



Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Agricultura i Pesca

4

Quaderns d'Investigació

Obtenció d'un producte comercialitzable amb propietats antioxidants a partir del germen de garroff

Dr.^a Antònia Llobera Balle
Dr. Jaume Cafellas Mut



**Obtenció d'un producte
comercialitzable amb
 propietats antioxidants a
partir del germen de garroff**

Autors:

**Dra. Antònia Llobera Balle
Dr. Jaume Cañellas Mut**



Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Agricultura i Pesca

*Aquest projecte d'investigació ha estat
subvencionat per la Conselleria d'Agricultura
i Pesca del Govern de les Illes Balears.*

*La part experimental s'ha realitzat en els
laboratoris del Departament de Química i
dels Serveis Científicotècnics de la Universitat
de les Illes Balears.*

EDITA:
Conselleria d'Agricultura i Pesca

IMPRIMEIX: Gràfiques Rubines

Dipòsit Legal: PM 489-2007

ISBN: 978-84-606-4181-0

ÍNDEX

1. Objectius del projecte	7
2. Descripció del fruit	8
3. Obtenció de les mostres	11
4. Composició i característiques del producte	13
5. Antioxidants	16
5.1. Definició i classificació	16
5.2. Paper dels antioxidants en el procés d'oxidació	17
5.3. Fonts naturals dels antioxidants	21
6. Metodologia per a l'estudi de les propietats antioxidants	24
6.1. Extracció i determinació dels polifenols totals	24
6.2. Determinació dels flavan-3-ols: catequines i proantocianidines	26
6.3. Mètode de determinació de l'activitat antioxidant	30
6.4. Determinació de la capacitat antioxidant del germen de la garrova	31
7. Anàlisi dels gèrmens de la garrova per HPLC	35
7.1. Comparació dels gèrmens de la garrova per HPLC	36
7.2. Comparació dels extractes dels gèrmens de garroí per HPLC	41
8. Conclusions	44
9. Annex	46
10. Bibliografia	48

1. OBJECTIUS DEL PROJECTE

Els objectius del projecte d'investigació aplicada objecte d'estudi són els següents:

1. Obtenció d'un producte d'alt valor nutritiu amb elevades propietats antioxidants a partir del germen de garrofi, comercialitzable, per tal de contribuir a l'augment del preu de la garrova, producte molt important dins l'economia agrícola de les Illes Balears.
2. Comparació entre les propietats del germen obtingut pel mètode habitual de separació de la resta de la llavor (àcid sulfúric concentrat) amb l'obtingut per un altre mètode mecànic, no contaminant i, per tant, sense impacte ambiental.

2. DESCRIPCIÓ DEL FRUIT

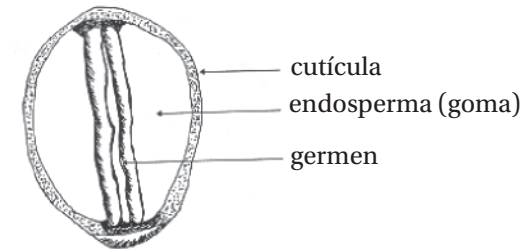
La garrova és el fruit del garrover (*Ceratonia siliqua L.*) que és un arbre de fulla perenne de la família de les lleguminoses, característic del mediterrani, resistent a la sequera i als terrenys calcaris i tolerant a la salinitat, raons que el fan molt idoni per a ser cultivat a les Illes.

La garrova és de color marró obscur, llustrosa i de pes (5-30 g) i mida variable segons la varietat i les condicions de creixement. En alguns casos, la mida arriba als 25 cm de llarg i als 4 cm d'ample. Té forma de beina corbada, com una banya, i els costats són aplanats i estan endinsats i arrugats.

La garrova està formada per una part carnososa, denominada polpa, que correspon al mesocarp i representa un 90% del total del fruit. Tallant la garrova paral·lelament al costat pla, apareixen una sèrie de buits ovalats que contenen una llavor arrodonida (coneguda amb el nom de garrofi), marró o vermell fosc, llustrosa d'uns 9 mm de llargària. Cada garrova conté varies llavors que suposen el 10% del seu pes total.



El garrofi està format per tres elements diferenciats: cutícula (30-33% del pes de la llavor), endosperma (42-46%) i germen (23-25%). Una secció transversal del garrofi és la següent:



El gran valor comercial de la garrova ve donat per l'elevada cotització de la goma de garrofi que es treu de l'endosperma. És un polisacàrid format per una combinació de mannosa i galactosa que té unes excel·lents propietats com a espessidor, estabilitzant, emulsionant i gelificant, a la vegada que no dona als productes als que s'hi incorpora ni color, ni gust, ni olors estranys. A les Illes s'obté i comercialitza goma de garrofi amb alts nivells d'acceptació i elevada capacitat exportadora.

La resta de la llavor i la pròpia polpa (parlam del 95% del total del fruit) són considerats subproductes i tenen una valoració econòmica molt escassa. Qualsevol intent per revalorar el fruit ha de passar per trobar noves aplicacions i sortides comercials a la resta de la garrova.

Actualment, la polpa es destina majoritàriament a alimentació animal bé per consum directe o com a ingredient per a pinsos. L'elevada presència de sucres a la polpa (40-50% de sucres solubles) possibilita l'extracció dels mateixos per a l'obtenció dels sucres components o de xarops. Existeix també la possibilitat d'aprofitar-los per a l'obtenció de alcohol. També resulta interessant l'ús en forma de farina torrada en l'elaboració de productes alimentaris. Aquesta farina, adientment torrada, és un bon substitut del cacau en l'elaboració de xocolata i pastissos. De fet, l'igual que ocorre amb el garrofi a Mallorca s'obtenen i comercialitzen productes substitutius de cacau fets amb polpa de garrova.

