PCR (mg/L)	-0,001	-0,020	0,018	9,03E-01	0,219	0,011	-0,016	0,037	4,41E-01	0,493
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	-0,009	-0,028	0,010	3,36E-01	0,223	0,013	-0,024	0,051	4,94E-01	0,498
PAI-I (ng/ml)	0,027	-0,010	0,064	1,56E-01	0,231	0,008	-0,034	0,050	7,01E-01	0,471
Resistina (ng/ml)	0,018	-0,025	0,062	4,13E-01	0,223	-0,040	-0,109	0,030	2,69E-01	0,482
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,026	-0,015	0,067	2,17E-01	0,209	-0,001	-0,052	0,049	9,63E-01	0,389
IL-8 (pg/ml)	-0,008	-0,034	0,018	5,31E-01	0,196	-0,000	-0,033	0,032	9,93E-01	0,399
IL-6 (pg/ml)	-0,021	-0,047	0,005	1,22E-01	0,233	0,007	-0,020	0,035	5,98E-01	0,472

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

p de interacción por categorías de IMC > 0,05.

**Tabla 39:** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en la cohorte EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa según índice de adherencia a la DM.

Biomarcadores y CANE-P	Índice adherencia a DM bajo & medio (n=140)					Índice adherencia a DM alto (n=70)				
	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>	$\beta$ coeff	CI 95%	p-valor	R <sup>2</sup>		
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0314	0.003	0.0600	<b>3.33E-02</b>	0.2778	0.0086	-0.038	0.0552	7.20E-01	0.4744
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0006	0.000	0.0016	2.22E-01	0.2605	0.0003	-0.001	0.0014	5.42E-01	0.4766
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0235	-0.002	0.0492	7.69E-02	0.2699	-0.0026	-0.041	0.0360	8.95E-01	0.4734
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0878	0.026	0.1494	<b>5.93E-03</b>	0.2947	0.0604	-0.015	0.1354	1.20E-01	0.4950
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0498	0.010	0.0898	<b>1.60E-02</b>	0.2849	0.0479	-0.010	0.1057	1.10E-01	0.4961
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0124	-0.010	0.0351	2.89E-01	0.2584	0.0241	0.002	0.0465	<b>3.95E-02</b>	0.5107
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0000	-0.021	0.0211	9.98E-01	0.2519	0.0304	0.006	0.0551	<b>1.93E-02</b>	0.5211
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.0642	0.027	0.1016	<b>9.95E-04</b>	0.3124	0.0673	0.015	0.1195	<b>1.42E-02</b>	0.5255
Ácido úrico (mg/dl)	0.2619	0.212	0.3116	<b>1.34E-18</b>	0.5906	0.2173	0.155	0.2798	<b>6.05E-09</b>	0.7074
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0.1435	0.007	0.2797	<b>4.10E-02</b>	0.2758	0.0451	-0.141	0.2311	6.36E-01	0.4753
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0.0260	-0.091	0.0387	4.32E-01	0.2555	0.0289	-0.052	0.1098	4.86E-01	0.4777
Tp (mg GAE/L)	0.3193	0.127	0.5116	<b>1.45E-03</b>	0.3086	0.1287	-0.113	0.3706	3.01E-01	0.4830
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0.0466	-0.016	0.1089	1.45E-01	0.2642	0.0237	-0.056	0.1037	5.65E-01	0.4763
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0.0251	-0.114	0.0635	5.79E-01	0.2537	-0.0486	-0.149	0.0520	3.48E-01	0.4813
PCR (mg/L)	-0.0028	-0.022	0.017	7.84E-01	0.2529	-0.0051	-0.033	0.0231	7.24E-01	0.4744
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.0015	-0.024	0.0275	9.08E-01	0.2510	-0.0040	-0.024	0.0156	6.89E-01	0.4759
PAI-I (ng/ml)	0.0043	-0.032	0.0402	8.13E-01	0.2522	0.0323	-0.013	0.0774	1.66E-01	0.4905
Resistina (ng/ml)	0.0102	-0.034	0.0548	6.54E-01	0.2531	0.0038	-0.061	0.0681	9.09E-01	0.4734
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0.0298	-0.012	0.0720	1.71E-01	0.2361	-0.0120	-0.060	0.0356	6.23E-01	0.4581
IL-8 (pg/ml)	-0.0101	-0.038	0.0183	4.89E-01	0.1817	-0.0153	-0.043	0.0121	2.80E-01	0.5120
IL-6 (pg/ml)	-0.0207	-0.048	0.0061	1.33E-01	0.2649	-0.0171	-0.043	0.0085	1.96E-01	0.4884

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log2.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

p de interacción por categorías del índice de DM > 0,05.

Respecto al coeficiente de determinación, en el ensayo FRAP el valor de  $R^2$  se situó entre el 28-66% en fumadores y el 16-52% en no fumadores (**tabla 37**), entre el 19-62% en no obesos y el 40-64% en obesos (**tabla 38**) y, entre el 18-60% en el nivel de adherencia a rMED bajo-medio y el 47-71% en el nivel alto (**tabla 39**), dependiendo del biomarcador considerado.

Al considerar las asociaciones de CANE-P y biomarcadores solamente en la agrupación mayor (clúster-1), no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los ensayos de CANE-P ni los nutrientes antioxidantes o biomarcadores de inflamación, excepto entre el ensayo FRAP y el ácido úrico ( $\log_2 \beta=0,22$ ), la resistina ( $\log_2 \beta=0,08$ ), la PCR ( $\log_2 \beta=0,03$ ) y la adiponectina ( $\log_2 \beta=0,03$ ), tal y como se puede apreciar en la **tabla 40**. Concretamente, altos niveles de FRAP en plasma se asociaron positivamente con niveles de ácido úrico y adiponectina, pero también con resistina y PCR en sentido opuesto al esperado.

**Tabla 40:** Asociaciones entre el ensayo FRAP en plasma y biomarcadores en el clúster-1, que mayoritariamente comprende mujeres de la cohorte EPIC-Granada, no fumadoras e inactivas (n=70; valor medio de FRAP=395  $\mu\text{mol TE/L}$ ).

Biomarcadores y CANE-P	Modelo 1					Modelo 2				
	coeff	CI <sub>Low</sub>	CI <sub>High</sub>	p-valor	R-squared	coeff	CI <sub>Low</sub>	CI <sub>High</sub>	p-valor	R-squared
Ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,021	-0,018	0,061	2,93E-01	0,104	0,011	-0,031	0,053	6,18E-01	0,164
Ácido dehidroascórbico ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,000	-0,002	0,002	8,98E-01	0,088	-0,000	-0,002	0,002	7,66E-01	0,162
Vitamina C total ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,023	-0,016	0,060	2,58E-01	0,106	0,012	-0,030	0,054	5,77E-01	0,165
Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,037	-0,044	0,118	3,73E-01	0,099	0,045	-0,043	0,132	3,18E-01	0,174
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,013	-0,054	0,080	7,07E-01	0,090	0,017	-0,056	0,090	6,52E-01	0,163
Carotenos totales ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,011	-0,039	0,018	4,59E-01	0,096	-0,010	-0,040	0,020	5,25E-01	0,166
Q9 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,007	-0,017	0,031	5,60E-01	0,093	0,009	-0,016	0,034	4,89E-01	0,167
Q10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,002	-0,048	0,053	9,29E-01	0,088	0,005	-0,051	0,061	8,72E-01	0,161
Ácido úrico (mg/dl)	0,206	0,152	0,260	<b>2,62E-10</b>	0,509	0,222	0,164	0,281	<b>4,33E-10</b>	0,568
TRAP ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,062	-0,266	0,142	5,54E-01	0,093	-0,047	-0,260	0,166	6,68E-01	0,163
TEAC-ABTS ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,059	-0,197	0,079	4,03E-01	0,098	-0,033	-0,180	0,113	6,56E-01	0,163
TP (mg GAE/L)	0,202	-0,043	0,446	1,11E-01	0,123	0,255	-0,004	0,513	5,85E-02	0,210
ORAC sin proteínas ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	0,107	0,019	0,196	<b>2,05E-02</b>	0,161	0,091	-0,010	0,191	8,29E-02	0,202
ORAC ( $\mu\text{mol TE/L}$ )	-0,099	-0,200	0,002	6,01E-02	0,137	-0,095	-0,205	0,015	9,63E-02	0,199
PCR (mg/L)	0,020	-0,002	0,040	8,78E-02	0,148	0,030	0,007	0,053	<b>1,45E-02</b>	0,296
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	-0,022	-0,037	-0,007	<b>5,45E-03</b>	0,211	-0,020	-0,035	-0,005	<b>1,20E-02</b>	0,293
PAI-I (ng/ml)	0,033	-0,013	0,080	1,66E-01	0,115	0,037	-0,013	0,087	1,57E-01	0,189
Resistina (ng/ml)	0,072	0,011	0,132	<b>2,38E-02</b>	0,157	0,078	0,012	0,145	<b>2,51E-02</b>	0,229
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0,032	-0,006	0,069	1,05E-01	0,171	0,015	-0,024	0,054	4,52E-01	0,325
IL-8 (pg/ml)	0,010	-0,013	0,034	4,02E-01	0,106	0,007	-0,018	0,032	5,90E-01	0,199
IL-6 (pg/ml)	-0,012	-0,037	0,013	3,52E-01	0,100	-0,012	-0,041	0,017	4,14E-01	0,170

Los biomarcadores del plasma fueron transformados a log<sub>2</sub>.

Modelo 1: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo y centro.

Modelo 2: Regresión lineal múltiple ajustada por edad, sexo, centro, actividad física y hábito tabáquico.

Las asociaciones estadísticamente significativas se muestran en negrita.

## 5.4. Estudio transversal III

### 5.4.1. Características de la población del estudio III (n=52)

En la **tabla 41** se muestran las características de la población del estudio III. Al igual que en la población del estudio I, la mayoría de los participantes eran no fumadores y físicamente inactivos. En general, los hombres presentaron un mayor IMC ( $p=0,04$ ) que las mujeres, mientras que, en relación a la ingesta media de energía y de nutrientes antioxidantes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres.

**Tabla 41.** Características socio-demográficas de la población del estudio III según sexo (n=52).

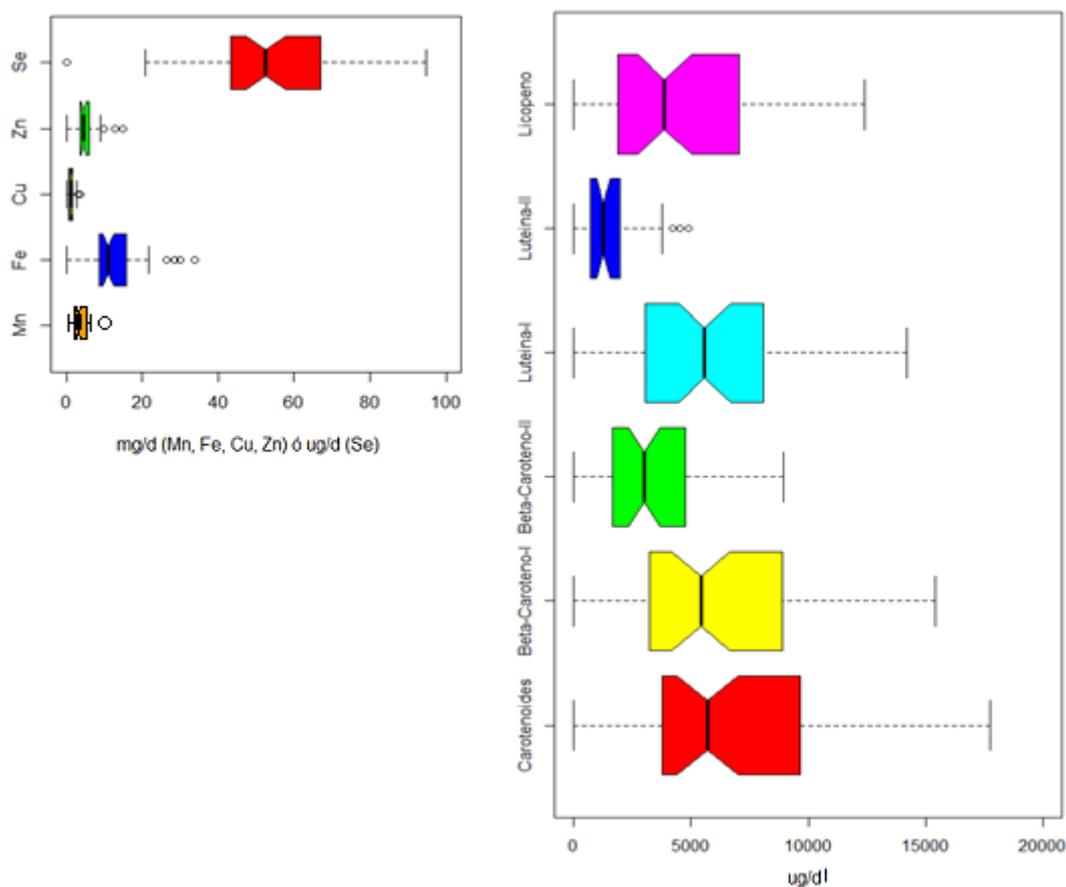
Variables	Todos (n=52)	Hombres (n=27)	Mujeres (n=25)	p-valor <sup>2</sup>
	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	
Edad (años)	41,3 (12,4)	44,6 (10,5)	39,8 (13,4)	0,08
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,5 (3,66)	25,4 (2,41)	23,3 (3,94)	0,04
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
Hábito tabáquico				
No fumador	45 (90,4)	24 (88,9)	21 (84,0)	0,52
Fumador	7 (9,60)	3 (11,1)	4 (16,0)	
Actividad física				
Sedentario	38 (73,1)	17 (62,9)	21 (84,0)	0,10
Activo	14 (26,9)	10 (37,1)	4 (16,0)	
Consumo de alcohol				
No consumidor	10 (19,2)	6 (22,2)	4 (16,0)	0,79
Consumidor	42 (80,8)	21 (77,8)	21 (84,0)	
<b>Características dietéticas<sup>1</sup></b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>	
Ingesta de energía (kcal/día)	2040 (542)	2056 (636)	2024 (459)	0,81
Fibra (g/día)	27,3 (10,2)	23,7 (8,41)	31,9 (10,5)	0,26
Vitamina E (mg Eq/día)	6,59 (2,81)	6,16 (2,10)	6,86 (3,70)	0,67
Vitamina C (mg/día)	299 (162)	268 (137)	331 (178)	0,18
Vitamina A (µg Eq/día)	2700 (1576)	2690 (1382)	2708 (1727)	0,88

<sup>1</sup>Datos dietéticos derivados del CFCA.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de la t de Student y test de Wilcoxon para variables continuas y test de la chi-cuadrado para variables categóricas.

### 5.4.2. Descripción de la ingesta dietética y de los niveles en plasma de minerales y carotenoides en la población del estudio III (n=52)

En la **figura 36** se representa la distribución, en cuartiles, de la ingesta de minerales y carotenoides en la población del estudio III (distribución no-normal de valores; prueba Shapiro-Wilk;  $p<0,05$ ).



**A** **B**  
**Figura 36:** Diagrama de cajas de minerales (A) y carotenoides (B) en dieta de la población del estudio III. (Datos de minerales del CESNID y de Mataix *et al.* (2009); datos de carotenoides del CESNID; datos de  $\beta$ -caroteno-I y luteína-I de Mataix *et al.* (2009); datos de  $\beta$ -caroteno-II, luteína-II y licopeno de Beltrán *et al.* (2012)).

En la **tabla 42**, correspondiente a la información de dieta obtenida a través del CFCA, se muestran la mediana y el rango intercuartílico (IQR; P25-P75) de la ingesta de minerales y carotenoides según sexo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la ingesta de estos nutrientes antioxidantes. Con respecto a las IDR, tanto en hombres como en mujeres, todos los minerales se encontraron dentro del rango de las cantidades diarias de ingesta de referencia, excepto el Zn y, para las mujeres jóvenes, en el caso del Fe. En relación a los carotenoides, se muestran las ingestas dietéticas según fuente de información empleada para su cuantificación en la **tabla 42**. Como también se aprecia en esta tabla, las mujeres presentaron ingestas más elevadas que los hombres en todos los carotenoides, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 42.** Descripción de la ingesta de minerales y carotenoides según el CFCA en la población del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).

Minerales y Carotenos en dieta	Hombres (n=27)		Mujeres (n=25)		p-valor <sup>5</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	Mediana	[IQR]	
Mn <sup>2,3</sup> (mg/día)	2,00	[1,42;3,09]	1,62	[1,09;3,39]	0,469
Fe <sup>2,3</sup> (mg/día)	10,8	[9,17;14,7]	11,6	[8,58;15,9]	0,891
Cu <sup>2,3</sup> (mg/día)	1,02	[0,87;1,25]	0,98	[0,72;1,79]	0,819
Zn <sup>2,3</sup> (mg/día)	4,62	[3,75;5,58]	4,45	[3,29;6,12]	0,469
Se <sup>2,3</sup> (µg/día)	54,7	[48,0;68,5]	48,6	[37,3;60,8]	0,126
Carotenoides <sup>2</sup> (µg/día)	5237	[3263;8445]	7882	[4001;11125]	0,301
β-caroteno <sup>3</sup> (µg/día)	2552	[1421;4227]	3688	[1767;5437]	0,341
Luteína <sup>3</sup> (µg/día)	1168	[717;1823]	1277	[909;2042]	0,674
β-caroteno <sup>4</sup> (µg/día)	4923	[3031;7991]	6633	[3705;9563]	0,379
Luteína <sup>4</sup> (µg/día)	5279	[2958;7183]	5747	[3316;8084]	0,680
Lycopeno <sup>4</sup> (µg/día)	3611	[2116;5434]	4556	[1524;8142]	0,812

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Resultados obtenidos usando los datos de minerales y carotenoides del CESNID.

<sup>3</sup>Resultados obtenidos usando los datos de minerales, β-caroteno y luteína de Mataix *et al.* (2009).

<sup>4</sup>Resultados obtenidos usando los datos de β-caroteno, luteína y licopeno de Beltrán *et al.* (2012).

<sup>5</sup>Diferencias según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

La **tabla 43** muestra igualmente mediana e IQR (P25-P75) de la ingesta de minerales y carotenoides, según la información derivada del R-24H. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres al comparar la ingesta media de minerales y carotenoides. Con respecto a la adecuación de la ingesta a las IDR, se encontró que la ingesta de todos los minerales estaba por debajo de las ingestas recomendadas. En general, la ingesta de minerales y carotenoides derivada a partir de la dieta recogida con el R-24H fue más baja que la recogida con el CFCA ( $p < 0,05$ ).

Por otro lado, en la **tabla 44**, se muestran la mediana y el IQR (P25-P75) de cada uno de los minerales y carotenoides analizados en las muestras sanguíneas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios entre ambos sexos, excepto para el Cu ( $p = 0,001$ ), con niveles significativamente más elevados en mujeres que en hombres.

**Tabla 43.** Descripción de la ingesta de minerales y carotenoides según el R-24H en la población del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).

Minerales y Carotenos en dieta	Hombres (n=27)		Mujeres (n=25)		p-valor <sup>5</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	Mediana	[IQR]	
Mn <sup>2,3</sup> (mg/día)	1,72	[1,14;17,7]	2,85	[1,23;32,7]	0,621
Fe <sup>2,3</sup> (mg/día)	5,64	[4,42;9,15]	6,05	[3,96;7,58]	0,621
Cu <sup>2,3</sup> (mg/día)	0,58	[0,39;0,83]	0,58	[0,33;1,08]	0,912
Zn <sup>2,3</sup> (mg/día)	2,27	[1,99;3,68]	2,54	[1,30;3,10]	0,840
Se <sup>2,3</sup> (µg/día)	41,7	[27,2;59,7]	29,1	[16,7;46,0]	0,099
Carotenoides <sup>2</sup> (µg/día)	1811	[1032;3453]	1951	[1297;4688]	0,498
β-caroteno <sup>3</sup> (µg/día)	829	[522;1058]	478	[220;1523]	0,589
Luteína <sup>3</sup> (µg/día)	346	[144;564]	290	[113;616]	0,783
β-caroteno <sup>4</sup> (µg/día)	1118	[364;3906]	3380	[639;7078]	0,148
Luteína <sup>4</sup> (µg/día)	200	[67,5;2892]	1635	[0,00;4280]	0,292
Licopeno <sup>4</sup> (µg/día)	6200	[0,00;8064]	3100	[0,00;6200]	0,320

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Resultados obtenidos usando los datos de minerales y carotenoides del CESNID.

<sup>3</sup>Resultados obtenidos usando los datos de minerales, β-caroteno y luteína de Mataix *et al.* (2009).

<sup>4</sup>Resultados obtenidos usando los datos de β-caroteno, luteína y licopeno de Beltrán *et al.* (2012).

<sup>5</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

**Tabla 44.** Descripción de los niveles minerales y carotenoides en el plasma sanguíneo en la muestra del estudio transversal III según sexo (n=27 hombres; n=25 mujeres).

Minerales y Carotenos en plasma	Todos (n=52)		Hombres (n=27)		Mujeres (n=25)		p-valor <sup>2</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	Mediana	[IQR]	Mediana	[IQR]	
Mn (mg/L)	8,58E-04	[6,50E-04;7,22E-03]	8,40E-04	[6,50E-04;1,40E-03]	8,70E-04	[7,30E-04;1,50E-03]	0,694
Fe (mg/L)	2,26	[1,89;2,65]	2,33	[1,90;2,79]	2,19	[1,89;2,46]	0,458
Cu (mg/L)	1,00	[0,92;1,08]	0,95	[0,91;1,00]	1,06	[1,01;1,13]	0,001
Zn (mg/L)	1,44	[1,28;1,64]	1,50	[1,33;1,78]	1,40	[1,18;1,61]	0,260
Se (mg/L)	0,11	[0,10;0,12]	0,11	[0,10;0,12]	0,10	[0,10;0,12]	0,819
β-criptoxantina (µmol/L)	0,33	[0,22;0,49]	0,33	[0,24;0,52]	0,36	[0,22;0,47]	0,920
Luteína (µmol/L)	0,39	[0,39;0,59]	0,41	[0,27;0,59]	0,39	[0,32;0,59]	0,706
α-caroteno (µmol/L)	0,10	[0,07;0,13]	0,12	[0,07;0,14]	0,10	[0,09;0,11]	0,562
β-caroteno (µmol/L)	0,38	[0,28;0,57]	0,35	[0,26;0,52]	0,40	[0,34;0,66]	0,174
Licopeno (µmol/L)	1,64	[1,08;2,06]	1,49	[1,06;2,02]	1,65	[1,13;2,07]	0,701

<sup>1</sup>IQR=P25-P75

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas por sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Valores faltantes: n=1 para luteína; n=31 para α-caroteno; n=3 para β-caroteno; n=6 para licopeno.

### 5.4.3. Análisis de correlación entre minerales y carotenoides de la dieta y del plasma en la población del estudio III (n=52)

En la **tabla 45** se muestran las correlaciones entre la ingesta dietética de minerales cuantificada a partir de la información recogida con el CFCA y los niveles de minerales determinados en las muestras de plasma. Las correlaciones entre los minerales en dieta fueron todas estadísticamente significativas ( $\rho=0,54-0,94$ ;  $p<0,001$ ). Se observaron factores de correlación más elevados ( $\rho>0,8$ ) entre Fe con Cu y Zn, y entre Cu con Zn. En cuanto a las correlaciones entre minerales del plasma, se constataron correlaciones moderadas y estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre Mn y Cu ( $\rho=0,31$ ), Mn y Zn ( $\rho=0,36$ ), Fe y Cu ( $\rho=0,28$ ), Fe y Zn ( $\rho=0,63$ ), Fe y Se ( $\rho=0,48$ ), Cu y Zn ( $\rho=0,36$ ) y Se ( $\rho=0,35$ ), y Zn y Se ( $\rho=0,59$ ). En las correlaciones dieta-plasma se observaron correlaciones moderadas ( $\rho\sim 0,3$ ) y significativas entre Fe-plasma y Cu-dieta, Fe-plasma y Zn-dieta, y entre Fe-plasma y Se-dieta. Sin embargo, no se observan correlaciones significativas entre ningún mineral estimado a través del CFCA y el mismo mineral analizado en el plasma.

**Tabla 45.** Correlaciones (spearman) entre los niveles de minerales en dieta (derivados del CFCA) y los niveles de minerales en plasma (n=52).

Minerales en dieta y plasma	Mn <sup>a</sup>	Fe <sup>a</sup>	Cu <sup>a</sup>	Zn <sup>a</sup>	Se <sup>a</sup>	Mn <sup>b</sup>	Fe <sup>b</sup>	Cu <sup>b</sup>	Zn <sup>b</sup>	Se <sup>b</sup>
Mn (mg/día) <sup>a</sup>	-	0,69**	0,60**	0,65**	0,54**	0,10	0,24	-0,12	0,03	0,06
Fe (mg/día) <sup>a</sup>	0,69**	-	0,92**	0,93**	0,73**	0,19	0,26	-0,01	0,14	0,21
Cu (mg/día) <sup>a</sup>	0,60**	0,92**	-	0,94**	0,73**	0,13	0,33*	-0,09	0,19	0,21
Zn (mg/día) <sup>a</sup>	0,65**	0,93**	0,94**	-	0,80**	0,15	0,34*	-0,06	0,15	0,16
Se (µg/día) <sup>a</sup>	0,54**	0,73**	0,73**	0,80**	-	0,05	0,32*	-0,06	0,19	0,15
Mn (mg/L) <sup>b</sup>	0,10	0,19	0,13	0,15	0,05	-	0,24	0,31*	0,36*	0,17
Fe (mg/L) <sup>b</sup>	0,24	0,26	0,33*	0,34*	0,32*	0,24	-	0,28*	0,63**	0,48**
Cu (mg/L) <sup>b</sup>	-0,12	-0,01	-0,09	-0,06	-0,06	0,31*	0,28*	-	0,36*	0,35*
Zn (mg/L) <sup>b</sup>	0,03	0,14	0,19	0,15	0,19	0,36*	0,63**	0,36*	-	0,59**
Se (mg/L) <sup>b</sup>	0,06	0,21	0,21	0,16	0,15	0,17	0,48**	0,35*	0,59**	-

\*Coeficiente de correlación significativo ( $p<0,05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p<0,001$ ).

<sup>a</sup>Niveles de ingesta de minerales en dieta (derivados del CFCA).

<sup>b</sup>Niveles de minerales en plasma.

En relación con la ingesta de minerales derivada del R-24H (**tabla 46**), también se observaron correlaciones significativas entre los minerales de la dieta ( $\rho>0,3$ : Mn-Fe, Mn-Cu, Mn-Zn, Fe-Cu, Fe-Zn, Fe-Se, Zn-Cu, Zn-Se), los minerales del plasma ( $\rho>0,3$ : Fe-Se, Zn-Cu, Zn-Se) y minerales dieta-plasma ( $\rho>0,3$ : Mn-Cu, Mn-Zn, Fe-Zn, Fe-Se, Cu-Zn, Cu-Se, Zn-Se). Tampoco se observaron, en este caso, correlaciones significativas para un mismo mineral entre los niveles de ingesta dietética y los niveles plasmáticos del mismo.

**Tabla 46.** Correlaciones (spearman) entre los niveles de minerales en dieta (derivados del R-24H) y los niveles de minerales en plasma (n=52).

Minerales en dieta y plasma	Mn <sup>a</sup>	Fe <sup>a</sup>	Cu <sup>a</sup>	Zn <sup>a</sup>	Se <sup>a</sup>	Mn <sup>b</sup>	Fe <sup>b</sup>	Cu <sup>b</sup>	Zn <sup>b</sup>	Se <sup>b</sup>
Mn (mg/día) <sup>a</sup>	-	0,46**	0,32*	0,52**	0,03	-0,09	0,11	0,26	0,26	0,15
Fe (mg/día) <sup>a</sup>	0,46**	-	0,81**	0,93**	0,49**	0,00	0,17	0,22	0,31*	0,17
Cu (mg/día) <sup>a</sup>	0,32*	0,81**	-	0,85**	0,36*	-0,07	0,11	0,21	0,20	0,08
Zn (mg/día) <sup>a</sup>	0,52**	0,93**	0,85**	-	0,44**	-0,06	0,16	0,25	0,27	0,13
Se (μg/día) <sup>a</sup>	0,03	0,49**	0,36*	0,44**	-	0,12	0,30*	0,05	0,48**	0,15
Mn (mg/L) <sup>b</sup>	-0,09	0,00	-0,07	-0,06	0,12	-	0,24	0,31*	0,36*	0,17
Fe (mg/L) <sup>b</sup>	0,11	0,17	0,11	0,16	0,30*	0,24	-	0,28	0,63**	0,48**
Cu (mg/L) <sup>b</sup>	0,26	0,22	0,21	0,25	0,05	0,31*	0,28	-	0,36*	0,35*
Zn (mg/L) <sup>b</sup>	0,26	0,31*	0,20	0,27	0,48**	0,36*	0,63**	0,36*	-	0,59**
Se (mg/L) <sup>b</sup>	0,15	0,17	0,08	0,13	0,15	0,17	0,48**	0,35*	0,59**	-

\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*Coeficiente de correlación significativo ( $p < 0,001$ ).

<sup>a</sup>Niveles de ingesta de minerales en dieta (derivados del R-24H).

<sup>b</sup>Niveles de minerales en plasma.

En la **tabla 47** se presentan las correlaciones entre la ingesta de carotenoides cuantificada en el CFCA y los carotenoides analizados en plasma. Entre los carotenoides de la dieta, todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas ( $\rho = 0,48-0,96$ ;  $p < 0,001$ ). Considerando las correlaciones entre los carotenoides determinados en las muestras de plasma, se alcanzaron correlaciones moderadas y significativas ( $p < 0,05$ ) para luteína con  $\alpha$ -caroteno ( $\rho = 0,35$ ) y con  $\beta$ -caroteno ( $\rho = 0,43$ ); y correlaciones más elevadas ( $p < 0,001$ ) para  $\beta$ -criptoxantina con luteína ( $\rho = 0,51$ ) y  $\beta$ -caroteno ( $\rho = 0,61$ ), luteína con licopeno ( $\rho = 0,48$ ),  $\alpha$ -caroteno con  $\beta$ -caroteno ( $\rho = 0,65$ ) y con licopeno ( $\rho = 0,52$ ), y  $\beta$ -caroteno con licopeno ( $\rho = 0,49$ ). Por último, atendiendo a las correlaciones entre los carotenoides en dieta y plasma, sólo se observaron correlaciones significativa ( $p < 0,05$ ) entre la luteína estimada en la dieta y la luteína analizada en el plasma ( $\rho = 0,37-0,40$ ). El resto de correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) se dieron entre los niveles de luteína en plasma y otros carotenoides en dieta (carotenoides  $\rho = 0,33$ ; y  $\beta$ -caroteno  $\rho = 0,33-0,35$ ). En relación con la ingesta de carotenoides cuantificada a partir del R-24H (**tabla 47**), se observó un patrón de correlación similar entre carotenoides de la dieta ( $\rho > 0,3$ ), y los carotenoides del plasma ( $\rho > 0,3$ :  $\beta$ -criptoxantina-luteína;  $\beta$ -criptoxantina- $\beta$ -caroteno; luteína-licopeno;  $\alpha$ -caroteno- $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno-licopeno; y  $\beta$ -caroteno-licopeno). Respecto a correlaciones dieta-plasma que fueron estadísticamente significativas, éstas sólo aparecieron entre los carotenoides de la dieta y el  $\alpha$ -caroteno del plasma ( $\rho = 0,35$ ) y entre el  $\beta$ -caroteno de la dieta y el  $\alpha$ -caroteno del plasma ( $\rho = 0,48$ ).

**Tabla 47.** Correlaciones (spearman) entre niveles de carotenoides en dieta (derivados del CFCA y del R-24H) y niveles de carotenoides en plasma (n=52).

Carotenoides en dieta y plasma	Carotenoides <sup>1a</sup>	β-caroteno <sup>2a</sup>	Luteína <sup>2a</sup>	β-caroteno <sup>3a</sup>	Luteína <sup>3a</sup>	Licopeno <sup>3a</sup>	β-criptoxantina <sup>b</sup>	Luteína <sup>b</sup>	α-caroteno <sup>b</sup>	β-caroteno <sup>b</sup>	Licopeno <sup>b</sup>
<b>Derivados del CFCA</b>											
Carotenoides <sup>1a</sup> (μg/día)	-	0,96**	0,89**	0,96**	0,84**	0,60**	0,18	0,33*	-0,05	0,19	0,11
β-caroteno <sup>2a</sup> (μg/día)	0,96**	-	0,84**	0,94**	0,77**	0,55**	0,20	0,35*	0,16	0,22	0,11
Luteína <sup>2a</sup> (μg/día)	0,89**	0,84**	-	0,90**	0,94**	0,62**	0,24	0,37*	-0,04	0,27	0,06
β-caroteno <sup>3a</sup> (μg/día)	0,96**	0,94**	0,90**	-	0,87**	0,63**	0,23	0,33*	-0,06	0,19	0,13
Luteína <sup>3a</sup> (μg/día)	0,84**	0,77**	0,94**	0,87**	-	0,57**	0,25	0,40*	0,09	0,23	0,13
Licopeno <sup>3a</sup> (μg/día)	0,60**	0,55**	0,62**	0,63**	0,57**	-	-0,01	0,10	-0,09	-0,09	-0,08
β-criptoxantina <sup>b</sup> (μmol/L)	0,18	0,20	0,24	0,23	0,25	-0,01	-	0,51**	0,23	0,61**	0,29
Luteína <sup>b</sup> (μmol/L)	0,33*	0,35*	0,37*	0,33*	0,40*	0,10	0,51**	-	0,35*	0,43*	0,48**
α-caroteno <sup>b</sup> (μmol/L)	-0,05	0,16	-0,04	-0,06	0,09	-0,09	0,23	0,35*	-	0,65**	0,52**
β-caroteno <sup>b</sup> (μmol/L)	0,19	0,22	0,27	0,19	0,23	-0,09	0,61**	0,43*	0,65**	-	0,49**
Licopeno <sup>b</sup> (μmol/L)	0,11	0,11	0,06	0,13	0,13	-0,08	0,29	0,48**	0,52**	0,49**	-
<b>Derivados del R-24h</b>											
Carotenoides <sup>1a</sup> (μg/día)	-	0,82**	0,80**	0,74**	0,69**	0,30*	0,22	0,12	0,32*	0,25	-0,12
β-caroteno <sup>2a</sup> (μg/día)	0,82**	-	0,80**	0,76**	0,74**	0,51**	0,08	0,05	0,48**	0,16	-0,13
Luteína <sup>2a</sup> (μg/día)	0,80**	0,80**	-	0,64**	0,78**	0,40*	0,14	0,22	0,23	0,10	-0,06
β-caroteno <sup>3a</sup> (μg/día)	0,74**	0,76**	0,64**	-	0,77**	0,48**	0,12	0,06	0,20	0,18	-0,17
Luteína <sup>3a</sup> (μg/día)	0,69**	0,74**	0,78**	0,77**	-	0,33*	0,03	0,17	0,27	0,13	-0,08
Licopeno <sup>3a</sup> (μg/día)	0,30*	0,51**	0,40*	0,48**	0,33*	-	0,05	0,05	-0,13	-0,04	-0,22
β-criptoxantina <sup>b</sup> (μmol/L)	0,22	0,08	0,14	0,12	0,03	0,05	-	0,51**	0,23	0,61**	0,29*
Luteína <sup>b</sup> (μmol/L)	0,12	0,05	0,22	0,06	0,17	0,05	0,51**	-	0,35*	0,43*	0,48**
α-caroteno <sup>b</sup> (μmol/L)	0,32*	0,48**	0,23	0,20	0,27	-0,13	0,23	0,35*	-	0,65**	0,52**
β-caroteno <sup>b</sup> (μmol/L)	0,25	0,16	0,10	0,18	0,13	-0,04	0,61**	0,43*	0,65**	-	0,49**
Licopeno <sup>b</sup> (μmol/L)	-0,12	-0,13	-0,06	-0,17	-0,08	-0,22	0,29*	0,48**	0,52*	0,49**	-

\*Coeficiente de correlación significativo (p<0.05); \*\*Coeficiente de correlación significativo (p<0.001).

<sup>1</sup>Resultados obtenidos usando los datos de carotenos del CESNID.

<sup>2</sup>Resultados obtenidos usando los datos de β-caroteno y luteína de Mataix *et al.* (2009).

<sup>3</sup>Resultados obtenidos usando los datos de β-caroteno, luteína y licopeno Beltrán *et al.* (2012).

<sup>a</sup>Niveles de carotenoides en dieta (derivados del CFCA).

<sup>b</sup>Niveles de carotenoides en plasma.

#### 5.4.4. Descripción de los niveles en plasma de minerales y carotenoides en la población del estudio II (n=210)

Las características de la población de estudio II (estudio EPIC-Granada y Guipúzcoa) se han descrito en el apartado 5.3.1. Asimismo, se describe la ingesta de Fe y de  $\beta$ -caroteno en la tabla 22. No ha sido posible disponer de datos de ingesta de otros minerales o carotenoides en esta población de estudio (la cuantificación de estos nutrientes no se ha completado).

En la tabla 48 se muestran los resultados del estudio descriptivo realizado en minerales y carotenoides en la muestra de esta población de estudio. Cabe destacar, que no fue posible cuantificar en todas las muestras algunos minerales y carotenoides por estar por debajo del límite de detección. La proporción de medidas faltantes fue considerable en el  $\alpha$ -caroteno (91,9%), por lo que se decidió desechar este biomarcador en los análisis posteriores.

**Tabla 48.** Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II.

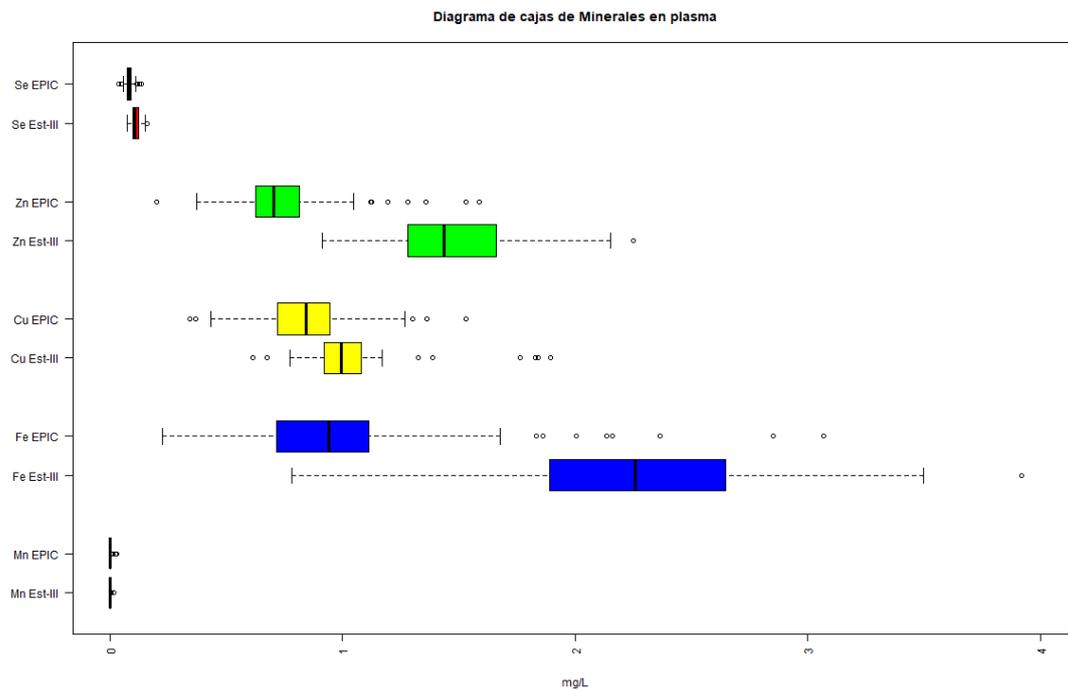
Minerales y carotenoides en plasma	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	n	%n de datos faltantes
Mn (mg/L)	1,52E-03	[1,17E-03;2,10E-03]	208	0,95
Fe (mg/L)	0,94	[0,72;1,11]	208	0,95
Cu (mg/L)	0,84	[0,72;0,94]	208	0,95
Zn (mg/L)	0,70	[0,63;0,81]	208	0,95
Se (mg/L)	0,08	[0,07;0,09]	208	0,95
$\beta$ -criptoxantina ( $\mu$ mol/L)	0,30	[0,17;0,48]	170	19,0
Luteína ( $\mu$ mol/L)	0,24	[0,16;0,36]	166	21,0
$\alpha$ -caroteno ( $\mu$ mol/L)	0,10	[0,06;0,15]	17	91,9
$\beta$ -caroteno ( $\mu$ mol/L)	0,21	[0,14;0,34]	112	46,7
Licopeno ( $\mu$ mol/L)	1,23	[0,67;2,22]	72	65,7

<sup>1</sup>IQR=P25-P75

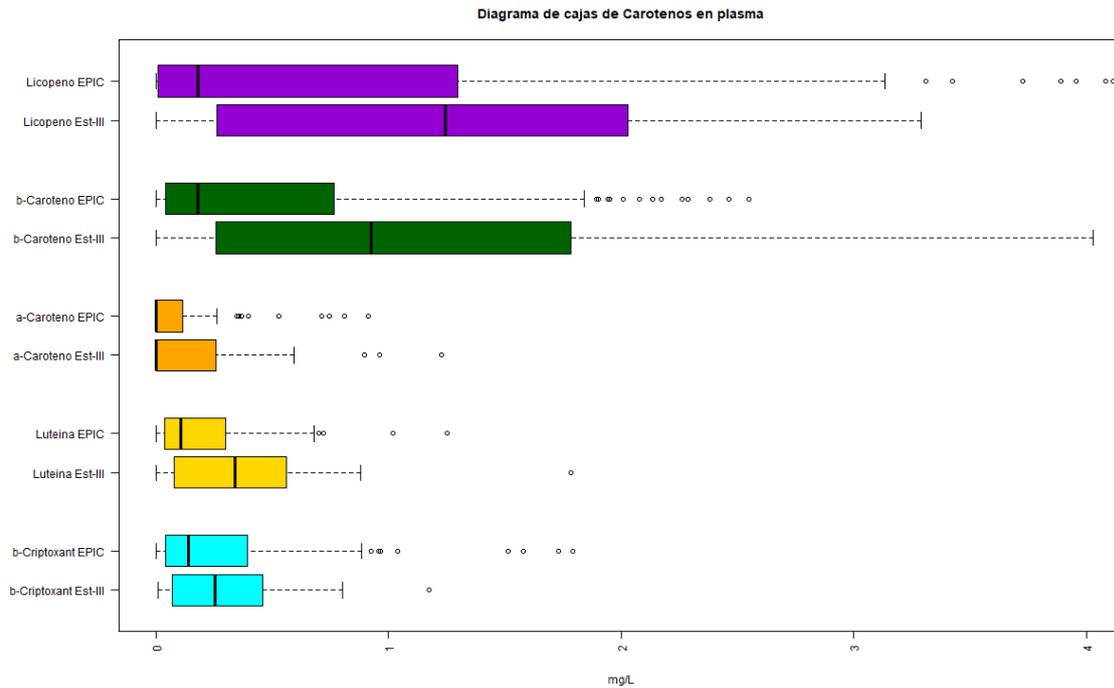
Resto de biomarcadores nutricionales y de CANE-P con información completa (ver tablas 24 y 25).

Al comparar los niveles plasmáticos de estos nutrientes en ambas poblaciones de estudio (estudio transversal II y estudio transversal III), se encontraron diferencias notables entre los mismos. En general, las concentraciones plasmáticas de minerales y de carotenoides fueron más elevadas en la población del estudio III (tabla 44) que en la población del estudio II (tabla 48). La figura 37 y figura 38, muestran, mediante diagramas de cajas, la mediana y el IQR (P25-P75) de las dos poblaciones de estudio para todos los minerales y carotenoides del plasma. La distribución de los valores fue asimétrica (prueba Shapiro-Wilk;  $p < 0,05$ ). El rango de valores de Se y Mn fue parecido en ambas poblaciones de estudio. Sin embargo, se observaron niveles más elevados de Zn, Cu y Fe y un rango de valores más amplio, en la población del estudio III (excepto en el Cu). Análogamente, los niveles de carotenoides fueron, en general,

aparentemente más elevados en el estudio III que en el estudio II. El rango de valores (máximo-mínimo) también fue más amplio en el estudio III, si bien este estudio presentó menos valores atípicos de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. Las diferencias observadas entre ambos estudios se pueden deber a diferencias en la proporción de mujeres y hombres (70% de mujeres en estudio II), diferencias regionales (la población del estudio II incluye Guipúzcoa) y a diferencias temporales (la población del estudio II fue reclutada entre 1992-1996). Por lo tanto, se pudo asumir una buena reproducibilidad de las determinaciones plasmáticas de minerales y carotenoides inter-estudio.



**Figura 37.** Diagrama de cajas y comparación de las concentraciones de minerales en plasma entre la población del estudio II y la población del estudio III.



**Figura 38.** Diagrama de cajas y comparación de las concentraciones de carotenoides en plasma entre la población del estudio II y la población del estudio III.

En la **tabla 49** se describen los niveles (mediana e IQR (P25-P75)) de minerales y carotenoides determinados en las muestras de plasma de la población del estudio II según sexo. Este análisis descriptivo reveló diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto a los niveles medios de Mn y Fe ( $p < 0,05$ ) y Cu ( $p < 0,001$ ). En concreto, la concentración media de Mn y Fe fue mayor en los hombres y la concentración media de Cu fue mayor en las mujeres. No se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos en los restantes minerales ni en ninguno de los carotenoides analizados.

**Tabla 49.** Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II según sexo (n=63 hombres; n=147 mujeres). Valores crudos, sin imputar.

Minerales y carotenoides en plasma	Hombres (n=63)		Mujeres (n=147)		p-valor <sup>2</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	Mediana	[IQR]	
Mn (mg/L)	1,40E-03	[1,09E-03;1,72E-03]	1,57E-03	[1,21E-03;2,25E-03]	0,007
Fe (mg/L)	1,00	[0,81;1,20]	0,87	[0,67;1,10]	0,006
Cu (mg/L)	0,73	[0,65;0,84]	0,87	[0,79;0,98]	<0,001
Zn (mg/L)	0,68	[0,62;0,79]	0,71	[0,63;0,82]	0,179
Se (mg/L)	0,08	[0,07;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	0,791
β-criptoxantina (μmol/L)	0,27	[0,19;0,43]	0,30	[0,16;0,52]	0,847
Luteína (μmol/L)	0,28	[0,17;0,33]	0,23	[0,15;0,36]	0,531
α-caroteno (μmol/L)	0,07	[0,05;0,11]	0,10	[0,06;0,16]	0,673
β-caroteno (μmol/L)	0,19	[0,13;0,28]	0,22	[0,16;0,36]	0,351
Licopeno (μmol/L)	2,28	[0,90;3,13]	1,19	[0,60;1,82]	0,091

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Los niveles plasmáticos de minerales y carotenoides según el centro de reclutamiento de la población del estudio II (EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa), se describen en la **tabla 50**. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos de ambos centros en cuanto a los niveles medios de Mn ( $p<0,001$ ), Cu ( $p<0,05$ ) y Se ( $p<0,05$ ) y, en cuanto a los carotenoides, las diferencias estadísticamente significativas entre centros se dieron en la β-criptoxantina y el licopeno ( $p<0,001$ ), en la luteína ( $p=0,002$ ) y en β-caroteno ( $p=0,041$ ). Las concentraciones de Fe, β-criptoxantina, luteína, α-caroteno, β-caroteno y licopeno fueron más elevadas en Guipúzcoa que en Granada, mientras que, las concentraciones de Cu, fueron más elevadas en los sujetos de Granada.

**Tabla 50.** Descripción de los niveles de minerales y carotenoides en las muestras de plasma del estudio transversal II según centro (n=105 Granada; n=105 Guipúzcoa). Valores crudos, sin imputar.

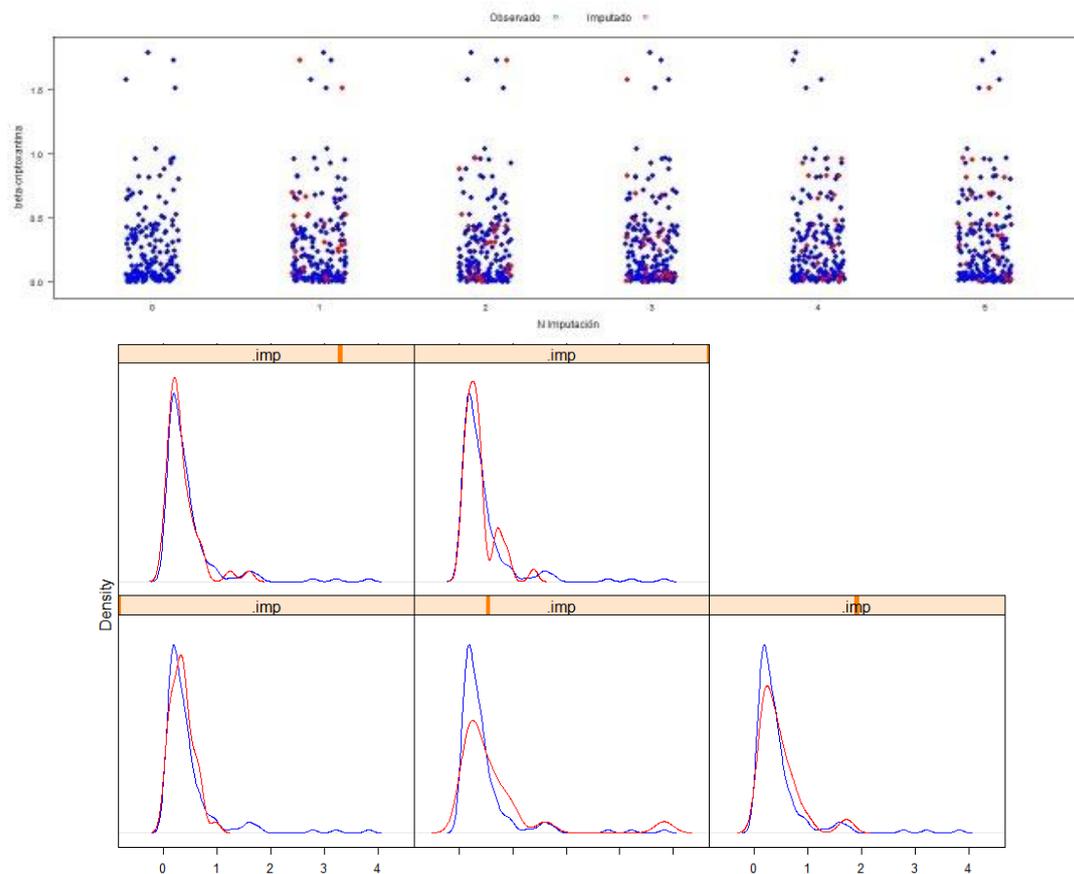
Minerales y carotenoides en plasma	Granada (n=105)		Guipúzcoa (n=105)		p-valor <sup>2</sup>
	Mediana	[IQR] <sup>1</sup>	Mediana	[IQR]	
Mn (mg/L)	1,46E-03	[1,09E-03;1,82E-03]	1,59E-03	[1,20E-03;2,28E-03]	<0,001
Fe (mg/L)	0,93	[0,69;1,09]	0,95	[0,74;1,18]	0,283
Cu (mg/L)	0,86	[0,78;0,98]	0,81	[0,70;0,91]	0,006
Zn (mg/L)	0,70	[0,62;0,82]	0,70	[0,63;0,79]	0,659
Se (mg/L)	0,08	[0,08;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	0,008
β-criptoxantina (μmol/L)	0,21	[0,13;0,41]	0,37	[0,23;0,52]	<0,001
Luteína (μmol/L)	0,19	[0,12;0,31]	0,28	[0,20;0,39]	0,002
α-caroteno (μmol/L)	0,06	[0,05;0,06]	0,10	[0,07;0,18]	0,136
β-caroteno (μmol/L)	0,20	[0,12;0,30]	0,25	[0,17;0,42]	0,041
Licopeno (μmol/L)	0,74	[0,18;1,27]	2,07	[1,30;3,13]	<0,001

<sup>1</sup>IQR=P25-P75

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según centro: Test de Wilcoxon para variables continuas.

### 5.4.5. Descripción de los niveles en plasma de minerales y carotenoides tras la imputación de los datos faltantes

La imputación de los datos faltantes de minerales y carotenoides, por el procedimiento de imputación múltiple MICE, generó cinco conjuntos de datos imputados (n=210 sujetos x 5 ciclos de imputación=1050 sujetos), que se manejaron como bases de datos independientes en los análisis siguientes. Para la aplicación de la imputación se comprobó la asunción de “missing at random” (MAR); la variable de sexo se asoció al patrón de datos faltantes (por ejemplo;  $\beta$ -caroteno  $p=0,014$  y licopeno  $p=0,004$ ). La evaluación de la calidad de la imputación, a través de la comparación de la distribución de valores observados y valores imputados, mostró que el modelo de imputación elegido fue adecuado y que los valores imputados eran plausibles. Así, tal y como se muestra en las **figuras 39-42**, la distribución de los valores imputados siguió un patrón similar al de los observados, para la  $\beta$ -criptoxantina (**figura 39**),  $\beta$ -caroteno (**figura 40**), licopeno (**figura 41**) y luteína (**figura 42**). La proporción de valores faltantes fue insignificante en el caso de los minerales (N=2), por lo que no se describen los datos tras la imputación.



**Figura 39:** Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de  $\beta$ -criptoxantina en los cinco ciclos de imputación múltiple.

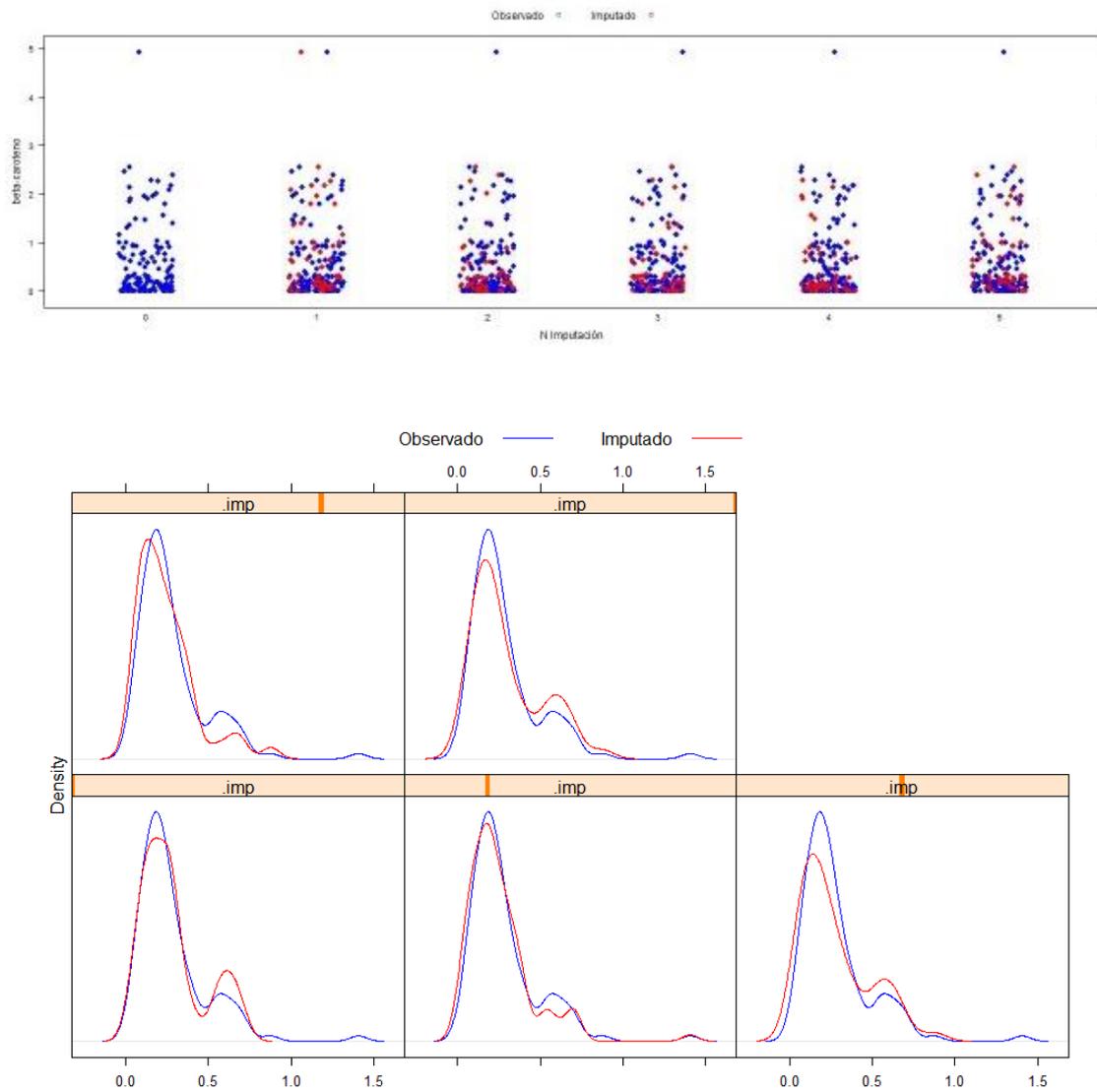


Figura 40: Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de  $\beta$ -caroteno en los cinco ciclos de imputación múltiple.

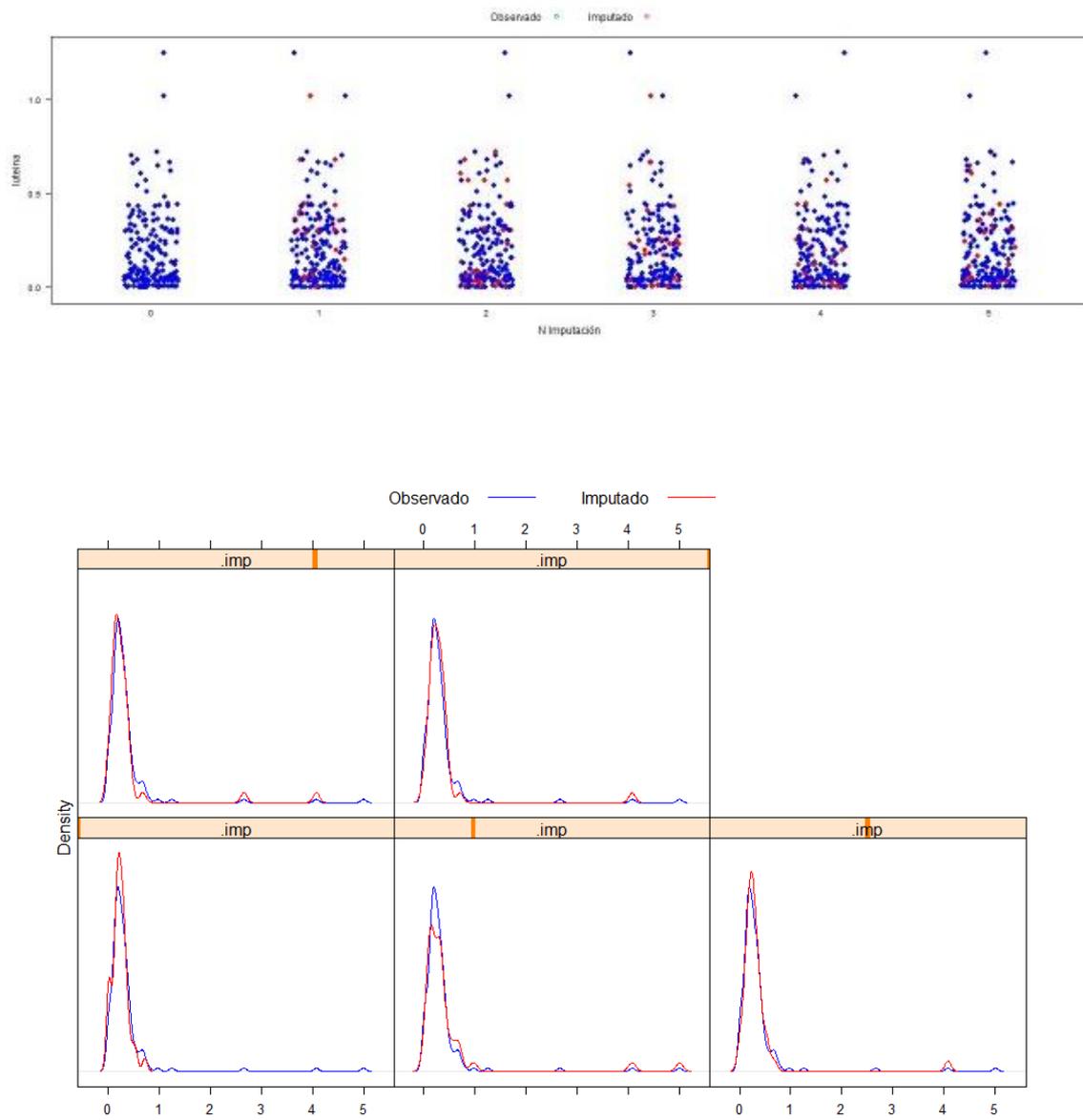
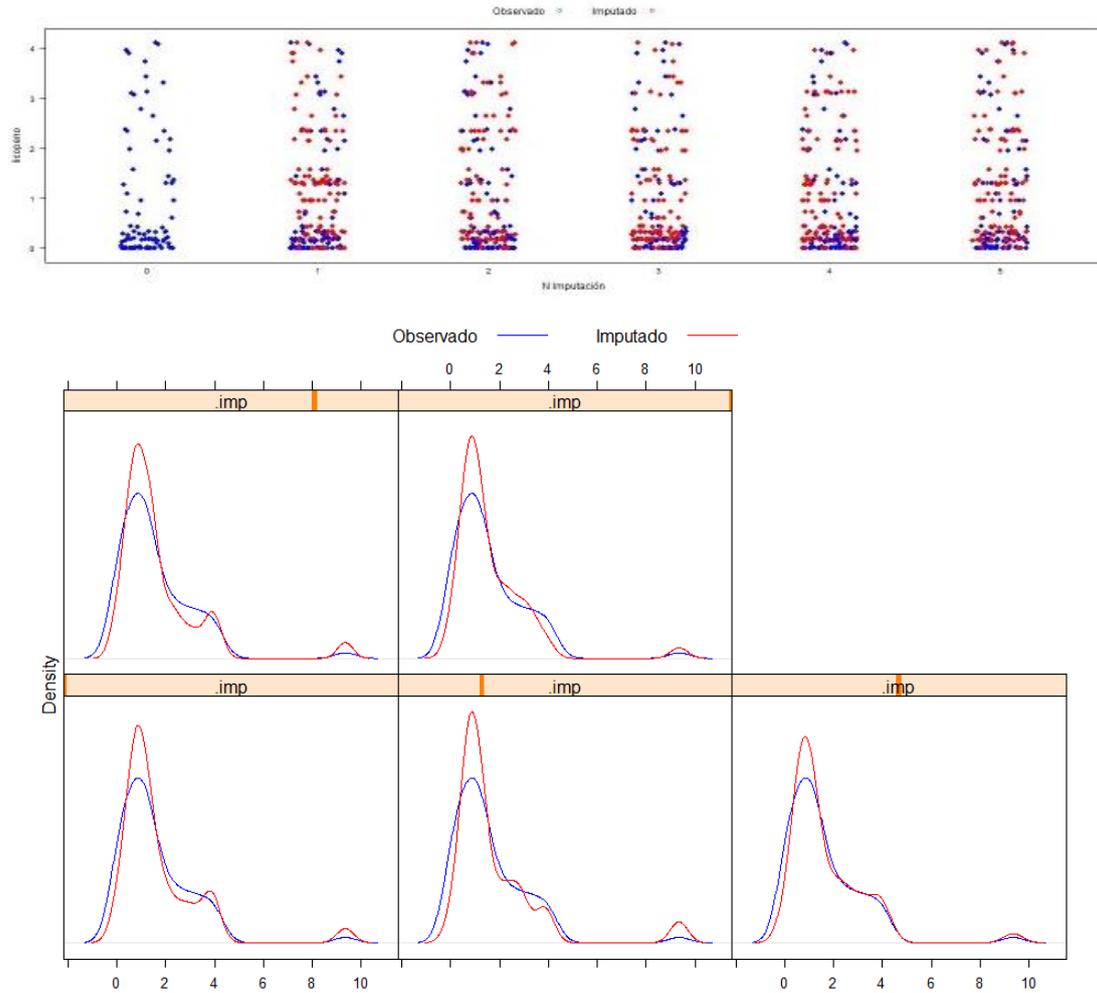


Figura 41: Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de luteína en los cinco ciclos de imputación múltiple.



**Figura 42:** Distribución de valores observados (azul) e imputados (rojo) de licopeno en los cinco ciclos de imputación múltiple.

El descriptivo de los datos imputados se muestra en las **tablas 51** (según sexo) y **52** (según centro) de manera global y, de manera separada para cada conjunto de datos, en la **tabla 53**. No se observaron diferencias significativas en la comparación de los valores medios imputados y no imputados. Las características de la población de estudio se mantuvieron similares en el conjunto de datos imputados. Es destacable que, los niveles plasmáticos de todos los carotenoides fueron similares entre hombres y mujeres, existiendo únicamente diferencias estadísticamente significativas respecto al  $\beta$ -caroteno ( $p=0,010$ ). Según centro, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de todos los carotenoides ( $p<0,001$ ). En general, la distribución de los valores no varió entre hombres y mujeres (por ejemplo, mediana de  $\beta$ -criptoxantina observada e imputada en hombres: 0,27 y 0,29 respectivamente), ni entre los centros EPIC-Granada o EPIC-Guipúzcoa (por ejemplo, mediana de luteína observada e imputada en Guipúzcoa: 0,28 y 0,28, respectivamente), lo que corrobora que la imputación de los datos faltantes fue óptima.

**Tabla 51.** Descripción de las características de la población de estudio en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050) según sexo.

Variables	Hombres (n=315) N (%)	Mujeres (n=735) N (%)	p-varlor <sup>2</sup>		
Centro			<0,001		
Granada	85 (27,0%)	440 (59,9%)			
Guizpúzcoa	230 (73,0%)	295 (40,1%)			
Estación del año			0,329		
Primavera	80 (25,4%)	220 (29,9%)			
Verano	40 (12,7%)	105 (14,3%)			
Otoño	80 (25,4%)	170 (23,1%)			
Invierno	115 (36,5%)	240 (32,7%)			
Hábito tabáquico			<0,001		
No fumadores	125 (39,7%)	525 (71,4%)			
Exfumadores	95 (30,2%)	75 (10,2%)			
Fumadores	95 (30,2%)	130 (17,7%)			
Actividad física			<0,001		
Inactivos	25 (7,94%)	365 (49,7%)			
Moderadamente inactivos	95 (30,2%)	245 (33,3%)			
Moderadamente activos	120 (38,1%)	85 (11,6%)			
Activos	75 (23,8%)	40 (5,44%)			
Índice de adherencia a DM			0,012		
Bajo	100 (31,7%)	250 (34,0%)			
Medio	90 (28,6%)	260 (35,4%)			
Alto	125 (39,7%)	225 (30,6%)			
	<b>Mediana</b>	<b>[IQR]<sup>1</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>[IQR]</b>	
Edad	51,9	[46,5;57,2]	46,3	[39,9;53,3]	<0,001
Índice de adherencia a DM	9,00	[6,00;11,0]	8,00	[6,00;11,0]	0,024
IMC	28,0	[25,8;31,0]	26,4	[24,1;30,4]	<0,001
Circunferencia de cintura	99,5	[93,1;106]	84,7	[76,5;91,0]	<0,001
Ratio cintura/cadera	0,96	[0,92;0,98]	0,82	[0,77;0,85]	<0,001
Mn (mg/L)	1,40E-03	[1,09E-03;1,72E-03]	1,57E-03	[1,21E-03;2,25E-03]	<0,001
Fe (mg/L)	1,00	[0,78;1,21]	0,87	[0,66;1,10]	<0,001
Cu (mg/L)	0,73	[0,65;0,85]	0,87	[0,79;0,98]	<0,001
Zn (mg/L)	0,68	[0,62;0,79]	0,71	[0,63;0,82]	0,002
Se (mg/L)	0,08	[0,07;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	0,624
β-criptoxantina (μmol/L)	0,29	[0,19;0,44]	0,30	[0,16;0,52]	0,798
Luteína (μmol/L)	0,26	[0,16;0,32]	0,23	[0,15;0,36]	0,924
β-caroteno (μmol/L)	0,19	[0,13;0,28]	0,22	[0,14;0,36]	0,010
Licopeno (μmol/L)	1,13	[0,71;2,38]	1,27	[0,71;2,14]	0,800
TRAP (μmol TE/L)	1034	[907;1117]	949	[867;1048]	<0,001
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	996	[896;1080]	853	[785;926]	<0,001
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	3115	[2492;3851]	3008	[2635;3396]	0,298
Tp (mg GAE/L)	1206	[1124;1277]	1207	[1130;1278]	0,671
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1308	[1094;1576]	1124	[907;1363]	<0,001
ORAC (μmol TE/L)	15138	[13160;17839]	14547	[12614;16694]	0,002
Ácido ascórbico (μmol/L)	28,2	[23,8;54,3]	27,8	[20,2;43,1]	0,004
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00	[0,00;7,23]	0,00	[0,00;0,00]	<0,001
Vitamina C total (μmol/L)	31,6	[24,2;65,7]	28,9	[20,2;44,7]	<0,001
Ácido úrico (mg/dl)	4,71	[3,95;5,44]	3,45	[2,91;4,03]	<0,001
Q9 (μmol/L)	0,05	[0,03;0,09]	0,05	[0,03;0,07]	0,434
Q10 (μmol/L)	1,17	[1,00;1,65]	1,15	[0,95;1,50]	0,327
Retinol (μmol/L)	2,31	[1,93;2,87]	2,16	[1,78;2,67]	<0,001
α-tocoferol (μmol/L)	27,3	[20,1;37,2]	29,4	[21,7;37,5]	0,065
Carotenos totales (μmol/L)	2,79	[1,76;4,54]	3,92	[2,60;7,66]	<0,001

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Cada conjunto de imputación engloba un 20% de hombres (n=63) y un 20% de mujeres (n=147).

**Tabla 52.** Descripción de las características de la población de estudio en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050) según centro.

		Granada (n=525)		Guipúzcoa (n=525)	p-varlor <sup>2</sup>	
		N (%)		N (%)		
Sexo					<0,001	
	Hombres	85 (16,2%)		230 (43,8%)		
	Mujeres	440 (83,8%)		295 (56,2%)		
Estación del año					0,177	
	Primavera	135 (25,7%)		165 (31,4%)		
	Verano	75 (14,3%)		70 (13,3%)		
	Otoño	125 (23,8%)		125 (23,8%)		
	Invierno	190 (36,2%)		165 (31,4%)		
Hábito tabáquico					<0,001	
	No fumadores	385 (73,3%)		265 (50,5%)		
	Exfumadores	55 (10,5%)		115 (21,9%)		
	Fumadores	85 (16,2%)		140 (26,7%)		
Actividad física					<0,001	
	Inactivos	265 (50,5%)		125 (23,8%)		
	Moderadamente inactivos	170 (32,4%)		170 (32,4%)		
	Moderadamente activos	50 (9,52%)		155 (29,5%)		
	Activos	40 (7,62%)		75 (14,3%)		
Índice de adherencia a DM					1,000	
	Bajo	175 (33,3%)		175 (33,3%)		
	Medio	175 (33,3%)		175 (33,3%)		
	Alto	175 (33,3%)		175 (33,3%)		
		<b>Mediana</b>	<b>[IQR]<sup>1</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>[IQR]</b>	
	Edad	50,0	[40,1;58,7]	48,0	[41,9;52,8]	0,069
	Índice de adherencia a DM	9,00	[6,00;11,0]	9,00	[6,00;11,0]	0,171
	IMC	27,7	[25,1;31,4]	26,6	[24,3;29,2]	<0,001
	Circunferencia de cintura	89,0	[81,0;96,4]	90,3	[78,1;99,0]	0,613
	Ratio cintura/cadera	0,83	[0,80;0,87]	0,87	[0,80;0,94]	<0,001
	Mn (mg/L)	1,46E-03	[1,09E-03;1,82E-03]	1,59E-03	[1,20E-03;2,28E-03]	<0,001
	Fe (mg/L)	0,93	[0,69;1,09]	0,95	[0,74;1,18]	0,009
	Cu (mg/L)	0,86	[0,78;0,98]	0,81	[0,70;0,91]	<0,001
	Zn (mg/L)	0,70	[0,62;0,83]	0,70	[0,63;0,79]	0,295
	Se (mg/L)	0,08	[0,08;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	<0,001
	β-criptoxantina (μmol/L)	0,21	[0,14;0,41]	0,37	[0,23;0,53]	<0,001
	Luteína (μmol/L)	0,19	[0,13;0,32]	0,28	[0,20;0,38]	<0,001
	β-caroteno (μmol/L)	0,20	[0,12;0,31]	0,25	[0,15;40]	<0,001
	Licopeno (μmol/L)	0,96	[0,63;1,44]	1,35	[0,73;2,79]	<0,001
	TRAP (μmol TE/L)	901	[852;1008]	1044	[938;1121]	<0,001
	FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	860	[782;954]	917	[837;1023]	<0,001
	TEAC-ABTS (μmol TE/L)	2947	[2737;3230]	3152	[2403;4227]	0,001
	Tp (mg GAE/L)	1206	[1127;1261]	1209	[1130;1287]	0,162
	ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1077	[907;1284]	1280	[1094;1550]	<0,001
	ORAC (μmol TE/L)	14055	[11883;15971]	15463	[13995;17966]	<0,001
	Ácido ascórbico (μmol/L)	24,0	[17,9;30,4]	42,1	[27,2;68,5]	<0,001
	Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00	[0,00;0,00]	3,49	[0,00;20,9]	<0,001
	Vitamina C total (μmol/L)	24,3	[17,9;30,4]	47,4	[28,7;93,2]	<0,001
	Ácido úrico (mg/dl)	3,63	[3,08;4,37]	3,78	[2,97;4,84]	0,502
	Q9 (μmol/L)	0,04	[0,03;0,07]	0,05	[0,03;0,10]	0,005
	Q10 (μmol/L)	1,15	[0,95;1,41]	1,17	[1,00;1,69]	0,014
	Retinol (μmol/L)	2,10	[1,72;2,45]	2,38	[1,98;2,87]	<0,001
	α-tocoferol (μmol/L)	29,6	[22,9;36,2]	27,2	[20,4;39,2]	0,375
	Carotenos totales (μmol/L)	3,80	[2,52;6,74]	3,18	[2,14;6,68]	0,009

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Diferencias estadísticas según sexo: Test de Wilcoxon para variables continuas.

Cada conjunto de imputación engloba un 20% de individuos de Granada (n=105) y un 20% de individuos de Guipúzcoa (n=105).

Tabla 53. Análisis descriptivo en los cinco conjunto de datos de imputación (n=1050).

Variables	Conjunto de datos imputados 1 (n=210)	Conjunto de datos imputados 2 (n=210)	Conjunto de datos imputados 3 (n=210)	Conjunto de datos imputados 4 (n=210)	Conjunto de datos imputados 5 (n=210)
	N (%)				
Sexo					
Hombres	63 (30,0%)	63 (30,0%)	63 (30,0%)	63 (30,0%)	63 (30,0%)
Mujeres	147 (70,0%)	147 (70,0%)	147 (70,0%)	147 (70,0%)	147 (70,0%)
Centro					
Granada	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)
Guipúzcoa	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)	105 (50,0%)
Estación del año					
Primavera	60 (28,6%)	60 (28,6%)	60 (28,6%)	60 (28,6%)	60 (28,6%)
Verano	29 (13,8%)	29 (13,8%)	29 (13,8%)	29 (13,8%)	29 (13,8%)
Otoño	50 (23,8%)	50 (23,8%)	50 (23,8%)	50 (23,8%)	50 (23,8%)
Invierno	71 (33,8%)	71 (33,8%)	71 (33,8%)	71 (33,8%)	71 (33,8%)
Hábito tabáquico					
No fumadores	130 (61,9%)	130 (61,9%)	130 (61,9%)	130 (61,9%)	130 (61,9%)
Exfumadores	34 (16,2%)	34 (16,2%)	34 (16,2%)	34 (16,2%)	34 (16,2%)
Fumadores	45 (21,4%)	45 (21,4%)	45 (21,4%)	45 (21,4%)	45 (21,4%)
Actividad física					
Inactivos	78 (37,1%)	78 (37,1%)	78 (37,1%)	78 (37,1%)	78 (37,1%)
Moderadamente inactivos	68 (32,4%)	68 (32,4%)	68 (32,4%)	68 (32,4%)	68 (32,4%)
Moderadamente activos	41 (19,5%)	41 (19,5%)	41 (19,5%)	41 (19,5%)	41 (19,5%)
Activos	23 (11,0%)	23 (11,0%)	23 (11,0%)	23 (11,0%)	23 (11,0%)
Índice de adherencia a DM					
Bajo	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)
Medio	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)
Alto	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)	70 (33,3%)
	<b>Mediana [IQR]<sup>1</sup></b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>	<b>Mediana [IQR]</b>
Edad	48,8 [41,4;55,2]	48,8 [41,4;55,2]	48,8 [41,4;55,2]	48,8 [41,4;55,2]	48,8 [41,4;55,2]
Índice de adherencia a DM	9,00 [6,00;11,0]	9,00 [6,00;11,0]	9,00 [6,00;11,0]	9,00 [6,00;11,0]	9,00 [6,00;11,0]
IMC	27,2 [24,8;30,4]	27,2 [24,8;30,4]	27,2 [24,8;30,4]	27,2 [24,8;30,4]	27,2 [24,8;30,4]
Circunferencia de cintura	89,0 [79,6;97,9]	89,0 [79,6;97,9]	89,0 [79,6;97,9]	89,0 [79,6;97,9]	89,0 [79,6;97,9]
Ratio cintura/cadera	0,84 [0,80;0,92]	0,84 [0,80;0,92]	0,84 [0,80;0,92]	0,84 [0,80;0,92]	0,84 [0,80;0,92]
Mn (mg/L) <sup>2</sup>	0,00 [0,00;0,00] <sup>2</sup>	0,00 [0,00;0,00] <sup>2</sup>	0,00 [0,00;0,00] <sup>2</sup>	0,00 [0,00;0,00] <sup>2</sup>	0,00 [0,00;0,00] <sup>2</sup>

Fe (mg/L)	0,94 [0,72;1,11]	0,94 [0,72;1,11]	0,94 [0,72;1,11]	0,94 [0,71;1,11]	0,94 [0,72;1,12]
Cu (mg/L)	0,84 [0,72;0,94]	0,84 [0,72;0,95]	0,84 [0,72;0,94]	0,84 [0,72;0,95]	0,84 [0,72;0,94]
Zn (mg/L)	0,70 [0,63;0,81]	0,71 [0,63;0,81]	0,70 [0,63;0,81]	0,70 [0,63;0,81]	0,71 [0,63;0,81]
Se (mg/L)	0,08 [0,07;0,09]	0,08 [0,07;0,09]	0,08 [0,07;0,09]	0,08 [0,07;0,09]	0,08 [0,07;0,09]
β-criptoxantina (μmol/L)	0,30 [0,17;0,48]	0,31 [0,17;0,52]	0,31 [0,17;0,51]	0,28 [0,16;0,48]	0,30 [0,17;0,46]
Luteína (μmol/L)	0,24 [0,15;0,35]	0,25 [0,15;0,36]	0,25 [0,16;0,36]	0,23 [0,14;0,36]	0,24 [0,16;0,36]
β-caroteno (μmol/L)	0,22 [0,14;0,33]	0,21 [0,13;0,33]	0,21 [0,13;0,36]	0,21 [0,13;0,33]	0,21 [0,14;0,37]
Licopeno (μmol/L)	1,18 [0,70;2,18]	1,20 [0,71;2,18]	1,19 [0,71;2,34]	1,27 [0,71;2,14]	1,18 [0,71;2,18]
TRAP (μmol TE/L)	976 [884;1073]	976 [884;1073]	976 [884;1073]	976 [884;1073]	976 [884;1073]
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	881 [808;982]	881 [808;982]	881 [808;982]	881 [808;982]	881 [808;982]
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	3041 [2599;3677]	3041 [2599;3677]	3041 [2599;3677]	3041 [2599;3677]	3041 [2599;3677]
Tr (mg GAE/L)	1207 [1128;1276]	1207 [1128;1276]	1207 [1128;1276]	1207 [1128;1276]	1207 [1128;1276]
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1160 [946;1399]	1160 [946;1399]	1160 [946;1399]	1160 [946;1399]	1160 [946;1399]
ORAC (μmol TE/L)	14706 [12739;17005]	14706 [12739;17005]	14706 [12739;17005]	14706 [12739;17005]	14706 [12739;17005]
Ácido ascórbico (μmol/L)	27,8 [20,9;46,3]	27,8 [20,9;46,3]	27,8 [20,9;46,3]	27,8 [20,9;46,3]	27,8 [20,9;46,3]
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00 [0,00;3,76]	0,00 [0,00;3,76]	0,00 [0,00;3,76]	0,00 [0,00;3,76]	0,00 [0,00;3,76]
Vitamina C total (μmol/L)	29,3 [21,4;52,5]	29,3 [21,4;52,5]	29,3 [21,4;52,5]	29,3 [21,4;52,5]	29,3 [21,4;52,5]
Ácido úrico (mg/dl)	3,73 [3,05;4,48]	3,73 [3,05;4,48]	3,73 [3,05;4,48]	3,73 [3,05;4,48]	3,73 [3,05;4,48]
Q9 (μmol/L)	0,05 [0,03;0,08]	0,05 [0,03;0,08]	0,05 [0,03;0,08]	0,05 [0,03;0,08]	0,05 [0,03;0,08]
Q10 (μmol/L)	1,16 [0,96;1,50]	1,16 [0,96;1,50]	1,16 [0,96;1,50]	1,16 [0,96;1,50]	1,16 [0,96;1,50]
Retinol (μmol/L)	2,22 [1,85;2,73]	2,22 [1,85;2,73]	2,22 [1,85;2,73]	2,22 [1,85;2,73]	2,22 [1,85;2,73]
α-tocoferol (μmol/L)	28,4 [21,6;37,3]	28,4 [21,6;37,3]	28,4 [21,6;37,3]	28,4 [21,6;37,3]	28,4 [21,6;37,3]
Carotenos totales (μmol/L)	3,47 [2,34;6,73]	3,47 [2,34;6,73]	3,47 [2,34;6,73]	3,47 [2,34;6,73]	3,47 [2,34;6,73]

<sup>1</sup>IQR=P25-P75.

<sup>2</sup>Valor del Mn en cada uno de los cinco conjuntos de datos de imputación: Mediana = 1,52E-03; IQR = [1,17E-03;2,10E-03].

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de imputación.

#### 5.4.6. Variables asociadas a la variabilidad de los niveles plasmáticos de minerales y carotenoides en la población del estudio II (n=210)

En la **tabla 54** se muestran los resultados del análisis de regresión multivariante, considerando cada uno de los minerales como variable independiente y habiendo ajustado el modelo por sexo, edad, hábito tabáquico, centro, estación del año, índice de adherencia a la DM, nivel de actividad física, IMC, circunferencia de cintura, consumo de alcohol, ingesta de fibra e ingesta de aceite de oliva. Las variables predictoras que presentaron coeficientes de determinación parcial ( $R^2$ ) estadísticamente significativos fueron el sexo para el Mn, Fe y Cu ( $R^2=1,96$   $p=0,041$ ,  $R^2=4,23$   $p=0,002$ , y  $R^2=10,9$   $p<0,001$  respectivamente), la edad para el Cu ( $R^2=2,47$   $p=0,016$ ), el hábito tabáquico para el Fe y Cu ( $R^2=3,89$   $p=0,037$  y  $R^2=4,94$   $p=0,009$ , respectivamente), el centro para el Mn y Se ( $R^2=2,21$   $p=0,030$  y  $R^2=2,44$   $p=0,023$ , respectivamente) y la circunferencia de cintura para el Zn ( $R^2=3,53$   $p=0,007$ ). Por lo tanto, las variables predictoras que explicaron en mayor medida la varianza total (variabilidad) fueron el sexo en Cu y Fe, la circunferencia de cintura en Zn y el centro en Mn y Se. En el resto de variables predictoras no se obtuvieron coeficientes  $R^2$  estadísticamente significativos con ninguno de los minerales. La ingesta de aceite de oliva en el Mn ( $R^2=0,001$   $p=0,846$ ), el consumo de alcohol en Fe, Zn y Se ( $R^2=0,02$   $p=0,721$ ;  $R^2=0,02$   $p=0,736$ ;  $R^2=0,001$   $p=0,818$ , respectivamente) y la circunferencia de cintura en el Cu ( $R^2=0,002$   $p=0,904$ ) fueron las variables predictoras que explicaron en menor magnitud la variabilidad de las concentraciones de minerales en plasma.

**Tabla 54.** Regresión múltiple de variables predictoras asociadas a niveles plasmáticos de minerales en plasma (transformados logarítmicamente) en el estudio II (n=210).

Variables	DF <sup>a</sup>	Mn		Fe		Cu		Zn		Se	
		R <sup>2</sup> % <sup>b</sup>	p-valor <sup>c</sup>								
Sexo	1	1,96	0,041	4,23	0,002	10,9	<0,001	0,64	0,250	0,11	0,621
Edad	1	0,72	0,214	0,33	0,389	2,47	0,016	0,96	0,159	0,07	0,699
Hábito tabáquico	3	2,42	0,162	3,89	0,037	4,94	0,009	0,22	0,928	3,25	0,074
Centro	1	2,21	0,030	0,34	0,385	0,10	0,631	0,07	0,705	2,44	0,023
Estación del año	3	2,53	0,146	1,07	0,496	0,77	0,607	0,85	0,622	0,83	0,620
Índice de adherencia a DM	2	0,04	0,960	2,06	0,102	0,03	0,965	1,19	0,290	0,83	0,409
Actividad física	3	0,31	0,880	0,66	0,687	0,51	0,747	0,44	0,820	3,67	0,051
IMC	1	0,40	0,356	1,58	0,061	0,39	0,336	0,55	0,286	0,33	0,400
Circunferencia de cintura	1	0,83	0,184	0,34	0,385	0,00	0,950	3,53	0,007	0,30	0,419
Consumo de alcohol	1	0,02	0,834	0,02	0,845	0,09	0,648	0,02	0,833	0,00	0,974
Ingesta de fibra	1	0,15	0,569	0,35	0,378	0,35	0,364	0,05	0,747	0,20	0,512
Ingesta de aceite de oliva	1	0,001	0,955	0,06	0,719	0,05	0,735	0,37	0,379	0,01	0,874
Modelo R <sup>2</sup>	19	0,07		0,12		0,16		0,07		0,08	

<sup>a</sup>DF: Grados de libertad (degrees of freedom).

<sup>b</sup>R<sup>2</sup> %: Coeficiente de determinación parcial.

<sup>c</sup>p-valor estimado a partir del test de Fisher sobre la suma de cuadrados.

En la **tabla 55** se presentan los resultados del análisis de regresión multivariante en los carotenoides (variable independiente), teniendo en cuenta tanto los valores imputados como sin imputar (valores crudos), y considerando las mismas variables predictoras en el modelo que en los minerales (sexo, edad, hábito tabáquico, estación del año, índice de adherencia a la DM, nivel de actividad física, IMC, circunferencia de cintura, consumo de alcohol, ingesta de fibra e ingesta de aceite de oliva). En cuanto a los valores imputados, el centro de reclutamiento (Granada o Guipúzcoa) fue la variable predictora que explicó mayoritariamente la variabilidad de los niveles plasmáticos de carotenoides ( $R^2=6,06$   $p<0,001$  en  $\beta$ -criptoxantina;  $R^2=5,16$   $p=0,001$  en luteína;  $R^2=2,92$   $p=0,014$  en  $\beta$ -caroteno; y  $R^2=9,11$   $p<0,001$  en licopeno). Así, la proporción de la varianza total (de cada uno de los carotenoides), explicada por el centro en el modelo de regresión, fue del 3-9%. Respecto al licopeno, además del centro, la estación del año fue otra variable predictora de la variabilidad de los niveles plasmáticos de éste ( $R^2=5,9$   $p=0,005$ ). Ninguna de las demás variables predictoras presentaron coeficientes  $R^2$  estadísticamente significativos en los restantes carotenoides medidos en las muestras de plasma. Por lo tanto, el centro de reclutamiento fue la variable predictora que explicó mayoritariamente la variabilidad de las concentraciones de carotenoides en plasma. Por otro lado, atendiendo a los valores sin imputar, el centro de reclutamiento se mantuvo como variable predictora estadísticamente significativa de los niveles plasmáticos de todos los carotenoides, incrementándose el coeficiente  $R^2$  en el caso del licopeno, del 9,11% al 17,4%.

También se mantiene la variable estación del año como variable predictora en el licopeno, aumentando el valor del coeficiente  $R^2$  del 5,49% al 10,9%. Finalmente y, de nuevo, únicamente en el caso del licopeno, en los valores sin imputar aparecen el sexo y el índice de adherencia a la DM como variables predictoras estadísticamente significativas de los valores plasmáticos del mismo ( $R^2=3,83$   $p=0,042$ ; y  $R^2=9,00$   $p=0,010$ , respectivamente).

Mediante gráficos radiales (**figura 43**), se muestra también la variación en los niveles de carotenoides plasmáticos en función de las variables predictoras que se identificaron en el análisis anterior. Así, se constató que, en general, los niveles plasmáticos de carotenoides variaron según el centro y, en el caso del licopeno, además, según la estación del año, sexo y grado de adherencia a la DM.

**Tabla 55.** Regresión múltiple de variables predictoras asociadas a niveles plasmáticos de carotenoides en plasma (transformados logarítmicamente) en el estudio II (n=210).