El germen sol ser utilitzat com a ingredient per a pinsos correctors concentrats. El germen té unes característiques nutritives molt bones que el fan idoni per a l'alimentació humana, concretament en preparats dietètics i de règim. Si a aquestes característiques s'hi pogués afegir un elevat poder antioxidant s'obriria un mercat per a ella actualment molt en voga.

3. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

La llavor forma una unitat molt compacta, amb una superfície exterior molt dura i impermeable capaç de preservar el producte de tot tipus d'agents exteriors. És precisament aquesta cutícula exterior la que s'ha de trencar per poder accedir a l'interior on s'hi troba la goma (endosperma) i el germen.

Per tal d'obtenir la separació del germen i l'endosperma de la cutícula exterior, així com poder separar aquests dos components entre si, existeixen dues opcions diferenciades:

1. Per via química. Tractament de la llavor amb àcid sulfúric concentrat per aconseguir ablanir la pell exterior, seguit d'un procés de pelat. A continuació s'aplica un procés mecànic de trossejat que permet separar el germen de l'endosperma en base a la gran diferència de friabilitat que tenen. L'endosperma (goma de garrofi) queda en forma d'escames, fines i planes, mentre que el germen queda granulat. Un cop separats, mitjançant les corresponents malles, es procedeix a la trituració del germen fins a obtenir un granulat fi (< 80 micres). El color que té és groguenc pàl·lid. L'anomenarem **germen (a)**.
2. Un procés de tractament tèrmic de la llavor perquè la pell es trenqui cercant temps baixos d'aplicació per evitar afectar la viscositat de la goma. La temperatura cal que no superi els 130°C perquè d'aquesta manera, conjuntat amb el baix temps, es minimitzen les pèrdues texturals de la goma. Seguidament, es produeix la ruptura del producte mitjançant un procés mecànic que el romp en funció de la seva friabilitat. S'acaba amb un procés de separació/decantació mitjançant unes malles dotades d'uns moviments vibratoris que separa el producte en funció de la mida i la densitat. Un cop separats es procedeix a la trituració del germen fins a la mida desitjada. Interessa tenir un granulat fi, capaç de poder ser mesclat directament amb altres ingredients (< 2 mm). Aquest germen presenta un color groc pàl·lid amb miques fosques. L'anomenarem **germen (t)**.



germen (a)



germen (t)

Aquests dos processos són els que actualment s'utilitzen industrialment per separar la goma de garroí (producte principal) del germen. Per tant suposa que, en el cas de resultar d'interès l'obtenció d'antioxidants a partir del germen de la garrova, ja es disposa d'aquests productes de partida sense cap necessitat de costos addicionals. Aquests dos productes han estat subministrats per l'empresa alimcarat S.L.

4. COMPOSICIÓ I CARACTERÍSTIQUES DEL PRODUCTE

Les característiques del producte final obtingut per aquests dos procediments són diferents. El tractament per via química, més agressiu, aconseguix finalment una separació més completa de les distintes parts del producte, mentre que la separació tèrmico-mecànica dona com a resultat que el germen tingui restes de goma i de la cutícula exterior.

Aquesta diferència fa que la composició presenti diferències d'una certa importància com es pot veure a la Taula 1 de composició general dels dos tipus de germen.

Taula 1. Rang de valors obtinguts per a cada tipus de germen. (valors màxims i mínims de 7 mostres diferents)

	Germen (a) (g/100 g de germen)	Germen (t) (g/100 g de germen)
<i>Humitat</i>	6,0-9,1	6,0-8,8
<i>Proteïna</i>	44,2-51,5	30,4-38,9
<i>Sucres solubles</i>	5,8-7	5,0-6,2
<i>Lípids</i>	5,6-7,3	4,9-6,1
<i>Cendres</i>	5,8-6,8	5,7-6,6
<i>Pectines solubles</i>	1,0-2,1	1,3-2,6
<i>Goma (galactomannans)</i>	0,4-1,2	1,0-2,9
<i>NDF (fibra)</i>	21,6-25,6	29,5-35,5
<i>Polifenols solubles</i>	0,9-1,6	1,4-2,3
<i>Polifenols condensats</i>	0,4-0,7	1,5-2,8

Els mètodes usats per a la determinació de la composició general són els descrits a l'annex.

Per a realitzar el present estudi s'ha escollit una mostra de cada tipus de germen que pugui ser considerada com a mostra representativa respecte a la quantitat de proteïna, per ésser aquest paràmetre el més significatiu a l'hora d'establir els valors comercials. La composició d'aquestes mostres es troba a la Taula 2.

Taula 2. Valors obtinguts per a les mostres representatives de cada tipus de germen.

	Germen (a) (g/100 g de germen)	Germen (t)
Humitat	6,8	6,0
Proteïna	47,9	36,9
Sucres solubles	6,8	5,5
Lípids	6,8	5,2
Cendres	5,6	5,8
Pectines solubles	1,4	1,6
Goma	0,4	1,8
NDF (fibra)	22,5	30,2
Polifenols solubles	1,1	2,0
Polifenols condensats	0,5	2,8

És de destacar l'elevat contingut en proteïna que tenen ambdós gèrmens de garrofi. Això fa que tinguin una especial rellevància nutritiva per poder ser utilitzats en el camp de l'alimentació. No obstant, hi ha diferències significatives entre la proteïna dels dos tipus de germen, derivades del diferent grau de separació obtingut en funció del mètode.