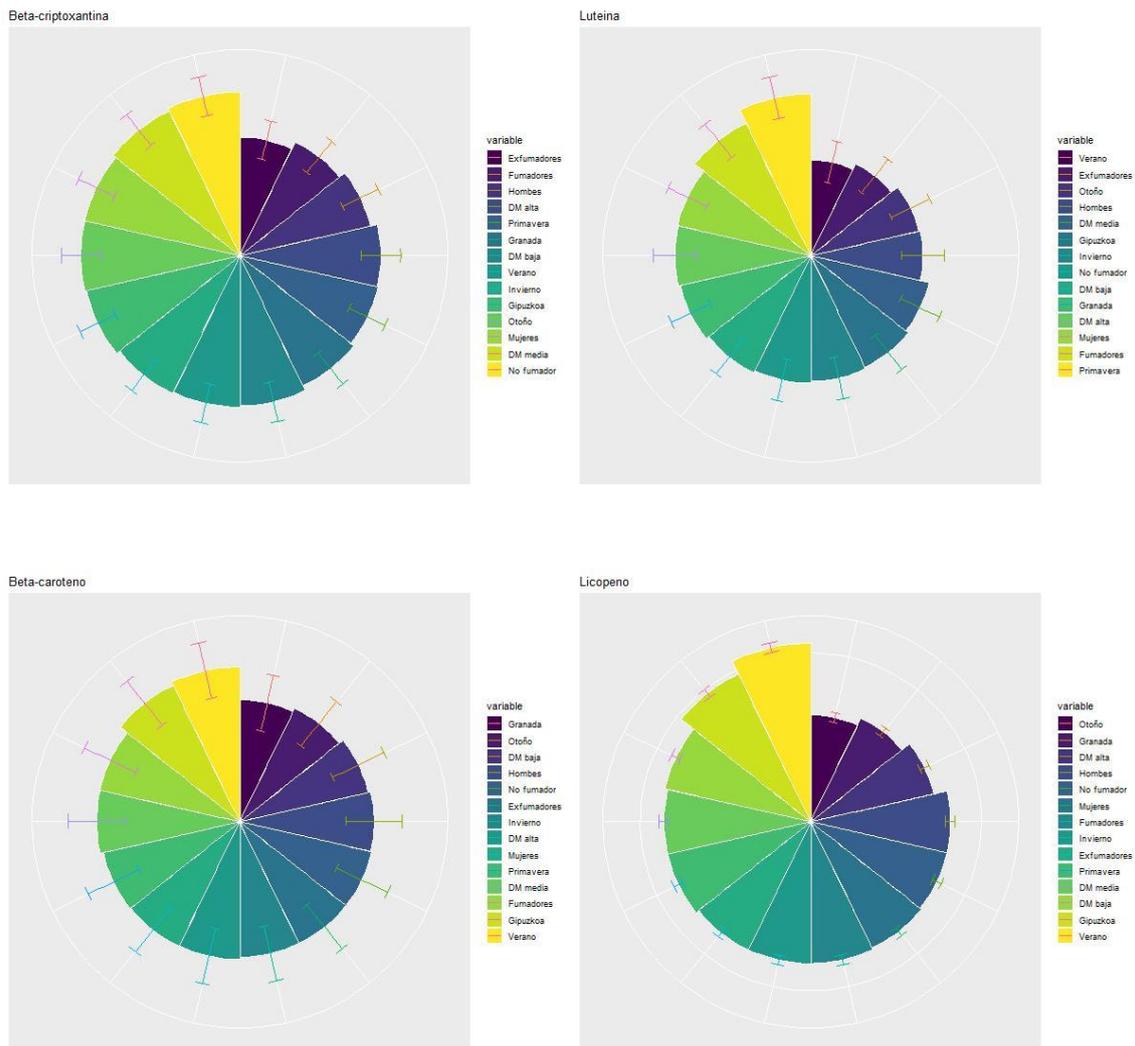
Variables	DF <sup>a</sup>	β-criptoxantina		Luteína		β-caroteno		Licopeno		
		R <sup>2</sup> % <sup>b</sup>	p-valor <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> %	p-valor	R <sup>2</sup> %	p-valor	R <sup>2</sup> %	p-valor	
<b>Valores imputados</b>										
Sexo	1	0,02	0,843	0,21	0,497	0,09	0,665	0,46	0,294	
Edad	1	0,20	0,513	0,05	0,745	0,08	0,685	0,22	0,465	
Hábito tabáquico	3	2,89	0,100	0,79	0,639	0,97	0,562	0,07	0,983	
Centro	1	6,06	3,42E-04	5,16	0,001	2,92	0,014	9,11	5,04E-06	
Estación del año	3	1,63	0,313	1,69	0,307	3,38	0,070	5,49	0,005	
Índice de adherencia a DM	2	1,08	0,306	2,24	0,093	0,83	0,416	2,14	0,077	
Actividad física	3	1,12	0,484	0,13	0,963	1,64	0,324	0,73	0,621	
IMC	1	0,00	0,959	0,00	0,962	0,03	0,810	0,33	0,371	
Circunferencia de cintura	1	0,13	0,590	0,23	0,480	0,00	0,966	0,02	0,829	
Consumo de alcohol	1	0,60	0,252	0,04	0,764	1,41	0,085	0,02	0,829	
Ingesta de fibra	1	0,49	0,300	0,83	0,183	0,20	0,519	0,03	0,802	
Ingesta de aceite de oliva	1	0,18	0,527	0,30	0,419	0,24	0,478	0,54	0,256	
Modelo R <sup>2</sup>	19	85,10		86,82		87,95		77,17		
<b>Valores sin imputar</b>										
Sexo	1	0,00	0,985	0,48	0,371	0,04	0,839	3,83	0,042	
Edad	1	0,52	0,343	0,21	0,555	0,00	0,959	0,11	0,732	
Hábito tabáquico	3	3,88	0,084	0,90	0,681	1,98	0,549	2,20	0,296	
Centro	1	6,31	0,001	5,65	0,003	3,15	0,069	17,41	4,92E-05	
Estación del año	3	2,19	0,285	2,91	0,187	2,70	0,412	10,86	0,011	
Índice de adherencia a DM	2	1,83	0,206	2,00	0,193	0,46	0,783	9,00	0,010	
Actividad física	3	0,56	0,808	0,57	0,812	4,42	0,199	2,66	0,399	
IMC	1	0,06	0,739	0,11	0,665	0,13	0,710	0,01	0,898	
Circunferencia de cintura	1	0,12	0,643	0,50	0,362	0,21	0,638	0,04	0,833	
Consumo de alcohol	1	0,19	0,569	0,03	0,810	0,00	0,991	3,17	0,064	
Ingesta de fibra	1	0,01	0,904	0,22	0,549	2,18	0,130	0,71	0,374	
Ingesta de aceite de oliva	1	0,17	0,588	0,02	0,851	0,01	0,931	0,25	0,594	
Modelo R <sup>2</sup>	19	84,13		85,73		82,92		44,09		

<sup>a</sup>DF: Grados de libertad (degrees of freedom).

<sup>b</sup>R<sup>2</sup>%; Coeficiente de determinación parcial.

<sup>c</sup>p-valor estimado a partir del test de Fisher sobre la suma de cuadrados.

R<sup>2</sup> tanda de análisis:  $p > 0,05$



**Figura 43.** Gráfico radial representado la variabilidad de los niveles de carotenoides en plasma de algunas variables predictoras en la muestra del estudio II (n=210).

### 5.4.7. Comparación del perfil de minerales, carotenoides y otros biomarcadores del plasma según el grado de adherencia a la DM en la población del estudio II (n=210)

En la **tabla 56** se describen las concentraciones plasmáticas de minerales, carotenoides y otros biomarcadores (CANE-P y vitaminas antioxidantes) según la adherencia a la DM (rMED), distinguiendo entre baja, media y alta adherencia. Los niveles medios de los minerales, carotenoides y biomarcadores no difirieron significativamente según el grado de adherencia a la DM. De manera similar, tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas en los

niveles de CANE-P en los distintos grados de adherencia al patrón de DM. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas en los niveles medios de minerales, carotenoides y otros biomarcadores en función de la adherencia a la DM.

**Tabla 56.** Descripción de los niveles plasmáticos de minerales, carotenoides y otros biomarcadores según el grado de adherencia al índice de DM (baja, media y alta) en la población del estudio II (n=210). Valores imputados.

Minerales, carotenoides y biomarcadores en plasma	Baja adherencia <sup>1</sup> (n=70)		Media adherencia <sup>1</sup> (70)		Alta adherencia <sup>1</sup> (n=70)		p-valor <sup>3</sup>
Sexo		<b>N (%)</b>		<b>N (%)</b>		<b>N (%)</b>	0,413
	Hombres	20 (28,6%)		18 (25,7%)		25 (35,7%)	
	Mujeres	50 (71,4%)		52 (74,3%)		45 (64,3%)	
Centro de reclutamiento							1,000
	Granada	35 (50,0%)		35 (50,0%)		35 (50,0%)	
	Guipúzcoa	35 (50,0%)		35 (50,0%)		35 (50,0%)	
		<b>Mediana</b>		<b>Mediana</b>		<b>Mediana</b>	
		<b>[IQR]<sup>2</sup></b>		<b>[IQR]</b>		<b>[IQR]</b>	
Edad	48,8	[41,6;55,4]	47,4	[40,2;54,8]	49,8	[42,4;57,0]	0,453
Índice de adherencia a DM	5,00	[4,00;6,00]	9,00	[8,00;9,00]	12,0	[11,0;13,0]	<0,001
IMC	27,7	[25,2;30,4]	26,4	[24,0;30,7]	27,7	[25,1;29,9]	0,502
Circunferencia de cintura	89,0	[82,6;99,4]	87,5	[76,9;95,9]	90,2	[81,0;98,0]	0,281
Ratio cintura/cadera	0,86	[0,81;0,92]	0,84	[0,77;0,92]	0,85	[0,80;0,93]	0,178
Mn (mg/L)	1,55E-03	[1,19E-03;1,78E-03]	1,52E-03	[1,17E-03;1,75E-03]	1,57E-03	[1,23E-03;2,10E-03]	0,641
Fe (mg/L)	1,00	[0,78;1,20]	0,85	[0,69;1,10]	0,93	[0,72;1,08]	0,130
Cu (mg/L)	0,86	[0,72;0,97]	0,83	[0,73;0,93]	0,84	[0,73;0,93]	0,753
Zn (mg/L)	0,70	[0,63;0,78]	0,72	[0,65;0,83]	0,68	[0,62;0,79]	0,369
Se (mg/L)	0,08	[0,07;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	0,08	[0,07;0,09]	0,390
β-criptoxantina (μmol/L)	0,29	[0,19;0,51]	0,35	[0,20;0,53]	0,29	[0,17;0,44]	0,359
Luteína (μmol/L)	0,23	[0,15;0,36]	0,25	[0,18;0,36]	0,26	[0,14;0,36]	0,408
α-caroteno (μmol/L)	0,10	[0,07;0,12]	0,08	[0,07;0,13]	0,08	[0,06;0,11]	0,304
β-caroteno (μmol/L)	0,23	[0,16;0,36]	0,26	[0,19;0,36]	0,19	[0,14;0,33]	0,240
Lycopeno (μmol/L)	1,17	[0,71;2,15]	1,33	[1,06;1,96]	1,12	[0,70;2,27]	0,297
TRAP (μmol TE/L)	976	[891;1078]	966	[890;1063]	987	[872;1077]	0,946
FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> /L)	880	[817;994]	870	[785;968]	899	[815;986]	0,451
TEAC-ABTS (μmol TE/L)	2997	[2664;3222]	3031	[2639;3823]	3071	[2506;3981]	0,612
Tp (mg GAE/L)	1204	[1155;1286]	1215	[1140;1277]	1185	[1110;1260]	0,455
ORAC sin proteínas (μmol TE/L)	1188	[950;1412]	1142	[911;1357]	1184	[999;1422]	0,379
ORAC (μmol TE/L)	14706	[12616;17082]	14417	[12773;16400]	15148	[12881;17952]	0,179
Ácido ascórbico (μmol/L)	27,4	[18,2;41,9]	27,7	[20,1;49,3]	30,5	[25,2;51,9]	0,207
Ácido dehidroascórbico (μmol/L)	0,00	[0,00;3,35]	0,00	[0,00;3,45]	0,00	[0,00;3,99]	0,847
Vitamina C total (μmol/L)	27,7	[18,6;44,7]	29,9	[20,1;55,5]	31,7	[25,2;53,3]	0,259
Ácido úrico (mg/dl)	3,69	[3,06;4,24]	3,62	[3,01;4,42]	3,96	[3,06;4,79]	0,368
Q9 (μmol/L)	0,04	[0,03;0,08]	0,04	[0,03;0,08]	0,05	[0,03;0,08]	0,817
Q10 (μmol/L)	1,15	[0,96;1,49]	1,21	[1,00;1,65]	1,15	[0,93;1,39]	0,235
Retinol (μmol/L)	2,23	[1,90;2,84]	2,22	[1,79;2,73]	2,21	[1,83;2,65]	0,639
α-Tocoferol (μmol/L)	26,1	[21,3;36,8]	31,5	[22,2;39,2]	28,4	[21,7;36,7]	0,200
Carotenos totales (μmol/L)	3,21	[2,14;6,95]	3,89	[2,70;7,62]	3,1	[2,24;6,33]	0,119

<sup>1</sup>Nivel de adherencia al índice de DM: Nivel 1(baja adherencia)=0-6 puntos; Nivel 2(media adherencia)=7-10 puntos; Nivel 3(alta adherencia)=11-16. (Escala rMED varía entre 0-18 puntos, aunque la puntuación máxima alcanzada en EPIC-Granada/Guipúzcoa fue de 16 puntos).

<sup>2</sup>IQR=P25-P75.

<sup>3</sup>Diferencias estadísticas por nivel de adherencia al índice de DM: Test de Wilcoxon para variables continuas.

#### 5.4.8. Modelo de predicción de CAT-D y CANE-P basado en co-variables de ingesta de nutrientes, biomarcadores nutricionales y estilos de vida

El estudio de un modelo de predicción de CAT-D y CANE-P en un contexto de alta dimensión, en el conjunto de 210 observaciones y 105 co-variables y empleando métodos de validación cruzada, permitió seleccionar las variables con mayor capacidad discriminativa de altos con respecto a medios/bajos niveles de CAT-D (con y sin la contribución del café) y CANE-P. Como se muestra en la **tabla 57**, para el caso de la selección de co-variables de ingesta de nutrientes y de biomarcadores nutricionales con potencial antioxidante, el área bajo la curva (AUC) fue mayor a 0,8 en el caso de FRAP de la dieta con y sin la contribución del café (AUC=0,8), de FRAP del plasma (AUC=0,9) y del TRAP de la dieta con la contribución del café (AUC=0,86). En general, los valores del AUC fueron más bajos al considerar la CAT-D sin la contribución de la CAT del café, o similar a la CAT-D con café.

Así, considerando únicamente co-variables de nutrientes de la dieta y biomarcadores nutricionales, el modelo constituido por niveles en plasma de ácido úrico, Se, coenzima Q10, vitamina A (retinol) y Zn, permitió clasificar correctamente con un 90% de probabilidad en altos y medios/bajos niveles FRAP en plasma (**tabla 58**). Las siguientes co-variables más seleccionadas, si bien no contribuyeron a mejorar la capacidad predictiva de la firma, fueron: Fe, Cu, coenzima Q9,  $\beta$ -caroteno y Mn, todas ellas del plasma. Los resultados fueron similares al considerar conjuntamente las co-variables de dieta y de estilos de vida en el modelo de predicción (**tabla 58**). En este caso, la inclusión de las co-variables de los estilos de vida (nivel de actividad física, índice de adherencia a la DM (rMED), IMC, circunferencia de cintura, razón circunferencia de cintura y cadera, consumo de alcohol, frutas y verduras, frutos secos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas incluyendo café, ingesta energética total y hábito tabáquico), el modelo de predicción más óptimo (AUC más elevado) estuvo definido por las mismas co-variables de biomarcadores nutricionales junto con las co-variables de sexo, centro y niveles plasmáticos de Mn y coenzima Q9. Las siguientes co-variable más seleccionadas, si bien no formaron parte de la firma final al no mejorar el AUC, fueron: Índice de adherencia rMED,  $\beta$ -caroteno, Cu, hábito tabáquico y actividad física. Por lo tanto, la inclusión de variables de los estilos de vida no pareció mejorar la capacidad discriminativa del modelo basado únicamente en nutrientes de la dieta y biomarcadores nutricionales antioxidantes. Cabe destacar que, las co-variables de ingesta dietética de alimentos ricos en nutrientes

antioxidantes (frutas, verduras, bebidas alcohólicas, etc.) no fueron seleccionadas en ningún modelo de predicción.

**Tabla 57.** Selección de co-variables de ingesta de nutrientes, biomarcadores nutricionales y estilos de vida y valor del área bajo la curva dado por cada set de co-variables seleccionado en el modelo.

Variables de CAT-D y de CANE-P	Dieta y biomarcadores nutricionales		Dieta, biomarcadores nutricionales y estilos de vida	
	N variables seleccionadas	AUC	N variables seleccionadas	AUC
TRAP con/sin café (dieta)	5	0,77/0,56	5	0,64/0,57
	10	<b>0,86/0,68</b>	10	<b>0,86/0,69</b>
	15	0,86/ <b>0,75</b>	15	0,86/ <b>0,73</b>
	20	0,86/0,75	20	0,86/0,73
FRAP con/sin café (dieta)	5	0,85/0,61	5	0,71/0,66
	10	<b>0,87/0,85</b>	10	<b>0,75/0,86</b>
	15	0,87/ <b>0,86</b>	15	0,75/ <b>0,88</b>
	20	0,87/0,86	20	0,75/0,88
TEAC-ABTS con/sin café (dieta)	5	0,58/0,56	5	0,58/0,63
	10	<b>0,75/0,66</b>	10	<b>0,73/0,72</b>
	15	0,75/0,66	15	0,73/ <b>0,75</b>
	20	0,75/0,66	20	0,73/0,75
ORAC con/sin café (dieta)	5	0,70/0,53	5	0,64/0,58
	10	<b>0,71/0,64</b>	10	<b>0,67/0,58</b>
	15	0,71/0,64	15	0,67/0,58
	20	0,71/0,64	20	0,67/0,58
Polifenoles (dieta)	5	0,50	5	0,68
	10	0,80	10	0,92
	15	<b>0,94</b>	15	<b>0,93</b>
	20	0,94	20	0,93
TRAP (plasma)	5	0,48	5	0,66
	10	0,56	10	<b>0,70</b>
	15	<b>0,60</b>	15	0,70
	20	0,60	20	0,68
FRAP con/sin ácido úrico (plasma)	5	<b>0,90/0,73</b>	5	0,82/0,63
	10	0,90/0,73	10	<b>0,90/0,72</b>
	15	0,90/0,75	15	0,90/0,71
	20	0,90/0,75	20	0,90/0,71
TEAC-ABTS (plasma)	5	0,63	5	0,66
	10	0,63	10	<b>0,73</b>
	15	0,73	15	0,73
	20	<b>0,80</b>	20	0,72
ORAC con/sin proteínas (plasma)	5	0,53/0,59	5	0,53/0,64
	10	0,58/0,59	10	0,66/ <b>0,65</b>
	15	<b>0,67/0,60</b>	15	<b>0,67/0,64</b>
	20	0,67/ <b>0,70</b>	20	0,67/0,63
Polifenoles (plasma)	5	0,57	5	0,53
	10	0,57	10	<b>0,57</b>
	15	<b>0,58</b>	15	0,57
	20	0,58	20	0,57

En negrita se destaca el modelo de predicción elegido, es decir, el conjunto mínimo de variables en el modelo, en base al valor del AUC.

En la evaluación de la firma para FRAP en el plasma sin ácido úrico, se descartó el FRAP con ácido úrico de los componentes del modelo. De la misma manera, para la firma de ORAC con o sin proteínas en plasma, se descartaron ambas variables mutuamente en el modelo. Asimismo, en las evaluaciones de la CAT-D sin café, se descartaron las CAT-D con café y viceversa.

**Tabla 58.** Co-variables de biomarcadores nutricionales y de los estilos de vida seleccionados para predecir altos con respecto a medio/bajos niveles de FRAP en plasma con un AUC~0,9.

Dieta y biomarcadores nutricionales			Dieta, biomarcadores nutricionales y estilos de vida			
Variables	Frecuencia de selección	Porcentaje de selección	Variables	Frecuencia de selección	Porcentaje de selección	
1	Ácido úrico (mg/dl)	9	50	Ácido úrico (mg/dl)	9	50
2	Se plasma (mg/L)	32	50	Se plasma (mg/L)	32	50
3	Q10 (µmol/L)	15	47	Razón CC cintura_cadera	49	50
4	Retinol (µmol/L)	16	42	Q10 (µmol/L)	15	49
5	Zn plasma (mg/L)	33	42	Sexo <sup>1</sup>	51	47
6				Zn plasma (mg/L)	33	41
7				Retinol (µmol/L)	16	38
8				Mn plasma (mg/L)	30	37
9				Q9 (µmol/L)	14	36
10				Centro	53	35

<sup>1</sup>Mujeres y hombres.

<sup>2</sup>Baja adherencia, media adherencia y alta adherencia.

CC=circunferencia

En la **tabla 59**, considerando únicamente co-variables de nutrientes de la dieta y biomarcadores nutricionales, se muestran los modelos constituidos para predecir niveles de FRAP y TRAP de la dieta (con la contribución del café), distinguiendo con un 90% de probabilidad entre niveles altos y medios/bajos.

**Tabla 59.** Co-variables de biomarcadores nutricionales para predecir altos con respecto a medio/bajos niveles de FRAP y TRAP de la dieta (con la contribución del café) con un AUC~0,9.

Dieta y biomarcadores nutricionales			Dieta y biomarcadores nutricionales			
FRAP			TRAP			
Variables	Frecuencia de selección	Porcentaje de selección	Variables	Frecuencia de selección	Porcentaje de selección	
1	TRAP dieta con café <sup>1</sup>	27	50	TEAC dieta con café <sup>1</sup>	27	50
2	β-caroteno dieta <sup>3</sup>	21	43	ORAC sin café <sup>1</sup>	36	50
3	TRAP plasma <sup>2</sup>	5	39	Vitamina C dieta <sup>5</sup>	20	49
4	TEAC dieta con café <sup>1</sup>	28	38	ORAC plasma <sup>2</sup>	14	44
5	Fe plasma <sup>4</sup>	31	36	Retinol plasma <sup>6</sup>	7	40
6	TEAC plasma <sup>2</sup>	11	33	β-criptoxantina plasma <sup>6</sup>	1	36
7	Retinol dieta <sup>3</sup>	25	26	Retinol dieta <sup>3</sup>	25	31
8	Flavonoides dieta <sup>5</sup>	26	26	TRAP plasma <sup>2</sup>	5	30
9	Vitamina C dieta <sup>5</sup>	20	25	α-tocoferol plasma <sup>6</sup>	18	29
10	Cu plasma <sup>4</sup>	34	21	Vitamina C plasma <sup>6</sup>	7	27

<sup>1</sup>Ensayos de CAT-D en (µmol TE/día).

<sup>2</sup>Ensayos de CANE-P en (µmol TE/L).

<sup>3</sup>(µg/día).

<sup>4</sup>Minerales en plasma (mg/L).

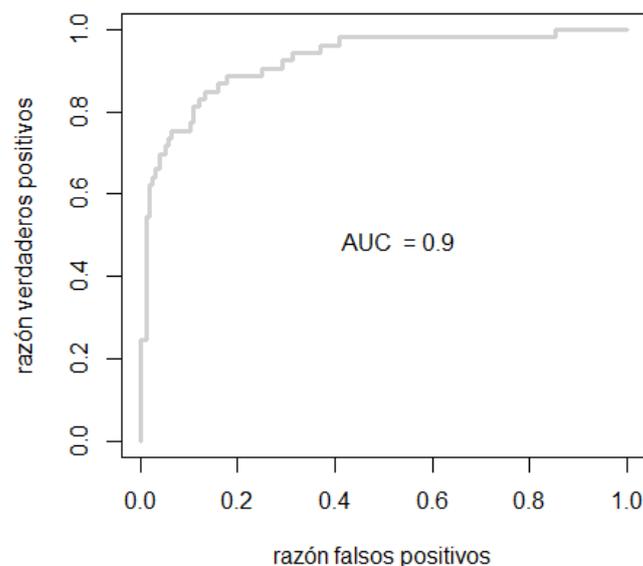
<sup>5</sup>(mg/día).

<sup>6</sup>(µmol/L).

También se realizó el modelo de predicción de alta ingesta en la dieta de polifenoles con respecto a una ingesta media/baja (AUC=0,94), siendo las variables seleccionadas, por orden de contribución, las siguientes: Fe del plasma, retinol del plasma, Fe de la dieta, Zn del plasma,  $\beta$ -criptoxantina del plasma, Mn del plasma, luteína del plasma, Se del plasma,  $\alpha$ -tocoferol de la dieta,  $\beta$ -caroteno del plasma, coenzima Q9 del plasma, vitamina C de la dieta, licopeno del plasma, ácido úrico del plasma y Cu del plasma. Las co-variables de estilos de vida no fueron seleccionadas por el algoritmo.

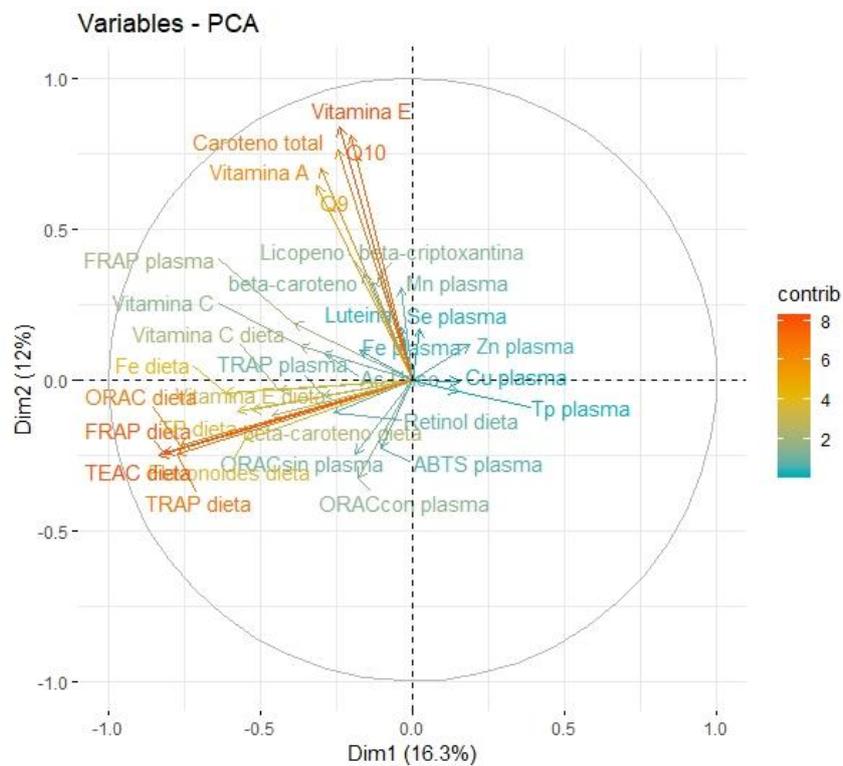
Finalmente, en cuanto al modelo de predicción de altos niveles de TEAC-ABTS del plasma con respecto a niveles medios/bajos (AUC=0,8), las variables seleccionadas en el orden en que contribuyen al moderado fueron: Luteína del plasma, ácido úrico del plasma, Mn del plasma, Cu del plasma,  $\beta$ -criptoxantina del plasma, Se del plasma, retinol del plasma,  $\beta$ -caroteno del plasma, Fe del plasma, Zn del plasma, coenzima Q9 del plasma, licopeno del plasma, coenzima Q10 del plasma, carotenos totales del plasma, ácido dehidroascórbico del plasma, vitamina C total del plasma, FRAP en equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$  del plasma, Cu del plasma,  $\alpha$ -tocoferol de la dieta y TRAP del plasma. Nuevamente, las co-variables de estilos de vida no fueron seleccionadas por el algoritmo.

En la **figura 44** se muestra la curva ROC correspondiente al modelo de predicción de niveles de FRAP (altos con respecto a medio/bajos) basado en los biomarcadores nutricionales.



**Figura 44.** Curva ROC del modelo de predicción de niveles de FRAP basado en los biomarcadores nutricionales de la firma (ácido úrico, Se, Zn, coenzima Q10 y retinol).

Finalmente, se comprobó la existencia de grupos de nutrientes y biomarcadores nutricionales con potencial antioxidante en la población de estudio mediante un análisis de componentes principales (PCA). Los resultados, representados en el gráfico biplot de la **figura 45**, revelaron dos grupos: Uno compuesto principalmente por biomarcadores de nutrientes antioxidantes junto con FRAP y TRAP del plasma y otro caracterizado por las variables de CAT-D y los nutrientes antioxidantes de la dieta. Las variables correlacionadas positivamente entre ellas se localizan en el mismo cuadrante. La correlación tendió a ser débil con las variables del cuadrante próximo (90%), es decir, entre los biomarcadores nutricionales y nutrientes de la dieta. Los dos primeros clústeres o componentes explicaron el 28% de la varianza.



**Figura 45.** Biplot del análisis de PCA conteniendo variables de nutrientes y compuestos con potencial antioxidante de la dieta y del plasma.

# DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Formulario de CAT en alimentos (frutas)

Los datos de CAT en alimentos introducidos en el formulario proceden de artículos que especificaron que estos eran comercializados en España, aunque su origen no lo fuese. El objeto fue obtener valores de CAT más próximos a los consumidos por nuestras poblaciones de estudio.

Con los datos obtenidos de los diferentes trabajos recogidos en el formulario y que aparecen en las **tablas 8, 10 y 12** (TEAC-ABTS, FRAP y Tp, respectivamente) se ha realizado la **tabla 60** que recoge los datos que hemos considerado útiles para su aplicación al análisis de CAT-D.

Dado que las tablas anteriores recogen artículos hasta el año 2015, se decidió actualizar la búsqueda bibliográfica hasta julio de 2019, lo que permitió incluir otros 13 artículos sobre CAT en alimentos (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014; Wojdylo *et al.*, 2016; Wojdylo *et al.*, 2016; Alcaraz-Mármol *et al.*, 2017; López-Cobo *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Redondo *et al.*, 2017; García-Martínez *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2018; Toledo-Martín *et al.*, 2018; Tripodo *et al.*, 2018; Barrera *et al.*, 2019; Fernández-Jalao *et al.*, 2019). Cabe destacar que, entre estos, una de las publicaciones correspondió a un análisis de contenido de CAT (FRAP, DPPH y TEAC-ABTS) y Tp en 52 frutas adquiridas en comercios locales de Granada (Ruiz *et al.*, 2018) realizado por nuestro grupo de investigación. Los datos de esta nueva búsqueda bibliográfica, excepto los correspondientes a Ruiz *et al.*, (2018), se tuvieron en cuenta a la hora de elaborar la tabla con los valores considerados como útiles.

**Tabla 60.** Valores de CAT y Tp disponibles en bibliografía para frutas comercializadas en España con estandarización de unidades.

FRUTAS	TEAC-ABTS μmol TE/100g FW	FRAP μmol TE/100g FW	FRAP μmol Fe <sup>2+</sup> /100g FW	Tp mg GAE/100g FW
Aguacate <sup>1</sup>	-	-	302	41
Albaricoque	165	994	-	112
Arándano	3179	-	-	-
Azofaifa <sup>2</sup>	8315	6609	-	-
Caqui	-	-	133	246
Carambola	-	-	-	111
Cereza <sup>3</sup>	1560	1049	-	149
Chayote	-	-	-	48,8
Chirimoya <sup>4</sup>	698	-	613	144
Ciruela	2059	779	1420	170
Frambuesa	1392	-	-	-
Fresa	1261	793	-	110
Granada <sup>5</sup>	674	-	-	241
Grosella	740	-	-	-
Higo <sup>6</sup>	58	-	-	27
Kiwi	608	-	-	130
Lima	614	735	-	-
Limón <sup>7</sup>	712	828	1386	-
Mandarina	1100	872	-	-
Mango <sup>8</sup>	873	-	597	38
Manzana <sup>9</sup>	756	254	-	62
Melocotón <sup>10</sup>	260	883	-	199
Melón <sup>11</sup>	104	-	168	-
Membrillo	110	-	233	-
Mora	2895	-	-	-
Naranja	580	714	1500	151
Nectarina	-	2005	-	708
Níspero	462	-	75	-
Papaya <sup>12</sup>	-	-	-	65
Paraguaya	-	895	-	350
Pera <sup>13</sup>	103	-	-	210
Piña	651	-	-	-
Plátano	598	-	-	-
Pomelo	695	566	-	-
Sandía <sup>14</sup>	54	-	53	-
Uva blanca	335	-	-	-
Uva tinta <sup>15</sup>	518	-	2288	-

<sup>1</sup>Valor medio de aguacate a partir de distintas referencias y variedades para ensayo Tp.

<sup>2</sup>Valor medio de azofaifa a partir de 4 variedades distintas para ensayo TEAC-ABTS, FRAP.

<sup>3</sup>Valor medio de cereza a partir de distintas referencias para ensayo Tp.

<sup>4</sup>Valor medio de chirimoya a partir de distintas referencias para ensayo TEAC-ABTS.

<sup>5</sup>Valor medio de granada a partir de distintas referencias y variedades para ensayo TEAC-ABTS, Tp.

<sup>6</sup>Valor medio de higo a partir de distintas referencias y variedades para ensayo Tp.

<sup>7</sup>Valor medio de limón a partir de distintas referencias y variedades para ensayo TEAC-ABTS, FRAP.

<sup>8</sup>Valor medio de mango a partir de distintas referencias y variedades para ensayo TEAC-ABTS.

<sup>9</sup>Valor medio de manzana a partir de distintas referencias y variedades para ensayo TEAC-ABTS.

<sup>10</sup>Valor medio de melocotón a partir de distintas referencias para ensayo Tp.

<sup>11</sup>Valor medio de melón a partir de distintas referencias y variedades para ensayo TEAC-ABTS, FRAP.

<sup>12</sup>Valor medio de papaya a partir de distintas referencias para ensayo Tp.

<sup>13</sup>Valor medio de pera a partir de distintas variedades para ensayo TEAC-ABTS.

<sup>14</sup>Valor medio de sandía a partir de distintas referencias y variedades para ensayo FRAP.

<sup>15</sup>Valor medio de uva tinta a partir de distintas referencias para ensayo TEAC-ABTS.

La selección de los datos de CAT fue complicada por diferentes factores:

- No utilización de un único antioxidante de referencia. Por ejemplo, en el ensayo TEAC-ABTS, además del Trolox, fue utilizado el ácido ascórbico; y en el ensayo Tp (esta información no se muestra en las tablas), además del ácido gálico, fueron utilizados el ácido caféico o el ácido clorogénico.
- Diferencias con los disolventes y los métodos de extracción empleados. Tanto el tipo de solvente como las posibles interferencias de los compuestos no enzimáticos, pueden influir notablemente en los resultados obtenidos en la mayoría de los ensayos comunes de determinación de la CAT (FRAP, TEAC-ABTS, DPPH y ORAC), tal como indican Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2006), Pérez-Jiménez *et al.* (2008) y Rodríguez-Pérez *et al.* (2015).
- Medida del punto final de los métodos en diferentes tiempos. Aunque cada ensayo de CAT (FRAP, TEAC-ABTS, DPPH y ORAC) tiene un tiempo de incubación óptimo según la mayoría de los autores, otros toman la medida a otro tiempo. En función del momento en el que se tome la medida de absorbancia, el dato de capacidad antioxidante del alimento varía (Sánchez-Moreno, 2002).

Todo ello da lugar a una alta variabilidad en algunos datos; cabe destacar la cereza como uno de los ejemplos más representativos. Como se puede observar en la **tabla 4**, dos estudios diferentes aportan información para la cereza (García-Alonso *et al.*, 2004 y Serrano *et al.*, 2005). Ambos consideraron la cereza como producto fresco, pero cada estudio publica los datos en unas unidades de expresión distintas ( $\mu\text{mol TE/g}$  vs  $\text{mg eq. Ác. Ascórbico/100 g}$ ), siguiendo un método analítico de autores diferentes (Rice-Evans y Miller, 1994 vs Cano *et al.*, 1998) y, finalmente, usando también solventes diferentes (Metanol vs Tampón Fosfato 50 mM).

Debido a la variabilidad de unidades de expresión, los datos se han transformado en las mismas unidades para estandarizar la información, por lo que en algunos casos fue necesario asignar un valor de humedad al alimento. Se han utilizado datos representados en gráficos, si se han considerado útiles y, se han omitido datos incongruentes, por ejemplo en Redondo *et al.*, (2017).

En el pie de tabla se observan las frutas para las que se ha tomado la decisión de calcular un valor promedio entre todos los datos disponibles, ya sea porque han sido analizadas por diferentes autores en distintos estudios o bien, porque son frutas que presentan más de una variedad. En este sentido, se presenta un único dato para cada una de las frutas, simplificando y haciendo más directa la búsqueda del valor de CAT y del contenido en Tp, para un posterior uso en la estimación de la CAT-D. En los casos en los que se ha seleccionado el valor promedio entre varios datos, éste se ha calculado con los valores menos dispares entre ellos, descartando el valor de algún estudio cuando éste se encontraba demasiado alejado del resto. Cuando sólo se disponía de dos datos, estos se compararon con datos de otros estudios españoles (Ruiz *et al.*, 2018) y no españoles (Fu *et al.*, 2011) para ayudar en la selección de los valores finales, eligiendo sólo un valor y no calculando el promedio, en este caso.

### 6.1.1. Comparación del formulario con otras bases de datos

Con el formulario de CAT diseñado y con otras bases de datos (Pellegrini *et al.*, 2003; Carlsen *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018), se realizó un estudio de correlación para la estimación de la CAT-D (en la muestra del estudio transversal I). Se encontraron correlaciones positivas entre todas las bases de datos, pero estadísticamente significativa sólo para la CAT del grupo de las frutas y zumos y la CANE-P en el ensayo FRAP y considerando los datos de CAT de Pellegrini *et al.*, (2003). La fuerza de estas correlaciones varió ligeramente entre una base de datos y otra, debido a que el tamaño de la muestra del estudio no es muy grande, pero la tendencia fue la misma para cada una de ellas, tanto al estimar la CAT de las frutas a partir de los datos derivados del CFCA como del R-24H.

Además, cuando el análisis de correlación se realizó cruzando las bases de datos, en todos los casos se alcanzó la significación estadística ( $p < 0,001$ ), lo que apoya que existe cierta similitud entre todas ellas. Estos resultados indican que para la estimación de la CAT-D en el grupo de las frutas se puede emplear una u otra base de datos.

La decisión de emplear la base de datos de Pellegrini *et al.* (2003 y 2006) para estimar la CAT-D, tanto global como por grupo de alimentos en ambas poblaciones de estudio, se tomó por ser la que mayor número de alimentos con valor de CAT aporta y, por haber sido empleada en estudio anteriores, habiendo sido validada con sus indicadores en plasma (Pellegrini *et al.*, 2007).

## 6.2. Estudio transversal I

Este estudio piloto realizado sobre 50 personas de mediana edad, se diseñó para poner a punto los métodos de análisis de capacidad antioxidante total en plasma en una población sana y para establecer si existe una relación entre la CAT-D y la CANE-P.

El estudio de precisión de los métodos se realizó con dos diluciones diferentes y por triplicado. El CV obtenido en los ensayos correspondiente a la media de las dos diluciones fue: 5,06% (ORAC), 6,61% (ORAC sin proteínas), 5,64% (Tp), 5,08% (FRAP) y 5,3% (TEAC-ABTS). Además, fue necesaria la determinación de ácido úrico para eliminar su contribución al valor de CANE-P, restando el valor doble del ácido úrico del FRAP (2 es el factor estequiométrico del ácido úrico en el ensayo FRAP (Benzie y Strain, 1999)). El CV obtenido para el ácido úrico fue de 12,4% (valores entre 1,72-8,35 mg/dl). Estos bajos CVs permiten una utilización fiable de los datos.

La población de estudio cumplió las ingestas dietéticas de referencia publicadas por el Instituto de Medicina (IOM) (The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, Institute of Medicine, 2010), con ingestas, relativamente altas, de vitamina A (2691  $\mu\text{g}$  Eq/día) y de vitamina C (273 mg/día). Sin embargo, la ingesta de vitamina E fue inferior a las recomendaciones (6,25 mg/día). De acuerdo con los valores de CAT-D, los valores medios de ingesta en la población de estudio fueron mayores que los encontrados en la población española para el ensayo ORAC (Martínez-Álvarez e Izquierdo-Pulido, 2005) y más elevadas que las necesidades dietéticas de antioxidantes establecidas por Prior *et al.* (2007) en 4,61 mmol TE/1000 kcal. En este estudio, también resultaron ser más elevada la ingesta de la CAT-D que la reportada en la población española para los ensayos FRAP, TEAC-ABTS y Tp (Saura-Calixto y Goñi, 2006) y que la reportada por Agudo *et al.* (Agudo *et al.*, 2007) para el ensayo TEAC-ABTS, FRAP y ORAC en la cohorte española del estudio EPIC.

### 6.2.1. Relaciones entre CAT-D y CANE-P

Los resultados de este estudio mostraron una relación moderadamente débil entre la CAT-D mediante el ensayo FRAP (sin tener en consideración la contribución de la CAT del café) y los niveles de CANE-P medida a través del ensayo FRAP, para ambos instrumentos de evaluación de la dieta empleados para estimar la CAT-D (así, para el CFCA observamos:  $\rho=0,31$ ,  $p=0,03$ ; y, para el R-24H:  $\rho=0,30$ ,  $p=0,04$ ). Además del ensayo FRAP, también se encontró relación entre la CAT-D del ensayo ORAC evaluada mediante el R-24H y la CANE-P del

mismo ensayo ( $\rho=0,35$ ,  $p=0,01$ ). Para el resto de ensayos, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la CAT-D (sin la contribución de la CAT del café) y la CANE-P.

En lo que respecta a los grupos de alimentos, los niveles de FRAP de frutas y zumos y, los niveles de FRAP de los vegetales, fueron los grupos de alimentos que mayor porcentaje aportaron a la CAT-D global y las correlaciones entre la CAT-D y la CANE-P fueron mayores en estos dos grupos de alimentos ( $\rho\sim 0,5$ ). Kashino *et al.* (2018), en un estudio de 244 hombres y 253 mujeres, que completaron un recuerdo dietético de 28 días y un CFCA, también encontraron que las frutas y los vegetales fueron, tras las bebidas, los grupos de alimentos que más contribuyeron a la CAT-D estimada con los ensayos FRAP, ORAC y TRAP (rango frutas de 10,2% a 36,9% de la CAT-D global; y rango vegetales de 8,1% a 32,3% de la CAT-D global).

En varios estudios, se ha propuesto la CAT-D como un modulador de la función antioxidante en las personas a través de la interacción sinérgica de los antioxidantes de la dieta. Sin embargo, sigue siendo cuestionable que la CAT-D refleje, ciertamente, el estado antioxidante del organismo (Bartosz, 2010). Por tanto, ha habido un uso limitado de la CAT-D en los estudios epidemiológicos que han abordado las relaciones entre antioxidantes y las enfermedades en las que está involucrado el estrés oxidativo, como puede ser el cáncer. Por este motivo, se ha considerado importante desentrañar la relevancia fisiológica de la CAT-D para obtener información sobre el papel de los antioxidantes de la dieta en la salud humana (Bartosz, 2010).

Los estudios previos que han explorado la relación entre la CAT-D y la CANE-P han mostrado resultados contradictorios (**tabla 61**). Por ejemplo, Cao *et al.* (1998) observaron una correlación significativa positiva entre los niveles basales de ORAC en plasma y la ingesta diaria habitual de antioxidantes totales procedentes de las frutas y los vegetales en una muestra de 36 personas sanas. Estos mismos autores, informaron del incremento que se producía en los niveles de ORAC en plasma después de una intervención que consistía en un incremento en el consumo de frutas y vegetales. Por su parte, Pellegrini *et al.* (2007) reportaron una débil correlación entre la CAT-D y la CANE-P en el ensayo FRAP en una población de estudio de 285 voluntarios italianos, pero no encontraron correlaciones entre la CAT-D y la CANE-P en los demás ensayos (TRAP ni TEAC-ABTS). En este estudio, los autores pretendían validar un CFCA como herramienta de evaluación de la CAT-D usando como referente un recuerdo dietético de 3 días. Los coeficientes de correlación fueron de similar magnitud para ambos cuestionarios dietéticos ( $\rho=0,17$  y  $\rho=0,13$ , respectivamente). El tercer estudio que se destaca es el de

Rautiainen *et al.* (2008), quienes también pretendían validar la medida de la CAT-D usando los niveles de CANE-P en una muestra de 108 mujeres de Suecia. Para ello, usaron dos CFCA, uno de 96 ítems para la validación del estudio y otro de 123 ítems para la reproducibilidad del estudio. Estos autores observaron una correlación significativa y positiva entre los niveles de ORAC del plasma y los niveles de ORAC de la dieta ( $\rho=0,27$ ). En cuanto a la CAT-D estimada por grupo de alimentos, encontraron correlaciones positivas entre el grupo denominado *frutas&verduras* en los ensayos ORAC y TEAC-ABTS, pero no para el ensayo FRAP. Para encontrar relación entre los niveles de ORAC de la dieta y los niveles de TEAC-ABTS del plasma se debe acudir al estudio de Khalil *et al.* (2011), en el que participaron 94 personas de Montreal. Estos autores observaron una correlación entre la CAT-D estimada con un R-24H y la CANE-P. En relación a estos resultados, en nuestro análisis cruzado (similar al realizado por Khalil *et al.*), aparecieron correlaciones estadísticamente significativas entre el FRAP y el ORAC (sin la contribución de las proteínas) del plasma y la CAT-D estimada. Finalmente, Wang *et al.* (2012), en un estudio realizado en 40 mujeres postmenopáusicas con sobrepeso, observaron una correlación positiva moderada entre la CAT-D mediante el ensayo VCEAC y los niveles de CANE-P para el ensayo VCEAC (es una modificación del ensayo TEAC-ABTS que usa la vitamina C en lugar del Trolox como antioxidante de referencia (Kim *et al.*, 2002)).

**Tabla 61:** Comparación de estudios que analizan correlaciones entre CAT-D y CANE-P.

Referencia	Población de estudio	Diseño de estudio	Ensayos de CAT-D y CANE-P		Bases de datos de CAT-D	Rango de CAT-D	Rango de CANE-P	Resultados (rho y p-valor)
			Dieta	Plasma				
Estudio actual	50 hombres y mujeres sanos, Registro de la dieta: CFCA y R-24H	Estudio transversal	ORAC Tp FRAP TEAC-ABTS	ORAC ORAC without <sup>1</sup> proteins Tp FRAP TEAC-ABTS	Pellegrini et al, 2003; Pellegrini et al, 2006; USDA 2007 USDA 2010 Carlsen et al, 2010	FFQ-based <sup>2,3</sup> : ORAC: 7,788±2,411 μmolTE/day Tp: 818±159 mgGAE/day FRAP: 5,432±1,491 μmol FeSO <sub>4</sub> /day TEAC-ABTS: 2436±661 μmolTE/day  24-HR-based <sup>2,3</sup> : ORAC: 6278±3776 μmolTE/day Tp: 775±351 mgGAE/day FRAP: 3,065±1,355 μmol FeSO <sub>4</sub> /day TEAC-ABTS: 1,052±392 μmolTE/day	ORAC <sup>2</sup> : 20,010±1,455 μmolTE/L ORAC w/o <sup>2</sup> : 2,081±181 μmolTE/L Tp <sup>2</sup> : 1,595±82,1 mgGAE/L FRAP <sup>2</sup> : 1,644±82,1 μmol FeSO <sub>4</sub> /L TEAC-ABTS <sup>2</sup> : 9,317±483 μmolTE/L	FFQ-ORAC & Plasma-ORAC (r=0,03 p=0,82) <sup>3,4</sup> 24-HR-ORAC & Plasma-ORAC (r=0,15 p=0,30) <sup>3,4</sup> FFQ-ORAC & Plasma-ORAC w/o <sup>1</sup> (r=0,12 p=0,39) <sup>3,4</sup> 24-HR-ORAC & Plasma-ORAC w/o <sup>1</sup> (r=0,27 p=0,06) FFQ-Tp & Plasma-Tp (r=0,11 p=0,43) <sup>3,4</sup> 24-HR-Tp & Plasma-Tp (r=-0,03 p=0,83) <sup>3,4</sup> FFQ-FRAP & Plasma-FRAP (r=0,31 p=0,03) <sup>3,4</sup> 24-HR-FRAP & Plasma-FRAP (r=0,30 p=0,03) <sup>3,4</sup> FFQ-TEAC-ABTS & Plasma-TEAC-ABTS (r=0,09 p=0,52) 24-HR-TEAC-ABTS & Plasma-TEAC-ABTS (r=0,14 p=0,32)
Cao et al, 1998	18 sujetos sanos jóvenes (hombres y mujeres) y 18 sujetos sanos mayores (hombres y mujeres)	Estudio de intervención	ORAC	ORAC sin proteínas	Cao et al, 1996 Wang et al, 1997	Hombres mayores 1910±460 μmolTE/day Mujeres mayores 1640±250 μmolTE/day Hombres jóvenes 1420±180 μmolTE/day	Hombres mayores 612,7±24,4 μmolTE/L Mujeres mayores 587,0±41,1 μmolTE/L Hombres jóvenes 635,3±33,3 μmolTE/L Mujeres jóvenes 545,8±41,5 μmolTE/L	Plasma ORAC y antioxidantes totales de frutas & verduras del año anterior (rho= 0,44 p=0,011)

	mujeres), Registro de dieta: No especificado,					Mujeres jóvenes 1740±580 µmolTE/day		
Pellegrini et al, 2007	285 hombres y mujeres sanos (empleados de empresa alimentaria)  Registro de dieta: Food Frequency Questionnaire (FFQ) y 3-d weighed food record (3D-WR)	Estudio transversal	TEAC-ABTS TRAP FRAP	TEAC-ABTS FRAP	Pellegrini et al, 2003 Pellegrini et al, 2006	<p><u>FFQ-based:</u> TEAC: 1900-33800 µmol TE/d TRAP: 2300-43400 µmol TE/d FRAP: 5700-89800 µmol Fe<sup>2</sup>/d</p> <p><u>3D-WR:</u> TEAC: 1300-13900 µmol TE/d TRAP: 1400-17400 µmol TE/d FRAP: 4100-37500 µmol Fe<sup>2</sup>/d</p>	TEAC: 119-1337 µmol TE/L FRAP: 575-1634 µmol Fe <sup>2</sup> /L	<p>FFQ-TEAC &amp; Plasma TEAC (r=0,11 p=0,07)</p> <p>3D-WR-TEAC &amp; Plasma TEAC (r=0,046 p=0,44)</p> <p>FFQ-FRAP &amp; Plasma FRAP (r=0,17 p=0,008)</p> <p>3D-WR-FRAP &amp; Plasma FRAP (r=0,13 p=0,04)</p>

**Tabla 61:** Comparación de estudios que analizan correlaciones entre CAT-D y CANE-P (continuación).

Rautiainen et al, 2008	108 mujeres suecas Registro de dieta: Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Estudio transversal	ORAC TRAP FRAP	ORAC TRAP FRAP	Prior et al, 2003 Wu et al, 2004 Sánchez Moreno et al, 2003 Pellegrini et al, 2003 Pellegrini et al, 2006 Halvorsen et al, 2006	<u>FFQ-based:</u> FFQ- ORACTOTAL: 12127±6180 µmol TE/d FFQ- TRAPTOTAL: 3165±1659 µmol TE/d FFQ- FRAPTOTAL: 2793±1622 µmol Fe <sup>2</sup> /d	ORACwhole: (6092-16967) µmol TE/L ORAClipophilic: (219-1091) µmol TE/L ORACHydrophilic: (806-2055) µmol TE/L TRAP: (859-1566) µmol TE/L FRAP: (592-1216) µmol Fe <sup>2</sup> /L	Plasma ORACwhole & FFQ-based ORACtotal r=0,27 (0,06, 0,46), Plasma ORAClipophilic & FFQ-based ORACtotal r=0,27 (0,06, 0,46) Plasma ORACHydrophilic & FFQ-basedtotal r=-0,01 (-1,35, 1,33) Plasma TRAP & FFQ-based TRAPTtotal r=0,18 (-0,03, 0,37) Plasma FRAP & FFQ-based FRAPTtotal r=0,07 (-0,15, 0,30)
Khalil et al, 2011	94 hombres y mujeres de Montreal Registro de dieta: 24 hour recall	Estudio transversal	ORAC	TEAC	USDA, 2007	<u>24-h recalls:</u> Men 10196±6021 µmol TE/d Women 12931±7140 µmol TE/d	Men 9970±1070 µmol TE/L Women 9500±850 µmol TE/L	Daily ORAC values from 24-h recalls & Plasma TEAC assay All (r=0,14, p=0,17) Men (r=0,11, p=0,45) Women (r=0,33, p=0,03)
Wang et al, 2012	40 mujeres postmenopáusicas con sobrepeso Registro de dieta: no especificado	Estudio transversal	VCEAC	VCEAC FRAP ORAC	Chun et al, 2007 Floegel et al, 2010	Low TAC group (347- 732) <sup>2,5</sup> (357- 805) <sup>2,6</sup> mg VCE/d High TAC group (497- 1048) <sup>2,5</sup> (452- 1020) <sup>2,6</sup> mg VCE/d	Low TAC group (264- 296) <sup>2</sup> mg VCE/L High TAC group (298- 379) <sup>2</sup> mg VCE/L	Plasma VCEAC & TAC VCEAC p<0,01 <sup>5</sup> p<0,05 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Sin proteínas.<sup>2</sup>Medias geométricas (±SD).<sup>3</sup>WSin la contribución de la CAT del café.<sup>4</sup>Correlaciones parciales ajustadas por ingesta de energía (Kcal/día), sexo and edad (años).<sup>5</sup>Ajustado por ingesta total de energía.<sup>6</sup>Ajustado por edad, IMC, etnia e ingesta total de energía (Kcal/día).

Por otro lado, hay algunos estudios de intervención y transversales que estudiaron si existe una relación entre una dieta rica en antioxidantes, basada en un consumo elevado de frutas y verduras y los niveles de CANE-P. Por ejemplo, Record *et al.* (2001), en un estudio de intervención de 2 semanas realizado en 25 hombres no fumadores, observaron que el consumo de 5-7 raciones de frutas y verduras al día (que equivalen a una ingesta de 30 g de suplementos antioxidantes), aumentó los niveles de ácido ascórbico,  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno y luteína+zeaxantina en el plasma, pero no los niveles de licopeno, retinol y tocoferol. A pesar del incremento en las concentraciones de estos nutrientes antioxidantes, la CANE-P medida con el ensayo TEAC-ABTS no se vió afectada significativamente ni por la intervención dietética, ni por el momento de la extracción sanguínea (en ayunas o tras la ingesta). En otro estudio de intervención, diseñado para 43 personas sanas y no fumadoras, se observó que los niveles de CANE-P, tanto en ayunas como tras la ingesta, no se vieron afectados significativamente, ni en el grupo de intervención con frutas y vegetales ni en el grupo suplementado (Dragsted *et al.*, 2004). En contraposición, otros estudios no observaron esta tendencia. Por ejemplo, Pitsavos *et al.* (2005) encontraron que, la CANE-P, medida con un test colorimétrico, fue correlacionada positivamente con el consumo de aceite de oliva, frutas y verduras en 3042 participantes en el estudio ATTICA. Además, dentro del estudio PREDIMED, donde se evaluaron a 187 participantes, se vieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CANE-P (ensayo TEAC-ABTS), entre el grupo control y los dos grupos de intervención (dieta Mediterránea + aceite de oliva virgen o dieta Mediterránea + frutos secos), después de 3 años de intervención de dieta (Razquin *et al.*, 2009) y, tanto los niveles de plasma analizados con el ensayo FRAP, como con el ensayo TRAP, se incrementaron en ambos grupos tras un año de intervención dietética, en la que se evaluaron 564 participantes (Zamora *et al.*, 2013). Otro estudio de intervención relacionado con la DM, con un seguimiento de dos meses, también mostró un aumento de los niveles de CANE-P (ensayo ORAC) en el grupo de intervención (46 sujetos con obesidad abdominal), al ser comparados con el grupo control (n=44 sujetos) (Kolomvotsou *et al.*, 2013). Además, un meta-análisis de 88 estudios de intervención, también apoya que el consumo de alimentos y bebidas vegetales aumenta el potencial antioxidante del plasma (Lettieri-Barbato *et al.*, 2013). El efecto de la ingesta de macronutrientes en el nivel de CAT-D fue examinado en 156 individuos sanos. Según los resultados encontrados en este estudio, una baja ingesta calórica diaria se relaciona con niveles altos de CANE-P (analizado con el ensayo TEAC-ABTS) (Ferreira *et al.*, 2014).

En resumen, la mayoría de estos estudios informaron sobre correlaciones no significativas entre la CAT-D y la CANE-P. Sólo los estudios de Cao *et al.* (1998), Pellegrini *et al.*

(2007), Rautiainen *et al.* (2008), Khalil *et al.* (2011), Wang *et al.* (2012) y nuestro estudio, han observado correlaciones estadísticamente significativas, de débiles a moderadas, entre los ensayos FRAP y ORAC estimados, tanto en la dieta como en el plasma. Esta moderada correlación entre la CAT-D y la CANE-P puede indicar que la contribución dietética de la CAT-D al estatus *in vivo* de la CANE-P es casi irrelevante, debido a varias razones: (1) La CANE-P puede estar influenciada por diferentes procesos fisiológicos, como la absorción, antioxidantes endógenos, estrés, contaminación e inflamación (Pellegrini *et al.*, 2007; Rautiainen *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 2007; Record *et al.*, 2001; Kolomvotsou *et al.*, 2013); (2) La CANE-P puede estar influenciada por las diferencias en cuanto a biodisponibilidad de los componentes antioxidantes, como por ejemplo, los flavonoides, los cuales están presentes en concentraciones milimolares en los alimentos, pero en concentraciones nanomolares o inferiores en el plasma (Erlund, 2004); (3) Los ensayos disponibles para medir la CANE-P no miden únicamente los componentes antioxidantes exógenos, sino también, otros antioxidantes que se encuentran en el plasma humano y que tienen una importante contribución a la CANE-P (Bartosz, 2010):

- Contribución al ORAC: Ácido úrico 36,9%, proteína-SH 31,5% y otros compuestos sin identificar 23,1%.

- Contribución al FRAP: Ácido úrico 60%, vitamina C 15% y compuestos sin identificar 10%.

- Contribución al TEAC-ABTS: Proteína-SH 52,9% y ácido úrico 33,1%.

- Y contribución al TRAP: Ácido úrico 42,9%, otros compuestos sin identificar 35,1% y proteína-SH 16,3%.

La mayoría de estos ensayos se preparan en soluciones acuosas, por lo que, los antioxidantes hidrofílicos o insolubles en agua pueden estar subestimados (Bartosz, 2010). Además, algunos ensayos no representan la medida de CANE-P en su totalidad, como por ejemplo el ensayo de Tp usando el reactivo FCR, debido a que no sólo reacciona con los fenoles, sino que también lo hace con proteínas, tioles y muchos derivados de vitaminas (Huang *et al.*, 2005); (4) La ingesta dietética en la población de estudio podría ser demasiado homogénea, dando lugar a un rango de ingesta de antioxidantes que no fuese lo suficientemente amplio como para observar una asociación.

En lo que respecta a las relaciones entre diferentes herramientas de medida de la CAT-D, en nuestro estudio el CFCA y el R-24H, se obtuvieron coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $\rho$  de 0,54 a 0,71;  $p < 0,001$ ) entre los valores de CAT-D estimados con ambos instrumentos de medida. Recientemente, Kashino *et al.* (2018) encontraron también correlaciones similares entre ambos métodos de recogida de información de la dieta ( $\rho = 0,51$  para el ensayo ORAC y  $\rho = 0,53$  para el ensayo FRAP).

### 6.2.2. Fortalezas y limitaciones del estudio

Varias fortalezas de nuestro estudio, apoyan la robustez de los resultados. En primer lugar, las muestras de plasma fueron extraídas después de 12 horas de ayuno para estimar los niveles de CANE-P basales.

En segundo lugar, se emplearon varios ensayos de CANE-P para abarcar los distintos mecanismos antioxidantes (Bartosz, 2010). Esto permitió realizar un análisis cruzado entre los ensayos de CAT-D y de CANE-P y explorar, exhaustivamente, las relaciones CAT-D/CANE-P y CANE-P/CANE-P. La existencia de correlaciones estadísticamente significativas en estos análisis cruzados se debe, fundamentalmente, a las concentraciones de ácido úrico, vitamina C, vitamina E y otros compuestos no identificados, ya que, como se ha visto anteriormente, son los compuestos que contribuyen en mayor porcentaje en los ensayos de CANE-P, como el FRAP y el ORAC (Bartosz, 2010).

Como tercera fortaleza se destaca el uso de dos instrumentos de recogida de información de ingesta de dieta. Ambos instrumentos, CFCA y R-24H, tienen ventajas y limitaciones, tal y como se recoge en los estudios de Pérez *et al.* (2015) y Salvador *et al.* (2015), pero la información derivada de ellos puede ser considerada como complementaria. En este sentido, la recogida de información relativa a la ingesta de frutas y verduras estacionales es menos eficiente con el CFCA, mientras que el R-24H recoge con mayor precisión el consumo de estos alimentos. A pesar de ser bien conocido este inconveniente de los CFCA (Michels *et al.*, 2005; Marks *et al.*, 2006), su uso en estudios epidemiológicos se justifica por el hecho de que proporcionan una medida fiable de la ingesta dietética habitual. Respecto al R-24H, los participantes especificaron la cantidad de cada uno de los alimentos ingeridos, ya que, durante su cumplimentación, los participantes en el estudio tuvieron la referencia visual de pesos de medidas caseras y raciones habituales de consumo de Carbajal y Sánchez-Muñiz (2003) y la guía para estudios dietéticos de Ruiz y Artacho (2010). De acuerdo con nuestros resultados,

los datos de CAT-D derivados del CFCA y del R-24H estuvieron fuertemente correlacionados entre sí y casi no existieron diferencias cuando se exploraron correlaciones entre ambos instrumentos de medida de CAT-D y la CANE-P.

En cuarto lugar, se destaca la estimación de la CAT-D sin tener en cuenta la contribución de la CAT del café. Se llevó a cabo esta acción ya que los productos de Maillard que se producen durante el proceso de tostado del café son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante *in vitro* del café, pero además, parece que impiden la absorción de antioxidantes *in vivo*, lo que significa que una cantidad importante de antioxidantes no son absorbidos (Delgado-Andrade y Morales, 2005; Morales *et al.*, 2012). Además, el ácido cafeico es el compuesto fenólico más abundante que se encuentra en la preparación del café. Sin embargo, después de su esterificación en ácido clorogénico, su absorción se reduce notablemente (Olthof *et al.*, 2001). La hidrólisis del ácido clorogénico por las esterasas microbianas en el tracto gastrointestinal puede dejar algunos compuestos fenólicos libres o conjugados en el plasma, pero no está del todo claro hasta qué punto esto es así (Manach *et al.*, 2005). Por tanto, la CAT del café puede crear confusión en las estimaciones totales de CAT-D, de ahí que, en nuestro estudio, se hayan considerado tanto la CAT-D global como la CAT-D sin la contribución de la CAT del café.

Sin embargo, nuestro estudio también posee algunas limitaciones. La población de estudio fue reducida, aunque fue suficiente para detectar coeficientes de correlación superiores a 0,2 para las variables estudiadas. Existió una potencia estadística limitada para realizar análisis por variables que podían tener influencia en nuestros resultados, como el IMC, nivel de actividad física y el hábito tabáquico. Otra limitación es que, las bases de datos disponibles en la literatura para cuantificar la ingesta de CAT-D se basan en alimentos estadounidenses (USDA, 2007 y 2010) e italianos (Pellegrini *et al.*, 2003 y 2006). Esto es importante destacarlo ya que, el contenido de antioxidantes de los alimentos puede variar en función de la ubicación geográfica y de las condiciones de crecimiento, siendo posible haber obtenido resultados diferentes si se hubieran utilizado los valores de CAT-D obtenidos en análisis de alimentos producidos en España (Prior y Gu, 2005). Por último, también fue una limitación el haber dispuesto de una sola colección de muestras de sangre y una sola medición de CANE-P, lo que puede no reflejar el estado de CANE-P a largo plazo de una persona. Sin embargo, en un estudio previo, Al-Delaimy *et al.* (2006) informaron de que varios biomarcadores de la ingesta de antioxidantes, entre los que se incluía el FRAP, pueden considerarse suficientemente fiables y estables en el tiempo.

### 6.3. Estudio transversal II

En este estudio se buscó examinar la asociación entre la CAT-D y la CANE-P con algunos nutrientes antioxidantes y marcadores de inflamación. En general, se encontraron correlaciones positivas, aunque moderadas, entre los ensayos de CAT-D y ensayos de CANE-P con nutrientes antioxidantes, pero no con marcadores de inflamación. Estas asociaciones con nutrientes antioxidantes sólo se mantuvieron para el ensayo FRAP en los análisis ajustados por edad, sexo, centro de reclutamiento, actividad física, IMC y hábito tabáquico. Las agrupaciones (clústeres) que resultaron de la combinación de factores demográficos y estilos de vida en función de los niveles de biomarcadores sugieren que existe variabilidad de la CANE-P en relación con el estado antioxidante e inflamatorio de cada individuo.

Al igual que en el estudio transversal I, se estudió la precisión de los diferentes métodos analíticos analizados. Para el ácido ascórbico el CV fue de 8,65% (para valores entre 4,77-133  $\mu\text{mol/L}$ ) y de 9,01% para el ácido dehidroascórbico (para valores entre 0-163  $\mu\text{mol/L}$ ).

Respecto a las vitaminas liposolubles, los CVs fueron de 6,77% para el retinol (valores entre 1,34-6,28  $\mu\text{mol/L}$ ), de 8,25% para  $\alpha$ -tocoferol (valores entre 9,04-128  $\mu\text{mol/L}$ ), de 9,87% para los carotenos totales (valores entre 0,81-87,4  $\mu\text{mol/L}$ ), de 9,29% para la CoQ9 (valores entre 0,003-0,53  $\mu\text{mol/L}$ ) y 5,11% para la CoQ10 (valores entre 0,34-5,31  $\mu\text{mol/L}$ ).

Los valores de los CVs en los marcadores de estrés oxidativo fueron mayores al 20%, por lo que se tomó la decisión de no incluir estos biomarcadores en los análisis estadísticos.

Respecto a los marcadores de inflamación, los CVs fueron inferiores al 15% para adiponectina (valores entre 0,03-49,9  $\mu\text{g/ml}$ ), PAI-1 (valores entre 1,13-78,8  $\text{ng/ml}$ ), resistina (valores entre 4,97-83,4  $\text{ng/ml}$ ), IL-6 (valores entre 0,01-25,4  $\text{pg/ml}$ ) e IL-8 (valores entre 0,24-85,6  $\text{pg/ml}$ ), e inferior al 20% para TNF- $\alpha$  (valores entre 0,09-4,00  $\text{pg/ml}$ ).

Finalmente, para PCR, el CV osciló entre el 2% (para valores de 0,45  $\text{mg/L}$ ) y el 0,26% (para valores de 45  $\text{mg/L}$ ).

Estos CVs permiten una utilización fiable de los datos, excepto en los biomarcadores de estrés oxidativo, como ya se ha comentado.

### 6.3.1. Relaciones entre CAT-D y CANE-P

La CAT-D se ha asociado a un menor riesgo de enfermedades crónicas en varios estudios epidemiológicos (Parohan *et al.*, 2019). Sin embargo, como se ha argumentado en el apartado anterior, la capacidad antioxidante de los alimentos puede no reflejar el potencial *in vivo* del organismo tras su consumo (Serafini y Del Río, 2004; Valko *et al.*, 2007; Pellegrini *et al.*, 2019). Los estudios que han evaluado la relación entre la CAT-D y la CANE-P han encontrado, en el mejor de los casos, correlaciones moderadamente débiles en algunos de los ensayos (Pellegrini *et al.*, 2007; Rautiainen *et al.*, 2008; Carrión-García *et al.*, 2017), mientras que otros no respaldaron una correlación (Floegel *et al.*, 2010).

La CANE-P, concretamente el ensayo FRAP, tanto con la contribución del ácido úrico como sin su contribución, se correlacionó positivamente con el FRAP de la dieta en este estudio transversal II, confirmando los resultados encontrados en el estudio transversal I (Carrión-García, *et al.*, 2017). Este resultado coincide con el estudio de Pellegrini *et al.* (2007), el cual reporta una correlación débil entre el FRAP del plasma y de la dieta en una población de estudio formada por 285 voluntarios italianos sanos. El uso de CFCA para evaluar la CAT-D puede ser una razón de la débil correlación entre el CAT-D y la CANE-P, ya que las variaciones estacionales en la ingesta de antioxidantes se recogen de una manera más limitada. Sin embargo, el estudio anterior (estudio transversal I), demostró que ambos métodos de recogida de información dietética, CFCA y R-24H, reflejaron de manera similar relaciones entre la CAT-D y la CANE-P (Carrión-García *et al.*, 2017). Otra posible razón de la débil correlación entre ambos es que la CANE-P se ve afectada por varios factores relacionados con los estilos de vida como hábitos alimenticios, estado fisiológico del sujeto, variaciones genéticas y la composición y función de la microbiota intestinal (Manach *et al.*, 2005). Todos estos factores tienen un conocido impacto sobre los mecanismos de digestión, absorción y metabolismo de los antioxidantes de la dieta, lo que da lugar a una alta variabilidad de CANE-P entre sujetos (Pellegrini *et al.*, 2018). Por ejemplo, se han reportado casos en los que la CANE-P fue mayor en fumadores que en no fumadores (Serafini y Del Río, 2004), en hombres (Detopoulou *et al.*, 2010) y en personas con sobrepeso/obesidad (Wang *et al.*, 2012). Estos estudios se realizaron en poblaciones de estudio de bajo tamaño de muestra y no se han reproducido en otros estudios, ni tampoco, en el nuestro. Sin embargo, nuestros resultados puede que estén determinados por esta variabilidad de la CANE-P, ya que no observamos asociaciones entre los valores de dieta y los valores de plasma para el ensayo FRAP cuando se tienen en cuenta los factores de estilos de vida en los modelos de regresión multivariante. La debilidad de las

correlaciones entre los valores de CAT-D y CANE-P podrían deberse también a la influencia de otros compuestos antioxidantes presentes en el organismo, como las proteínas en el ensayo ORAC y el ácido úrico en el ensayo FRAP (Pellegrini *et al.*, 2018). En nuestro estudio, todas las asociaciones se mantuvieron al eliminar el efecto de estos compuestos en los ensayos correspondientes.

La baja biodisponibilidad de algunos antioxidantes, como por ejemplo, los flavonoides, que sólo alcanzan niveles de concentración nanomolar en el plasma (Manach *et al.*, 2005), podría explicar también la debilidad de la correlación. Además, como ya se ha comentado, la mayoría de los ensayos de CAT-D y CANE-P se realizan en soluciones acuosas, lo que implica que los antioxidantes hidrófobos y los antioxidantes no solubles en agua, puedan ser subestimados (Bartosz, 2010).

### **6.3.2. Asociaciones de CAT-D y CANE-P con marcadores de nutrientes antioxidantes y de inflamación**

En este estudio no se encontraron asociaciones entre los niveles de CANE-P ni CAT-D con los niveles de PCR. Tampoco se encontraron asociaciones entre el FRAP de la dieta y los niveles de PCR en el estudio ATTICA de 532 adultos sanos (Detopoulou *et al.*, 2010), ni en el estudio de Rotterdam de 4506 participantes (Stringa *et al.*, 2017). Tampoco hubo asociación entre los niveles de ORAC del plasma con los de PCR en un estudio realizado con 815 sujetos españoles (Romeu *et al.*, 2013). La falta de una asociación general en nuestro estudio podría ser explicada por el hecho de que los niveles de PCR estuvieron comprendidos en un rango bajo y estrecho. Asimismo, nuestra población de estudio comprendía únicamente individuos sanos, menos propensos a tener altos niveles de este marcador.

Sin embargo, otros estudios reportaron una asociación entre la CAT-D y los niveles de PCR en individuos sanos, como el estudio de Kobayashi *et al.* (2012) en 474 mujeres japonesas y, el estudio de Brighenti *et al.* (2005) en 243 sujetos italianos no diabéticos. Es importante destacar que, este último estudio también mostró que la asociación fue mayor en los sujetos con hipertensión que en los sujetos con normotensión, lo que sugiere que la asociación entre la CAT-D y los niveles de PCR del plasma puede fortalecerse bajo condiciones pro-inflamatorias. Otros estudios también han encontrado una asociación entre una baja ingesta dietética de antioxidantes y elevados parámetros inflamatorios, lo que respalda que la inflamación puede explicar, en parte, los mecanismos que vinculan los antioxidantes y el estrés

oxidativo con las enfermedades crónicas relacionadas con la inflamación. El estudio de Wang *et al.* (2012), por ejemplo, indicó que una alta ingesta de CAT-D se asoció con niveles más bajos de PCR del plasma en 35 mujeres postmenopáusicas con sobrepeso/obesidad.

Por otro lado, niveles altos de CANE-P, concretamente el ensayo FRAP, se asociaron también inversamente con los niveles de PCR en 80 pacientes con insuficiencia renal terminal (Babaei *et al.*, 2014). Por lo tanto, sigue siendo controvertido si los alimentos antioxidantes están relacionados a ambos, un bajo perfil inflamatorio en condiciones de inflamación crónica de bajo grado (por ejemplo, fumadores, personas obesas y enfermas) y/o un estado saludable. Los resultados de nuestro estudio no apoyan que exista una asociación entre los valores de CANE-P y los de PCR.

Respecto a estudios que han evaluado TNF- $\alpha$ , IL-6, PAI-I, resistina y adiponectina en relación con los niveles de CANE-P y CAT-D (Wang *et al.*, 2012; Babaei *et al.*, 2014; Stringa *et al.*, 2017; Gawron-Skarbek *et al.*, 2018), sólo el estudio de Rotterdam encontró asociaciones negativas y estadísticamente significativas entre el ensayo FRAP de la dieta y PAI-I y, una asociación positiva entre el ensayo FRAP de la dieta y adiponectina (Stringa *et al.*, 2017). Por lo tanto, al igual que en nuestro estudio, la mayoría de estudios previos tampoco observaron una asociación entre los valores de CAT-D ni CANE-P y estos marcadores de inflamación.

En cuanto a los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, niveles altos de CANE-P según el ensayo FRAP, se asociaron con niveles altos de casi todos los antioxidantes y de contenido en Tp. Aunque este marcador parece no reflejar el contenido de compuestos fenólicos de los alimentos (Pellegrini *et al.*, 2018), en nuestro estudio observamos asociaciones positivas entre todos los ensayos de CANE-P y el ensayo FCR para la medida de Tp.

Por otro lado, Wang *et al.* (2012) en un estudio de 60 jóvenes sanos no fumadores obtuvieron una asociación positiva entre la ingesta dietética (carotenoides y flavonoides) y niveles de antioxidantes del plasma (luteína y  $\alpha$ -tocoferol). Sin embargo, contrariamente a lo encontrado en nuestro estudio, altos niveles de CAT-D (mediante ensayo FRAP y ensayo VCEAC) no se relacionaron significativamente con el incremento de los niveles de ácido ascórbico y contenido en Tp en plasma. Además, el estudio de Wang *et al.* (2012) realizado con mujeres postmenopáusicas tampoco mostró asociaciones significativas entre CAT-D y CANE-P (ORAC, FRAP y VCEAC) y la ingesta dietética de nutrientes antioxidantes. Nuestro estudio es, por tanto, el primero en encontrar una asociación entre CAT-D y CANE-P y los niveles de nutrientes antioxidantes.

Si bien nuestros resultados no apoyan diferencias en el efecto entre las medidas de CAT-D y CANE-P y sobre los niveles de biomarcadores según sexo, hábito tabáquico, obesidad o actividad física (aunque sí según centro), sí hubo agrupaciones diferenciadas de individuos en el análisis de clúster (**figura 33**). Estas agrupaciones pueden reflejar distintos patrones según la relación entre la CANE-P y los marcadores de nutrientes antioxidantes y de inflamación. La población de nuestro estudio resultó ser demasiado pequeña para observar diferentes patrones de asociación entre los clústeres identificados, excepto en la agrupación de mayor tamaño. En esta agrupación, formada principalmente por mujeres inactivas y no fumadoras, la tendencia fue opuesta a la esperada en algunos marcadores de inflamación (como adiponectina, resistina y PCR). Por lo tanto, debido al tamaño limitado de la muestra de nuestro estudio, no se pudo probar que existan asociaciones entre los individuos más propensos a presentar estados inflamatorios.

### 6.3.3. Limitaciones y fortalezas del estudio

En este estudio, no se pudo evaluar la asociación entre la CAT-D y la CANE-P con marcadores de estrés oxidativo. Las enzimas antioxidantes, las cuales juegan un papel fundamental en las defensas antioxidantes del organismo tampoco fueron consideradas. Sin embargo, su efecto sobre la absorción de los nutrientes exógenos que conforman la CAT-D no está del todo clara, de hecho, algunos estudios no han observado cambios significativos en su actividad con la ingesta de antioxidantes, alimentos o suplementos dietéticos (Young *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000). Otros estudios han informado de que su grado de actividad depende del genotipo de cada sujeto (Yuan *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2013). De esta manera, diferencias en el genotipo de los genes que codifican estas enzimas, podrían haber afectado también nuestros resultados. Tampoco disponemos de medidas de otros marcadores inflamatorios como la leptina. No obstante, entre los estudios publicados, nuestro estudio ha considerado el mayor conjunto de marcadores de inflamación. Nuestros resultados, por lo tanto, son consistentes con la ausencia de una asociación entre una dieta rica en antioxidantes y un estado inflamatorio bajo. Sin embargo, dado el tamaño de la muestra no ha permitido explorar la asociación con suficiente poder estadístico, no se puede descartar totalmente que exista tal asociación. Otras limitaciones estuvieron relacionadas con el diseño del estudio (no se pudieron establecer asociaciones causales), con una posible confusión residual (influencia de otras co-variables en las asociaciones) y una única medición de biomarcadores (no se puede evaluar si la asociación varía en el tiempo).

En cuanto a las fortalezas, dado que se utilizó un cuestionario de historia de dieta, se pudo minimizar el error de la medida de la dieta en la recogida de información de la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes. Los errores de medición también fueron poco probables en las determinaciones de los biomarcadores, ya que todos los valores obtenidos estuvieron comprendidos en los rangos esperados (por ejemplo, correlación entre el IMC y la adiponectina  $\rho=-0.63$ ). Dado que existe una gran variabilidad en los niveles de CANE-P, que ya ha sido resaltada con anterioridad (Pellegrini *et al.*, 2018), se examinó cómo los factores de estilos de vida y factores externos podrían influir en las asociaciones entre los niveles de CANE-P y los biomarcadores. Éste, es el primer estudio que demuestra que existen varios perfiles de sujetos con diferentes relaciones entre los biomarcadores y la CANE-P. Además, se usaron diferentes ensayos de CANE-P, lo que también confiere robustez a nuestro estudio. Asimismo, ya que la contribución que ofrece el café a la CAT-D puede confundir las estimaciones totales de ésta (Manach *et al.*, 2005; Delgado-Andrade y Morales, 2005), se consideraron, tanto los valores de CAT-D teniendo en cuenta la contribución del café, como los valores de CAT-D sin la contribución del café. Finalmente, para asegurar un amplio rango de ingesta de antioxidantes, se seleccionó una población de estudio con niveles diferentes de adherencia a una dieta rica en antioxidantes.

## 6.4. Estudio transversal II y III

### 6.4.1. Estudios de precisión para los métodos analíticos de carotenoides y minerales

La precisión obtenida en el estudio de carotenoides individuales en plasma, realizado en siete alicuotas de plasma de un individuo, fue de 6,98% para el licopeno para un nivel de concentración de 0,82  $\mu\text{mol/L}$ , de 4,92% para luteína para un nivel de concentración de 0,20  $\mu\text{mol/L}$ , de 11,6% para el  $\alpha$ -caroteno para un nivel de concentración 0,08  $\mu\text{mol/L}$ , de 5,20% para  $\beta$ -caroteno para un nivel de concentración de 0,28  $\mu\text{mol/L}$  y 6,22% para  $\beta$ -criptoxantina para un nivel de concentración 0,10  $\mu\text{mol/L}$ .

La exactitud obtenida para el estudio de minerales se realizó mediante un ensayo de recuperación de muestras con estándares de multi-elementos. Las recuperaciones calculadas para cada elemento estuvieron comprendidas entre 95% y 105% en todos los casos. La precisión se evaluó mediante la comparación con un material de referencia certificado Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Serum (Billingstad, Norway) y con el valor medio obtenido del análisis de cada muestra por duplicado, obteniéndose un CV medio para el Mn de 9,20% para un rango de concentración de 0,0003-0,03 mg/L, para el Fe de 7,14% para un rango de concentración 0,23-3,07 mg/L, para el Cu de 4,60% para un rango de concentración 0,34-1,53 mg/L, para el Zn de 6,18% para un rango de concentración 0,20-1,59 mg/L y para el Se de 4,35% para un rango de concentración 0,04-0,14 mg/L.

Estos CVs obtenidos para ambos métodos permiten una utilización fiable de los datos.

### 6.4.2. Estudio de minerales en dieta y plasma

Los minerales analizados están relacionados con el estrés oxidativo en el organismo; Mn, Cu, Zn y Se están implicados en la disminución de éste, mientras que el Fe es un elemento pro-oxidante.

En la muestra del estudio transversal III, el consumo medio diario de Fe, utilizando los valores de CFCA, en hombres fue de 12,8 $\pm$ 6,5 mg y sólo un 3,7% de la población no alcanzó las IDR (8 mg/día). Para las mujeres el valor medio fue ligeramente superior, 13,3 $\pm$ 6,7 mg, pero sus mayores necesidades (18 mg/día en edad fértil y 8 mg/día en edad no fértil) hicieron que el 63% de éstas no llegase a las recomendaciones. Y si tenemos en cuenta el 75% del valor

recomendado para satisfacer sus necesidades, las deficiencias sólo se manifestaron en el 33% de las mujeres. El valor máximo fue de 34 mg/día, consumido por un hombre, pero en ningún caso se alcanzó la ingesta máxima tolerable (IMT del Fe=45 mg), por lo que, en principio, no se verá afectada la absorción de otros minerales como el Zn. Los valores medios obtenidos a partir del R-24H fueron inferiores,  $6,88 \pm 3,25$  mg y  $6,81 \pm 4,53$  mg para hombres y mujeres respectivamente y, el porcentaje de población que no cubrió las IDR fue superior, alcanzando en las mujeres un 75%. No se encontró relación entre la estimación del Fe utilizando el CFCA y R24h. Por otro lado, en el plasma de los 52 individuos, el valor medio de Fe fue de  $2,32 \pm 0,84$  mg/L, siendo superior en los hombres respecto a las mujeres, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas (**tabla 44**). Estos valores se encontraron dentro del rango de valores normales, en el extremo superior (0,4-1,6 mg/L). Al no existir déficit de este elemento, es el CFCA, y no el R-24H (sólo se aplicó en una ocasión), el instrumento que mejor valoró la ingesta dietética de este mineral.

Respecto al consumo medio de Mn, utilizando el CFCA, en hombres fue de  $2,25 \pm 1,38$  mg y para mujeres de  $2,01 \pm 1,27$  mg. Para este elemento el porcentaje de déficit nutricional fue del 37% para hombres (IDR=2,3 mg) y de 46% (IDR=1,8 mg) para mujeres. No se alcanzó el valor máximo tolerable (IMT del Mn=11 mg día), ya que el valor máximo obtenido fue de 6,73 mg. Al igual que para el Fe, los valores obtenidos de la ingesta utilizando el R-24H fueron inferiores:  $0,96 \pm 1,42$  mg para hombres y de  $1,51 \pm 1,60$  mg para mujeres. En el plasma el valor medio de Mn fue de  $1,85 \pm 2,54$  µg/L, siendo superior en los hombres respecto a las mujeres. Estos valores son superiores a los considerados normales (0,36-0,96 µg/L) (Sánchez *et al.*, 2010) aunque sólo el 37% de los sujetos estaban por encima de ellos.

En relación a los valores medios de Cu dietético, utilizando el CFCA, estos fueron de  $1,23 \pm 0,68$  mg y  $1,30 \pm 0,72$  mg para hombres y mujeres, respectivamente, encontrándose deficiencias para el 7,4% de los hombres y 12,5% para mujeres (IDR=0,9 mg para ambos). Los valores obtenidos con el R-24H fueron inferiores:  $0,70 \pm 0,45$  mg en hombres y  $0,72 \pm 0,59$  mg en mujeres. El valor máximo obtenido fue de 3,54 mg, no alcanzándose el valor de la IMT que es de 10 mg/día, por lo que no influirá en la absorción de otros minerales como el Zn y el Fe. Los valores medios de Cu en plasma fueron de  $1,05 \pm 0,27$  mg/L y fueron mayores en las mujeres que en los hombres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sólo 2 sujetos (3,84% de la población) presentaron hipocupremia ( $<0,75$  mg/L). El Cu plasmático mostró un adecuado estatus nutricional, al igual que los valores derivados del CFCA. El sexo influye en el contenido de Cu, lo que ya ha sido observado por otros autores (Sánchez *et al.*, 2010) y puede

ser debido a la mayor absorción de este elemento observada en mujeres adultas (20-50 años) (Johnson *et al.*, 1992).

La ingesta de Zn siguió un comportamiento similar a los tres elementos anteriores, los valores obtenidos con el CFCA fueron superiores a los de R-24H,  $5,33 \pm 2,78$  mg vs  $2,98 \pm 1,45$  mg para hombres y  $4,91 \pm 2,19$  mg vs  $3,01 \pm 2,28$  mg, para mujeres. Las deficiencias con respecto a las IDR para hombres (11mg/día) y mujeres (8 mg/día), estuvieron comprendidas entre el 85-100%. El valor medio del Zn en el plasma fue de  $1,49 \pm 0,33$  mg/L, ligeramente superior en los hombres y dentro del intervalo de valores normales aceptados ( $1,25 \pm 0,28$  mg/L) (Folin *et al.*, 1994). Aunque el Zn plasmático mostró un adecuado estatus nutricional, no se obtuvo lo mismo con la valoración dietética, por lo que, probablemente, se deberían revisar los valores de Zn aportados por los alimentos y tener en cuenta el contenido de ácido fítico que influye en su absorción.

Los valores medios de Se dietético, utilizando el CFCA, fueron de  $61,5 \pm 23,7$  µg para hombres y  $54,6 \pm 24,7$  µg para mujeres. Las deficiencias dietéticas de este elemento fueron de 3,7% para hombres y 25% para mujeres (IDR=55 µg para ambos). Los valores obtenidos con el R-24H fueron inferiores  $47,5 \pm 28,9$  µg y  $36,6 \pm 30,99$  µg para hombres y mujeres, respectivamente. El valor máximo obtenido fue de 146 µg, no alcanzándose la IMT que es de 400 µg/día. Los valores medios de Se en plasma fueron de  $0,11 \pm 0,02$  mg/L, iguales en hombres y mujeres y, dentro del rango encontrado en la bibliografía (Sánchez *et al.*, 2010). El 21% de los sujetos (11 de 52) presentaron valores por encima de 0,13 mg/L, que es el valor mínimo requerido para tener una actividad óptima de la glutatión peroxidasa (Thomson 2004 *et al.*, 2010) y el 96% (50/52) por encima de 0,08 mg/L, que es el valor mínimo considerado óptimo para una actividad adecuada de la yodotirosina desyodinasasa (Gibson *et al.*, 2005). Como sucede para elementos anteriores, el CFCA refleja más fielmente la ingesta que el R-24H.

Por otro lado, en la muestra del estudio transversal II (EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa), los valores en plasma de minerales fueron notablemente diferentes a los encontrados en la muestra del estudio III para el Fe y el Zn, con medianas entre 2,4 y 2 veces superiores, respectivamente para el estudio trasversal. Los demás valores fueron similares, ligeramente superiores para el estudio transversal en el Cu y Se y ligeramente inferiores para el Mn (**figura 37**). El 16% de la población de Granada presentó hipocupremia ( $<0,75$  mg/L) y esto sucedió en el 39% de la población de Guipúzcoa, probablemente el consumo de cereales integrales, frutos secos y legumbres fuese inferior (Mataix y Llopis, 2009). En cuanto al Se, sólo

1 de 210 sujetos presentó valores superiores a los considerados adecuados para tener el nivel óptimo de glutatión peroxidasa (Thomson 2004 *et al.*, 2010).

Al igual que en el estudio transversal III, el contenido de Cu fue significativamente superior en mujeres que en hombres. Para el Fe se obtuvo un valor superior y estadísticamente significativo, lo que no sucedió en el estudio trasversal III, probablemente por el número menor de sujetos analizados. Lo mismo le ocurrió al Se. Esta diferencia entre sexos también fue encontrada por otros autores (Van Cauwenbergh *et al.*, 2007; Letsiou *et al.*, 2009).

Por centros el contenido de Mn, Cu y Se fue significativamente diferente. El mayor nivel de Cu en Granada podría deberse a la mayor proporción de mujeres en este grupo de población y, en cuanto a los mayores niveles de Se, también en Granada, pueden deberse a diferencias en el contenido de Se en el suelo, ya que este es el que determina las diferentes formas químicas en las que puede encontrarse este elemento. Sánchez *et al.*, (2010) encontraron mayores valores de Se en plasma en las provincias de Andalucía oriental (Granada, Almería y Jaén) con respecto a la Occidental (Córdoba, Sevilla y Cádiz).