Observant la taula, també es troben diferències significatives en la composició d'altres components com és el cas dels sucres i lípids. Aquests són inferiors pel cas de la mostra tèrmica-mecànica respecte a la mostra obtinguda per via àcida.

Per altra banda, la mostra tèrmica- mecànica té continguts clarament superiors de fibra i de polifenols, tan solubles com condensats, aportats particularment per la presència de cutícula exterior. Aquest darrer factor tal vegada podrà influir en les característiques i poder antioxidant d'ambdós productes.

Donada la importància quantitativa i qualitativa de la proteïna, s'ha considerat oportú quantificar els aminoàcids components de la mateixa (Taula 3).

De la Taula 3 és de destacar que si bé les diferències absolutes de la fracció proteica són diferents, fet que naturalment es veu reflectit en el contingut d'aminoàcids referits als 100 g de germen, la composició de la proteïna (%) és prou semblant en ambdós casos. És de destacar l'alt contingut en aminoàcids essencials que confereix a aquesta proteïna un alt valor nutritiu. A més a més, ambdós gèrmens es caracteritzen per l'elevat contingut en àcid glutàmic (superior al 27% de la proteïna).

Taula 3. Aminoàcids de les proteïnes dels dos tipus de germen.

	Germen (a)		Germen (t)	
	mg/100 g germen	% proteïna	mg/100 g germen	% proteïna
Treonina	1798	3,9	1249	3,5
Cisteïna	711	1,5	538	1,5
Valina	1847	4,0	1407	4,0
Metionina	231	0,5	141	0,4
Isoleucina	1521	3,3	1020	2,9
Leucina	2818	6,1	2246	6,4
Tirosina	1413	3,1	1127	3,2
Fenilalanina	1452	3,1	1157	3,3
Lisina	2513	5,4	1873	5,3
Histidina	1654	3,6	1319	3,7
Arginina	5232	11,3	3994	11,3
Aspàrtic, àc.	3324	7,2	2517	7,1
Glutàmic, àc.	13060	28,2	9643	27,3
Hidroxiprolina	44	0,1	24	0,1
Prolina	1775	3,8	1415	4,0
Serina	2738	5,9	2183	6,2
Glicina	2318	5,0	1958	5,6
Alanina	1840	4,0	1467	4,2
Total	46289	100,0	35278	100,0

5. ANTIOXIDANTS

5.1. Definició i classificació

Els antioxidants són compostos que inhibeixen o retarden el procés d'oxidació d'altres molècules. Per conveniència, els antioxidants tradicionalment s'han dividit en dues classes, primaris o antioxidants trenca-cadenes i secundaris o antioxidants preventius (Jadhav, S.J., 1996). Els antioxidants primaris, AH, quan estan en petites quantitats, poden retardar o inhibir l'inici del procés d'oxidació. Els secundaris o preventius (Frankel, E.N., 2000) són compostos que retarden la velocitat d'oxidació.

Segons la seva procedència, també hi ha dues categories bàsiques d'antioxidants: els sintètics i els naturals. En general, els antioxidants sintètics són compostos amb estructures fenòliques—anell aromàtic amb un grup hidroxílic com a mínim— que tenen diversos graus de substitució alquílica. Des de principis del segle XX es venen usant els antioxidants sintètics, com el BHA (hidroxianisol butilat) i el BHT (hidroxitoluè butilat), dins la indústria d'aliments i estan inclosos dins la dieta humana.

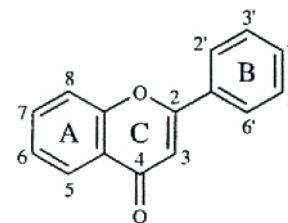
L'ús dels antioxidants naturals ha estat promogut pels seus efectes positius sobre la salut i, també, a causa de la preocupació de que alguns antioxidants sintètics poden tenir efectes secundaris no desitjables (Chen, Q., 1992) (Williams, G.M., 1999) (Iverson, F., 1999).

En els darrers anys s'ha centrat l'interès en cercar alternatives naturals, com per exemple biofenols de plantes, que tenguin una activitat antioxidant similar o fins i tot superior als antioxidants sintètics i l'estudi dels antioxidants naturals ha augmentat de manera considerable (Wanasundara, 1994) (Velioglu, Y.S., 1998) (Beutner, S., 2001).

La majoria dels antioxidants naturals s'obtenen a partir de plantes i són majorment compostos fenòlics o polifenòlics. Els antioxidants naturals més comuns són flavonoids, derivats de l'àcid hidroxicinnàmic, tocoferols (vitamina E) i àcids fenòlics.

Els flavonoids són compostos orgànics heterocíclics (fenilcromones) i estan caracteritzats estructuralment per tenir dos anells aromàtics amb

distints grups hidroxil, A i B, units per una cadena de tres àtoms de carboni que poden formar, o no, un tercer anell, C. Un dels grups hidroxílics està, molt sovint, unit a un sucre.



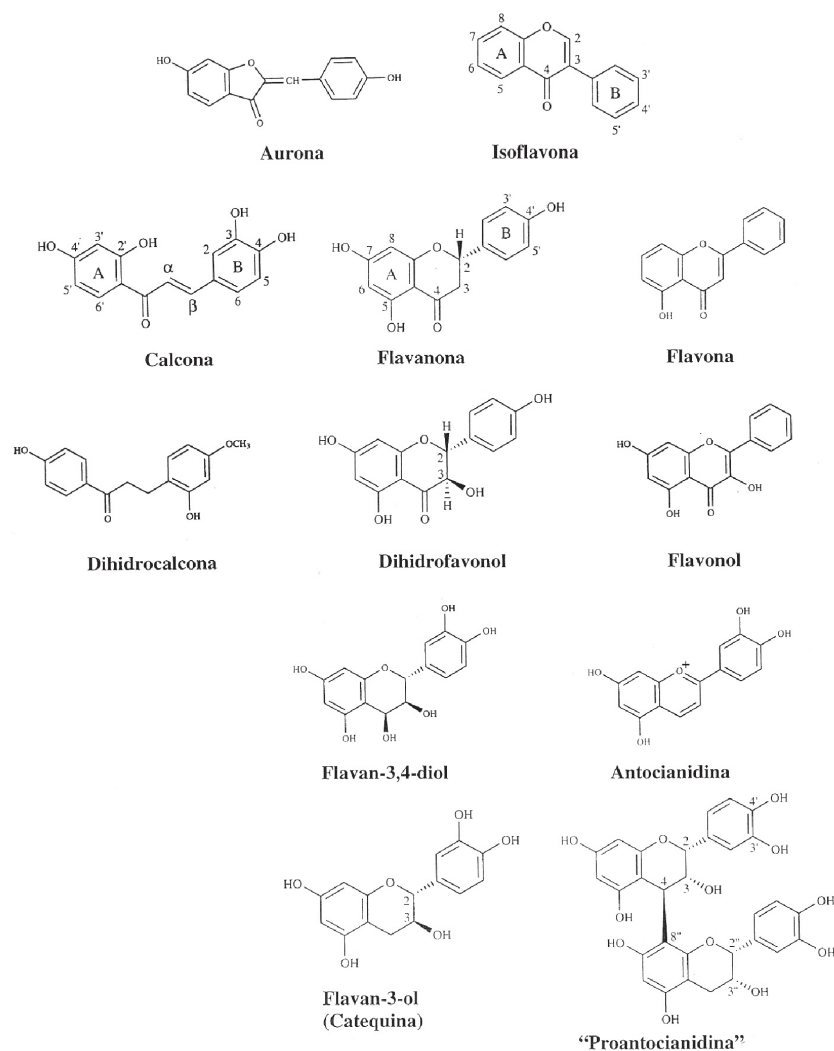
Els flavonoids són un grup extraordinàriament nombrós de compostos polifenòlics naturals que es troben a les plantes superiors, flors, fulles i fruits. Principalment són els responsables del color de les plantes. Són molècules complexes i amb una intrincada variació química. El rang de flavonoids identificats químicament supera els 6000 i només aquests són una petita fracció del total que hi ha a la natura (MacManus, S.M., 1999). Sols s'ha examinat sistemàticament un petit percentatge de plantes per conèixer els seus flavonoids constituents.

Els flavonoids estan dividits en distintes classes segons la seva estructura i, dins cada classe, segons el seu grau d'oxidació, de substitució i talla molecular (polimerització). Es poden distingir diverses estructures, així podem trobar: calcones, flavones, isoflavones, aurones, antocianidines, flavonols, flavandiols, flavan-3-ols (catequines), "proantocianidines" (Figura 1).

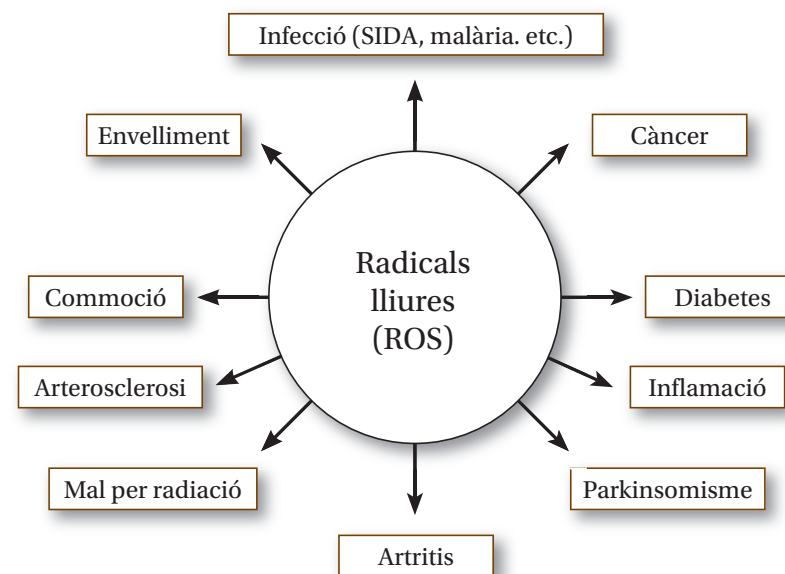
5.2. Paper dels antioxidants en el procés d'oxidació.

El procés d'oxidació es dona per un mecanisme de reacció en cadena de radicals lliures (Shahidi, F. 1995).