En el análisis de regresión multivariante de variables predictoras asociadas a los niveles plasmáticos de minerales en plasma (**tabla 54**), se observó que, con respecto al Cu, se obtuvo significancia estadística para la edad y el hábito tabáquico, hecho que también ha sido observado por otros autores (Sauberlich *et al.*, 1999; Northrop y Thurham, 2007). Para el Se fue casi significativa con respecto a la actividad física ( $p=0,051$ ), lo que también se ha encontrado en bibliografía (González *et al.*, 2010).

### 6.4.3. Estudio de carotenoides en dieta y plasma

En la muestra del estudio transversal III, la ingesta de carotenos individuales estimada a partir del CFCA, fue mayor en las mujeres que en los hombres, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por su parte, en el R-24H, los resultados fueron similares, excepto para el licopeno, cuya ingesta fue mayor en los hombres. Los valores fueron más elevados en el CFCA que en el R-24H, excepto para el licopeno. Como en el caso de los minerales, el R-24H de un único día, no reflejó el consumo real de carotenoides, excepto en el caso del licopeno, ya que el proceso de reclutamiento de la muestra de estudio se realizó en la época estacional entre primavera y verano. Respecto a los niveles en plasma, la mediana de los valores osciló entre 0,10  $\mu\text{mol/L}$  para el  $\alpha$ -caroteno y 1,64  $\mu\text{mol/L}$  para el licopeno. Estos

valores se encuentran dentro de los valores normales recogidos en bibliografía (Al-Delaimy *et al.*, 2004). En el caso del licopeno, los valores fueron ligeramente más elevados.

En referencia al análisis de correlación dieta (CFCA) y plasma, ésta resultó positiva en todos los carotenoides para los que se disponían valores de ambas estimaciones (luteína,  $\beta$ -caroteno y licopeno). De estos, sólo alcanzó la significancia estadística la correlación dieta-plasma de la luteína. En relación al R-24H, no se obtuvo ninguna correlación estadísticamente significativa. Asimismo, la utilización de distintas herramientas de recogida de información nutricional realizada por Bingham *et al.* (1997), mostró diferencias notables según el método utilizado en cuanto a las correlaciones dieta-plasma. Burrows *et al.* (2017), en una revisión sistemática de carotenoides, destacó los estudios que compararon carotenoides individuales de la dieta con el correspondiente carotenoide del plasma, indicando la existencia de correlaciones muy variables, pero generalmente más elevadas que las nuestras, lo que puede ser debido a que las poblaciones de estudio de estos trabajos estuvieron formadas por un mayor número de sujetos que la nuestra.

En cuanto a la población del estudio transversal II, los valores de carotenoides individuales obtenidos fueron:  $\beta$ -criptoxantina 0,30  $\mu\text{mol/L}$ , luteína 0,24  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\alpha$ -caroteno 0,10  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\beta$ -caroteno 0,21  $\mu\text{mol/L}$  y licopeno 1,23  $\mu\text{mol/L}$ . Estos valores fueron más bajos que los obtenidos en el estudio transversal III, especialmente en luteína,  $\beta$ -caroteno y licopeno, aunque dentro de los rangos descritos en bibliografía (Al-Delaimy *et al.*, 2004). En los valores de carotenoides individuales en plasma no existieron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. Sin embargo, Al-Delaimy *et al.* (2004), encontró, generalmente, niveles significativamente mayores en mujeres que en hombres en  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, de forma similar a los resultados obtenidos en nuestro análisis. Este mismo autor encuentra también valores más elevados para la luteína y licopeno en hombres que en mujeres, al igual que en nuestro análisis. En relación al centro de reclutamiento, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de carotenoides ( $\beta$ -criptoxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno y licopeno), siendo más elevados en Guipúzcoa que en Granada. Sin embargo, Al-Delaimy *et al.* (2004) indicó que, generalmente, los niveles de carotenoides fueron más elevados en la población de Granada respecto a la del norte de España. Estos mismos resultados se observaron al comparar la población del estudio III (sujetos residentes de Granada) con la población perteneciente a Guipúzcoa del estudio transversal II, pero es de destacar que ambas poblaciones pertenecen a épocas diferentes, por

lo que, no sólo la dieta, sino que también los hábitos de vida podrían tener influencia sobre los niveles de carotenoides en el plasma.

Se considera que la concentración de carotenoides en sangre refleja la ingesta dietética de estos a corto plazo y es aceptada como un buen biomarcador de la ingesta de fruta y vegetales (Bohn *et al.*, 2015 y Bohn *et al.*, 2017). La DM es, probablemente, la que mayor cantidad de carotenoides aporta debido a su riqueza en frutas y verduras (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019). Por ello, sería comprensible que las personas que siguen este tipo de dieta tuviesen mayores concentraciones de carotenoides en plasma. En este sentido, un informe del estudio EPIC diferenció individuos de diferentes regiones de Europa en función del perfil de carotenoides en plasma. En general, en las regiones del sur de Europa fueron en las que se encontraron mayores niveles plasmáticos de carotenoides. La población de la zona mediterránea presentó mayores niveles que la población anglosajona, especialmente de licopeno, lo cual puede deberse al mayor consumo de tomates en la DM (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019). En resumen, los países de la vertiente mediterránea consumen mayores cantidades de frutas y vegetales que los países del norte y, en este sentido, carotenoides como la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina pueden ser marcadores de adherencia a la DM (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019).

Además, los niveles de carotenoides en plasma están relacionados con factores intrínsecos del individuo, siendo estos muy difíciles de medir debido a la gran cantidad de factores que tienen lugar en el organismo. Según se ha observado en estudios anteriores, además de los hábitos alimentarios, las principales causas de esta variabilidad son, el nivel de salud del individuo (incluyendo infecciones virales, niveles de micronutrientes, perfil lipídico sanguíneo, condiciones respiratorias, trastornos de la tiroides, así como, longitud y permeabilidad del intestino y procesos de absorción), sexo, edad, peso, etnia y otros hábitos de vida como el consumo de tabaco y alcohol, la dieta (patrón de la DM, ingesta de fibra y aceite de oliva) y nivel de actividad física (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019).

También la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los carotenoides puede estar afectada por multitud de causas. Biehler *et al.* (2011) describió que un pH gástrico bajo degradaría algunos carotenoides, reduciendo su accesibilidad y absorción. Además, altas concentraciones de pepsinas, sales biliares, enzimas pancreáticas y variaciones polimórficas de los genes que intervienen en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los carotenoides, pueden explicar los diferentes resultados que se han descrito en algunos estudios (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019).

Por otro lado, aunque existen pocas referencias respecto a esta área, la microbiota puede tener una influencia sobre la asimilación de los carotenoides. Un estudio en pacientes obesos con aterosclerosis y grandes cantidades de la bacteria *Collinsella*, presentaron bajos niveles de  $\beta$ -caroteno, por lo que parece que los carotenoides no se absorben demasiado bien en el intestino grueso (Karlsson *et al.*, 2012).

Finalmente, algunos estudios han mostrado que existe competencia entre los diferentes carotenoides a la hora de ser absorbidos, existiendo evidencias sobre el descenso en los niveles de luteína cuando es consumida junto al licopeno o el  $\beta$ -caroteno y descenso de los niveles de  $\alpha$ -caroteno y licopeno, tras la ingesta de  $\beta$ -caroteno (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019).

En el análisis de regresión multivariante realizado para los carotenoides (**tabla 55**), el centro, además de ser el factor más importante en relación a los niveles de plasma en estos, presentó los porcentajes de incidencia más altos, entre el 3-9% en los valores imputados y, entre el 9-17% en los valores sin imputar. Como es sabido, la dieta juega un papel principal en la variabilidad interindividual (Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019) y esto se ha podido poner de manifiesto estableciendo estas diferencias entre sujetos que pertenecen a localizaciones distintas, una del sur de España (Granada) y otra del norte de España (Guipúzcoa). Además del centro, el sexo, el índice de adherencia a la DM y la estación del año, influyeron en gran medida en las concentraciones plasmáticas de licopeno. En relación al sexo, los hombres de nuestro estudio tuvieron mayores niveles de algunos carotenoides en plasma (luteína y licopeno) que las mujeres, lo cual coincide con lo que se reportó en un estudio anterior (Al-Delaimy *et al.*, 2004). La diferencia entre sexos puede deberse a variaciones, tanto cuantitativas como cualitativas (relativas a la ingesta de energía) en la ingesta dietética, a la absorción y al metabolismo. Se ha comprobado que los cambios hormonales que experimenta la mujer durante el ciclo menstrual pueden afectar a los niveles de carotenoides en suero (Forman *et al.*, 1996). Mientras que, el motivo por el que la estación del año es un factor importante en esta variabilidad se debe a que los alimentos ricos en carotenoides son estacionales y, aspectos como la luz y el calor pueden afectar al contenido en estos compuestos de frutas y vegetales. Este hecho ya ha sido destacado por algunos autores, pero no por otros (Al-Delaimy *et al.*, 2004). Por tanto, la estación del año en la que se realiza la extracción de la muestra de sangre de los participantes de un estudio debe ser tomada en cuenta en los estudios que estimen carotenoides entre poblaciones diferentes, principalmente si uno de los carotenoides analizado es el licopeno. En nuestro estudio, la estación del año fue

una variable predictora de la variabilidad de los niveles de licopeno, siendo los niveles de este carotenoide más elevados en verano que en otras estaciones del año.

Dado el elevado número de datos faltantes en algunos carotenoides, como el licopeno, el análisis de regresión multivariante se realizó también asignando el valor del límite de detección para dicho carotenoide en aquellas observaciones que habían presentado valor para otros carotenoides, pero no para el licopeno. Este proceso se llevó a cabo porque es posible que las muestras no se trataran adecuadamente en el laboratorio y, que el licopeno, al ser carotenoide más oxidable, se degradara en una serie de sujetos y, por eso, no presentaran dato para éste. Tras la repetición del análisis de regresión introduciendo estos valores del límite de detección para los sujetos en cuestión, se observó que el centro permanecía como la variable predictora con mayor impacto sobre los niveles de carotenoides en el plasma (coeficiente de determinación parcial  $R^2$  estadísticamente significativo) para todos los carotenoides, excepto para el licopeno ( $R^2=5,01$ ;  $p=0,001$  para  $\beta$ -criptoxantina,  $R^2=7,31$ ;  $p<0,001$  para luteína,  $R^2=2,79$ ;  $p=0,011$  para  $\beta$ -caroteno). Esto se explica porque, al haber introducido numerosas observaciones con el valor el límite de detección, ya no existían diferencias entre los sujetos según el centro por poseer el mismo valor. Por otro lado, la variable predictora de la estación del año, sí permaneció en el licopeno ( $R^2=8,31$ ;  $p<0,001$ ), pero también presentaron un coeficiente  $R^2$  estadísticamente significativo la luteína ( $R^2=3,64$ ;  $p=0,047$ ) y el  $\beta$ -caroteno ( $R^2=4,58$ ;  $p=0,015$ ), lo cual pudo ocurrir debido a que, al existir más observaciones con el límite de detección como dato se llegó a alcanzar la significancia estadística para estos carotenoides en dicha variable predictora. Finalmente, lo mismo ocurrió con la edad para el  $\beta$ -caroteno ( $R^2=2,29$ ;  $p=0,022$ ) y el licopeno ( $R^2=5,24$ ;  $p=0,001$ ).

Finalmente, con la información generada en esta Tesis Doctoral, se ha propuesto un modelo de clasificación en niveles de CAT-D y CANE-P basado en biomarcadores nutricionales, nutrientes antioxidantes y variables de los estilos de vida. Esta firma o modelo predictivo, validado internamente mediante un procedimiento de validación cruzada, constituye una primera aproximación a la obtención de un algoritmo de predicción de la CAT-D y del estatus antioxidante individual. Se obtuvo una mejor capacidad predictiva entre CANE-P y biomarcadores nutricionales. Las variables seleccionadas en el mejor modelo de predicción, FRAP plasma, han sido, principalmente, el ácido úrico, los minerales Se y Zn y, el retinol. Si bien los otros biomarcadores nutricionales (vitamina C y  $\alpha$ -tocoferol) también fueron seleccionados por el modelo, estos no mejoraron la capacidad discriminativa (valor del AUC) del modelo predictivo.

#### 6.4.4. Limitaciones y fortalezas del estudio

Entre las principales limitaciones de este estudio cabe destacar que el tamaño de la población de estudio pudo ser limitado para establecer variables predictivas de los niveles plasmáticos de minerales y carotenoides en los análisis de regresión múltiple. No obstante, a diferencia de otros estudios previos (Al-Delaimy et al., 2004), se ha evaluado un número importante de potenciales variables predictoras de la variabilidad de los niveles de carotenoides, considerando, incluso, factores dietéticos como la adherencia al patrón de la DM, la ingesta de fibra y de aceite de oliva. Además, se han explorado variables asociadas a la variabilidad individual de los niveles plasmáticos de minerales. En cuanto a las determinaciones de los niveles de carotenoides, se obtuvo un número considerable de medidas por debajo del límite de detección para algún carotenoide, que se han considerado como medidas de baja fiabilidad. Para minimizar esta limitación y conservar todos los valores en el análisis de los datos, no incurriendo así en un sesgo, se ha recurrido a la imputación de datos faltantes aplicando técnicas de imputación múltiple. Otra limitación a destacar es que, en el estudio transversal II (estudio EPIC) no se disponía de información sobre la ingesta dietética de los minerales y carotenoides que se determinaron en las muestras de plasma (excepto Fe y  $\beta$ -caroteno), por lo que no se pudieron evaluar las correlaciones dieta-plasma en este estudio.

En cuanto a las fortalezas, además de los aspectos mencionados anteriormente (consideración de un gran número de variables predictoras y la imputación de datos faltantes), se contó con información de dieta recogida a través de un R-24H y un CFCA en el estudio transversal III, recabando así, información sobre la ingesta dietética de minerales y carotenoides reciente y habitual, respectivamente. La principal fortaleza de nuestro estudio es la aplicación de un enfoque metodológico innovador para la obtención de un modelo de clasificación binario en niveles altos y medio/bajos de CAT-D y CANE-P. Este método, basado en técnicas estadísticas de selección de variables y validación cruzada (*cross-fold*), aplicado generalmente en un contexto de alta dimensión ( $p > n$ , es decir, número de co-variables considerable con respecto al número de observaciones), ha permitido obtener, por primera vez, una selección de las variables de nutrientes y biomarcadores nutricionales para un modelo o firma de clasificación en alta y medio/baja CAT-D o CANE-P. No obstante, no se han podido considerar todos los componentes de la dieta con potencial antioxidante debido a la falta de información en el estudio transversal II (estudio EPIC). Además, el número de validaciones cruzadas ( $N=5$ ) puede haber sido insuficiente para obtener estimadores fiables en nuestra

población de estudio, por lo que se considera que, el modelo que se ha obtenido, constituye una primera aproximación al desarrollo de un modelo predictivo de niveles de CAT-D y CANE-P. La validación interna del modelo se ha llevado a cabo mediante el procedimiento de la validación cruzada. Sin embargo, dado que no ha sido posible la validación externa del modelo en una población de estudio independiente (no se ha podido determinar CANE-P en las muestras biológicas de la población de estudio III), no se puede concluir acerca de la generabilidad o capacidad del modelo para inferir los resultados a otras poblaciones.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta memoria de Tesis Doctoral permiten inferir las siguientes conclusiones:

### *Respecto al formulario de recopilación de datos de CAT en alimentos*

- 1) La búsqueda de valores de CAT en alimentos españoles, considerando los ensayos TEAC-ABTS, DPPH, FRAP, TRAP y ORAC, y Tp, permitió identificar 1197 valores de CAT. El grupo de las frutas fue el que aportó mayor número de registros.
- 2) El análisis de la información de CAT y Tp en las frutas muestra una gran heterogeneidad en los valores. Las diferentes metodológicas analíticas aplicadas podrían ser, en parte, responsables de esta variabilidad. El establecimiento de un protocolo universal permitiría mejorar la evaluación.
- 3) Los valores de CAT-D de las frutas comercializadas en España para el ensayo FRAP recogidos en el formulario, mostró correlación con la CANE-P para el mismo ensayo.

### *Respecto a la correlación entre CAT-D y CANE-P*

- 4) Existe una buena correlación entre la CAT-D derivada del CFCA y la del R-24H. La correlación entre CAT-D y CANE-P es ligeramente más fuerte al considerar la CAT-D derivada del R-24H.
- 5) Las frutas y las verduras son los alimentos que más contribuyen a la CAT-D; como consecuencia, las correlaciones CAT-D y CANE-P son más elevadas en estos grupos de alimentos. A pesar de la contribución del café a la CAT-D, no se han observado diferencias en la relación CAT-D y CANE-P al restar la CAT del café, lo que confirma la baja biodisponibilidad de los componentes antioxidantes del café.
- 6) Existe una correlación moderadamente-débil, pero estadísticamente significativa, entre la CAT-D y la CANE-P en el ensayo FRAP, con o sin ácido úrico. Esta correlación se confirma en las dos poblaciones estudiadas. El ensayo FRAP es el más adecuado para estimar la CAT-D y la CANE-P.

*Respecto a la relación entre la CAT-D y CANE-P con los biomarcadores de nutrientes antioxidantes e inflamación*

7) La CANE-P en términos de FRAP se asocia positiva y significativamente con la mayoría de los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, pero no se asocia con los marcadores de inflamación. Por lo tanto, la medida de FRAP en plasma refleja el potencial antioxidante del organismo pero no el estado anti-inflamatorio en individuos sanos.

8) Dada la correlación intra-CANE-P de los diferentes ensayos, se han encontrado también asociaciones significativas entre la CANE-P de otros ensayos con algunos biomarcadores nutricionales. Las asociaciones se mantienen con independencia de factores como la edad, el sexo, la actividad física, el IMC y el hábito tabáquico.

9) Si bien se ha observado una asociación entre la CAT-D con la ingesta dietética de nutrientes antioxidantes, no se constata tal asociación con biomarcadores de nutrientes antioxidantes. En cambio, existe una relación “CAT-D – antioxidantes” cuando estos se consideran de manera global a través de la CANE-P medida como FRAP.

10) El análisis de clúster ha permitido identificar cinco grupos de sujetos con patrones variables de asociación entre los biomarcadores con la CANE-P.

*Respecto a otros compuestos con potencial antioxidante (minerales y carotenoides) y la firma de CAT-D y CANE-P*

11) La fuerza de la correlación entre los minerales o los carotenoides de la dieta con sus correspondientes niveles en plasma es, generalmente, débil. El centro de reclutamiento y la estación del año, en el caso del licopeno, son las variables que explican, en mayor medida, la variabilidad individual de los niveles plasmáticos de carotenoides.

12) Mediante un enfoque metodológico de modelos de clasificación y validación cruzada, se han identificado cinco biomarcadores nutricionales antioxidantes con capacidad para discriminar entre altos y medio/bajos niveles de FRAP en plasma. Los estilos de vida no mejoran la capacidad predictiva de los modelos.

# BIBLIOGRAFÍA

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

Agudo A., Cabrera L., Amiano P., Ardanaz E., Barricarte A., Berenguer T., *et al.* Fruit and vegetable intakes dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: Findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007;85(6):1634-1642. doi:10.1093/ajcn/85.6.1634.

Ahmadinejad F., Geir-Møller S., Hashemzadeh-Chaleshtori M., Bidkhor G., y Jami M.S. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*, 2017;6(3):51. doi:10.3390/antiox6030051.

Alcaraz-Mármol F., Nuncio-Jáuregui N., García-Sánchez F., Martínez-Nicolás J.J., y Hernández F. Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulture*, 2017;219:152-160. doi:10.1016/j.scienta.2017.03.008.

Al-Delaimy W.K., van Kappel A.L., Ferrari P., Slimani N., Steghens J.P., Bingham S., *et al.* Plasma level of six carotenoids in nine European countries: Report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutrition*, 2004;7(6):713-722. doi:10.1079/PHN2004598.

Al-Delaimy W.K., Jansen E.H.J.M., Peeters P.H.M., van der Laan J.D., van Noord P.A.H., Boshuizen H.C., *et al.* Reliability of biomarkers or iron status, blood lipids, oxidative stress, vitamin D, C-reactive protein and fructosamine in two Dutch cohorts. *Biomarkers*, 2006;11(4):370-382. doi:10.1080/13547500600799748.

Al-Duais M., Müller L., Böhm V., y Jetschke G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *European Food Research and Technology*, 2009;228:813-21. doi:10.1007/s00217-008-0994-8.

Alonso A.M., Domínguez C., Guillén D.A., y Barroso C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002;50:3112-3115. doi:10.1021/jf0116101.

Amiano P., Molina-Montes E., Molinuevo A., Huerta J.M., Romaguera D., García E., *et al.* Association study of dietary non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) and colorectal cancer risk in the Spanish Multicase-Control Cancer (MCC-Spain) study. *European Journal of Nutrition*, 2019;58(6):2229-2242. doi:10.1007/s00394-018-1773-3.

Apak R., Ozyurek M., Guclu K., y Capanoglu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016;64(5):1046-1070. doi:10.1021/acs.jafc.5b04744.

Arnao M.B., Cano A., y Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2001;73:239-244.

Babaei M., Dashti N., Lamei N., Abdi K., Nazari F., Abbasian S., *et al.* Evaluation of plasma concentrations of homocysteine, IL-6, TNF-alpha, hs-CRP, and total antioxidant capacity in patients with end-stage renal failure. *Acta Medica Iranica*, 2014;52(12):893-898.

Barea-Álvarez M. Caracterización, capacidad antioxidante y perfil fenólico de frutas subtropicales producidas y comercializadas en la costa de Granada-Málaga. Universidad de Granada. Tesis Doctoral, 2015. ISBN:978-84-9125-819-3.

Barrera C., Burca C., Betoret E., García-Hernández J. Hernández M. y Betoret N. Improving antioxidant properties and probiotic effect of clementine juice inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) by trehalose addition and/or sublethal homogenisation. *International Journal of Food Science and Technology*, 2019;54:2109-2122. doi:10.1111/ijfs.14116.

Barrington R., Williamson G., Bennett R.N., Davis B.D., Brodbelt J.S., Kroon P.A. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal Caco-2/TC7 cell model. *Journal of Functional Foods*, 2009;1(1):74-87. doi:10.1016/j.jff.2008.09.011.

Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 2010;44:711-720. doi:10.3109/10715761003758114.

Battino M., Leone L., y Bompadre S. High-Performance Liquid Chromatography –EC assay of mitochondrial Coenzyme Q9, Coenzyme Q9H2, Coenzyme Q10, Coenzyme Q10H2, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods in Enzymology*, 2004. doi:10.1016/S0076-6879(04)78012-X.

BEDCA. Base de datos Española de composición de alimentos AECOSAN.

Beltrán B., Estévez R., Cuadrado C., Jiménez S., y Olmedilla-Alonso B. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A en adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria*, 2012;27(4):1334-1343. doi:10.3305/nh.2012.27.4.5886.

Benzie F.F., y Strain J.J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996;239:70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292.

Benzie I.F.F., y Strain J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 1999;299:15–27. doi:10.1016/S0076-6879(99)99005-5.

Benzie I.F.F., y Choi S-W. Antioxidants in food: Content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2014;71(Chapter 1):1-47. ISSN 1043-4526. doi: 10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8.

Benzie I.F.F., y Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (eds R. Apak, E. Capanoglu y F. Shahidi), 2017;Chapter 5:77-106. doi:10.1002/9781119135388.ch5.

Biehler E., Hoffmann L., Krause E., y Bohn T., Divalent minerals decrease micellarization and uptake of carotenoids and digestion products into Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 2011;141(10):1769-1776. doi:10.3945/jn.111.143388.

Bingham S.A., Gill C., Welch A., Cassidy A., Runswick S.A., Oakes S., *et al.* Validation of dietary assessment methods in the UK arm of EPIC using weighed records, and 24-hour urinary nitrogen and potassium and serum vitamin C and carotenoids as biomarkers. *International Journal of Epidemiology*, 1997;26(1):137-151.

Bjørklund G., y Chirumbolo S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition*, 2017;33:311-321. doi:10.1016/j.nut.2016.07.018.

Bobo-García G., Davidov-Pardo G., Arroqui C., Viseda P., Marín-Arroyo M.R., y Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015;95(1):204-209.

Boffetta P., Couto E., Wichmann J., Ferrari P., Trichopoulos D., Bueno-de-Mesquita H.B., van Duijnhoven F.J., *et al.* Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in EPIC. *Journal of the National Cancer Institute*, 2010;102(8):529-537. doi:10.1093/jnci/djq072.

Bohn T., McDougall G.J., Alegria A., Alminger M., Arrigoni E., Aura A.M., *et al.* Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites—a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015;59(7):1307-1323. doi:10.1002/mnfr.201400745.

Bohn T., Desmarchelier C., Dragsted L.O., Nielsen C.S., Stahl W., Rühl R., *et al.* Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017;61(6):1600685. doi:10.1002/mnfr.201600685.

Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science Technology*, 1997;30:6:609-615.

Borel P. Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012;56(2):228-240. doi:10.1002/mnfr.201100322.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., y Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 1995;28(1):25-30.

Brighenti F., Valtueña S., Pellegrini N., Ardigò D., Del Río D., Salvatore S., *et al.* Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *British Journal of Nutrition*, 2005;93:619-625. doi:10.1079/BJN20051400.

Buckland G., González C.A., Agudo A., Vilardell M., Berenguer A., Amiano P., *et al.* Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 2009;170:1518-1529. doi:10.1093/aje/kwp282.

Burrows T.L., Rollo M.E., Williams R., Wood L.G., Garg M.L., Jensen M., *et al.* A systematic review of technology-based dietary intake assessment validation studies that include carotenoid biomarkers. *Nutrients*, 2017;9(2). pii: E140. doi:10.3390/nu9020140.

Cano A., Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F., Acosta M., y Arnao M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*, 1998;9:196-202.

Cao G., Booth S.L., Sadowski J.A., y Prior R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998;68(5):1081-1087. doi: 10.1093/ajcn/68.5.1081.

Carbajal A., y Sánchez-Muñiz F.J. Pesos de medidas caseras y raciones habituales de consumo. Guía de prácticas en Nutrición y dietética pp: 1ª-130ª MT García-Arias, MC García-Fernández (Eds). Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales. Universidad de León. 2003. (ISBN: 84-9773-023-2).

Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Bøhn S.K., Dragland S., Sampson L., *et al.* The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 2010;9:3. doi:10.1186/1475-2891-9-3.

Carrión-García C.J., Guerra-Hernández E.J., García-Villanova B., y Molina-Montes E. Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels. *European Journal of Nutrition*, 2017;56(4):1561-1576. doi:10.1007/s00394-016-1201-5.

Cook R.D. Detection of influential observation in linear regression. *Technometrics*, 1977;19:15-18. doi:10.1080/00401706.1977.10489493.

Davey M.W., Van Montague M., Samartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.F.F., *et al.* Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and processing. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 2000;80(7):825-860.

De la Fuente-Arrillaga C., Vázquez Ruiz Z., Bes-Rastrollo M., Sampson L., y Martínez-González M.A. Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutrition*, 2010;13(9):1364-1372. doi:10.1017/S1368980009993065.

Delgado-Andrade C., y Morales F.J. Unravelling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005;53:1403-1407. doi:10.1021/jf048500p.

Del Río D., Calani L., Cordero C., Salvatore S., Pellegrini N., y Brighenti F. Bioavailability and catabolism of Green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, 2010;26(11-12):1110-1116. doi:10.1016/j.nut.2009.09.021.

Detopoulou P., Panagiotakos D.B., Chrysohoou C., Fragopoulou E., Nomikos T., Antonopoulou S., *et al.* Dietary antioxidant capacity and concentration of adiponectin in apparently healthy adults: The ATTICA study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010;64:161-168. doi:10.1038/ejcn.2009.130.

Dilis V., y Trichopoulou A. Antioxidant intakes and food sources in Greek adults. *The Journal of Nutrition*, 2010;140(7):1274-1279. doi:10.3945/jn.110.121848.

Dragsted L., Pedersen A., Hermetter A., Basu S., Hansen M., Haren G.R., *et al.* The 6 day study: Effects of fruits and vegetables or markers of oxidative stress and antioxidant defence in healthy smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004;79(6):1060-1072. doi:10.1093/ajcn/79.6.1060.

EPIC Group of Spain. Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain (I, II y III). *International Journal of Epidemiology*, 1997;26(1):91-117.

EPIC Group of Spain. El estudio prospectivo europeo sobre dieta, cáncer y salud (EPIC) en España. *Revista Española de Salud*, 2004;78:167-176.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 2004;24(10):851-874. doi:10.1016/j.nutres.2004.07.005.

Escrig-Fernández, R. Sastre-Belloch J., y Vento-Torres M. Estrés oxidativo en la hipoxia/reoxigenación de la transición fetal-neonatal. Reanimación del recién nacido prematuro con concentraciones bajas de oxígeno. Tesis Doctoral, 2012. Universidad de Valencia.

Fattman C.L., Schaefer L.M., y Oury T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003;35(3):236-256. doi:10.1016/S0891-5849(03)00275-2.

Fernández-Jalao I., Sánchez-Moreno C., y De Ancos B. Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple "Golden Delicious" from different geographical origin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019;51:20-31. doi:10.1016/j.ifset.2018.06.002.

Fernández-Pachón M.S., Villano D., Troncoso A.M., y García-Parrilla M.C. Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008;48(7):649-671. doi:10.1080/10408390701761845.

Ferrari C.K.B. Effects on xenobiotics on total antioxidant capacity. *Interdisciplinary Toxicology*, 2012;5(3):117-222. doi:10.2478/v10102-012-0019-0.

Ferreira-Barbosa K.B., Pinheiro-Volp A.C., Marques-Rocha J.L., Rocha-Ribeiro S.M., Navarro-Blasco I, Zulet M.A., *et al.* Low energy and carbohydrate intake associated with higher total antioxidant capacity in apparently healthy adults. *Nutrition*, 2014;30(11-12):1349-1354. doi:10.1016/j.nut.2014.03.031.

Floegel A., Kim D.O., Chung S.J., Song W.O., Fernández M.L., Bruno R.S., *et al.* Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2010;61:600-623. doi:10.3109/09637481003670816.

Folin M., Contiero E., y Vaselli G.M. Zinc content of normal human serum and its correlation with some hematic parameters. *Biometals*, 1994;7(1):75-79.

Forman M.R., Beecher G.R., Muesing R., Lanza E., Olson B., Campbell W.S., *et al.* The fluctuation of plasma carotenoids by phase of the menstrual cycle: A controlled diet study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1996;64(4):559-565. doi:10.1093/ajcn/64.4.559.

Fossati P., Prencipe L., y Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 1980;26:227-231.

Frankel E.N., y Meyer A.S. The problem of using one-dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000;80:1925-1941.

Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Gan R.Y., Zhang Y., Xia E.Q., *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 2011;129:345-350. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.079.

García-Alonso M., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., y Rivas-Gonzalo J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 2004;84:13-18. doi:10.1016/S0308-8146(03)00160-2.

García-Martínez E., Andújar-Pérez I., Yuste del Carmen A. Prohens-Tomás J., y Martínez-Navarrete N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of freeze-dried grapefruit phenolics as affected by gum arabic and bamboo fibre addition and microwave pretreatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018;98(8):3076-3083. doi:10.1002/jsfa.8807.

Gawron-Skarbek A., Guligowska A., Prymont-Przyimińska A., Nowak D., Kostka T. Plasma and salivary non-urate total antioxidant capacity does not depend on dietary vitamin C, E or  $\beta$ -Carotene intake in older subjects. *Molecules*, 2018;23:1-12. doi:10.3390/molecules23040983.

Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 2007;19(9):1807-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.009.

Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., y Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995;18(1):29-36. doi:10.1016/0891-5849(94)00102-p.

Ghiselli A., Serafini M., Natella F., y Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000;29(11):1106-1114. doi:10.1016/S0891-589(00)00394-4.

Gibson R. Principles of nutritional assessment. Oxford: Oxford University Press; 2005. 683-796 pp.

Gironés-Vilaplana A., Moreno D.A., y García-Viguera C. Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food and Function*, 2014;5:764-772. doi:10.1039/c3fo60700c.

González C.A., Navarro C., Martínez C., Quirós J.R., Dorronsoro, M., Barricarte A., *et al.* The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Revista Española de Salud Pública*, 2004;78:167-176.

González S., Huerta J.M., Fernández S., Patterson A.M., y Lasheras C. Life-quality indicators in elderly people are influenced by selenium status. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2007;19(1):10-15.

Gorinstein S., Martín-Belloso O., Lojek A., Cíz M., Soliva-Fortuny R., Park Y.S., *et al.* Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002;82:1166-1170. doi: 10.1002/jsfa.1178.

Gorinstein S., Martín-Belloso O., Park Y.S., Haruenkit R., Lojek A., Cíz M., *et al.* Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 2001;74:309-315.

Granato D., Shahidi F., Wroslstad R., Kilmartin P, Melton L.D., Hidalgo F.J., *et al.* Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 2018;264:471-475. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.12.

Gutiérrez-Grijalva E.P., Ambriz-Pere D.L. Leyva-López N., Castillo-López R.I., y Heiedia J.B. Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2016;66(2):87-100.

Haftenberger M., Schuit A.J., Tormo M.J., Boeing H., Wareham N., Bueno-de-Mesquita H.B., *et al.* Physical activity of subjects aged 50-64 years involved in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutrition*, 2002;5(6B):1163-1176. doi:10.1079/PHN2002397.

Halliwel B., y Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993;57(5):715S-725S. doi:10.1093/ajcn/57.5.715S.

Halliwel B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 2006;141(2):312-322. doi:10.1104/pp.106.077073.312.

Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., *et al.* A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 2002;132:461-471. doi:10.1093/jn/132.3.461.

Henríquez-Sánchez P., Sánchez-Villegas A., Ruano-Rodríguez C., Gea A., Lamuela-Raventós R.M., Estruch R., *et al.* Dietary total antioxidant capacity and mortality in the PREDIMED study. *European Journal of Nutrition*, 2016;55(1):227-236. doi:10.1007/s00394-015-0840-2.

Hercberg S., Czernichow S., y Galan P. Antioxidant vitamins and minerals in prevention of cancer: The SUVIMAX study. *British Journal of Nutrition*, 2006;96(1):S28-S30. doi:10.1079/BJN20061695.

Hernández-Ruiz A., García-Villanova B., Guerra-Hernández E., Amiano P., Sánchez M.J., Dorronsoro M., *et al.* Comparison of the dietary antioxidant profiles of 21 a priori defined Mediterranean Diet indexes. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2018;118(12):2254-2268.e8. doi:10.1016/j.jand.2018.01.006.

Hu F. Dietary assessment methods. En: *Obesity Epidemiology*. New York: Oxford University Press. 2008. pp:321-316.

Huang D., OU B., y Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c.

Hulthe J., y Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002;22(7):1162-1167. doi:10.1161/01.ATV.0000021150.63480.CD.

Hung H.C., Joshipara J., Jiang R., Hu F.B., Hunter D., Smith-Warner S.A., *et al.* Fruit and vegetables intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004;96(21):1577-1584. doi:10.1093/jnci/djh296.

Institute of Medicine of the National Academies, Food and Nutrition Board: dietary reference intakes: for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington DC. The National Academies Press, 2005;Chapter 5:107-264. [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=10490&page=R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10490&page=R1). Accessed Feb 2015.

Jiang L., Yang K.H., Tian J.H., Guan Q.L., Yao N., Cao N., *et al.* Efficacy of antioxidant vitamins and selenium supplement in prostate cancer prevention: A meta-analysis. *Nutrition Cancer*, 2010;62(6):719-727. doi:10.1080/01635581.2010.494335.

Jiménez-Escrig A. Multifunctional in vitro antioxidant evaluation of strawberry (*Fragaria virginiana* Dutch.) *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2007;58(8):629-636. doi:10.1080/09637480701395473.

Johnson P.E., Milne D.B., y Lykken G.I. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992;56(5):917-925. doi:10.1093/ajcn/56.5.917.

Karadag A., Ozcelik B., y Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2009;2(1):41-60. doi:10.1007/s12161-008-9067-7.

Karlsson F.H., Fak F., Nookaew I, Tremaroli V., Fagerberg B., Petranovi D., *et al.* Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*, 2012;3:1245. doi:10.1038/ncomms2266.

Kashino I., Serafini M., Ishihara J., Mizoue T., Sunami A., Maruyama K., *et al.* The validity and reproducibility of dietary non-enzymatic antioxidant capacity estimated by self-administered food frequency questionnaires. *Journal of Epidemiology*, 2018;28(10):428-436. doi:10.2188/jea.JE20170063.

Kavouras S.A., Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Chrysohoou C., Arnaoutis G., Skoumas Y., *et al.* Physical activity and adherence to Mediterranean Diet increase total antioxidant capacity: The ATTICA study. *Cardiology Research and Practice*, 2010;2011:248626. doi:10.4061/2011/248626.

Khachik F., De Moura F.F., Chew E.Y., Douglass L.W., Ferris F.L., Kim J., *et al.* The effect of lutein and zeaxanthin supplementation on metabolites of these carotenoids in the serum of persons aged 60 or older. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006;47(12):5234-5242. doi:10.1167/iovs.06-0504.

Khalil A., Gaudreau P., Cherki M., Wagner R., Tessier D.M., Fulop T., *et al.* Antioxidant-rich food intakes and their association with blood total antioxidant status and vitamin C and E levels in community-dwelling seniors from the Quebec longitudinal study NuAge. *Experimental Gerontology*, 2011;46(6):475-481. doi: 10.1016/j.exger.2011.02.002.

Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., y Lee C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002;50(13):3713-3717. doi: 10.1021/jf0200071c.

Kim Y., y Je Y. Flavonoid intake and mortality from cardiovascular disease and all causes: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2017;20:68-77. doi:10.1016/j.clnesp.2017.03.004.

Kleinbaum D.G., Kupper L.L., Muller K.E., y Nizam A. *Applied regression analysis and other multivariate methods*. Belmont, CA: Duxbury Press, 1988; 151.

Kobayashi S., Murakami K., Sasaki S., Uenishi K., Yamasaki M., Hayabuchi H., *et al.* Dietary total antioxidant capacity from different assays in relation to serum C-reactive protein among young Japanese women. *Nutrition Journal*, 2012;11:5-7. doi:10.1186/1475-2891-11-91.

Kojo S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2004;11(8):1041-1064. doi:10.2174/0929867043455567.

Kolomvotsou A.I., Rallidis L.S., Mountzouris K.C., Lekakis J., Koutelidakis A., Efstathiou S., *et al.* Adherence to Mediterranean diet and close dietetic supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. *European Journal of Nutrition*, 2013;52(1):37-48. doi:10.1007/s00394-011-0283-3.

Laporta O., Pérez-Fons L., Mallavia R., Caturla N., y Micol V. Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chemistry*, 2007;101:1425–37.

Lattieri-Barbato D., Tomei F., Sancini A., Morabito G., y Serafini M. Effect of plant foods and beverages on plasma non-enzymatic antioxidant capacity in human subjects: A meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 2013;109(9):1544-1556. doi:10.1017/S0007114513000263.

Leone V., Chang E.B., y Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: The perfect storm inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*, 2013;48(3):315-321. doi:10.1007/s00535-013-0777-2.

Letsiou S., Nomikos T., Panagiotakos D., Pergantis S., Fragopoulou E., Antonopoulou S., *et al.* Serum total selenium status in Greek adults and its relation to age. The ATTICA study cohort. *Biological Trace Element Research*, 2009;128(1):8-17. doi:10.1007/s12011-008-8252-2.

Leufkens A.M., van Duijnhoven F.J.B., Woudt S.H.S, Siersema P.D., Jenab M., Jansen E.H.J.M., *et al.* Biomarkers of oxidative stress and risk of developing colorectal cancer: A cohort-nested case-control study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *American Journal of Epidemiology*, 2012;175(7):653-663. doi:10.1093/aje/kwr418.

Libby P., Ridker P.M., y Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/nature10146.

Lima V.L.A.G., Mélo, E.A., Maciel M.I.S., Prazeres F.G., Musser R.S., y Lima D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 2005;90(4): 565-568. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.014.

Little R.J.A. y Rubin D.B. Statistical analysis with missing data. *Journal of Educational Statistics*, 1987;16(2):150-155.

Llorach R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., y Ferreres F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 2008;108:1028–38. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.032.

López-Cobo A., Verardo V., Díaz-de-Cerio E., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., y Gómez-Caravaca A.M. Use of HPLC-and GC-QTOF to determine hydrophilic and lipophilic phenols in mango fruit (*Mangifera indica* L.) and its by-products. *Food Research International*, 2017;100:423-434. doi:10.1016/j.foodres.2017.02.008.

Lotito S.B., y Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in human: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*, 2006;41(12):1727-1746. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.

Lykkesfeldt J. Ascorbate and dehydroascorbic acid as reliable biomarkers of oxidative stress: Analytical reproducibility and long-term stability of plasma samples subjected to acidic deproteinization. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2007;16(11):2513-2516. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0639.

Madley-Dowd P., Hughes R., Tilling K., y Heron J. The proportion of missing data should not be used to guide decisions on multiple imputation. *Journal of Clinical Epidemiology*, 2019;110:63-73. doi:10.1016/j.jclinepi.2019.02.016.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., y Jiménez L. Polyphenols. Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004;79(5):727-747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005;81(1):230S-242S. doi:10.1093/ajcn/81.1.230S.

Mancini F.R., Affret A., Dow C., Balkau B., Bonnet F., Boutron-Ruault M.C., *et al.* Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes in the large prospective E3N-EPIC cohort. *Diabetologia*, 2018;61(2):308-316. doi:10.1007/s00125-017-4489-7.

Marhuenda-Muñoz M., Hurtado-Barroso S., Tresserra-Rimbau A., y Lamuela-Raventós R.M. A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: Differences between Mediterranean and Northern diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2019;72:18-25. doi:10.1038/s41430-018-0305-9.

Marks G.C., Hughes M.C., y van der Pols J.C. Relative validity of food intake estimates using a food frequency questionnaire is associated with sex, age, and other personal characteristics. *The Journal of Nutrition*, 2006;136(2):459-465. doi:10.1093/jn/136.2.459.

Marreiro D.N., Cruz K.J., Morais J.B.S., Beserra J.B., Severo J.S., De Oliveira A.R.S. Zinc and oxidative stress: Current mechanisms. *Antioxidants*, 2017;6(2):24. doi:10.3390/antiox6020024.

Martínez-Álvarez J., e Izquierdo-Pulido M. La capacidad antioxidante de la dieta española, la "rueda de los alimentos" antioxidantes [The antioxidant capacity of the Spanish diet, the "food Wheel"]. Madrid: Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación, pp 1-24. [http://www.nutricion.org/recursos\\_y\\_utilidades/PDF/Instrucciones\\_Rueda\\_Antiox.pdf](http://www.nutricion.org/recursos_y_utilidades/PDF/Instrucciones_Rueda_Antiox.pdf).

Accessed 7 Jan 2015.

Martínez-Cayuela M. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante. *Tratado de Nutrición*, Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición (capítulo 18). Editor, Ángel Gil Hernández. Editorial Panamericana, 2010:455-480.

Martínez-González M.A., Hershey M.S., Zazpe I., y Trichopoulou A. Transferability of the Mediterranean diet to non-Mediterranean countries. What is and what is not the Mediterranean diet. *Nutrients*, 2017;9(11):1226. doi:10.3390/nu9111226.

Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., y Giovanninni C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005;16(10):577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.

Mataix J., Llopis J. In: Mataix J., editor. *Minerales. Nutrición y alimentación humana*. Madrid: Ergón;2009. p. 265-231.

Mayne S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers os exposure and oxidative stress status in Epidemiologic Research. *The Journal of Nutrition*, 2003;133(3):933S-940S. doi:10.1093/jn/133.3.933S.

McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 2000;108(8):652-659. doi:10.1016/S0002-9343(00)00412-5.

McLachlan G.J. Cluster analysis and related techniques in medical research. *Statistical Methods in Medical Research*, 1992;1:27-48.

Mena-Guillermno J.M. Estudio de la capacidad antioxidante de diferentes fracciones de salvado de trigo (variedad Gazul). Trabajo de investigación de Máster, 2010. Universidad de Granada.

Michels K.B., Welch A.A., Luben R., Bingham S.A., y Day N.E. Measurement of fruit and vegetable consumption with diet questionnaires and implications for analyses and interpretation. *American Journal of Epidemiology*, 2005;161(10):987-994. doi:10.1093/aje/kwi115.

Molendijk M., Molero P., Ortuño F., Van der Does W., y Martínez-González M.A. Diet quality and depression risk: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Journal of Affective Disorders*, 2018;226:346-354. doi:10.1016/j.jad.2017.09.022.

Morales F.J., Somoza V., y Fogliano V. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 2012;42(4):1097-1109. doi:10.1007/s00726-010-0774-1.

Morales-Soto A., García-Salas P., Rodríguez-Pérez C., Jiménez-Sánchez C., Cádiz-Gurrea M. de la L., Segura-Carretero A., y Fernández-Gutiérrez A. Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International*, 2014;58:35-46. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.050.

Morillas-Ruiz J., y Delgado-Alarcón J. Nutritional analysis of vegetable food with different origins: Evaluation of antioxidant capacity and phenolic total compounds. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 2012;32:8-20.

Montreau F.R. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaiss. Vigne Vin*, 1972;24:397-404. doi:10.20870/oeno-one.1972.6.4.2071.

Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010;49(4):503-515. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016.

Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014;66:3-12. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022.

Northrop C.A., y Thurham D.I. Trace elements: Selenium, copper, zinc, and iron. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2016;69(2):120-124. doi:10.1159/000450763.

Oboh G., y Ademosun A.O. Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. *Journal of Food Science and Technology*, 2012;49(6):729-736. doi:10.1007/s13197-010-0222-y.

Olthof M.R., Hollman P.C.H., y Katan M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 2001;131(1):66-71. doi:10.1093/jn/131.1.66.

Ortega-Anta R.M., Mena-Valverde M.C., y Carvajales P.A. Vitamina A. In: Gil Hernández Á, editors. *Tratado de Nutrición*, 2nd edn. Médica Panamericana, 2010. pp 756-787.

Ou B., Hampsch-Woodill M., y Prior R.I. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001;49(10):4619-4626. doi:10.1021/jf010586o.

Pantavos A., Ruiters R., Feskens E.F., de Keyser C.E., Hofman A., Stricker B.H. *et al.* Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *International Journal of Cancer*, 2015;136(9):2178-2186. doi:10.1002/ijc.29249.

Parohan M., Anjom-Shoae J., Nasiri M., Khodadost M., Khatibi S.R., y Sadeghi O. Dietary total antioxidant capacity and mortality from all causes, cardiovascular disease and cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Nutrition*, 2019;58:2175-2189. doi:10.1007/s00394-019-01922-9.

Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., *et al.* Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Journal of Nutrition*, 2003;133:2812-2819. doi:10.1093/jn/133.9.2812

Pellegrini N., Serafini M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M., Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Molecular Nutrition Food Research*, 2006;50:1030-1038. doi:10.1002/mnfr.200600067.

Pellegrini N., Salvatore S., Valtueña., Bedogni G., Porrini M., Pala V., *et al.* Development and validation of a food frequency questionnaire for the assessment of dietary total antioxidant capacity. *The Journal of Nutrition*, 2007;137(1):93-98. doi:10.1093/jn/137.1.93.

Pellegrini N., Vitaglione P., Granato D., y Fogliano V. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. (Review). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018. doi:10.1002/jsfa.9550.

Peng C., Wang X., Chen J., Jiao R., Wang L., Li Y.M., *et al.* Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, 2014;2014:831841. doi:10.1155/2014/831841.

Pereira C., López-Corrales M., Serradilla M.J., Villalobos M. del C., Ruiz-Moyano S., y Martín A. Influence of ripening stage on bioactive compounds and antioxidant activity in nine fig (*Ficus carica* L.) varieties grown in Extremadura, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017;64:203-212. doi:10.1016/j.jfca.2017.09.006.

Pérez C., Aranceta J., Salvador G., y Varela-Moreiras. Food frequency questionnaires. *Nutrición Hospitalaria*, 2015;31(3):49-56. doi:10.3305/nh.2015.31.sup3.8751.

Pérez-Jiménez J., y Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 2006;39(7):791-800. doi:10.1016/j.foodres.2006.02.003.

Pérez-Jiménez J., Arranz S., Taberner M., Díaz-Rubio M., Serrano J., Goñi I., *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 2008;41(3):274-285. doi:10.1016./j.foodres.2007.12.004.

Pitsavos C., Panagiotakos B.P., Tzima N., Chrysohoou C., Economou M., Zampelas A., *et al.* Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: The ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005;82(3):694-699.

Poljsak B., Šuput D., y Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2013;2013:956792. doi:10.1155/2013/956792.

Powis G., Mustacich D., Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000;29(3-4):312-322. doi:10.1016/S0891-5849(00)00313-0.

Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and foods samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003;51(11):3273-3279. doi:10.1021/jf0262256.

Prior R.L., y Gu L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 2005;66(18):2264-2280. doi:10.1016/j.phytochem.2005.03.025.

Prior R.L., Wu X.L., y Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005;53(10):4290-4302. doi:10.1021/jf0502698.

Prior R.L., Gu L., Wu X., Jacob R.A., Sotoudeh G, Kader A.A., *et al.* Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition*, 2007;26(2):170-181. doi:10.1080/07315724.2007.10719599.

Priyadarshani A.M.B. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017;57(8):1710-1717. doi:10.1080/10408398.2015.1023431.

Psaltopoulou T., Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Chrysochoou C., Detopoulou P., Skoumas J., *et al.* Dietary antioxidant capacity is inversely associated with diabetes biomarkers: The ATTICA study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2011;21(8):561-567. doi:10.1016/j.numecd.2009.11.005.

Puchau B., Zulet M.A., de Echávarri A.G., Hermsdorff H.H., y Martínez J.A. Dietary total antioxidant capacity: A novel indicator of diet quality in healthy young adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 2009;28(6):648-656.

Puchau B., Zulet M.A, de Echávarri A.G., Hermsdorff H.H., y Martínez J.A. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with metabolic syndrome features in healthy adults. *Nutrition*, 2010;26(5):534-541. doi:10.1016/j.nut.2009.06.017.

Pulido R., Bravo L., y Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric reducing/Antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000;48(8):3396-3402. doi:10.1021/jf9913458.

Pulido R., Hernández-García M., y Saura-Calixto F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003;57:1275-1282. doi:10.1039/sj.ejcn.1601685.

Qiao Y.L., Dawsey S.M., Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: Follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009;101(7):507-518. doi:10.1093/jnci/djp037.

Rao A.V., Ray M.R., y Rao L.G. Lycopene. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2006;51:99-164. doi:10.1016/S1043-4526(06)51002-2.

Rautiainen S., Serafini M., Morgenstern R., Prior R.L. y Wolk A. The validity and reproducibility of food-frequency questionnaire-based total antioxidant capacity estimates in Swedish women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008;87(5):1247-1253. doi:10.1093/ajcn/87.5.1247.

Rayman M.P., Blundell-Pound G., Pastor-Barriuso R., Guallar E., Steinbrenner H., y Stranges S. A randomized trial of selenium supplementation and risk of type-2 diabetes, as assessed by plasma adiponectin. *Plos One*, 2012;7(9):e45269. doi:10.1371/journal.pone.0045269.

Razquin C., Martínez J.A., Martínez-González M.A., Mitjavila M.T., Estruch R., y Martí A. A 3-y followup of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009;63(12):1387-1393. doi:10.1038/ejcn.2009.106.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., y Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999;26:1231–1237.

Record I.R., Dreosti I.E., y McInerney J.K. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with and antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition*, 2001 85(4):459-464. doi:10.1079/BJN2000292.

Redondo D., Arias E., Oria R., y Venturi M.E. Thinned stone fruits are a source of polyphenols and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017;97:902-910. doi:10.1002/jsfa.7813.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymology*, 1994;234:279-293.

Rinaldi de Alvarenga J.F., Tran C., Hurtado-Barroso S., Martínez-Huélamo M., Illan M., y Lamuela-Raventós R.M. Home cooking and ingredient synergism improve lycopene isomer production in sofrito. *Food Research International*, 2017;99(2):851-861. doi:10.1016/j.foodres.2017.01.009.

Rodríguez-Pérez C., Quirantes-Piné R., Fernández-Gutiérrez A., y Segura Carretero A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 2015;66:246-254. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.002.

Romeu M., Aranda N., Giralt M., Ribot B., Nogues M.R., Arija V. Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. *Nutrition Journal*, 2013;12:102. doi:10.1186/1475-2891-12-102.

Rubin D.B. Multiple imputation for nonresponse in surveys. 1987. ISSN 0271-6232. ISBN 0-471-08705-X. United States of America.

Ruiz López M.D., y Artacho Martín-Lagos R. Assessment program diets. Teaching innovation projects 2006 and 2013. University of Granada. <http://farmacia.ugr.es/mdruiz2013/index.php>. Accessed Nov 2014.

Ruiz López M.D., y Artacho Martín-Lagos R. Guía para estudios dietéticos. Álbum fotográfico de alimentos, 2010, 1ª Edición. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Ruiz-Torralba A., Guerra-Hernández E.J., and García-Villanova B. Antioxidant capacity, polyphenol content and contribution to dietary intake of 52 fruits sold in Spain. *CYTA - J Food*, 2018;16:1131–8. doi:10.1080/19476337.2018.1517828.

Salas-Salvadó J., Becerra-Tomás N., García-Gavilán J.F., Bulló M., y Barrubés L. Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease Prevention: What Do We Know? *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2018;61(1):62-67. doi:10.1016/j.pcad.2018.04.006.

Salvador G., Serra-Majem L., y Ribas-Barba. What and how much do we eat? 24-hour dietary recall method. *Nutrición Hospitalaria*, 2015;31(3):46-48. doi:10.3305/nh.2015.31.sup3.8750.

Samaniego C., Quesada-Granados J.J., Sánchez-Navarro M.R., De la Serrana H.L.G., y López-Martínez M.C. Antioxidant capacity of blood after extra virgin olive oil intake in human volunteers. En: *Olives and olive oil intake in human volunteers*. Londres: Academic Press, Elsevier. 2010. pp:915-924. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00098-X.

Sánchez C., López-Jurado M., Aranda P., y Llopis J. Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: Influence of age, obesity and lifestyle factors. *Science of the Total Environment*, 2010;408:1014-1020. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.041.

Sánchez-Moreno, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 2002;8(3):121-137. doi:10.1106/108201302026770.

Santos J.S., Deolindo C.T.P., Esmerino L.A., Genovese M.I., Fujita A., Marques M.B., *et al.* Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). *Food Research International*, 2016;89:476-487. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.041.

Sauberlinch H.E. *Laboratory tests for the assessment of nutritional status*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999. 313 pp.

Saura-Calixto F., y Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 2006;94(3):442-447. doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.033.

Schwingshackl L., Schwedhelm C., Galbete C., y Hoffmann G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 2017;9(10):E1063. doi:10.3390/nu9101063.

Serafini M., y Del Río D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Report*, 2004;9:145-152. doi:10.1179/135100004225004814.

Serafini M., Villano D., Spera G., y Pellegrini N. Redox molecules and cancer prevention: The importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutrition and Cancer*, 2006;56(2):232-240.

Serafini M., Jakszyn P., Luján-Barroso L., Agudo A, Bueno-de-Mesquita H.B., van Duijnhoven F.J.B., *et al.* Dietary total antioxidant capacity and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International Journal of Cancer*, 2012;131(4):544-554. doi:10.1002/ijc.27347.

Serpen A., Capuano E., Fogliano V., y Gökmen V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007;55:7676-7681. doi:10.1021/jf071291z.

Serrano M., Guillén F., Martínez-Romero D, Castillo S., y Valero D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Research*, 2005;53:2741-2745. doi:10.1021/jf0479160.

Shaheen N., Tukun A.B., Islam S., Irfan N.Md., Khan I.N., y Hasan T. Evaluation of functional potentiality of selected commonly consumed foods of Bangladesh. *Functional Foods in Health and Disease*, 2016;6(11):735-753.

Sies H. Total antioxidant capacity: Appraisal of a concept. *The Journal of Nutrition*, 2007;137(6):1493-1495. doi:10.1093/jn/137.6.1493.

Singleton V.L., y Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965;16(3):144-158.

Singleton V.L., Orthofer R., y Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999;299:152–178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

Slimani N., Kaaks R., Ferrari P., Casagrande C., Clavel-Chapelon F, Lotze G., *et al.* European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study: Rationale, design and population characteristics. *Public Health Nutrition*, 2002;5(6B):1125-1145. doi:10.1079/PHN2002395.

Slimani N., Deharveng G., Unwin .I, Southgate D.A., Vignat J., Skeie G., *et al.* The EPIC nutrient database project (ENDB): A first attempt to standardize nutrient database across the 10 European countries participating in the EPIC study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2007;61(9):1037-56. doi:10.1038/sj.ejcn.1602679.

Stringa N., Brahimaj A., Zaciragic A., Dehghan A., Ikram M.A., Hofman A., *et al.* Relation of antioxidant capacity of diet and markers of oxidative status with C-reactive protein and adipocytokines: A prospective study. *Metabolism*, 2017;71:171-181. doi:10.1016/j.metabol.2017.03.015.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., y Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006;19:669-75. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003.

The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, Institute of Medicine. Dietary reference intakes tables and application. IOP Publishing Physics Web. <http://iom.national-academies.org/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>. Accessed Jan 2015.

Thomson C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2004;58(3):391-402. doi:10.1038/sj.ejcn.1601800.

Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1996;58(1):267-288.

Toledo-Martín E.M., García-García M. del C., Font R., Moreno-Rojas J.M., Salinas-Navarro M., Gómez P., y del Río-Celestino M. Quantification of total phenolic and carotenoid content in blackberries (*Rubus Fruticosus* L.) using near infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis. *Molecules*, 2018;23:3191. doi:10.3390/molecules23123191.

Trichopoulou A., Orfanos P., Norat T., Bueno-de-Mesquita B., Ocké M.C., Peeters P.H., *et al.* Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *British Medical Journal*, 2005;330(7498):991. doi:10.1136/bmj.38415.644155.8F.

Trichopoulou A., Martínez-González M.A., Tong T.Y., Forouhi N.G., Khandelwal S., Prabhakaran D., *et al.* Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: Views from experts around the world. *BMC Medicine*, 2014;12:112. doi:10.1186/1741-7015-12-112.

Tripodo G., Ibáñez E., Cifuentes A., Gilbert-López B., y Fanali C. Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium Barbarum* L.) phenolic bioactive compounds. *Electrophoresis*, 2018;39:1673-1682. doi:10.1002/elps.201700448.

USDA. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods – 2007.

USDA. Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. May 2010.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Vallverdú-Queralt A., Regueiro J., de Alvarenga J., Torrado X., y Lamuela-Raventós R. Carotenoid profile of tomato sauces: Effect of cooking time and content of extra virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015;16(5):9588-9599. doi:10.3390/ijms16059588

Valtueña S., Del Río D., Pellegrini N., Ardigò D., Franzini L., Salvatore S., *et al.* The total antioxidant capacity of the diet is an independent predictor of plasma  $\beta$ -caroteno. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2007;61(1):69-76. doi:10.1038/sj.ejcn.1602485.

Van Cauwenbergh R., Robberecht H., van Vlaslaer V., De Smet A., Emonds M.P., y Hermans N. Plasma selenium levels in healthy blood donors in the central eastern part of Belgium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2007;21(4):225-233. doi:10.1016/j.jtemb.2007.06.003.

Van Het Hof K.H., West C.E., Weststrate J.A., y Hautvast J.G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 2000;130(3):503-506. doi:10.1093/jn/130.3.503.

Wagner R., y Cadet J. DNA base damage by reactive oxygen species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013;5(2):1-18. doi:10.1101/cshperspect.a012559.

Wang Y., Yang M., Lee S.G., Davis C.G., Kenny A., Koo S.I., *et al.* Plasma total antioxidant capacity is associated with dietary intake and plasma level of antioxidants in postmenopausal women. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012;23:1725-1731. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.12.004.

Wang Y., Yang M., Lee S.G., Davis C.G., Koo S.I., y Chun O.K. Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2012;112(10):1626-1635. doi:10.1016/j.jand.2012.06.007.

Wang X.D. Carotenoids. (eds Ross A.C., Caballero B., Cousins R.J., Tucker K.L., Ziegler T.R.) In: *Modern nutrition in health and disease*, 11<sup>th</sup> edn. pp 427-439. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U., y Locke S. Quantitative measurement of the total peroxyl-radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 1985;187(1):33-37. doi:10.1016/0014-5793(85)81208-4.

Willet W.C., Howe G.R., y Kushi L. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997;65(4):1220-1228. doi:10.1093/ajcn/65.4.1220S.

Winterbourn C.C., y Hampton M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signalling. *Free Radical Biology & Medicine*, 2008;45(5):549-561. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004.

Wojdylo A., Nowicka P., Carbonell-Barrachina A.A., y Hernández F. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *Journal of Functional Foods*, 2016;25:421-432. doi: 10.1016/j.jff.2016.06.015.

Wojdylo A., Carbonell-Barrachina A.A., Legua P., y Hernández P. Phenolic composition, ascorbic acid content, and antioxidant capacity of Spanish jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) fruits. *Food Chemistry*, 2016;201:307-314. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.090.

Woodford F.P., y Whitehead T.P. Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful? *Annals of Clinical Biochemistry*, 1998;35(1):48-56. doi:10.1177/000456329803500105.

World Cancer Research Fund/AICR. *Food, nutrition, physical activity, and prevention of cancer*. Washington: 2007. AICR.

Yang C.S., Lu G., Ju J., y Li GX. Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010;1203:29-34. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05561.x.

Yang M., Chung S.J., Chung C.E., Kim D.O., Song W.O., Koo S.I., *et al.* Estimation of total antioxidant capacity from diet and supplements in US adults. *British Journal of Nutrition*, 2011;106(2):254-263. doi:10.1017/S0007114511000109.

Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdóttir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., *et al.* Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999;69:87-94. doi:10.1093/ajcn/69.1.87.

Young J.F., Dragsted L.O., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Hansen M., Sandström B. The effect of grape-skin extract on oxidative status. *British Journal of Nutrition*, 2000;84:505-513. doi:10.1017/S0007114500001811.

Yuan L.H., Meng L.P., Ma W.W., Li S., Feng J.F., Yu H.L., *et al.* The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and fruit and vegetable consumption in antioxidant parameters in healthy subjects. *British Journal of Nutrition*, 2012;107:928-933. doi:10.1017/S0007114511003746.

Yuan L., Zhang L., Ma W., Zhou X., Ji J., Li N., *et al.* Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms with consumption of high fruit-juice and vegetable diet affect antioxidant capacity in healthy adults. *Nutrition*, 2013;29:965-971. doi:10.1016/j.nut.2012.12.025.

Zamora-Ros R., Serafini M, Estruch R., Lamuela-Raventós R.M., Martínez-González M.A., Salas-Salvadó J., *et al.* Mediterranean diet and non-enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2013;23(12):1167-1174. doi:10.1016/j.numecd.2012.12.008.

Zamora-Ros R., Knaze V., Rothwell J.A., Hémon B., Moskal A., *et al.* Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition*, 2016;55(4):1359-1375. doi:10.1007/s00394-015-0950-x.

# ANEXOS

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. Listado de trabajos resultantes de la búsqueda bibliográfica con información relativa a las frutas

Nº Ref.	Título del estudio	Autores
28	Nutritional analysis of vegetable food with different origins: Evaluation of antioxidant capacity and phenolic total compounds	Morillas-Ruiz <i>et al.</i> (2012)
62	Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet	Saura-Calixto <i>et al.</i> (2006)
72	Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results	Pérez-Jiménez <i>et al.</i> (2008)
75	Evaluation of the antioxidant properties of fruits	García-Alonso <i>et al.</i> (2004)
88	Volatile composition and sensory quality of Spanish pomegranates ( <i>Punica granatum L.</i> )	Calín-Sánchez <i>et al.</i> (2011)
91	Multifunctional in vitro antioxidant evaluation of strawberry ( <i>Fragaria virginiana Dutch.</i> )	Jiménez-Escrig <i>et al.</i> (2007)
109	Fatty Acids, Sterols, and Antioxidant Activity in Minimally Processed Avocados during Refrigerated Storage	Plaza <i>et al.</i> (2009)
112	Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages	Serrano <i>et al.</i> (2005)
138	Quality, bioactive compounds, and antioxidant activity of new flat-type peach and nectarine cultivars: a comparative study	Legua <i>et al.</i> (2011)
142	Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage	Plaza <i>et al.</i> (2011)
150	Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power	Alonso Borbalán <i>et al.</i> (2003)
159	Bioactive compounds from flesh and by-product of fresh-cut watermelon cultivars	Tarazona-Díaz <i>et al.</i> (2011)
169	Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes	Alcolea <i>et al.</i> (2002)
177	Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity and related bioactive compounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars	Díaz-Mula <i>et al.</i> (2009)
204	Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain)	Morales-Soto <i>et al.</i> (2014)
205	A systematic screening of total antioxidants in dietary plants	Halvorsen <i>et al.</i> (2002)
215	Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of <i>Ficus carica L.</i> fruits	Wojdylo <i>et al.</i> (2016)
216	Phenolic composition, ascorbic acid content, and antioxidant capacity of Spanish jujube ( <i>Ziziphus jujube Mill.</i> ) fruits	Wojdylo <i>et al.</i> (2016)
217	Characterization of twenty pomegranate ( <i>Punica granatum L.</i> ) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing	Alcaraz-Mármol <i>et al.</i> (2017)
218	Use of HPLC-and GC-QTOF to determine hydrophilic and lipophilic phenols in mango fruit ( <i>Mangifera indica L.</i> ) and its by-products	López-Cobo <i>et al.</i> (2017)
219	Influence of ripening stage on bioactive compounds and antioxidant activity in nine fig ( <i>Ficus carica L.</i> ) varieties grown in Extremadura, Spain	Pereira <i>et al.</i> (2017)

220	Thinned Stone fruits are a source of polyphenols and antioxidant compounds	Redondo <i>et al.</i> (2016)
221	Antioxidant and anti-inflammatory activities of freeze-dried grapefruit phenolics as affected by gum arabic and bamboo fibre addition and microwave pretreatment	García-Martínez <i>et al.</i> (2018)
227	Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple "Golden Delicious" from different geographical origin	Fernández-Jalao <i>et al.</i> (2019)
228	Phytochemistry and biological activity of Spanish <i>Citrus</i> fruits	Gironés-Vilaplana <i>et al.</i> (2014)
Tesis Doctoral	Caracterización, capacidad antioxidante y perfil fenólico de frutas subtropicales producidas y comercializadas en la costa de Granada-Málaga	Barez-Álvarez (2015)

## ANEXO 2. Códigos empleados en los análisis

### A) Sintaxis STATA de aplicación de índices de adhesión a la DM (rMED) de Buckland et al. (2009)

#### # Definición componentes

```
gen eqge04_r = QGE04 # frutas
gen eqge02_r = QGE02 # vegetales
gen eqge03_r = QGE03 # legumbres
gen eqge06_r = QGE06 # cereales
gen eqge08_r = QGE08 # pescado
gen eqge07_r = QGE07 # carne y productos cárnicos
gen eqge05_r = QGE05 # leche y lácteos
gen eqge100101_r = QGE100101
```

#### # Aplicación de tertiles

```
xtile t_fruit_r = QGE04, nq(3)
xtile t_veg_r = QGE02, nq(3)
xtile t_leg_r = QGE03, nq(3)
xtile t_cer_r = QGE06, nq(3)
xtile t_fis_r = QGE08, nq(3)
xtile t_mea_r = QGE07, nq(3)
xtile t_dai_r = QGE05, nq(3)
xtile t_oliv_r = QGE100101, nq(3)
```

#### # Otorgar puntuaciones (0-1-2)

```
replace t_fruit_r = 0 if (t_fruit_r == 1)
replace t_fruit_r = 1 if (t_fruit_r == 2)
replace t_fruit_r = 2 if (t_fruit_r == 3)
replace t_veg_r = 0 if (t_veg_r == 1)
replace t_veg_r = 1 if (t_veg_r == 2)
replace t_veg_r = 2 if (t_veg_r == 3)
replace t_leg_r = 0 if (t_leg_r == 1)
replace t_leg_r = 1 if (t_leg_r == 2)
replace t_leg_r = 2 if (t_leg_r == 3)
replace t_cer_r = 0 if (t_cer_r == 1)
replace t_cer_r = 1 if (t_cer_r == 2)
replace t_cer_r = 2 if (t_cer_r == 3)
replace t_fis_r = 0 if (t_fis_r == 1)
replace t_fis_r = 1 if (t_fis_r == 2)
replace t_fis_r = 2 if (t_fis_r == 3)
replace t_oliv_r = 0 if (t_oliv_r == 1)
replace t_oliv_r = 1 if (t_oliv_r == 2)
replace t_oliv_r = 2 if (t_oliv_r == 3)
replace t_mea_r = 2 if (t_mea_r == 1)
replace t_mea_r = 1 if (t_mea_r == 2)
replace t_mea_r = 0 if (t_mea_r == 3)
replace t_dai_r = 2 if (t_dai_r == 1)
replace t_dai_r = 1 if (t_dai_r == 2)
replace t_dai_r = 0 if (t_dai_r == 3)
```

### # Generar el componente consumo de alcohol

```
gen alc_r = 1 if (QE_ALC >= 10 & QE_ALC < 51 & Sex == 1)
replace alc_r = 0 if (QE_ALC < 10 & Sex == 1)
replace alc_r = 0 if (QE_ALC >= 51 & Sex == 1)
replace alc_r = 1 if (QE_ALC >= 5 & QE_ALC < 26 & Sex == 2)
replace alc_r = 0 if (QE_ALC < 5 & Sex == 2)
replace alc_r = 0 if (QE_ALC >= 26 & Sex == 2)
gen t_alc_r = alc
replace t_alc_r = 2 if (t_alc == 1)
```

### ## Obtención del índice total

#### # Escala continua

```
gen rMED_r = t_fruit_r + t_veg_r + t_leg_r + t_cer_r + t_fis_r + t_mea_r + t_dai_r + t_oliv_r +
t_alc_r
```

#### # Escala categórica

```
gen rMED_rC = rMED_r
recode rMED_rC (0/6=1) (7/12=2) (13/18=3)
```

#### # Escala categorías en terciles

```
xtile rMED_rT = rMED_r, nq(3)
```

#### # Escala categorías en quintiles

```
xtile rMED_rQ = rMED_r, nq(5)
```

## B) Sintaxis R de creación de heatmap de correlaciones

### # Ejecutar los paquetes R necesarios

```
library(ggplot2)
library(Hmisc)
library(reshape2)
```

### # Selección de variables para el estudio de correlación y generación de una matriz de datos (objeto indexes)

```
indexes <- as.matrix(indexes) # transformación a matriz de datos
```

### # Creación de la matriz de correlaciones spearman adjuntando p-valores y coeficientes rho

```
aa <- rcorr(indexes, type="spearman") # correlación empleando método de Spearman
pval <- as.data.frame(aa$P)
fc <- as.data.frame(aa$r)
```

### # Creación del heatmap a partir de la matriz de correlaciones (objeto cormat)

```
cormat <- rcorr(indexes, type="spearman")
```

### # Creación de una base de datos con combinaciones de variables (función melt)

```
melted_cormat <- melt(cormat, na.rm = TRUE)
head(melted_cormat)
colnames(melted_cormat) <- c("biomarker1", "biomarker2", "value") # renombrar variables
```

**# Creación del heatmap con funciones implementadas en paquete ggplot2****# preparación de los datos**

```
aa<-c(1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,2,2,2,2,2,2,2,3,3,3,3,3,3,3,3) # lista de las categorías
aa<-factor(aa, levels=c(1,2,3), labels=c("vitamins", "NEAC", "inflammation/OS")) # asignación
de etiquetas los grupos de biomarcadores para lograr separación en el gráfico
melted_cormat$depth<-aa # incorporar denominación de variables a base de datos
```

**# elaboración del gráfico (objetos sp y sp1 añadiendo líneas al gráfico)**

```
sp<-ggplot(data = melted_cormat, aes(x=biomarker1, y=biomarker2, fill=value)) +
geom_tile()
sp1<-sp+geom_tile(color = "white")+
scale_fill_gradient2(low = "blue", high = "red", mid = "white",
midpoint = 0, limit = c(-1,1), space = "Lab",
name="rho\ncorrelation") +
theme_minimal()+
theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 1,
size = 10, hjust = 1))+
scale_y_discrete(limits=rev(levels(as.factor(melted_cormat$biomarker1))))+
ggtitle(label= "Spearman correlations")+
facet_grid(~depth, switch="x", scales="free_x", space="free_x", labeller=label_value)
sp1
print(sp1)
```

**C) Sintaxis R de creación de clústeres jerárquicos (hierarchical clustering)****# Ejecutar los paquetes R necesarios**

```
library(pheatmap)
library(RColorBrewer)
```

**# Selección de variables y generación de una matriz de datos siendo filas los biomarcadores y sujetos las columnas (objeto data)**

```
data<-metadada[,c("biomarkers[[i]]")] # selección de biomarcadores del conjunto de datos
original (objeto metadada)
```

```
data<-as.data.frame(t(data)) # cambio de columnas y filas
data<-as.matrix(data) # matriz de datos
```

**# Selección de variables de estilos de vida para agrupaciones posteriores (objeto metadada)**

```
metadada<-metadada[,c("Center", "Age2", "Sex", "AF", "BMI_cat3", "Smoke_Stat")] # selección
de metadada del conjunto de datos original (objeto data)
```

**# Preparación de variables en variables factor asignando sus etiquetas**

```
metadada$BMI_cat3 <- factor(metadada$BMI_cat3,
levels = c(1,2,3),
labels = c("normal", "overweight", "obese")) # IMC
```

```
metadada$Center <- factor(metadada$Center,
```

```

levels = c(32,35),
labels = c("Granada", "Guipuzkoa")) # centro

metadata$Sex <- factor(metadata$Sex,
levels = c(1,2),
labels = c("Men", "Women")) # sexo

metadata$AF <- factor(metadata$AF,
levels = c(1,2),
labels = c("Inactive", "Active")) # actividad física

metadata$Age2 <- factor(metadata$Age2,
levels = c(1,2),
labels = c("< 49y", "> 49y")) # grupos de edad

table(metadata$Smoke_Stat)
metadata$Smoke_Stat[metadata$Smoke_Stat==4]<-1
metadata$Smoke_Stat <- factor(metadata$Smoke_Stat,
levels = c(1,2,3),
labels = c("Never", "Former", "Current")) # tabaco

colnames(metadata)<-c("Center","Age", "Sex", "Physical Activity", "BMI", "Smoking status") #
renombrar variables

# Definición de barras de colores e intensidad de las relaciones para los gráficos
paletteLength <- 50
myBreaks <- c(seq(-3, 0, length.out=ceiling(paletteLength/2) + 1),
seq(3/paletteLength, 3, length.out=floor(paletteLength/2)))
myColor <- colorRampPalette(c("blue", "grey90", "red")) (paletteLength)

# Ordenar variables de metadata para barra de anotaciones/agrupaciones
metadata<-metadata[,c("Smoking status", "Physical Activity", "BMI", "Center", "Age",
"Sex")]

# Creación del gráfico Hiarchical clustering con función pheatmap para filas y columnas con
distancias Manhattan
out<-pheatmap(data, color = myColor, show_rownames = T,
show_colnames = F, cluster_cols = T, cluster_rows = T, scale="row",
breaks=myBreaks, cex=1, clustering_distance_rows = "euclidean", cex=1,
clustering_distance_cols = "manhattan", clustering_method = "ward.D", border_color = T,
annotation_col = metadata,
cutree_rows = 7, cutree_col=5, angle_col = "90")
print(out)

```

## D) Sintaxis R de creación de gráficos de correlación (scatterplot)

### # Ejecutar los paquetes R necesarios

```
library(Hmisc)
library(ggplot2)
library(ggpubr)
library(gridExtra)
library(grid)
```

### # Selección de variables y generación de una matriz de datos siendo filas los biomarcadores y sujetos las columnas (objeto data)

```
data<-metadada[,c("biomarkers[[i]]")] # selección de biomarcadores del conjunto de datos original (objeto metadata)
```

### # Creación del "scatterplot" con línea de tendencia para FRAP plasma con:

#### # vitamina C (objeto sp1)

```
sp1 <- ggscatter(data, x = "vitctotal", y = "FRAP-P", xlab = "Total Vitamin C", ylab = "FRAP FE",
  add = "reg.line", # Añadir línea de regresión
  add.params = list(color = "blue", fill = "lightgray"),
  conf.int = TRUE # Añadir intervalo de confianza )
# Añadir coeficiente de correlación
sp1<-sp1 + stat_cor(method = "spearman", label.x = 3, label.y = 30)
```

#### # Beta-caroteno (objeto sp2)

```
sp2 <- ggscatter(newdata, x = "BetaCaroteno", y = "FRAP-P", xlab = "Carotenos", ylab = "FRAP FE",
  add = "reg.line",
  add.params = list(color = "blue", fill = "lightgray"),
  conf.int = TRUE )
sp2<-sp2 + stat_cor(method = "spearman", label.x = 3, label.y = 30)
```

#### # PCR (objeto sp3)

```
sp3 <- ggscatter(newdata, x = "PCR", y = "FRAP-P", xlab = "CRP", ylab = "FRAP FE",
  add = "reg.line",
  add.params = list(color = "blue", fill = "lightgray"),
  conf.int = TRUE )
sp3<-sp3 + stat_cor(method = "spearman", label.x = 3, label.y = 30)
```

#### # Adiponectina (objeto sp4)

```
sp4 <- ggscatter(newdata, x = "Adiponectina", y = "FRAP-P", xlab = "Adiponectin", ylab = "FRAP FE",
  add = "reg.line",
  add.params = list(color = "blue", fill = "lightgray"),
  conf.int = TRUE )
sp4<-sp4 + stat_cor(method = "spearman", label.x = 3, label.y = 30)
```

### # Unión de gráficos

```
p<-grid.arrange(sp1, sp2, sp3, sp4, ncol=2) # juntar gráficos en un único gráfico
```

## E) Sintaxis R de estimación de $R^2$

### # Modelo de regresión lineal ajustado (ejemplo licopeno, escala logarítmica)

```
fit = lm(log(Licopeno + 0.0001) ~ as.factor(Sex) + Age_Recr.x + as.factor(Smoke_Stat) +
as.factor(Cntr_C) + as.factor(Season) + as.factor(mdsbcn_cET) + as.factor(Pa_Index) + Bmi_C.x
+ Waist_C.x + Alc_Re + QE_FIBT + QGE100101, data=data )
summary(fit)
round(summary(fit)$r.squared, 4)
```

### # ANOVA: extracción de $R^2$

```
anova(fit)
af <- anova(fit)
afss <- af$"Sum Sq"
print(cbind(af,PctExp=afss/sum(afss)*100))
summary(fit)$coefficients[,4]
round(summary(fit)$r.squared, 4)
```

### # Alternativa extracción de $R^2$ con las bases de datos imputadas y función "pool"

```
library(mice)
fit <- with(imp, lm(log(b.criptoxantina + 0.0001) ~ as.factor(Sex) + as.factor(Smoke_Stat) +
as.factor(Cntr_C)))
summary(fit)
pool(fit)
summary(pool(fit))
```

### # Alternativa del análisis de varianza (tipo 2)

```
library(miceadds)
an2a <- miceadds::mi.anova(mi.res=imp, formula="log(licopeno + 0.0001) ~ as.factor(Sex) +
Age_Recr + as.factor(Smoke_Stat) + as.factor(Cntr_C) + as.factor(Season) +
as.factor(mdsbcn_cET) + as.factor(Pa_Index) + Bmi_C + Waist_C + Alc_Re + QE_FIBT +
QGE100101")
round(an2a$r.squared, 4)
afss <- an2a$anova.table$SSQ
print(cbind(an2a$anova.table,PctExp=afss/sum(afss)*100))
```

### ANEXO 3. Publicaciones y contribuciones a congresos

#### Publicaciones

- **Carrión-García C.J.**, Guerra-Hernández E.J., García-Villanova B., y Molina-Montes E. Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels. *European Journal of Nutrition*, 2017;56(4):1561-1576. doi:10.1007/s00394-016-1201-5. JCR (2018) FI: 4,449 (Q1).
- **Carrión-García C.J.**, Guerra-Hernández E.J., García-Villanova B., Sánchez M.J., Amiano P., y Molina-Montes E. Plasma non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) in relation to dietary NEAC, nutrient antioxidants and inflammation-related biomarkers. (Enviado a *Journal Molecular Nutrition & Food Research*; "en revisión"). JCR (2018) FI: 4,653 (Q1).

#### Contribuciones a congresos (comunicaciones poster)

- **Carrión-García C.J.**, García-Villanova B., Guerra-Hernández E.J., Azpiri M., Amiano P., Ruiz-López M.D., Artacho R., Requena M., Molina E, y Molina-Montes E. Diseño de una base de datos de Capacidad Antioxidante española: Aplicación al grupo de frutas y derivados y a frutos secos. III Congreso de la FESNAD (Sevilla, 2015).
- **Carrión-García C.J.**, Molina-Montes E., García-Villanova B., y Guerra-Hernández E.J. Relación entre Capacidad Antioxidante Total del plasma y de la dieta según estimación por recordatorio de 24 horas y cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. III Congreso de la FESNAD (Sevilla, 2015).
- Molina-Montes E., **Carrión-García C.J.**, Guerra-Hernández E.J., García-Villanova B., Serafini M., Zamora-Ros R., Amiano P., Azpiri M., Sánchez M.J., y Molina-Montes E. Dietary and plasma non-enzymatic antioxidant capacity with regard to biomarkers of antioxidants nutrients in EPIC-Granada/Guipúzcoa. 12th European Nutrition Conference FENS (Berlín, 2015).
- **Carrión-García C.J.**, García-Villanova B., Guerra-Hernández E.J., Hernández-Ruiz Á., Azpiri M., Amiano P., Ruiz-López M.D., Artacho R., Molina-Montes E. Total phenolic content data of Spanish fruits available in the literatura. XVII International Congress of Dietetics (Granada, 2016).

# RESUMEN

## 10. RESUMEN

### 10.1. Introducción

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o inhiben la oxidación bloqueando los radicales libres que dañan las células, proteínas, lípidos y ADN. El organismo posee sistemas de defensa antioxidante que pueden ser de origen endógeno (de naturaleza enzimática y no enzimática) trabajando coordinadamente, o pueden ser de origen exógeno (procedentes de la dieta). Estos últimos pueden actuar de forma directa o indirecta activando los sistemas de detoxificación endógenos.

La evaluación de la **capacidad antioxidante total (CAT)** de los alimentos ha recibido gran atención en los últimos años, ya que considera la capacidad antioxidante de los compuestos individuales y sus posibles interacciones, sinergias y reacciones redox, y pueden relacionarse con el potencial de protección que tiene la dieta frente a determinadas enfermedades crónicas, como el cáncer o procesos inflamatorios. La utilización de esta CAT en sistemas biológicos es más controvertida, por lo que su aplicación en condiciones *in vivo* tiene restricciones, dado que no refleja la capacidad antioxidante de los sistemas enzimáticos del organismo por lo que se sugirió el uso del término **capacidad antioxidante no enzimática (CANE)**.

Se ha sugerido que la CAT-D no refleja el potencial antioxidante del organismo. El empleo de la medida de la CAT-D ha sido criticado por este motivo. Hoy en día, sigue siendo controvertida la correlación entre la CAT-D y la CANE-P. La puesta de manifiesto de esta correlación permitiría validar el empleo de la medida de la CAT-D en los estudios de nutrición y ciencia de los alimentos. Asimismo, no se ha caracterizado esta correlación según grupos de alimentos, métodos de recogida de información de dieta o características de los estilos de vida, ni se han analizado con exhaustividad los factores que contribuyen a la CAT-D ni a la CANE-P.

### 10.2. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue validar la relación entre la CAT de la dieta (CAT-D) con la CANE del plasma (CANE-P) y estudiar la asociación con biomarcadores de nutrientes antioxidantes, de estrés oxidativo y de inflamación. A partir de este objetivo general, se desglosaron los objetivos específicos que, a continuación, se enumeran: 1) Elaborar

un formulario (base de datos) de contenido de CAT en alimentos para cuantificar la CAT-D en términos de TRAP, FRAP, TEAC-ABTS y ORAC, recopilando de la bibliografía valores publicados en alimentos; 2) Estimar la CAT-D a través del formulario elaborado anteriormente y de la información de dieta recogida en las diferentes poblaciones de estudio; 3) Poner a punto los diferentes métodos analíticos para la de determinación de CANE (TRAP, FRAP, TEAC-ABTS y ORAC) y de algunos nutrientes antioxidantes (polifenoles totales (Tp),  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, Se, Cu, manganeso (Mn) y Zn en las muestras de plasma de una población de estudio sana; 4) Determinar los niveles de CANE, así como los niveles de biomarcadores nutricionales (polifenoles totales (Tp),  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, vitaminas A, E y C, carotenos totales, Co Q9 y Co Q10, Se, Cu, Mn y Zn), biomarcadores de estrés oxidativo (MDA, LDL-ox) y de inflamación (IL-6, IL-8, PCR, TNF- $\alpha$ , PAI-I, resistina, adiponectina) en el plasma de las cohortes del estudio EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa; 5) Analizar y validar la relación entre la CAT-D y la CANE-P en los estudios de la puesta a punto de métodos analíticos y EPIC, globalmente y según grupos de alimentos, y considerando posibles variaciones en las relaciones según características de las poblaciones de estudio (sexo, edad, hábito tabáquico, actividad física y otros); 6) Establecer la contribución de los nutrientes antioxidantes (dieta y biomarcadores) a la CAT-D y CANE-P, de manera individual y global a través de un modelo de biomarcadores nutricionales predictiva de la CAT-D y CANE-P en el estudio EPIC; 7) Examinar la asociación entre los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, estrés oxidativo y de inflamación con la CAT-D y la CANE-P en el estudio EPIC; 8) Evaluar la influencia y el efecto modificador del hábito tabáquico y de otras variables de estilos de vida (actividad física, obesidad, y otros), sobre las asociaciones entre la CAT-D y CANE-P y los biomarcadores (nutricionales, de estrés oxidativo y de inflamación) en el estudio EPIC.

### 10.3. Metodología

#### Diseño del formulario de CAT en alimentos.

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed/Medline, Embase y Web of Science, hasta Junio de 2015, con objeto de generar una base de datos de valores de CAT y de contenido en Tp de alimentos consumidos o producidos en España, a partir de estudios que habían analizado CAT y Tp en estos alimentos, a través de cualquiera de los ensayos de CAT (TRAP, FRAP, ORAC, TEAC-ABTS, DPPH) y de Tp (FCR). Con estos estudios se diseñó un formulario de recogida de información de CAT en alimentos.

### Estudio transversal I

Se empleó una población de estudio, de participantes sanos, de 22 hombres y 28 mujeres, con edades comprendidas entre 23-62 años, residentes en Granada, para estimar la CAT-D usando un CFCA y un R-24H y poner a punto los métodos analíticos para la determinación de CANE-P (TRAP, FRAP, TEAC-ABTS y ORAC) y el contenido en Tp y, así, analizar y validar la relación entre la CAT-D y la CANE-P, tanto de manera global como por grupos de alimentos.

### Estudio transversal II

Se determinaron los niveles de CAT-D, CANE-P y de biomarcadores nutricionales, de estrés oxidativo e inflamación en el plasma de 210 participantes sanos, con edades comprendidas entre 32-69 años y pertenecientes a las cohortes del estudio EPIC-Granada y EPIC-Guipúzcoa, reclutados durante los años 1992-1996. Se analizó y validó la relación entre la CAT-D y la CANE-P, se examinaron asociaciones entre los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, estrés oxidativo e inflamación con la CAT-D y la CANE-P y, se evaluó la influencia y el efecto modificador del hábito tabáquico y de otras variables de estilos de vida sobre las asociaciones entre la CAT-D y la CANE-P y los biomarcadores nutricionales, de estrés oxidativo y de inflamación.

### Estudio transversal III

La población de estudio, de participantes sanos, 27 hombres y 25 mujeres, con edades comprendidas entre 23-63 años. Se estimó la ingesta dietética de minerales y carotenoides a partir de la información de dieta recogida (CFCA y R-24H), se pusieron a punto los métodos analíticos para determinar minerales y carotenoides en plasma y, se analizaron correlaciones entre los niveles de minerales y carotenoides en la dieta y en el plasma.

## **10.4. Resultados y discusión**

### Diseño del formulario de CAT en alimentos

La búsqueda bibliográfica sobre publicaciones de CAT y Tp en alimentos consumidos en España, dio lugar a un total de 203 trabajos, de los cuales 15, fueron del grupo de las frutas. Tras un exhaustivo análisis de los mismos, se elaboró una tabla que recopiló valores de CAT de aquellas frutas de las que se dispuso un dato útil para los ensayos TEAC-ABTS, FRAP y Tp.

La selección de la base de datos para la estimación de la CAT-D global se llevó a cabo tras un análisis de correlación entre los valores de CANE-P en los ensayos TEAC-ABTS, FRAP y Tp y la CAT del grupo de las frutas (estimada a partir de diferentes bases de datos ya publicadas), como uno de los grupos de alimentos que mayor porcentaje de CAT aporta a la dieta y uno de los que mayor cantidad de compuestos fenólicos contiene. Se observaron correlaciones positivas entre la CAT del grupo de las frutas y la CANE-P en todas las bases de datos y, de éstas, fueron relaciones estadísticamente significativas para el ensayo FRAP estimado con la base de datos de Pellegrini *et al.* (2003) y el formulario de CAT-D. Se decidió emplear la base de datos de Pellegrini *et al.*, para estimar la CAT-D global debido a que fue la más completa en cuanto a número de alimentos disponibles y, por haber sido validada con indicadores plasmáticos con anterioridad.

#### Estudio transversal I

El estudio de correlación entre la CANE-P y la CAT-D, realizado en el estudio transversal I (piloto), dio lugar a relaciones estadísticamente significativa y positivas moderadas en el ensayo FRAP ( $\rho \sim 0,3-0,4$ ) tanto con la información derivada del CFCA como la derivada del R-24H. También se observó correlación estadísticamente significativa entre la CANE-P y la CAT-D en el ensayo ORAC con la información derivada del R-24H. En la literatura consultada, también se encontraron algunos trabajos que reportaron significación estadística entre la CAT-D y la CANE-P en el ensayo FRAP, pero al mismo tiempo, otros trabajos que no reportaron relaciones estadísticamente significativas en ninguno de los ensayos empleados.