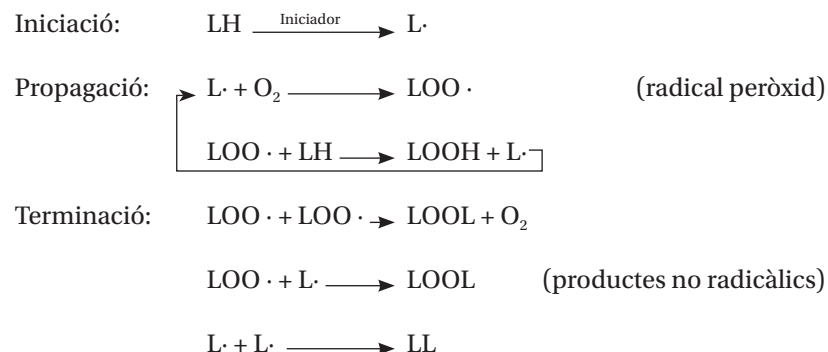
Els radicals lliures són partícules inestables i molt reactives perquè tenen un electró solitari i desaparellat. Els radicals lliures més comuns són espècies reactives d'oxigen (radicals peròxid, hidroxil i peroxil) (ROS) que es produeixen de manera natural.

Figura 1. Distintes classes de flavonoids

Es poden formar internament, pel metabolisme cel·lular i, externament, pels productes químics (consum d'alcohol, drogues, medecines, metalls tòxics, tabac, pesticides, herbicides,...). Són inestables i a través d'una reacció en cadena poden atacar components d'aliments i biomolècules vitals en cèl·lules i líquids del cos humà (com DNA, lípids, aminoàcids i proteïnes) produint malalties i lesions de teixits. Així, s'ha determinat que afecten als pulmons, cor i sistema cardiovascular, ronyons, fetge, tracte gastrointestinal, sang, ulls, pell, múscles i cervell i, també, són els responsables del procés d'envelliment (Henning, B., 1993) (Auroma, O.I., 1994) (Burr, M.L., 1994).

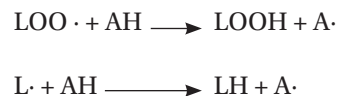


L'oxidació es dona per un mecanisme de reacció en cadena de radicals lliures i es produeix en tres etapes: iniciació, propagació i terminació.

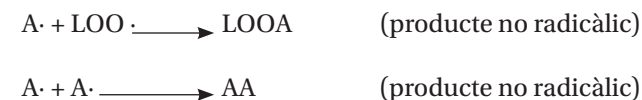


Els radicals lliures es formen a l'etapa d'iniciació i, ràpidament, reaccionen amb altres molècules (LH), com per exemple els àcids grassos insaturats, per abstracció d'un àtom d'hidrogen a l'etapa de propagació. Les reaccions en aquesta etapa de propagació es donen per una reacció en cadena fins que no es produeixi una reacció de terminació, és a dir, una destrucció del radical lliure format.

Els antioxidants (AH) interfereixen en els processos anteriors per diferents mecanismes. Aquests involucren la desactivació dels prooxidants del medi, com els carotenoides que atrapen l'oxigen singlet o els queladors que inactiven els metalls que catalitzen la reacció. Aquestes reaccions duen a un retràs de l'inici de l'oxidació i de la durada del període d'inducció. Un mecanisme important d'actuació dels antioxidants és el de donar un àtom d'hidrogen o un electró als radicals lliures formats produint la seva desactivació:



Els radicals lliures de l'antioxidant formats, $\text{A}\cdot$, són més estables i poden aturar les reaccions de propagació en cadena formant compostos no radicàlics.



Els antioxidants polifenòlics, que són antioxidants primaris, reaccionen amb els radicals lliures majoritàriament per aquest mecanisme de donació d'un hidrogen en virtut de la seva capacitat de donar l'hidrogen dels seus grups hidroxílics donant radicals fenoxi estables (Madsen, H.L., 1997).

Molts d'estudis demostren les propietats protectores dels flavonoids (compostos polifenòlics). Aquests tenen diferents efectes biològics com a antioxidants, antimutàgens, antiinflamatoris i antimicrobians (Mabry, 1982) (Singleton, 1981) (Teissedre, P.L., 1996) (Mikamo, E., 2000) (Middleton, 1992).

5.3. Fonts naturals dels antioxidants

Les plantes constitueixen un recurs natural molt ric en antioxidants (Caragay, A.B. 1992). La majoria dels antioxidants naturals que provenen de plantes tenen unes similituds moleculars bàsiques degut a que tots tenen com a mínim un anell aromàtic i un grup hidroxil: és l'estructura química bàsica del que s'anomena un fenol. Aquests antioxidants inclouen un conjunt molt variat i ampli de compostos que constitueixen un sistema de defensa efectiu contra l'atac de radicals lliures. La Taula 4 conté un resum d'alguns antioxidants naturals i el seu origen dins les plantes.

Els antioxidants naturals millor coneguts i que tenen més importància dins la indústria alimentària i respecte a la salut humana són els tocoferols (relacionats amb la vitamina E), la vitamina C i els carotenoids (Packer, L., 1996). Però en els darrers anys l'estudi dels antioxidants polifenòlics naturals està agafant una gran importància.

Les espècies i herbes utilitzades des de molt antic, o els seus extractes, així com els extractes de te, han demostrat tenir un efecte conservador de diversos aliments (Shahidi, F., 1995) (Wanasundra, U.N., 1997). Estudis recents van cap a la identificació dels ingredients actius i els components antioxidants de productes naturals. Així han estat objecte d'estudi els següents productes: romaní, closques d'arròs, te verd, pells de raïm, llavors de sèsam i gingebre (Ramarathnam, N., 1989) (Amarowicz, R., 1996) (Fukuda, Y., 1985) (Wanasundara, U., 1994) (Jitoe, A., 1992). Alguns dels seus extractes, tal com els de romaní i te, així com mescles de tocoferols i palmitat d'ascorbil, han estat comercialitzats amb èxit i són populars al Japó, Europa i recentment a Nord Amèrica, a pesar del seu alt cost en comparació amb el dels additius sintètics.

Certs olis vegetals també contenen antioxidants -diferents als tocoferols- i per tant poden protegir a altres olis i lípids d'aliments. Entre aquests han estat descrits: oli d'oliva verge, oli de sèsam, oli de palma, lípids de coco, oli de segó d'arròs i oli de civada.

Taula 4: Antioxidant naturals més importants i la seva procedència

Antioxidants naturals	Procedència
<i>Àcids fenòlics /Derivats</i>	<i>Oli de llavors, cereals, grans, certs olis, etc.</i>
<i>Carotenoids</i>	<i>Vegetals obscurs, cítrics, pastanagues, tomàquets, albercocs, oli de palma, etc.</i>
<i>Catequines</i>	<i>Te verd, grans de cafè, certs olis de llavors, etc.</i>
<i>Extractes</i>	<i>Extractes de te verd, romaní, orenga, sàlvia, closca de cacau, segó d'arròs, civada, farigola, etc.</i>
<i>Flavonoids/ Isoflavones</i>	<i>Grans de cafè, oli de llavors, fruites i vegetals, cebes, tomàquets, albergínies, moniatos, etc.</i>
<i>Vitamina C</i>	<i>Fruïtes i verdures, patates, cítrics, etc.</i>
<i>Vitamina E (tocoferols i tocotrienols)</i>	<i>Oli de llavors, nous, oli de palma, ous, vegetals, cereals, margarina, etc.</i>

Per una altra banda, s'han introduït dins el mercat del Japó una línia de begudes especialitzades que mesclen suc de fruites i vegetals apropiats amb les proporcions desitjades així com les que contenen extractes de plantes escollides. Encara que els preus d'aquests articles és sempre superior al de les begudes tradicionals, la demanda dels consumidors ha accelerat

la seva popularitat a causa de que els seus potencials efectes beneficiosos sobre la salut han estat recolzats pels descobriments científics.

Tant els estudis epidemiològics com els clínics han evidenciat que els antioxidants fenòlics presents als cereals, fruites i vegetals són els principals factors que contribueixen a la reducció significativa de malalties cròniques i degeneratives trobades a poblacions que tenen una dieta alta en aquests aliments (Caragay, A.B., 1992) (Thompson, L.U., 1994).

En retrospectiva, això no és sorprenent perquè els humans durant la seva evolució han confiat en les plantes per suplementar els seus cossos amb sistemes de defensa naturals consumint antioxidants dietètics.

De la bibliografia s'ha constatat que, fins ara, no s'ha realitzat cap estudi sobre les possibles propietats antioxidants del germen de garrofi.

6. METODOLOGIA PER A L'ESTUDI DE LES PROPIETATS ANTIOXIDANTS

D'acord amb la importància que tenen els compostos polifenòlics com a productes antioxidants, s'ha iniciat el procés d'extracció dels polifenols d'ambdós tipus de germen de garrofi obtinguts pel tractament àcid (germen (a)) i pel tractament tèrmic (germen (t)), per tal de poder determinar la seva possible activitat antioxidant.

6.1. Extracció i determinació dels polifenols totals

S'han dut a terme una sèrie d'extraccions dels dos tipus de germen de la llavor de la garrova usant dissolvents orgànics i aigua per tal d'optimitzar l'extracció dels polifenols. En concret s'han usat cinc sistemes d'extracció donada la solubilitat dels grups hidroxílics - presents en els polifenols - en els dissolvents pròtics i/o polars: un alcohol, etanol, que segons la bibliografia s'usa de forma majoritària per aquest tipus de substrats; aigua; acetona i mescles d'etanol i acetona amb aigua (etanol: aigua i acetona: aigua).

Les condicions usades són suaus per tal de no afectar la seva activitat antioxidant. La metodologia d'extracció de les mostres és la mateixa pels dos tipus de gèrmens descrits prèviament. Els extractes obtinguts es concentren, liofilitzen i pesen. Finalment, es guarden a baixa temperatura fins el seu posterior ús.

Els polifenols totals s'han determinat utilitzant el mètode de Folin-Ciocalteu usant com a estàndard l'àcid gàl·lic en dissolució aquosa (Singleton, V.L., 1965).

A la Taula 5 es troben els resultats obtinguts pels dos tipus de germen segons el sistema d'extracció usat. Es donen els pesos i el contingut en polifenols totals (expressats com a mg-equivalents d'àcid gàl·lic) de cada extracte, així com el referit a 1 gram de germen inicial. Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions del procés.

Taula 5. Extractes i polifenols totals dels dos tipus de germen.

Germen Tipus	Dissolvent Extracció	Extracte (mg/g germen sec)	Polifenols totals extracte (mg-equivalents àc. Gàl·lic/ g extracte)	Polifenols totals germen (mg-equivalents àc. Gàl·lic/ g germen)
<i>Germen (a)</i>	<i>Etanol</i>	<i>103 ± 5</i>	<i>11,9 ± 0,2</i>	<i>1,23 ± 0,02</i>
	<i>Aigua</i>	<i>366 ± 10</i>	<i>15,1 ± 0,2</i>	<i>5,53 ± 0,09</i>
	<i>Acetona</i>	<i>54 ± 3</i>	<i>1,6 ± 0,1</i>	<i>0,09 ± 0,01</i>
	<i>Etanol: aigua</i>	<i>250 ± 11</i>	<i>13,6 ± 0,2</i>	<i>3,40 ± 0,05</i>
	<i>Acetona: aigua</i>	<i>209 ± 10</i>	<i>32,5 ± 0,5</i>	<i>6,79 ± 0,10</i>
<i>Germen (t)</i>	<i>Etanol</i>	<i>49 ± 2</i>	<i>21,7 ± 0,3</i>	<i>1,06 ± 0,02</i>
	<i>Aigua</i>	<i>213 ± 10</i>	<i>44,1 ± 0,6</i>	<i>9,39 ± 0,14</i>
	<i>Acetona</i>	<i>31 ± 2</i>	<i>2,5 ± 0,1</i>	<i>0,08 ± 0,01</i>
	<i>Etanol: aigua</i>	<i>146 ± 7</i>	<i>100,5 ± 0,9</i>	<i>14,67 ± 0,23</i>
	<i>Acetona: aigua</i>	<i>194 ± 9</i>	<i>200,7 ± 3,0</i>	<i>38,94 ± 0,51</i>