#### Estudio transversal II

En el estudio transversal II, se analizó la asociación entre la CANE-P y la CAT-D con algunos nutrientes antioxidantes y marcadores de inflamación del plasma. En general, se encontraron correlaciones positivas, aunque moderadas, entre los ensayos de CAT-D y ensayos de CANE-P con nutrientes antioxidantes, pero no con marcadores de inflamación. Es destacable que, en el caso del ensayo FRAP, existieran asociaciones en los análisis ajustados por edad, sexo, centro de reclutamiento, actividad física, IMC y hábito tabáquico. Las agrupaciones que resultaron de la combinación de factores demográficos y estilos de vida en función de los niveles de biomarcadores sugieren que existe variabilidad de la CANE-P en relación con el estado antioxidante e inflamatorio de cada individuo. En la literatura consultada, los estudios que han evaluado la relación entre la CAT-D y la CANE-P han encontrado, en el mejor de los casos, correlaciones moderadamente débiles en algunos

ensayos, mientras que otros no respaldaron correlación alguna. En cuanto a las asociaciones entre los niveles de CANE-P y CAT-D con los niveles de PCR, TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina y adiponectina, la mayoría de estudios consultados tampoco encontraron asociaciones en la bibliografía consultada, sólo un estudio reportó asociaciones inversas significativas entre el ensayo FRAP de la dieta y PAI-I y, asociación positiva entre el ensayo FRAP de la dieta y la adiponectina.

### Estudio transversal II y III

En el estudio de correlación entre minerales de la dieta y del plasma, llevado a cabo en las muestras del estudio transversal III, no se observaron correlaciones significativas entre ningún mineral estimado a través del CFCA y el mismo mineral analizado en el plasma, aunque sí se observaron correlaciones moderadas ( $\rho \sim 0,3$ ) y significativas entre Fe-plasma y Cu-dieta, Fe-plasma y Zn-dieta, Fe-plasma y Se-dieta. Resultados similares se encontraron en las correlaciones entre los niveles de minerales plasmáticos y de la dieta derivados del R-24H. En cuanto a las correlaciones entre carotenoides de la dieta (CFCA) y del plasma, sólo en la luteína se estableció significancia estadística.

En el análisis de regresión multivariante de variables predictoras de los niveles plasmáticos de minerales en plasma realizada en la población del estudio transversal II, existió asociación con el sexo, la edad, el hábito tabáquico, el centro y la circunferencia de cintura. Por otro lado, en relación al mismo análisis para los carotenoides, se encontró asociación entre niveles plasmáticos y las variables predictoras como el centro, la estación del año, sexo y el índice de adherencia a la DM.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles plasmáticos de minerales, carotenoides y otros biomarcadores según el grado de adherencia al índice de DM (baja adherencia, media adherencia y alta adherencia) en la población del estudio transversal II.

Se ha propuesto un modelo de predicción para clasificar sujetos en altos y bajo/medios niveles de CAT-D y CANE-P, para lo que se emplearon todos los biomarcadores nutricionales, incluyendo minerales y carotenoides, nutrientes antioxidantes y otros factores dietéticos junto con variables de los estilos de vida.

El modelo de predicción de CAT-D y CANE-P basado en co-variables de ingesta de nutrientes, biomarcadores nutricionales y estilos de vida, mostró valores de AUC más elevados

para la selección de co-variables en el TRAP con café, el FRAP con y sin café, polifenoles de la dieta, FRAP del plasma con ácido úrico, y TEAC-ABTS del plasma.

## 10.5. Conclusiones

*Respecto al formulario de recopilación de datos de CAT en alimentos*

- 1) La búsqueda de valores de CAT en alimentos españoles, considerando los ensayos TEAC-ABTS, DPPH, FRAP, TRAP y ORAC, y T<sub>p</sub>, permitió identificar 1197 valores de CAT. El grupo de las frutas fue el que aportó mayor número de registros.
- 2) Los valores de CAT-D de las frutas comercializadas en España para el ensayo FRAP recogidos en el formulario, mostró correlación con la CANE-P para el mismo ensayo.

*Respecto a la correlación entre CAT-D y CANE-P*

- 3) Existe una buena correlación entre la CAT-D derivada del CFCA y la del R-24H. La correlación entre CAT-D y CANE-P es ligeramente más fuerte al considerar la CAT-D derivada del R-24H.
- 4) Existe una correlación débil/moderada pero estadísticamente significativa entre la CAT-D y la CANE-P en el ensayo FRAP, con o sin ácido úrico. Esta correlación se confirma en las dos poblaciones estudiadas. El ensayo FRAP es el más adecuado para estimar la CAT-D y CANE-P.

*Respecto a la relación entre la CAT-D y CANE-P con los biomarcadores de nutrientes antioxidantes e inflamación*

- 5) La CANE-P en términos de FRAP se asocia positiva y significativamente con la mayoría de los biomarcadores de nutrientes antioxidantes, pero no se asocia con los marcadores de inflamación. Por lo tanto, la medida de FRAP en plasma refleja el potencial antioxidante del organismo pero no el estado anti-inflamatorio en individuos sanos.
- 6) El análisis de clúster ha permitido identificar cinco grupos de sujetos con patrones variables de asociación entre los biomarcadores con la CANE-P.

*Respecto a otros compuestos con potencial antioxidante (minerales y carotenoides) y la firma de CAT-D y CANE-P*

- 7) La fuerza de la relación entre los minerales o los carotenoides de la dieta con sus correspondientes niveles en plasma es, generalmente, débil. El centro de estudio y la estación

del año en el caso del licopeno, son las variables que explican en mayor medida la variabilidad individual de los niveles plasmáticos de carotenoides.

8) Mediante un enfoque metodológico de modelos de clasificación y validación cruzada, se han identificado cinco biomarcadores nutricionales antioxidantes con capacidad para discriminar entre altos y medio/bajos niveles de FRAP en plasma. Los estilos de vida no mejoran la capacidad predictiva de los modelos.

## European Journal of Nutrition

### Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	<b>EJON-D-15-00827R2</b>	
Full Title:	<b>Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels</b>	
Article Type:	<b>Original Contribution</b>	
Keywords:	<b>Non-enzymatic antioxidant capacity; dietary antioxidant; Oxidative stress; dietary assessment.</b>	
Corresponding Author:	<b>Eduardo Jesús Guerra-Hernández, Ph.D. University of Granada Granada, Granada SPAIN</b>	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	<b>University of Granada</b>	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	<b>Cayetano Javier Carrión-García</b>	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	<b>Cayetano Javier Carrión-García</b>	
	<b>Eduardo Jesús Guerra-Hernández, Ph.D.</b>	
	<b>Belén García-Villanova, Ph.D.</b>	
	<b>Esther Molina-Montes, Ph.D.</b>	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	<b>Spanish Ministry of Health (Health Research Fund, FIS) (P112/00002)</b>	<b>Dr. Esther Molina-Montes</b>

<p><b>Abstract:</b></p>	<p><b>Abstract:</b></p> <p><b>Purpose:</b> We aimed to quantify and compare dietary non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC), estimated using two dietary assessment methods, and to explore its relationship with plasma NEAC.</p> <p><b>Methods:</b> 50 healthy subjects volunteer to participate in this study. Two dietary assessment methods (a food frequency questionnaire -FFQ- and a 24-hour recall -24- HR) were used to collect dietary information. Dietary NEAC, including oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total polyphenols (Tp), ferric-reducing antioxidant power (FRAP), and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC-ABTS), was estimated using several data sources of NEAC content in food. NEAC status was measured in fasting blood samples using the same assays. We performed non-parametric Spearman correlation analysis between pairs of dietary NEAC (FFQ and 24-HR) and diet-plasma NEAC, with and without the contribution of coffee's NEAC,. Partial correlation analysis was used to estimate correlations regardless of variables potentially influencing these relationships.</p> <p><b>Results:</b> FFQ-based and 24-HR-based NEAC were moderately correlated, with correlation coefficients ranging from 0.54 to 0.71, after controlling for energy intake, age and sex. Statistically significant positive correlations were found for dietary FRAP, either derived from the FFQ or the 24-HR, with plasma FRAP (<math>r \sim 0.30</math>). This weak, albeit statistically significant, correlation for FRAP was mostly present in the fruits and vegetables food groups. Plasma ORAC without proteins and 24-HR-based total ORAC was also positively correlated (<math>r = 0.35</math>).</p> <p><b>Conclusion:</b> The relationship between dietary NEAC and plasma FRAP and ORAC suggests the dietary NEAC may reflect antioxidant status despite its weak in vivo</p>
	<p>potential, supporting further its use in oxidative stress-related disease epidemiology.</p>
<p><b>Suggested Reviewers:</b></p>	<p><b>Mauro Serafini</b>  <a href="mailto:serafini@inran.it">serafini@inran.it</a>  Nutritional epidemiologist, in the field of dietary antioxidants and disease prevention</p> <p><b>Raul Zamora</b>  <a href="mailto:raulzamoraros@gmail.com">raulzamoraros@gmail.com</a>  Nutritional epidemiologist, working on dietary-disease association studies</p> <p><b>Vito Verardo</b>  <a href="mailto:vito.verardo@unibo.it">vito.verardo@unibo.it</a>  Specialist in bioactive compounds determination</p> <p><b>Maria Dolores Del Castillo</b>  <a href="mailto:md.delcastillo@csic.es">md.delcastillo@csic.es</a>  Specialist in antioxidant capacity determination</p>

# Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels

4

5 **Authors:** Cayetano Javier Carrión-García<sup>1,5</sup>, Eduardo J. Guerra-Hernández<sup>1,\*</sup>, Belén García-Villanova<sup>1</sup>, Esther Molina-Montes<sup>2,3,4</sup>

## 10 **Affiliations:**

11 <sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja S/N, 18071. University of Granada. Granada, Spain.

13 <sup>2</sup>Escuela Andaluza de Salud Pública. Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. Hospital Universitario de Granada/University of Granada. Granada, Spain.

15 <sup>3</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública, (CIBERESP), Spain.

16 <sup>4</sup>Genetic and Molecular Epidemiology Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain

17 <sup>5</sup>Nutrition and Food Science Doctorate Program (RD 99/2011). University of Granada. Granada, Spain.

## 19 **\*Corresponding author:**

20 Eduardo J. Guerra-Hernández. Departamento de Nutrición y Bromatología.

21 Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja S/N. 18071. University of Granada. Granada.

22 Spain. Tel: +34958243867. E-mail: [eiguerra@ugr.es](mailto:eiguerra@ugr.es)

23 **Word count (abstract):** 249

24 **Word count (text):** 4,713

29 **Abstract:**

30 **Purpose:** We aimed to quantify and compare dietary non-enzymatic antioxidant  
31 capacity (NEAC), estimated using two dietary assessment methods, and to explore its  
32 relationship with plasma NEAC.

33 **Methods:** 50 healthy subjects volunteer to participate in this study. Two dietary  
34 assessment methods (a food frequency questionnaire -FFQ- and a 24-hour recall -24-  
35 HR) were used to collect dietary information. Dietary NEAC, including oxygen radical  
36 absorbance capacity (ORAC), total polyphenols (Tp), ferric-reducing antioxidant power  
37 (FRAP), and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC-ABTS), was estimated using  
38 several data sources of NEAC content in food. NEAC status was measured in fasting  
39 blood samples using the same assays. We performed non-parametric Spearman  
40 correlation analysis between pairs of dietary NEAC (FFQ and 24-HR) and diet-plasma  
41 NEAC, with and without the contribution of coffee's NEAC,. Partial correlation analysis  
42 was used to estimate correlations regardless of variables potentially influencing these  
43 relationships.

44 **Results:** FFQ-based and 24-HR-based NEAC were moderately correlated, with  
45 correlation coefficients ranging from 0.54 to 0.71, after controlling for energy intake, age  
46 and sex. Statistically significant positive correlations were found for dietary FRAP,  
47 either derived from the FFQ or the 24-HR, with plasma FRAP ( $r \sim 0.30$ ). This weak, albeit  
48 statistically significant, correlation for FRAP was mostly present in the fruits and  
49 vegetables food groups. Plasma ORAC without proteins and 24-HR-based total ORAC  
50 was also positively correlated ( $r = 0.35$ ).

51 **Conclusion:** The relationship between dietary NEAC and plasma FRAP and ORAC  
52 suggests the dietary NEAC may reflect antioxidant status despite its weak in vivo  
53 potential, supporting further its use in oxidative stress-related disease epidemiology.

54

55 **Keywords:** Non-enzymatic antioxidant capacity, dietary antioxidants, oxidative stress,  
56 dietary assessment

57

58

59

**61 Abbreviations:**

- 62 TAC: Total Antioxidant Capacity
- 63 NEAC: Non-Enzymatic Antioxidant Capacity
- 64 ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity
- 65 FRAP: Ferric-Reducing Antioxidant Power
- 66 TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant parameters
- 67 TEAC-ABTS: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
- 68 VCEAC: Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity
- 69 GAE: gallic acid equivalent
- 70 Tp: total phenolic compounds
- 71 FCR: Folin-Ciocalteu reagent
- 72 FFQ: Food Frequency Questionnaire
- 73 24-HR: 24-Hour Recall
- 74 CI: Confidence Interval
- 75 BMI: Body Mass Index

## 78 **INTRODUCTION**

79

80 Reactive oxidants are produced by endogenous metabolic reactions and by exogenous  
81 factors (e.g. pollution, smoke or UV irradiation), with both being able to induce oxidative  
82 damage on key molecules in the body, including lipids, proteins, and DNA [1].  
83 The human antioxidant defence system is, at the same time, regulated by endogenous  
84 (through enzymatic and nonenzymatic systems), or exogenous (through naturally  
85 occurring compounds present in food) mechanisms [1]. Diet is therefore meant to play  
86 a major role in the prevention of oxidative stress-related chronic diseases, such as  
87 cancer, cardiovascular disease, diabetes, as well as ageing [1-3]. Fruits and vegetables  
88 are the most important dietary sources of antioxidants due to their high content of  
89 compounds with antioxidant activity, including ascorbic acid, tocopherols, carotenoids  
90 and phenolic compounds [4,5]. Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) is regarded  
91 a global measure of non-enzymatic antioxidant efficiency [6,7]. Various assays are  
92 available to measure it: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) [8], Ferric-  
93 Reducing Antioxidant Power (FRAP) [9], Total Radical-Trapping Antioxidant  
94 parameters (TRAP) [10], and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC-ABTS)  
95 [11]. Published values of NEAC in food allow quantification of dietary NEAC [12-16],  
96 and also ORAC, FRAP, TRAP, and TEAC-ABTS assays can be used to measure  
97 NEAC status in blood samples [8-11]. Several studies examining NEAC status after a  
98 dietary intervention have reported increasing NEAC plasma values with increasing  
99 dietary NEAC [17-20]. However, whether this relationship persists in people in a fasting  
100 state and not undergoing a dietary intervention remains unknown. Relatively few  
101 validation studies of dietary questionnaires comparing NEAC computed intakes with  
102 NEAC plasma levels have been conducted. In the study by Pellegrini et al [21] a food  
103 frequency questionnaire (FFQ) and a 3-D weighed food record (3DWR) were used to  
104 validate dietary NEAC estimates in blood samples of 285 men and women. A trivial  
105 association for dietary and plasma FRAP ( $r=0.13$  for the 3D-WR;  $r=0.17$  for the FFQ)  
106 was observed. In another study, dietary NEAC derived from a FFQ was compared  
107 against plasma NEAC in 108 women [22]. Positive correlations ( $r\sim 0.3$ ) were found  
108 between plasma and dietary NEAC for ORAC and TRAP, but not so for FRAP.

109 These studies considered the ORAC, TRAP, FRAP and TEAC-ABTS assays.  
110 Interestingly, none of these studies considered total polyphenols (Tp) assay in their  
111 analyses, which provides a measure of total reducing capacity in the event that it is  
112 assessed by the FolinCiocalteu reagent (FCR). The Tp assay is not perceived as being  
113 appropriate for the determination of the total phenolic content because the FCR can be  
114 reduced by many non-phenolic compounds (e.g. ascorbic acid, copper, iron, proteins,  
115 alanine, uric acid, etc.). This can be avoided if interfering species are removed  
116 beforehand, thereby providing a measure of the total reducing capacity [23-25].  
117 Our aim was to re-evaluate and compare the relationship between dietary and plasma  
118 NEAC by using a 24 hour recall (24-HR) and a validated FFQ. Both are dietary  
119 assessment methods suitable for our purpose, with both strengths and weaknesses  
120 [26,27]. For instance, FFQs account for dietary habits on a long-term but may  
121 underestimate the intake of fruits and vegetables due to recall bias and differing  
122 seasonal consumption patterns [26], whereas 24-HRs capture short-term diet and are  
123 subjected to less measurement error. Thus, in this study, the relationship between  
124 NEAC in diet and plasma was comparatively analyzed by dietary assessment method  
125 and NEAC plasma assay, also including the FCR assay.

126

127

## 128 **METHODS**

129

### 130 *Study design*

131 Cross-sectional study.

132

### 133 *Study population*

134 The study population comprised 22 men and 28 women, aged 23-62 years, residing in  
135 the Province of Granada (South of Spain). All were University of Granada employees  
136 and students of the Clinical Analysis School at the Faculty of Pharmacy. All agreed to  
137 participate and provided an informed consent. The study was approved by the  
138 Research Ethics Committee of the University of Granada.

139 *Blood samples and NEAC measurements*

140 Blood was drawn from the participants, who were at a fasting state of 12 hours, and  
141 collected in vacutainers containing EDTA-Na. Samples were centrifuged immediately at  
142 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C, and plasma was subsequently aliquoted in three  
143 microcentrifuge tubes and stored at -80°C until assay. Plasma NEAC was measured by  
144 means of the ORAC, FRAP and TEAC-ABTS high throughput assays, as described by  
145 Ou et al [8], Benzie and Strain [9] and Re et al [11], respectively. In order to remove the  
146 contribution of proteins to the ORAC assay, we added perchloric acid to precipitate  
147 them. Thus, ORAC without proteins was also measured [28]. Moreover, the FCR assay  
148 was used to measure Tp [24].

149 Two levels of diluted samples were introduced by triplicate in a 96-well microplate and  
150 analyzed using a FLUOstar Omega multimode microplate reader (BMG Labtech). Thus,  
151 analyses of each sample were performed in triplicates in the same assay. The reagents  
152 were introduced by apparatus (except for ORAC analyses). Mean values of the two  
153 dilutions were considered and the coefficients of variation obtained were 5.06%  
154 (ORAC), 6.61% (ORAC without proteins), 5.64% (Tp), 5.08% (FRAP), and 5.3%  
155 (TEAC-ABTS). We used the terms plasma ORAC, plasma ORAC without proteins,  
156 plasma Tp, plasma FRAP and plasma TEAC-ABTS to denote the different  
157 measurements performed in the plasma samples.

158 Uric acid was assessed using a standard method [29]. In sensitivity analyses we  
159 removed its contribution from the NEAC status by subtracting the double value of uric  
160 acid from FRAP (the stoichiometric factor of uric acid in the FRAP assay [9] is 2).

161

162

163 *Dietary assessment*

164 Two dietary assessment methods were used: a 24-HR and a FFQ. The 24-HR was  
165 administered through personal interviews at the day the blood sample was collected,  
166 along with a validated Spanish FFQ of 136 food items to collect information about the  
167 participant's dietary habits over the previous year [30]. To translate food composition  
168 into energy and nutrient intake we used the "NUTRIRE" software [31].

169 *Dietary NEAC*

170 For the dietary quantification of NEAC we used several sources of information on  
171 NEAC content in food: the USDA database for ORAC and for Tp [12], data of FRAP,  
172 TEAC-ABTS and TRAP analysed in Italian food [13, 14], and data of Norwegian  
173 analysed food to complete FRAP values not covered in the abovementioned data [15].  
174 NEAC was quantified separately for the dietary data derived from the FFQ and from the  
175 24-HR, so as to distinguish between NEAC-FFQ and NEAC-24-HR. For food items for  
176 which NEAC data were not available, the value of similar or comparable food was used  
177 (e.g. for chard we used the mean value of endives, leek, celery and spinach combined).  
178 When there were several possible matches for a food item, the mean value was  
179 assigned (e.g. for apple we used the mean value of golden delicious, red delicious, and  
180 granny smith combined). About 103 food items in our FFQ database were compiled  
181 with these databases (75.7% of all food items); 80 food items in the 24-HR database  
182 (58.8% of all food items).  
183 Since coffee is known to have a very high NEAC value due to its high content of total  
184 polyphenols, but also a poor bioavailability due to the high concentration of Maillard  
185 products that inhibit the absorption of polyphenol metabolites [32], we estimated total  
186 NEAC with and without the contribution of coffee's NEAC. We also estimated NEAC of  
187 different food groups: fruits & juices, vegetables, cereals, pulses, nuts, alcoholic  
188 beverages, tea, soft drinks, total fats and sweets. The contribution of their NEAC to the  
189 total NEAC of the diet (without the contribution of coffee) was computed as:  
190

191 
$$\% \text{ NEAC food group} = (\text{NEAC food group} * 100) / (\sum \text{ Total NEAC})$$

192 *Estimation of coffee NEAC by ORAC assay*

193 Owing to the lack of data on ORAC values for coffee, we measured ORAC in three  
194 different types of coffee (caffeinated espresso, decaffeinated espresso, and soluble  
195 coffee). All of them were prepared in 100 ml hot water solutions containing 14 g of  
196 coffee (2 g in the case of soluble coffee). A 96-wells microplate was used and 20 µl of  
197 different dilutions of coffee samples were mixed with 100 µl 7 mM fluorescein in 75 mM  
198 pH 7.4 phosphate buffer and completed with 75 µl 40 mM AAPH in phosphate buffer at  
199 37°C. Gain was monitored against a blank with 7mM fluorescein on a FLUOstar  
200 Omega multimode microplate reader (BMG Labtech) at 37°C. The 75 mM phosphate

201 buffer was used as blank and 25  $\mu$ M to 200  $\mu$ M Trolox were used as standards. The  
202 final ORAC values were calculated according to Ou et al [8] and were expressed as  
203 Trolox equivalents (TE)  $\mu$ mol/100ml. Three repetitions were performed for each type of  
204 coffee. The ORAC assay coefficients of variation of these measurements were 2.7%.  
205 ORAC values in these samples were: 21,900  $\mu$ molesTE/100ml for decaffeinated  
206 espresso, 20,500  $\mu$ molesTE/100ml for caffeinated espresso and 7,120  $\mu$ molesTE/100ml for  
207 soluble coffee.

208

209

210

211 *Other variables:*

212 Information on sex, age, smoking habit (smoker, former smoker and never smoker),  
213 alcohol drinking status (drinker and non-drinker), anthropometrics (self-reported height  
214 and weight), medical history (self-reported diabetes, cardiovascular disease, cancer)  
215 and use of supplements (yes, no) or medication (yes, no) was also collected through a  
216 self-administered questionnaire. The participants were also inquired about their daily  
217 physical activity to classify them as sedentary, light activity, active, very active. Total  
218 daily energy expenditure (TDEE) was estimated using the PAL method as proposed by  
219 The Institute of Medicine of the National Academies, Food and Nutrition Board [33].

220

221 *Statistical analysis*

222 We used descriptive statistics for categorical (frequencies) and continuous variables  
223 (means and standard deviations). Differences between variables were analysed using  
224 the Student's t test or non-parametric tests (the Wilcoxon test) for continuous variables,  
225 and the chi-square test for categorical variables.

226 Energy adjustment of dietary factors, including dietary NEAC, was performed by using  
227 the residual method, as proposed by Willet et al [34]. This adjustment is convenient  
228 given that high energy intake levels have been related to a lower plasma antioxidant  
229 capacity [35].

230 Geometric mean intakes, adjusted for age, sex and energy intake, were calculated  
231 using generalized linear regression models. Dietary and plasma NEAC variables were  
232 all transformed to their natural logarithm to approximate a normal distribution.

233 Spearman's correlation coefficients between dietary and plasma NEAC were calculated  
234 by NEAC assay and by dietary NEAC derived from the FFQ or 24-HR, with and without  
235 the contribution of NEAC from coffee. In addition, partial Spearman's rank correlation  
236 coefficients adjusted for age, sex (for analyses combining men and women) and energy  
237 intake were used to assess these correlations independently of the influence of these  
238 variables. The influence of smoking, obesity, physical activity and use of supplements  
239 on these relationships was examined in some subgroups (e.g. non-smokers, normal-  
240 weight and non-supplement users).  
241 All analyses were performed using Stata version 12.0 (Stata Corp., College Station, TX,  
242 USA). All statistical tests with p values 0.05 were deemed statistically significant.

243

244

## 245 **RESULTS**

246

247 Characteristics of the study population are shown in **Table 1**. The majority of the  
248 participants were nonsmokers and physically inactive. Men had overall a higher BMI  
249 than women ( $p=0.04$ ), although their total daily energy expenditure was higher  
250 ( $p<0.001$ ). Energy intake and intake of antioxidant nutrients did not significantly differ  
251 between men and women. There were also not any differences by sex with regard to  
252 dietary NEAC. Statistically significant differences in mean levels of plasma NEAC  
253 between men and women were observed for ORAC without proteins ( $p=0.02$ ) and for  
254 FRAP ( $p<0.001$ ).

255

256 The contribution of NEAC by food groups to the total dietary NEAC estimated through  
257 the FFQ or the 24HR data is shown in **Figure 1**. Fruit & juices, and vegetables were  
258 the major contributors to dietary NEAC in most FFQ-based estimates:  $ORAC_{\text{fruit\&juices}} =$   
259  $39.8\%$  and  $ORAC_{\text{vegetables}} = 21.1\%$ ;  $Tp_{\text{fruit\&juices}} = 39.1\%$  and  $Tp_{\text{vegetables}} = 17.3\%$ ;  
260  $FRAP_{\text{fruit\&juices}} = 32.2\%$  and  $FRAP_{\text{vegetables}} = 16.3\%$ ;  $TEAC-ABTS_{\text{fruit\&juices}} = 32.5\%$  and  
261  $TEAC-ABTS_{\text{cereals}} = 14.1\%$ . A similar pattern was observed for the 24-HR-based NEAC  
262 estimates:  $ORAC_{\text{fruit\&juices}} = 33.1\%$  and  $ORAC_{\text{vegetables}} = 26.0\%$ ;  $Tp_{\text{fruit\&juices}} = 28.8\%$  and  
263  $Tp_{\text{vegetables}} = 23.2\%$ ;  $FRAP_{\text{fruit\&juices}} = 35.7\%$  and  $FRAP_{\text{vegetables}} = 21.6\%$ ;  $TEAC-$   
264  $ABTS_{\text{fruit\&juices}} = 37.1\%$  and  $TEAC-ABTS_{\text{cereals}} = 20.0\%$ . The contribution of vegetables'

267 NEAC to the total NEAC dietary intake was overall higher in the 24-HR-based  
268 estimates when compared to the FFQ-based estimates.

269

270 Spearman's correlation coefficients between dietary and plasma NEAC are shown in  
271 **Table 2**. Statistically significant correlations were observed between dietary FFQ-based  
272 FRAP and plasma FRAP (with coffee:  $r=0.30$ ,  $p=0.04$ ; without coffee:  $r=0.31$ ,  $p=0.03$ );  
273 between dietary 24-HR-based ORAC and plasma ORAC without proteins (with coffee:  
274  $r=0.36$ ,  $p=0.01$ ; without coffee:  $r=0.31$ ,  $p=0.03$ ); and between dietary 24-HR-based  
275 FRAP and plasma FRAP (without coffee:  $r=0.30$ ,  $p=0.04$ ). Correlation coefficients  
276 between dietary FFQ-based FRAP and plasma FRAP remained statistically significant  
277 after adjustment for energy intake, sex and age (with coffee:  $r=0.39$ ,  $p=0.01$ ; without  
278 coffee:  $r=0.31$ ,  $p=0.03$ ). The same was true for dietary 24-HR-based  
279 FRAP and plasma FRAP (without coffee:  $r=0.30$ ,  $p=0.03$ ). Correlation coefficients also  
280 reached statistical significance for 24HR-based ORAC and plasma ORAC without  
281 proteins when the contribution of coffee was taken into consideration ( $r=0.35$ ,  $p=0.01$ ).  
282 We also observed statistically significant correlation coefficients ( $p<0.001$ ) between  
283 FFQ-based NEAC estimates and 24-HR-based NEAC estimates, which ranged from  
284 0.54 to 0.69 depending on the NEAC assay. Statistical significance remained after  
285 adjusting for energy intake, sex and age, with the correlation coefficients ranging from  
286 0.54 to 0.71. Correlation coefficients between non-uric FRAP plasma and dietary FRAP  
287 were similar in magnitude (data not shown).

288

289 In stratified analyses we observed similar dietary-plasma FRAP relationships in those  
290 being normal-weight ( $n=29$ ; e.g. FFQ-based  $r=0.31$ ,  $p=0.1$ ) or overweight/obese  
291 ( $n=21$ ), sedentary ( $n=36$ ; e.g. FFQ-based FRAP  $r=0.30$ ,  $p=0.1$ ) or physically active  
292 ( $n=14$ ), non-smokers ( $n=42$ ; FFQ-based  $r=0.26$ ,  $p=0.1$ ) or non-supplement users  
293 ( $n=48$ ; e.g. FFQ-based  $r=0.31$ ,  $p=0.03$ ). The relationships tended to be stronger in  
294 smokers ( $n=8$ ) but statistical significance was also not reached (data not shown).

295

296 Results of the correlation analysis by crossing pairs of dietary and plasma NEAC  
297 assays are shown in **Table 3**. Positive statistically significant correlation coefficients  
298 were observed between plasma FRAP and all dietary FFQ-based NEAC assays

299 (ORAC, Tp and TEAC-ABTS) ranging from 0.29 to 0.43, with and without the  
300 contribution of coffee. For 24-HR derived NEAC the correlation coefficients between  
301 plasma FRAP and each NEAC assay were of similar magnitude. Statistically significant  
302 correlations were not found for plasma ORAC, Tp or TEAC-ABTS when they were  
303 crossed with all dietary NEAC assays (data not shown), except for plasma ORAC and  
304 24-HR-based Tp with and without the contribution of coffee. We also observed  
305 correlations beyond 0.5 between ORAC and FRAP measured in blood plasma.

306

307 Correlation coefficients between dietary NEAC of selected food groups and plasma  
308 NEAC are shown in **Table 4**. Plasma FRAP showed borderline statistically significant  
309 correlations with FRAP<sub>vegetables</sub> when considering both the FFQ-based and the 24-HR-  
310 based estimates ( $r=0.28$ ,  $p=0.05$ ). These correlations weakened after adjustment for  
311 energy intake, sex and age in the FFQ-based ( $r=0.27$ ,  $p=0.06$ ), but not so in the 24-HR-  
312 based ( $r=0.29$ ,  $p=0.04$ ) estimates. ORAC<sub>vegetables</sub> derived from the 24-HR data showed a  
313 statistically significant correlation with plasma ORAC ( $r=0.30$ ,  $p=0.04$ ) in crude analyses  
314 only. The correlation between the FRAP<sub>fruits&juices</sub> 24-HR-based estimates and plasma  
315 FRAP reached statistical significance ( $r=0.30$ ,  $p=0.03$ ), and remained statistically  
316 significant after adjustment for energy intake, sex and age ( $r=0.29$ ,  $p=0.04$ ). In contrast,  
317 no statistically significant correlations were observed for the FFQ-based FRAP  
318 estimates. Plasma ORAC reached a weak correlation coefficient with ORAC<sub>nuts</sub> when  
319 considering the FFQ-based estimate ( $r=0.25$ ,  $p=0.08$ ) and the 24-HR-based estimates  
320 ( $r=0.26$ ,  $p=0.07$ ). Correlation analyses by food groups and between dietary NEAC  
321 estimates derived either from the FFQ or 24-RH data revealed higher energy-age and  
322 sex adjusted correlation coefficients for fruits & juices ( $r\sim 0.5$ ), followed by vegetables  
323 (ranging from  $r=0.33$  for ORAC to  $r=0.53$  for TEAC-ABTS) and alcoholic beverages  
324 ( $r=0.31$  for Tp).

325

326

327

328

## DISCUSSION

329

330 Results of the current study support that there is a moderately weak relationship  
331 between dietary FRAP (without the contribution of FRAP from coffee) and plasma  
332 FRAP in a healthy middle-aged study population of 50 men and women, regardless of  
333 the dietary assessment method used to estimate dietary FRAP (FFQ-based:  $r=0.31$ ,  
334  $p=0.03$ ; 24-HR-based:  $r=0.30$ ,  $p=0.04$ ). Dietary and plasma ORAC were also positively  
335 correlated in this study (e.g. 24HR-based:  $r=0.35$ ,  $p=0.01$ ). No statistically significant  
336 correlations were seen between dietary (without the contribution of coffee's NEAC) and  
337 plasma NEAC for the other NEAC assays. By food groups, FRAP from fruits & juices  
338 and FRAP from vegetables were the major contributors to the total dietary NEAC in this  
339 study population. As a consequence, correlations between the dietary NEAC estimates  
340 and plasma NEAC were higher in this food group ( $r\sim 0.5$ ).

341

342 Dietary NEAC has been proposed as a modulator of the antioxidant function in humans  
343 through the synergistic interplay of dietary antioxidants, yet it remains questionable  
344 whether dietary NEAC certainly reflects *in vivo* antioxidant status [7]. There has been  
345 therefore limited use of NEAC in epidemiological studies addressing antioxidants-  
346 disease relationships with regard to oxidative-stress related diseases, such as cancer.  
347 Thus, unraveling the physiologic relevance of dietary NEAC is crucial to gain  
348 knowledge on the role of dietary antioxidants in human health. Previous studies  
349 exploring the relationship between dietary and plasma NEAC have shown conflicting  
350 results (**Table 5**). For instance, Cao et al [18] observed a significant positive correlation  
351 between baseline fasting plasma ORAC levels and habitual daily intakes of total  
352 antioxidants from fruits & vegetables in 36 healthy men and women. They also reported  
353 an increase in plasma ORAC levels after an intervention of increasing fruit &  
354 vegetables consumption. Pellegrini et al [21] reported a weak correlation between  
355 dietary and plasma FRAP in an Italian study population of 285 healthy volunteers. In  
356 this study, the authors aimed to validate a FFQ for the assessment of dietary NEAC,  
357 using a 3-day dietary record as a referent. Correlation coefficients were of the same  
358 magnitude in both dietary questionnaires ( $r=0.17$  and  $0.13$ , respectively). No  
359 correlations were observed between any of the other FFQ-based dietary and plasma  
360 NEAC (TRAP and TEAC-ABTS). Rautiainen et al [22] also aimed to validate the  
361 assessment of dietary NEAC using plasma levels of NEAC in 108 Swedish women.

362 Two FFQs were used for this purpose: a 96-item FFQ for the validation study and a  
363 123-item FFQ for the reproducibility study. The authors observed significant positive  
364 correlations between plasma ORAC and the dietary ORAC estimate ( $r=0.27$ ). For  
365 dietary NEAC<sub>fruit&vegetables</sub> estimates positive correlations for ORAC and for TEAC were  
366 reported, but not so for FRAP. The relationship between dietary ORAC and plasma  
367 TEAC-ABTS was explored by Khalil et al [36] in another cross-sectional study including  
368 94 men and women from Montreal.

369 The authors did not observe any correlation between both the dietary (derived from a  
370 24-HR) and plasma NEAC. In our cross-comparison analyses, similar to that conducted  
371 by Khalil et al, we observed statistically significant correlations between plasma FRAP  
372 or plasma ORAC (without proteins) and the computed dietary NEAC estimates. Finally,  
373 Wang et al [37] observed in a study population comprised of 40 postmenopausal  
374 overweight women a positive modest correlation between dietary VCEAC and plasma  
375 VCEAC, which is a modified TEAC-ABTS assay that uses vitamin C instead of Trolox  
376 as reference antioxidant [38].

377 On the other hand, there are several intervention and cross-sectional studies exploring  
378 whether there is a relationship between an antioxidant-rich diet based on high fruits  
379 and vegetables consumption with plasma NEAC levels. These studies, however, did  
380 not consider dietary NEAC from fruits and vegetables for interpretation purposes. For  
381 example, Record et al [39] observed in a two weeks crossover intervention study,  
382 conducted in 25 male non-smokers, that consumption of five to seven servings of fruits  
383 and vegetables per day, equivalent in antioxidant intake to 30 g of a spray-dried  
384 supplements, increased plasma levels of ascorbic acid,  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene and  
385 lutein+zeaxanthin, but not that of lycopene, retinol and tocopherol. Despite these  
386 increases in the concentrations of antioxidant nutrients, plasma NEAC measured with  
387 the TEAC-ABTS assay was not significantly affected either by the dietary intervention  
388 or by the timing of the blood sampling (fasting or post-prandial). In another intervention  
389 study conducted in 43 healthy non-smokers it was reported that fasting or postprandial  
390 plasma NEAC status was not significantly affected in the fruits & vegetable or  
391 supplement intervention groups [17]. On the contrary, other studies do not support  
392 these findings. For instance, Pitsavos et al [40] reported that plasma NEAC measured  
393 with a colorimetric test was positively correlated with the consumption of olive oil, fruits

394 and vegetables in 3,042 men and women participating in the ATTICA study. Within the  
395 PREDIMED study, statistically significant differences were observed in plasma NEAC  
396 levels (TEAC-ABTS) between the control group and the two intervention groups  
397 (Mediterranean diet + virgin olive or nuts) after 3-year dietary intervention (evaluated in  
398 n=187 participants) [19], and plasma FRAP levels as well as plasma TRAP levels  
399 increased in both the Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil intervention  
400 group and the Mediterranean diet supplemented with nuts intervention group after a 1-  
401 year dietary intervention (evaluated in n=564 participants) [41]. Another Mediterranean-  
402 type dietary intervention study conducted during 2-months also showed increased  
403 plasma NEAC levels (ORAC) in the intervention group (n=46 abdominal obese  
404 subjects) when compared to the control group (n=44) [42]. A meta-analysis of eighty-  
405 eight intervention studies also supports that the consumption of plant-based food and  
406 beverages increases the plasma antioxidant potential [43]. The effect of intake of  
407 macronutrients on NEAC status has been examined in 156 apparently healthy  
408 individuals. According to the results reported in this study, a lower daily caloric intake is  
409 related to higher NEAC (TEAC-ABTS) levels in plasma [44], supporting the fact that  
410 energy metabolism is an important source of oxidative stress [35].  
411 Thus, most of the studies reported no significant correlations between dietary and  
412 plasma NEAC. Only the studies by Cao et al [18], Pellegrini et al [21], Rautiainen et al  
413 [22], Khalil et al [36], Wang et al [37] and our study have observed weak to moderate  
414 statistically significant correlations between FRAP or ORAC estimated in the diet and in  
415 plasma samples. This moderately strong correlation between dietary and plasma  
416 NEAC may indicate that NEAC's dietary contribution to the NEAC *in vivo* status is  
417 almost irrelevant for a variety of reasons: 1) plasma NEAC might be influenced by  
418 different physiological regulation processes such as absorption, endogenous  
419 antioxidants, stress, pollution, inflammation, etc. [21,22,35,39,42]; 2) NEAC might be  
420 influenced by the different bioavailability of the antioxidant compounds, e.g. flavonoids  
421 which are present in millimolar concentration in food matrixes and in nanomolar or even  
422 less in plasma [45]; 3) the assays available to measure plasma NEAC do not only  
423 measure exogenous antioxidant compounds, but also other antioxidants found in  
424 human plasma that contribute importantly to the NEAC (contribution to ORAC: uric acid  
425 36.9%, protein-SH 31.5%, and 23.1% other unidentified compounds; contribution to

426 FRAP: uric acid 60%, vitamin C 15%, and 10% unidentified compounds; contribution to  
427 TEAC-ABTS: protein-SH contributes 52.9% and uric acid 33.1%; and contribution to  
428 TRAP: uric acid contributes 42.9%, unidentified compounds 35.1%, and protein-SH  
429 16.3%) [7]. Moreover, the majority of these NEAC assays are performed in aqueous  
430 solutions so that hydrophobic antioxidants or insoluble antioxidants may be under-  
431 estimated [7]. In addition, some NEAC assays do not totally account for the NEAC  
432 measure, as for example total phenol using FCR, owing to the fact that it does not  
433 solely react with phenols but also with proteins, thiols and many vitamin derivatives [25];  
434 4) dietary intake in the study population could be too homogeneous meaning that the  
435 range of antioxidant intake was not wide enough to observe an association.  
436 Our study population met the dietary reference intakes published by the Institute of  
437 Medicine (IOM) [46], with relatively high intakes of vitamin A (2691 µg Eq/day) and  
438 vitamin C (273 mg/day). However, intakes of vitamin E were under the  
439 recommendations (6.25 mg Eq/day). According to dietary NEAC values, NEAC mean  
440 intakes in our study population sample were higher than those found in the Spanish  
441 population for ORAC [47], and higher than those set as antioxidant dietary estimate  
442 needs established by Prior et al [35] (4.61 mmol TE/1000 Kcal). Our dietary NEAC  
443 intakes were also higher than those reported in a Spanish population for FRAP, TEAC-  
444 ABTS and Tp assays [48], and also higher to those reported by Agudo et al for TEAC-  
445 ABTS, FRAP and ORAC in the Spanish European Prospective Investigation into  
446 Cancer and Nutrition cohort [49].

447

448

449 Some strengths of our study support the reliability of our results. First, blood samples  
450 were collected after fasting state of 12h to estimate NEAC levels in plasma at baseline.  
451 Second, we used several NEAC assays to account for different antioxidant  
452 mechanisms [7]. This allowed us to perform a cross-comparison between dietary and  
453 plasma NEAC assays, to comprehensively explore this NEAC dietary-plasma and  
454 plasma-plasma relationships. The existence of statistically significant correlations in  
455 these pair-wise analyses by NEAC assay could be attributable to uric acid, as well as to  
456 vitamin C, vitamin E or other unidentified compounds. Indeed, uric acid, followed by  
457 vitamin C and vitamin E have been reported to contribute to a great extent to FRAP

458 and ORAC [7]. Given that the non-uric FRAP and ORAC correlations were virtually the  
459 same, it is conceivable that the contribution of uric acid to these relations is of a lesser  
460 extent. The same is true for the non-uric plasma and dietary FRAP relations. Third, we  
461 used two dietary assessment methods to collect dietary intake information. Both FFQ  
462 and 24-HR have advantages and limitations [50,51], but the information derived from  
463 them can be complementary. For instance, seasonal intakes of fruits and vegetables  
464 are less efficiently collected with FFQ due to recall bias, while 24-HR capture more  
465 accurately fruits and vegetables consumption. Although this is a well-known drawback  
466 of FFQs [52,53], their use in epidemiological studies is supported by the fact that they  
467 provide a reliable measure of habitual dietary intake. According to our results, dietary  
468 NEAC data derived from the FFQ or 24-HR were highly correlated with each other and  
469 there were almost negligible differences between both dietary assessment methods in  
470 terms of their correlation between dietary and plasma NEAC. Fourth, we accounted for  
471 dietary NEAC without the contribution of NEAC from coffee. Maillard products produced  
472 during the roasting process of coffee are the main contributors to the in vitro antioxidant  
473 capacity of coffee, but they also seem to impede the absorption of antioxidants in vivo,  
474 meaning that an important amount of antioxidants are non-absorbable [54,55].  
475 Furthermore, caffeic acid is the most abundant phenolic compound found in coffee  
476 brew. However, after its esterification into chlorogenic acid, its absorption is markedly  
477 reduced [32]. Hydrolysis of chlorogenic acid by colonic microbial esterases in the  
478 gastrointestinal tract may lead to some free or conjugated phenolic compounds in  
479 human plasma, but to what degree is not clear yet [56]. Coffee's NEAC can therefore  
480 confuse the total dietary NEAC estimates, whereas this does not apply to other  
481 phenolic-rich foods, such as tea and wine. Therefore, we considered both total dietary  
482 NEAC and NEAC without the contribution of coffee's NEAC. To the best of our  
483 knowledge, there is no published value of ORAC content in coffee. We therefore  
484 measured ORAC of different coffee brews so as to estimate dietary ORAC without the  
485 contribution of coffee's NEAC.

486 Our study also has several limitations. Our study had a small sample size., Although it  
487 was sufficient to detect correlation coefficients for the variables under study higher than  
488 0.2, we had limited statistical power to perform analyses by variables that may have  
489 influenced our results (BMI, physical activity and smoking status). The databases

490 available to quantify NEAC intake are based on American [12] and Italian [13,14] foods.  
491 Hence, given that the antioxidant content of foods can vary with the geographic location  
492 and growing conditions, different results could have been obtained if we had used  
493 NEAC values obtained from laboratory analyses of foods produced in Spain [57]. This  
494 fact would not change the individual consumption of each participant neither the  
495 differences between them. Our results are derived from a cross-sectional study with a  
496 single blood sample collection and a single measurement of plasma NEAC, which may  
497 not reflect a person's long-term NEAC status. However, a previous study by Al-Delaimy  
498 et al [58] reported that several biomarkers of antioxidant intake including FRAP can be  
499 considered to be sufficiently reliable and stable over time.

500

501 In conclusion, our study supports that short-term and long-term assessed dietary FRAP  
502 and ORAC is moderately correlated with plasma NEAC , supporting that dietary NEAC  
503 may provide a reliable measure of antioxidant status despite its weak *in vivo* potential.  
504 Further studies should confirm these findings in greater study populations, taking into  
505 consideration the contribution of polyphenols, vitamin C and vitamin E to NEAC.

506

507 **Declaration of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

508

509

510 **Acknowledgments:** The authors thank the volunteers who made the study possible  
511 through their participation and collaboration. This paper and results presented  
512 constitute part of the CJ Carrión-García's Doctoral Thesis performed in the Nutrition  
513 and Food Science Doctorate Program of the University of Granada. This study was  
514 supported by a grant from Health Research Fund (FIS) of the Spanish Ministry of  
515 Health (PI12/00002), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF).

**516 Tables:**

517

518 **Table 1:** Socio-demographic characteristics of the study population by sex and  
519 according to NEAC (dietary and plasma) values.

520

521 **Table 2:** Correlation coefficients between dietary NEAC (derived from the FFQ and the  
522 R-24H) and plasma NEAC.

523

524 **Table 3:** Correlation coefficients between dietary and plasma NEAC in cross-  
525 comparison analyses.

526

527 **Table 4:** Correlation coefficients between dietary NEAC (derived from the FFQ and 24-  
528 HR) and plasma NEAC by food groups.

529

530 **Table 5:** Comparison of Studies which analyze correlations between dietary NEAC and  
531 plasma NEAC.

532

**533 Caption of figures:**

534 **Fig.1** Percentage contribution of food groups to NEAC intake (without the contribution  
535 of coffee's NEAC) derived from both dietary questionnaires.

536 AFFQ

537 B24-HR

538

## 541 REFERENCES

542

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidant in normal physiological function and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44–84
2. Wang X, Ouyang YY, Liu J, Zhu MM, Zhao G, Bao W, Hu FB (2014) Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ* 349:g4490. doi:10.1136/bmj.g4490
3. Carter P, Gray LJ, Troughton J, Khunti K, Davies MJ (2010) Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 341:c4229. doi:10.1136/bmj.c4229
4. O’Shea N, Arendt EK, Gallagher E (2012) Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innov Food Sci Emerg Technol* 16:1–10. doi:10.1016/j.ifset.2012.06.002
5. Schieber A, Stintzing FC, Carle R (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends Food Sci Technol* 12(11):401–413
6. Serafini M, Jakszyn P, Luján-Barroso L, Agudo A, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJB, Jenab M, Navarro C, Palli D, Boeing H, Wallström P, Regnér S, Numans ME, Carneiro F, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Grioni S, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Quirós JR, Molina-Montes E, Huerta Castaño JM, Barricarte A, Amiano P, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Key TJ, Jeurnink SM, Peeters PHM, Bamia C, Valanou E, Trichopoulou A, Kaaks R, Lukanova A, Bergmann MM, Lindkvist B, Stenling R, Johansson I, Dahm CC, Overvad K, Jensen M, Olsen A, Tjønneland A, Lund E, Rinaldi S, Michaud D, Mouw T, Riboli E, González CA (2012) Dietary total antioxidant capacity and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer* 131(4):E544–E554. doi:10.1002/ijc.27347
7. Bartosz G (2010) Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 44(7):711–720. doi:10.3109/10715761003758114
8. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RI (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49(10):4619–4626. doi:10.1021/jf010586o
9. Benzie IFF, Strain JJ (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299:15–57
10. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1995) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med* 18(1):29–36
11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9–10):1231–1237
12. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2010) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, release 2. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>. Accessed May 2010
13. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* 133(9):2812–2819
14. Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F (2006) Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Mol Nutr Food Res* 50(11):1030–1038

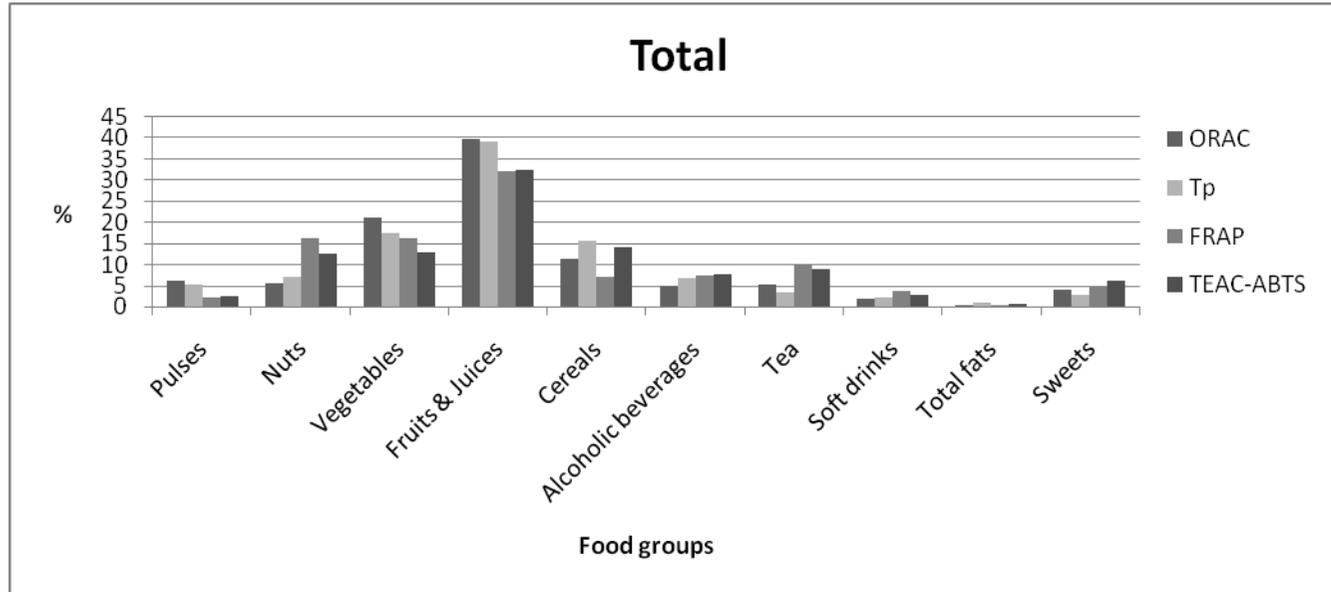
15. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C, Barikmo I, Berhe N, Willett WC, Phillips KM, Jacobs DR, Blomhoff R (2010) The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 9:3. doi:[10.1186/1475-2891-9-3](https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3)
16. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, Blomhoff R (2006) Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* 84(1):95–135
17. Dragsted L, Pedersen A, Hermetter A, Basu S, Hansen M, Haren GR, Kall M, Breinholt V, Castenmiller JJM, Stagsted J, Jokobsen J, Skibsted L, Rasmussen SE, Loft S, Sandstöm B (2004) The 6 day study: effects of fruits and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidant defence in healthy smokers. *Am J Clin Nutr* 79(6):1060–1072
18. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL (1998) Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 68(5):1081–1087
19. Razquin C, Martínez JA, Martínez-González MA, Mitjavila MT, Estruch R, Martí A (2009) A 3-y followup of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight. *Eur J Clin Nutr* 63(12):1387–1393. doi:[10.1038/ejcn.2009.106](https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.106)
20. Tulipani S, Álvarez-Suárez JM, Busco F, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2011) Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food Chem* 128(1):180–186. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.03.025](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.025)
21. Pellegrini N, Salvatore S, Valtueña S, Bedogni G, Porrini M, Pala V, Del Río D, Sieri S, Miglio C, Krogh V, Zavaroni I, Brighenti F (2007) Development and validation of a food frequency questionnaire for the assessment of dietary total antioxidant capacity. *J Nutr* 137(1):93–98
22. Rautiainen S, Serafini M, Morgenstern R, Prior RL, Wolk A (2008) The validity and reproducibility of food-frequency questionnaire-based total antioxidant capacity estimates in Swedish women. *Am J Clin Nutr* 87(5):1247–1253
23. Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53(10):4290–4302. doi:[10.1021/jf0502698](https://doi.org/10.1021/jf0502698)
24. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152–178. doi:[10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
25. Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53(6):1841–1856. doi:[10.1021/jf030723c](https://doi.org/10.1021/jf030723c)
26. Cade JE, Burley VJ, Wam DL, Thompson RL, Margetts BM (2004) Food-frequency questionnaires: a review of their design, validation and utilisation. *Nutr Res Rev* 17(1):5–22. doi:[10.1079/NRR200370](https://doi.org/10.1079/NRR200370)
27. Kipnis V, Midthune D, Freedman L, Bingham S, Day NE, Riboli E, Ferrari P, Carroll RJ (2002) Bias in dietary-report instruments and its implications for nutritional epidemiology. *Public Health Nutr* 5(6a):915–923. doi:[10.1079/PHN2002383](https://doi.org/10.1079/PHN2002383)
28. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and foods samples. *J Agric Food Chem* 51(11):3273–3279. doi:[10.1021/jf0262256](https://doi.org/10.1021/jf0262256)
29. Fossati P, Prencipe P, Berti G (1980) Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid-4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric-acid in serum and urine. *Clin Chem* 26(2):227–231

30. De la Fuente-Arrillaga C, Vázquez Ruíz Z, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martínez-González MA (2010) Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutrition* 13(9):1364–1372. doi:[10.1017/S1368980009993065](https://doi.org/10.1017/S1368980009993065)
31. Ruíz López MD, Artacho Martín-Lagos R (2013) Assessment program diets. Teaching innovation projects 2006 and 2013. University of Granada. <http://farmacia.ugr.es/mdruiz2013/index.php>. Accessed Nov 2014
32. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131(1):66–71
33. Institute of Medicine of the National Academies, Food and Nutrition Board: dietary reference intakes: for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (2005) Washington DC. The National Academies Press, Chapter 5, pp 107–264. [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id 10490&page R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id 10490&page R1). Accessed Feb 2015
34. Willet WC, Howe GR, Kushi L (1997) Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 65(4 Suppl):1220S–1228S
35. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, Cook RA (2007) Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *J Am Coll Nutr* 26(2):170–181
36. Khalil A, Gaudreau P, Cherki M, Wagner R, Tessier DM, Fulop T, Shatenstein B (2011) Antioxidant-rich food intakes and their association with blood total antioxidant status and vitamin C and E levels in community-dwelling seniors from the Quebec longitudinal study NuAge. *Exp Gerontol* 46(6):475–481. doi:[10.1016/j.exger.2011.02.002](https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.02.002)
37. Wang Y, Yang M, Lee SG, Davis CG, Kenny A, Koo SI, Chun OK (2012) Plasma total antioxidant capacity is associated with dietary intake and plasma level of antioxidants in postmenopausal women. *J Nutr Biochem* 23(12):1725–1731. doi:[10.1016/j.nutbio.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.nutbio.2011.12.004)
38. Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50(13):3713–3717. doi:[10.1021/jf0200071c](https://doi.org/10.1021/jf0200071c)
39. Record IR, Dreosti IE, McInerney JK (2001) Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with and antioxidant mixture. *Br J Nutr* 85(4):459–464. doi:[10.1079/BJN2000292](https://doi.org/10.1079/BJN2000292)
40. Pitsavos C, Panagiotakos BP, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, Stefanidis C (2005) Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 82(3):694–699
41. Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Fiol M, Lapetra J, Arós F, Covas MI, Andrés-Lacueva C (2013) Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23(12):1167–1174. doi:[10.1016/j.numecd.2012.12.008](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.12.008)
42. Kolomvotsou AI, Rallidis LS, Mountzouris KC, Lekakis J, Koutelidakis A, Efstathiou S, NanaAnastasiou M, Zampelas A (2013) Adherence to Mediterranean diet and close dietetic supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. *Eur J Nutr* 52(1):37–48. doi:[10.1007/s00394-011-0283-3](https://doi.org/10.1007/s00394-011-0283-3)
43. Lettieri-Barbato D, Tomei F, Sancini A, Morabito G, Serafini M (2013) Effect of plant foods and beverages on plasma non-enzymatic antioxidant capacity in human subjects: a meta-analysis. *Br J Nutr* 109(9):1544–1556. doi:[10.1017/S0007114513000263](https://doi.org/10.1017/S0007114513000263)
44. Ferreira-Barbosa KB, Pinheiro-Volp AC, Marques-Rocha JL, Rocha-Ribeiro SM, Navarro-Blasco I, Zulet MA, Martínez JA, Bressan J (2014) Low energy and carbohydrate intake associated with higher total antioxidant capacity in apparently healthy adults. *Nutrition* 30(11–12):1349–1354. doi:[10.1016/j.nut.2014.03.031](https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.031)
45. Erlund I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources,

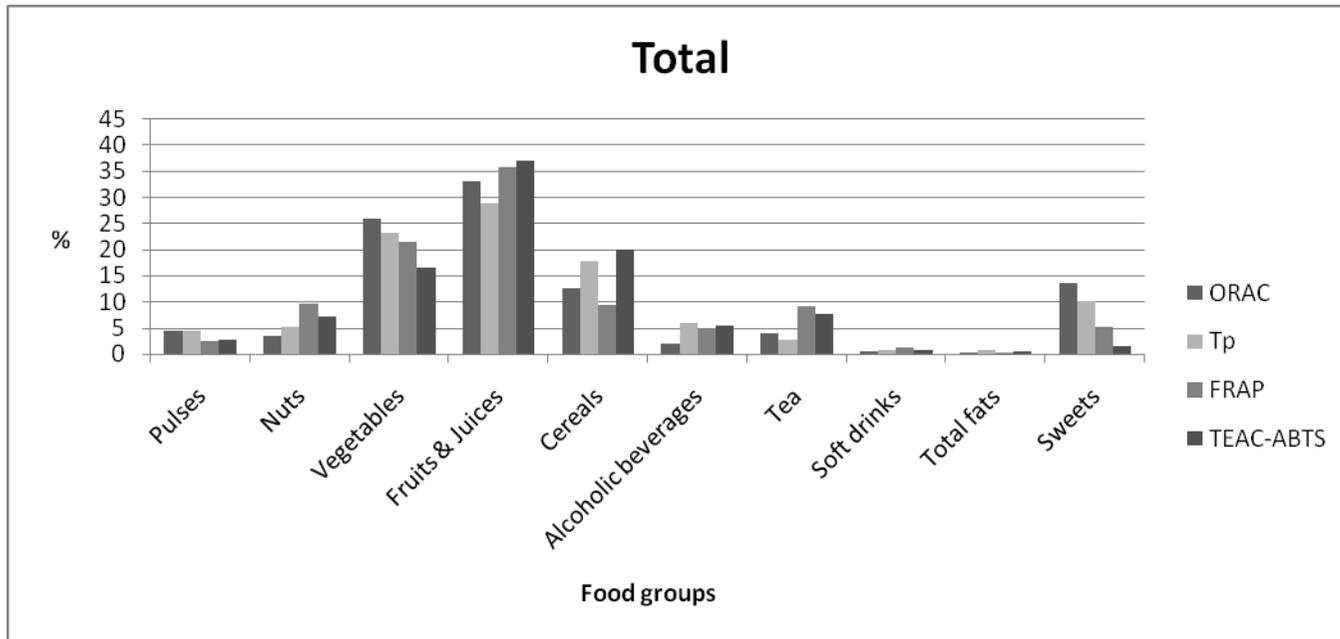
- bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 24(10):851–874. doi:[10.1016/j.nutres.2004.07.005](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005)
46. The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, Institute of Medicine (2010) Dietary reference intakes tables and application. IOP Publishing Physics Web. <http://iom.national-academies.org/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>. Accessed Jan 2015
  47. Martínez-Álvarez J, Izquierdo-Pulido M (2005) La capacidad antioxidante de la dieta española, la “rueda de los alimentos” antioxidantes [The antioxidant capacity of the Spanish diet, the “food wheel”]. Madrid: Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación, pp 1–24. [http://www.nutricion.org/recursos\\_y\\_utilidades/PDF/Instrucciones\\_Rueda\\_Antiox.pdf](http://www.nutricion.org/recursos_y_utilidades/PDF/Instrucciones_Rueda_Antiox.pdf). Accessed 7 Jan 2015
  48. Saura-Calixto F, Goñi I (2006) Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem* 94(3):442–447. doi:[10.1016/j.foodchem.2004.11.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.033)
  49. Agudo A, Cabrera L, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Berenguer T, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Jakšzyn P, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, Quirós JR, Sánchez MJ, Tormo MJ, González CA (2007) Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPICSpain). *Am J Clin Nutr* 85(6):1634–1642
  50. Pérez C, Aranceta J, Salvador G, Varela-Moreiras G (2015) Food frequency questionnaires. *Nutr Hosp* 31(Suppl 3):49–56. doi:[10.3305/nh.2015.31.sup3.8751](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup3.8751)
  51. Salvador G, Serra-Majem L, Ribas-Barba L (2015) What and how much do we eat? 24-hour dietary recall method. *Nutr Hosp* 31(Suppl 3):46–48. doi:[10.3305/nh.2015.31.sup3.8750](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup3.8750)
  52. Michels KB, Welch AA, Luben R, Bingham SA, Day NE (2005) Measurement of fruit and vegetable consumption with diet questionnaires and implications for analyses and interpretation. *Am J Epidemiol* 161(10):987–994. doi:[10.1093/aje/kwi115](https://doi.org/10.1093/aje/kwi115)
  53. Marks GC, Hughes MC, van der Pols JC (2006) Relative validity of food intake estimates using a food frequency questionnaire is associated with sex, age, and other personal characteristics. *J Nutr* 136(2):459–465
  54. Delgado-Andrade C, Morales FJ (2005) Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 53:1403–1407
  55. Morales FJ, Somoza V, Fogliano V (2012) Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* 42(4):1097–1109
  56. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl):230S–242S
  57. Prior RL, Gu L (2005) Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66(18):2264–2280. doi:[10.1016/j.phytochem.2005.03.025](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.025)
  58. Al-Delaimy WK, Jansen EHJM, Peeters PHM, van der Laan JD, van Noord PAH, Boshuizen HC, van der Schouw YT, Jenab M, Ferrari P, Bueno de Mesquita HB (2006) Reliability of biomarkers for iron status, blood lipids, oxidative stress, vitamin D, C-reactive protein and fructosamine in two Dutch cohorts. *Biomarkers* 11(4):370–382. doi:[10.1080/13547500600799748](https://doi.org/10.1080/13547500600799748)
  59. Cao G, Sofic E, Prior RL (1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 44:3426–3431
  60. Wang H, Cao G, Prior RL (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44:701–705
  61. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 52:4026–4037
  62. Sánchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL (2003) Anthocyanin and proanthocyanidin content in

- selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J Agric Food Chem* 51:4889–4896
63. Chun OK, Chung S, Song W (2007) Estimated dietary flavonoid intakes and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137:1244–1252
  64. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Song WO, Fernandez ML, Bruno RS, Koo SI, Chun OK (2010) Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *Int J Food Sci Nutr* 61(6):600–623

Fig 1



A. FFQ



B. 24-HR

**Table 1:** Socio-demographic characteristics of the study population by sex and according to NEAC (dietary and plasma) values.

Variables	All (n=50)		Men (n=22)	Women (n=28)	p-value <sup>4</sup>
	Mean (SD)		Mean (SD)	Mean (SD)	
Age	40.5 (12.4)		43.5 (10.7)	38.2 (13.4)	0.07
BMI	24.5 (3.66)		25.7 (2.61)	23.6 (4.11)	0.04
TDEE <sup>1</sup> (Kcal/day)	2,402 (506)		2,860 (367)	2,042 (232)	<0.001
	N (%)		N (%)	N (%)	
Smoking status					
Never smoker	42 (84.0)		21 (95.4)	21 (75.0)	0.05
Current smoker	8 (16.0)		1 (4.6)	7 (25.0)	
Physical activity					
Sedentary	36 (72.0)		13 (59.1)	23 (82.1)	0.07
Active	14 (28.0)		9 (40.9)	5 (17.9)	
Alcohol status					
Non-drinker	8 (16.0)		4 (18.2)	4 (14.3)	0.83
Drinker	42 (84.0)		18 (81.8)	24 (85.7)	
<b>Dietary characteristics<sup>2</sup></b>	<b>Mean (SD)</b>	<b>G. Mean (SD)<sup>3</sup></b>	<b>Mean (SD)</b>	<b>Mean (SD)</b>	
Energy intake (Kcal/day)	2,022 (539)	2,153 (275)	2,009 (615)	2,032 (483)	0.88
Dietary fiber (g/day)	25.3 (10.2)	14.0 (2.60)	22.9 (7.91)	27.2 (11.5)	0.21
Vitamin E (mgEq/day)	6.25 (2.81)	4.95 (1.65)	5.86 (2.03)	6.55 (3.30)	0.70
Vitamin C (mg/day)	273 (149)	126 (47.6)	237 (123)	300 (163)	0.18
Vitamin A (µgEq/day)	2,691 (1551)	1,586 (599)	2,681 (1352)	2,699 (1715)	0.86
Magnesium (mg/day)	328 (107)	210 (28.6)	297 (93.4)	352 (112)	0.07
Iron (mg/day)	13.4 (4.05)	11.3 (1.28)	12.8 (3.92)	13.9 (4.16)	0.45
Selenium (µg/day)	96.1 (42.7)	113 (34.2)	95.4 (37.1)	96.6 (47.3)	0.84
Zinc (mg/day)	11.6 (4.37)	14.2 (2.88)	10.8 (3.81)	12.3 (4.73)	0.45
<b>Dietary NEAC derived from FFQ</b>					
ORAC <sub>total</sub> (µmolTE/day)	28,505 (15,925)	10,190 (2,512)	29,369 (16,052)	27,825 (16,087)	0.76
ORAC <sub>without coffee</sub> (µmolTE/day)	17,954 (8,766)	7,788 (2,411)	18,148 (7,968)	17,801 (9,487)	0.61
Tp <sub>total</sub> (mgGAE/day)	1,906 (839)	855 (160)	1,916 (753)	1,898 (915)	0.77
Tp <sub>without coffee</sub> (mgGAE/day)	1,730 (782)	818 (159)	1,727 (651)	1,732 (883)	0.61
FRAP <sub>total</sub> (µmol FeSO <sub>4</sub> /day)	19,978 (11,732)	6,701 (1,747)	19,388 (10,497)	20,442 (12,790)	0.91
FRAP <sub>without coffee</sub> (µmol FeSO <sub>4</sub> /day)	13,419 (9,076)	5,432 (1,491)	12,329 (5,750)	14,276 (11,048)	0.91
TEAC-ABTS <sub>total</sub> (µmol TE/day)	7,100 (3,874)	2,792 (680)	7,159 (3,589)	7,055 (4,149)	0.82
TEAC-ABTS <sub>without coffee</sub> (µmol TE/day)	5,246 (3,153)	2,436 (661)	5,163 (2,368)	5,311 (3,697)	0.64
<b>Dietary NEAC derived from 24-HR</b>					
ORAC <sub>total</sub> (µmolTE/day)	22,877 (14,759)	7,449 (3,003)	25,004 (12,883)	21,205 (16,114)	0.58
ORAC <sub>without coffee</sub> (µmolTE/day)	15,253 (8,768)	6,278 (3,776)	16,811 (8,486)	14,030 (8,943)	0.24
Tp <sub>total</sub> (mgGAE/day)	1,466 (832)	722 (273)	1,608 (746)	1,355 (892)	0.12
Tp <sub>without coffee</sub> (mgGAE/day)	1,336 (788)	775 (351)	1,468 (722)	1,233 (835)	0.12
FRAP <sub>total</sub> (µmol FeSO <sub>4</sub> /day)	13,971 (10,446)	3,370 (1,467)	14,481 (8,319)	13,570 (11,993)	0.47
FRAP <sub>without coffee</sub> (µmol FeSO <sub>4</sub> /day)	9,572 (7,336)	3,065 (1,355)	9,525 (5,349)	9,609 (8,684)	0.27
TEAC-ABTS <sub>total</sub> (µmol TE/day)	5,083 (3,538)	1,226 (485)	5,330 (3,118)	4,890 (3,882)	0.43
TEAC-ABTS <sub>without coffee</sub> (µmol TE/day)	3,828 (2,694)	1,052 (392)	3,921 (2,334)	3,755 (2,986)	0.45
<b>Plasma NEAC</b>					
ORAC (µmol TE/L)	21,271 (2,695)	20,010 (1,455)	21,291 (2,785)	21,256 (2,673)	0.96
ORAC <sub>without proteins</sub> (µmol TE/L)	2,223 (329)	2,081 (181)	2,353 (354)	2,121 (273)	0.02
Tp (mg GAE/L)	1,685 (153)	1,595 (82.1)	1,652 (149)	1,711 (153)	0.17
FRAP (µmol FeSO <sub>4</sub> /L)	1,701 (211)	1,644 (82.1)	1,824 (194)	1,604 (171)	<0.001
TEAC-ABTS (µmoles TE/L)	8,669 (1,071)	9,317 (483)	8,670 (867)	8,669 (1,224)	0.10

<sup>1</sup>Total Daily Energy Expenditure

<sup>2</sup>Dietary data was derived from the FFQ.

<sup>3</sup>Geometric means were obtained using generalized linear models adjusted for age, sex and energy intake.

<sup>4</sup>Statistical differences by sex: Student's t-test and Wilcoxon's tests for continuous variables, and chi-square test for categorical variables.

**Table 2:** Correlation coefficients between dietary NEAC (derived from the FFQ and the R-24H) and plasma NEAC.

Variables	rho <sup>1</sup>	rho <sup>2</sup>	rho <sup>3</sup>
<b>Dietary NEAC from FFQ – Plasma NEAC</b>			
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.11	0.10	0.10
ORAC without coffee (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.04	0.03	0.03
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.21	0.27	0.27
ORAC without coffee (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.08	0.12	0.12
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.21	0.15	0.15
Tp without coffee (mg GAE /day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.16	0.11	0.11
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.30*	0.39*	0.39*
FRAP without coffee (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.31*	0.31*	0.31*
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.06	0.12	0.12
TEAC-ABTS without coffee (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	-0.01	0.09	0.09
<b>Dietary NEAC from 24-HR – Plasma NEAC</b>			
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.18	0.16	0.16
ORAC without coffee (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.25	0.15	0.15
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.36*	0.35*	0.35*
ORAC without coffee (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.31*	0.27	0.27
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.01	-0.03	-0.03
Tp without coffee (mg GAE /day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.03	-0.03	-0.03
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.26	0.28	0.28
FRAP without coffee (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.30*	0.30*	0.30*
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.12	0.07	0.07
TEAC-ABTS without coffee (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.23	0.14	0.14
<b>Dietary NEAC from FFQ – Dietary NEAC from 24-HR</b>			
ORAC FFQ (μmolTE/day) – ORAC 24-HR (μmol TE/day)	0.69**	0.67**	0.67**
ORAC without coffee FFQ(μmolTE/day) – ORAC without coffee 24-HR (μmol TE/day)	0.61**	0.71**	0.71**
Tp FFQ (mg GAE/day) – Tp 24-HR (mg GAE/day)	0.64**	0.69**	0.69**
Tp FFQ without coffee (mg GAE /day) – Tp 24-HR without coffee (mg GAE/day)	0.60**	0.70**	0.70**
FRAP FFQ (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – FRAP 24-HR (μmol FeSO <sub>4</sub> /day)	0.62**	0.57**	0.57**
FRAP FFQ without coffee (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – FRAP 24-HR without (μmol FeSO <sub>4</sub> /day)	0.56**	0.62**	0.62**
TEAC-ABTS FFQ (μmolTE/day) – TEAC-ABTS 24-HR (μmol TE/day)	0.62**	0.60**	0.60**
TEAC-ABTS FFQ without coffee (μmolTE/day) – TEAC-ABTS 24-HR without coffee (μmol TE/day)	0.54**	0.54**	0.54**

<sup>1</sup>Crude non-parametric Spearman correlation

<sup>2</sup>Partial correlation adjusted for energy intake (Kcal/day)

<sup>3</sup>Partial correlation additionally adjusted for: sex, age (years)

\* Positive significant correlation coefficients (p<0.05); \*\* Positive significant correlation coefficients (p<0.001)

**Table 3.** Correlation coefficients between dietary and plasma NEAC in cross-comparison analyses.

	$\rho^1$	$\rho^2$	$\rho^1$	$\rho^2$
<b>Dietary NEAC assays from FFQ variables</b>				
		<b>Plasma ORAC without proteins</b>		<b>Plasma FRAP</b>
ORAC without coffee	-	-	0.31*	0.37*
TP	0.18	0.28	0.34*	0.39*
TP without coffee	0.18	0.26	0.34*	0.41**
FRAP	0.21	0.27	-	-
FRAP without coffee	0.08	0.08	-	-
TEAC-ABTS	0.20	0.28	0.34*	0.43**
TEAC-ABTS without coffee	0.11	0.13	0.35*	0.39*
<b>Dietary NEAC assays from 24-HR</b>				
ORAC	-	-	0.42*	0.43*
ORAC without coffee	-	-	0.34*	0.40*
TP	0.40**	0.32*	0.39*	0.43**
TP without coffee	0.39*	0.29*	0.37*	0.43**
FRAP	0.29*	0.27	-	-
FRAP without coffee	0.30*	0.21	-	-
TEAC-ABTS	0.33*	0.27	0.28	0.29*
TEAC-ABTS without coffee	0.32*	0.21	0.25	0.26
<b>Plasma NEAC</b>				
ORAC without proteins	-	-	0.52**	0.52**
TP	-0.25	-0.25	0.06	0.06
FRAP	0.52**	0.52**	-	-
TEAC-ABTS	0.11	0.11	-0.04	-0.04

<sup>1</sup> Crude non-parametric Spearman correlation

<sup>2</sup> Partial correlation adjusted for energy intake (Kcal/day), sex and age (years)

\* Positive significant correlation coefficients ( $p < 0.05$ ); \*\* Positive significant correlation coefficients ( $p < 0.001$ )

**Table 4:** Correlation coefficients between dietary NEAC (derived from the FFQ and 24-HR) and plasma NEAC by food groups.

Variables	FRUITS & JUICES	VEGETABLE S	CEREALS	BEVERAGES	ALCOHOLIC
<b>Dietary NEAC from FFQ – Plasma NEAC (crude)</b>					
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	-0.01	0.04	0.12	0.27	-0.02
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.03	0.04	-0.05	-0.11	0.23
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.10	0.15	0.03	-0.02	-0.09
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.14	0.28*	-0.03	-0.06	0.10
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.03	-0.16	-0.03	0.01	-0.07
<b>Dietary NEAC from FFQ – Plasma NEAC (adjusted)</b>					
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	-0.01	0.03	0.14	0.25	-0.04
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.10	0.07	0.08	-0.01	0.24
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.09	0.15	-0.03	-0.07	-0.14
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.13	0.27	0.03	-0.03	0.09
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.12	-0.13	0.05	0.04	-0.01
<b>Dietary NEAC from 24-HR food groups – Plasma NEAC (crude)</b>					
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.19	0.29*	0.07	-0.01	-0.01
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.15	0.20	0.24	0.04	0.07
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.15	0.07	-0.13	-0.11	0.04
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.30*	0.28*	-0.10	0.07	0.08
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.19	0.03	0.08	0.07	0.02
<b>Dietary NEAC from 24-HR food groups – Plasma NEAC (adjusted)</b>					
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC (μmol TE/L)	0.23	0.25	-0.14	0.26	-0.22
ORAC (μmolTE/day) – Plasma ORAC without proteins (μmol TE/L)	0.18	0.15	0.06	0.25	-0.22
Tp (mg GAE/day) – Plasma Tp (mg GAE/L)	0.19	0.09	-0.17	-0.03	0.04
FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /day) – Plasma FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /L)	0.29*	0.29*	-0.10	0.05	0.03
TEAC-ABTS (μmolTE/day) – Plasma TEAC-ABTS (μmol TE/L)	0.21	0.03	0.01	0.16	-0.07
<b>Dietary NEAC from FFQ food groups – Dietary NEAC from R-24H food groups (crude)</b>					
ORAC FFQ(μmolTE/day) – Dietary ORAC R-24H (μmol TE/day)	0.54**	0.38*	0.01	0.08	0.35*
Tp FFQ (mg GAE/day) – Dietary Tp R-24H(mg GAE/day)	0.53**	0.36*	0.17	0.08	0.53**
FRAP FFQ(μmol FeSO <sub>4</sub> /day) –Dietary FRAP R-24H(μmol FeSO <sub>4</sub> /day)	0.53**	0.52**	0.07	0.15	0.43*
TEAC-ABTS FFQ (μmolTE/day) – Dietary TEAC-ABTS R-24H (μmol TE/day)	0.51**	0.54**	0.32*	0.12	0.46**
<b>Dietary NEAC from FFQ food groups – Dietary NEAC from R-24H food groups (adjusted)</b>					
ORAC FFQ(μmolTE/day) – Dietary ORAC R-24H (μmol TE/day)	0.48*	0.33*	-0.04	0.18	0.06
Tp FFQ (mg GAE/day) – Dietary Tp R-24H(mg GAE/day)	0.51*	0.35*	0.10	0.12	0.31*
FRAP FFQ(μmol FeSO <sub>4</sub> /day) –Dietary FRAP R-24H(μmol FeSO <sub>4</sub> /day)	0.51*	0.50**	0.13	0.13	0.14
TEAC-ABTS FFQ (μmolTE/day) – Dietary TEAC-ABTS R-24H (μmol TE/day)	0.47*	0.53**	0.07	0.13	0.17

Partial correlation adjusted for energy intake (Kcal/day), sex and age (years)

\* Positive significant correlation coefficients (p<0.05); \*\* Positive significant correlation coefficients (p<0.001)

**Table 5:** Comparison of studies which analyze correlations between dietary NEAC and plasma NEAC.

REFERENCE	STUDY POPULATION	STUDY DESIGN	NEAC ASSAYS		NEAC DATA BASES	DIETARY NEAC RANGE	PLASMA NEAC RANGE	RESULTS (rho and p-value)
			DIETARY	PLASMA				
Current study	50 healthy men and women.  Dietary assessment: Food Frequency Questionnaire (FFQ) and 24 hour recall (24-HR)	Cross-sectional study	ORAC Tp FRAP TEAC-ABTS	ORAC ORAC without <sup>1</sup> proteins Tp FRAP TEAC-ABTS	Pellegrini et al, 2003; Pellegrini et al, 2006; USDA 2007 USDA 2010 Carlsen et al, 2010	FFQ-based <sup>2,3</sup> : ORAC: 7,788±2,411 µmolTE/day Tp: 818±159 mgGAE/day FRAP: 5,432±1,491 µmol FeSO <sub>4</sub> /day TEAC-ABTS: 2436±661 µmolTE/day  24-HR-based <sup>2,3</sup> : ORAC: 6278±3776 µmolTE/day Tp: 775±351 mgGAE/day FRAP: 3,065±1,355 µmol FeSO <sub>4</sub> /day TEAC-ABTS: 1,052±392 µmolTE/day	ORAC <sup>2</sup> : 20,010±1,455 µmolTE/L ORAC w/o <sup>2</sup> : 2,081±181 µmolTE/L Tp <sup>2</sup> : 1,595±82.1 mgGAE/L FRAP <sup>2</sup> : 1,644±82.1 µmol FeSO <sub>4</sub> /L TEAC-ABTS <sup>2</sup> : 9,317±483 µmolTE/L	FFQ-ORAC & Plasma-ORAC (r=0.03 p=0.82) <sup>3,4</sup> 24-HR-ORAC & Plasma-ORAC (r=0.15 p=0.30) <sup>3,4</sup> FFQ-ORAC & Plasma-ORAC w/o <sup>1</sup> (r=0.12 p=0.39) <sup>3,4</sup> 24-HR-ORAC & Plasma-ORAC w/o <sup>1</sup> (r=0.27 p=0.06) FFQ-Tp & Plasma-Tp (r=0.11 p=0.43) <sup>3,4</sup> 24-HR-Tp & Plasma-Tp (r=-0.03 p=0.83) <sup>3,4</sup> FFQ-FRAP & Plasma-FRAP (r=0.31 p=0.03) <sup>3,4</sup> 24-HR-FRAP & Plasma-FRAP (r=0.30 p=0.03) <sup>3,4</sup> FFQ-TEAC-ABTS & Plasma- TEAC-ABTS (r=0.09 p=0.52) 24-HR-TEAC-ABTS & Plasma- TEAC-ABTS (r=0.14 p=0.32)
Cao et al, 1998	18 healthy young subjects (men and women) and 18 healthy old subjects (men and women)  Dietary assessment: not specified	Intervention study	ORAC	ORAC without proteins	Cao et al, 1996 Wang et al, 1997	Old men 1910±460 µmolTE/day Old women 1640±250 µmolTE/day Young men 1420±180 µmolTE/day Young women 1740±580 µmolTE/day	Old men 612.7±24.4 µmolTE/L Old women 587.0±41.1 µmolTE/L Young men 635.3±33.3 µmolTE/L Young women 545.8±41.5 µmolTE/L	Plasma ORAC and total antioxidant fruits & vegetables of the previous year (r= 0.44 p=0.011)
Pellegrini et al, 2007	285 healthy men and women (workers of a food company)  Dietary assessment: Food Frequency Questionnaire (FFQ) and 3-d weighed food record (3D-WR)	Cross-sectional study	TEAC-ABTS TRAP FRAP	TEAC-ABTS FRAP	Pellegrini et al, 2003 Pellegrini et al, 2006	FFQ-based: TEAC: 1900-33800 µmol TE/d TRAP: 2300-43400 µmol TE/d FRAP: 5700-89800 µmol Fe <sup>2</sup> /d  3D-WR: TEAC: 1300-13900 µmol TE/d TRAP: 1400-17400 µmol TE/d FRAP: 4100-37500 µmol Fe <sup>2</sup> /d	TEAC: 119-1337 µmol TE/L FRAP: 575-1634 µmol Fe <sup>2</sup> /L	FFQ-TEAC & Plasma TEAC (r=0.11 p=0.07) 3D-WR-TEAC & Plasma TEAC (r=0.046 p=0.44) FFQ-FRAP & Plasma FRAP (r=0.17 p=0.008) 3D-WR-FRAP & Plasma FRAP (r=0.13 p=0.04)

Rautiainen et al, 2008	108 Swedish women Dietary assessment: Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Cross-sectional study	ORAC TRAP FRAP	ORAC TRAP FRAP	Prior et al, 2003 Wu et al, 2004 Sánchez Moreno et al, 2003 Pellegrini et al, 2003 Pellegrini et al, 2006 Halvorsen et al, 2006	FFQ-based: FFQ-ORAC <sup>TOTAL</sup> : 12127±6180 µmol TE/d FFQ-TRAP <sup>TOTAL</sup> : 3165±1659 µmol TE/d FFQ-FRAP <sup>TOTAL</sup> : 2793±1622 µmol Fe <sup>2</sup> /d	ORAC <sup>whole</sup> : (6092-16967) µmol TE/L ORAC <sup>lipophilic</sup> : (219-1091) µmol TE/L ORAC <sup>hydrophilic</sup> : (806-2055) µmol TE/L TRAP: (859-1566) µmol TE/L FRAP: (592-1216) µmol Fe <sup>2</sup> /L	Plasma ORAC <sup>whole</sup> & FFQ-based ORAC <sup>total</sup> r=0.27 (0.06, 0.46). Plasma ORAC <sup>lipophilic</sup> & FFQ-based ORAC <sup>total</sup> r=0.27 (0.06, 0.46) Plasma ORAC <sup>hydrophilic</sup> & FFQ- based <sup>total</sup> r=-0.01 (-1.35, 1.33) Plasma TRAP & FFQ-based TRAP <sup>total</sup> r=0.18 (-0.03, 0.37) Plasma FRAP & FFQ-based FRAP <sup>total</sup> r= 0.07 (-0.15, 0.30)
Khalil et al, 2011	94 men and women from Montreal Dietary assessment: 24 hour recall	Cross-sectional study	ORAC	TEAC	USDA 2007	24-h recalls: Men 10196±6021 µmol TE/d Women 12931±7140 µmol TE/d	Men 9970±1070 µmol TE/L Women 9500±850 µmol TE/L	Daily ORAC values from 24-h recalls & Plasma TEAC assay All (r=0.14, p=0.17) Men (r=0.11, p=0.45) Women (r=0.33, p=0.03)
Wang et al, 2012	40 postmenopausal overweight women Dietary assessment: not specified	Cross-sectional study	VCEAC	VCEAC FRAP ORAC	Chun et al, 2007 Floegel et al, 2010	Low TAC group (347- 732) <sup>2,5</sup> (357-805) <sup>2,6</sup> mg VCE/d High TAC group (497- 1048) <sup>2,5</sup> (452-1020) <sup>2,6</sup> mg VCE/d	Low TAC group (264-296) <sup>2</sup> mg VCE/L High TAC group (298- 379) <sup>2</sup> mg VCE/L	Plasma VCEAC & TAC VCEAC p<0.01 <sup>5</sup> p<0.05 <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Without proteins

<sup>2</sup> Geometric means (±SD)

<sup>3</sup> Without coffee's NEAC contribution

<sup>4</sup> Partial correlations adjusted for energy intake (Kcal/day), sex and age (years)

<sup>5</sup> Adjusted for total energy intake

<sup>6</sup> Adjusted for age, BMI, ethnicity and total energy intake (Kcal/day)

# INDICIOS DE CALIDAD DE LA PUBLICACIÓN

Home > Journal Profile

## EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION

ISSN: 1436-6207  
 eISSN: 1436-6215  
 SPRINGER HEIDELBERG  
 TIERGARTENSTRASSE 17, D-69121 HEIDELBERG, GERMANY  
 GERMANY (FED REP GER)

TITLES  
 ISO: Eur. J. Nutr.  
 JCR Abbrev: EUR J NUTR

LANGUAGES  
 English

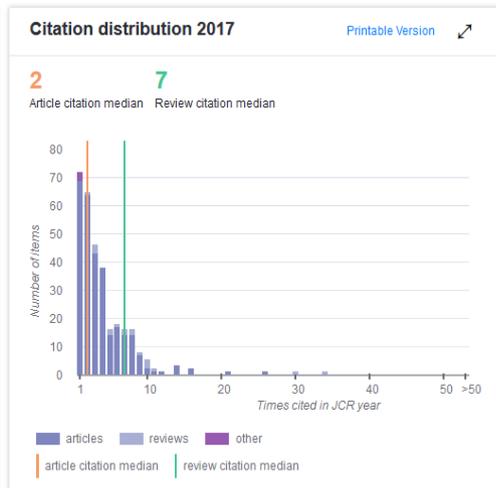
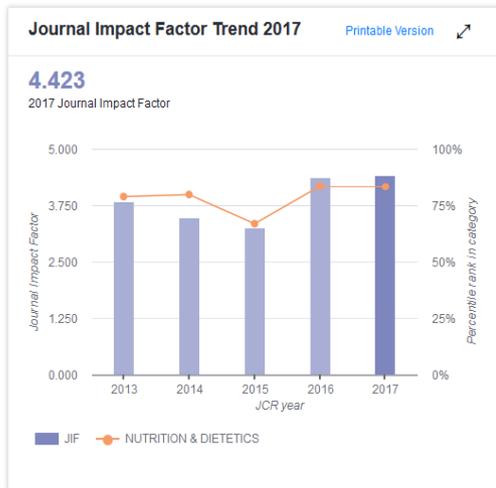
PUBLICATION FREQUENCY  
 8 issues/year

[Go to Journal Table of Contents](#) | [Go to Ulrich's](#) | [Printable Version](#)

[View Title Changes](#)  
 CATEGORIES  
 NUTRITION & DIETETICS - SCIE

Current Year **2017** All Years

The data in the two graphs below and in the Journal Impact Factor calculation panels represent citation activity in 2017 to items published in the journal in the prior two years. They detail the components of the Journal Impact Factor. Use the "All Years" tab to access key metrics and additional data for the current year and all prior years for this journal.



### Journal Impact Factor Calculation

$$2017 \text{ Journal Impact Factor} = \frac{1,632}{369} = 4.423$$

Date Submitted 18-Nov-2019

### Journal Impact Factor contributing items

[Show all](#)

[Citable items in 2016 and 2015 \(369\)](#) | Citations in 2017 (1,632)

Source data | Box plot | **Rank** | Cited Journal Data | Citing Journal Data | [Click here to view Journal Relationships](#) | [Author Dashboard](#)

### Rank

#### JCR Impact Factor

JCR Year	NUTRITION & DIETETICS		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2018	14/87	Q1	84.483
2017	14/83	Q1	83.735
2016	14/81	Q1	83.333
2015	27/80	Q2	66.875
2014	16/77	Q1	79.870

# PUBLICACIÓN EN REVISIÓN

---

## Submission Confirmation

 Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to** Molecular Nutrition and Food Research

**Manuscript ID** mnfr.201901177

**Title** Plasma non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) in relation to dietary NEAC, nutrient antioxidants and inflammation-related biomarkers

**Authors** Carrión-García, Cayetano  
Guerra-Hernandez, Eduardo  
García-Villanova, Belén  
Sánchez, María  
Amiano, Pilar  
Molina-Montes, Esther

**Date Submitted** 18-Nov-2019

---

[Author Dashboard](#) ▶