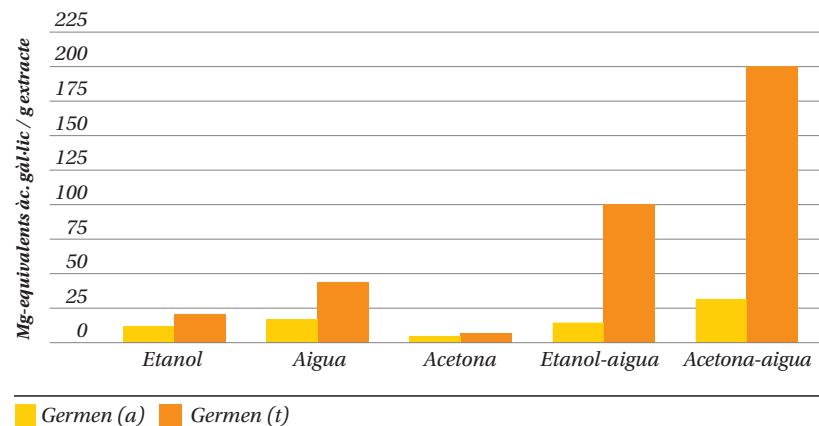
Valor mig ± desviació estàndard

De la Taula 5 s'observa que els pesos dels extractes i el contingut de polifenols totals varien bastant segons el dissolvent d'extracció usat i el tipus de germen. Així, pel que fa al pes d'extracte, el millor sistema d'extracció és l'aigua pels dos tipus: 36,6% pel germen (a) i 21,3% pel germen (t), seguit de les mescles acetona: aigua i etanol: aigua. Els pitjors dissolvents d'extracció són l'etanol i, sobretot, l'acetona ja que donen els pesos més baixos en els dos casos. Comparant els dos tipus de germen, i pel mateix sistema d'extracció sempre s'obtenen pesos superiors d'extracte del germen obtingut pel tractament àcid -germen (a)-, encara que, en el cas de l'extracció amb acetona: aigua, els pesos són molts similars (20,9% i 19,4% del pes dels gèrmens inicials).

Però, pel que fa a la quantitat de polifenols totals (mg-equivalent d'àcid gàl·lic) de cada extracte el millor sistema d'extracció pels dos casos, germen (a) i germen (t), és el de acetona: aigua tant si es refereix al pes del mateix extracte (32,5 ± 0,5 i 200,7 ± 3,0) com al del germen inicial (6,79 ± 0,10 i 38,94 ± 0,51). Aquest dissolvent d'extracció, acetona: aigua, és el que en diferència extreu la major quantitat de polifenols totals dels dos gèrmens (Figura 2).

Figura 2. Comparació dels polifenols totals dels extractes obtinguts dels dos tipus de germen de garrofi estudiats.

Polifenols totals dels extractes



Comparant els dos tipus de germen el que conté més quantitat de polifenols totals és l'obtingut pel tractament tèrmic, germen (t). Aquest tipus de germen conté sis vegades més de polifenols totals que l'obtingut pel tractament àcid, germen (a). Probablement aquest alt valor està relacionat amb el seu contingut en cutícula exterior.

La presència de polifenols en els extractes fa que aquests resultats siguin esperançadors cap a la possible capacitat antioxidant del germen de garrofi.

6.2. Determinació dels flavan-3-ols: catequines i proantocianidines

Per tal de caracteritzar, dins els polifenols totals, els que corresponen als flavonoids que tenen l'estructura de flavan-3-ols (catequines i proantocianidines), aquests s'han quantificat utilitzant l'assaig de la vainillina (Swain, T., 1959). Com a estàndard s'ha usat (+)-catequina en dissolució aquosa. Els flavan-3-ols estan descrits com compostos

que presenten una elevada capacitat antioxidant i són els compostos majoritaris de l'ordi (McMurrough, I., 1983).

A la Taula 6 es troben els resultats obtinguts pels gèrmens estudiats. No es varen poder obtenir els valors dels extractes d'etanol per no ser solubles les mostres en aigua. Dels valors de la Taula 6 s'observa que les majors quantitats de flavan-3-ols es troben també als extractes obtinguts usant acetona:aigua tant si es refereixen al pes del mateix extracte ($6,3 \pm 0,2$ i $49,3 \pm 1,1$) com al del germen inicial ($1,32 \pm 0,04$ i $9,56 \pm 0,22$).

Taula 6. Flavan-3-ols dels dos tipus de germen.

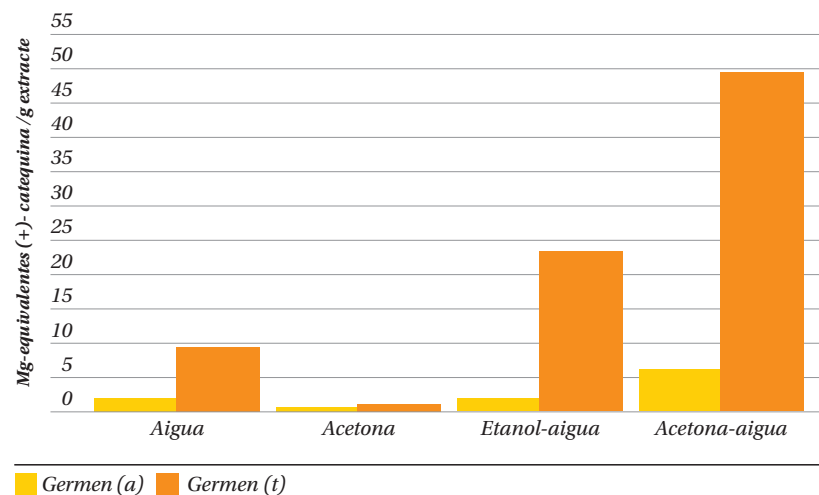
Germen Tipus	Dissolvent Extracció	Flavan-3-ols extracte (mg-equivalents (+) -catequina/g extracte sec)	Flavan-3-ols germen (mg-equivalents (+) -catequina / g germen sec)
Germen (a)	Etanol	-	-
	Aigua	$1,9 \pm 0,1$	$0,70 \pm 0,03$
	Acetona	$0,7 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,02$
	Etanol: aigua	$1,2 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,02$
	Acetona: aigua	$6,3 \pm 0,2$	$1,32 \pm 0,04$
Germen (t)	Etanol	-	-
	Aigua	$9,3 \pm 0,3$	$1,98 \pm 0,06$
	Acetona	$1,0 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,01$
	Etanol: aigua	$23,2 \pm 0,5$	$3,39 \pm 0,07$
	Acetona: aigua	$49,3 \pm 1,1$	$9,56 \pm 0,22$

Valor mig $\pm$ desviació estàndard

Comparant els dos tipus de germen, es fa notar que l'obtingut pel tractament tèrmic, germen (t), també en conté més -set vegades més- que l'obtingut pel tractament àcid (Figura 3).

Figura 3. Comparació dels flavan-3-ols dels extractes obtinguts dels dos tipus de germen de garrofi.

Flavan-3-ols dels extractes



La comparació de les quantitats de flavan-3-ols amb els valors de polifenols totals de la Taula 5, per a cada tipus de germen, fa que siguin un 24,6% -germen (t)- i un 19,4% -germen (a)- respecte als polifenols totals, respectivament. La representació de les quantitats relatives d'aquests compostos es troben a les Figures 4 i 5 pels dos gèrmens. En elles s'observa que cada extracte manté més o manco la mateixa proporció entre els flavan-3-ols i els polifenols totals encara que són més abundants en el germent (t).

Figura 4. Comparació dels polifenols totals i el seu contingut en flavan-3-ols de cada extracte per al germen obtingut pel tractament àcid.

Extractes del germen (a)

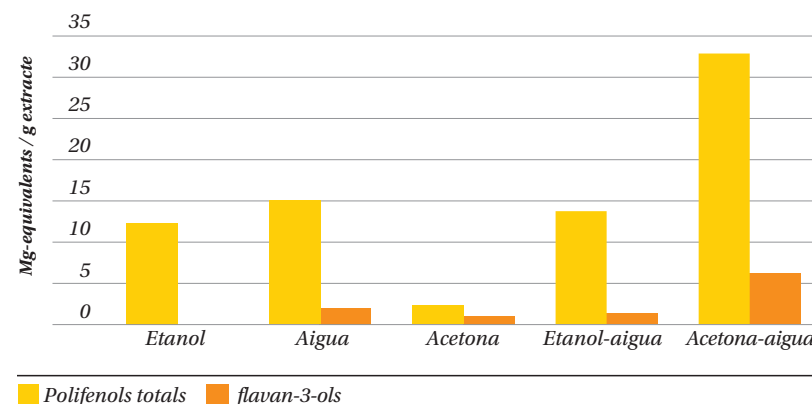
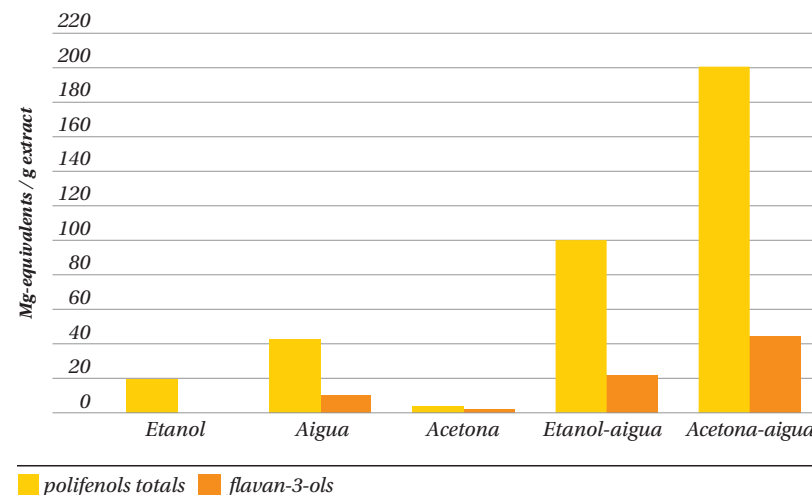


Figura 5. Comparació dels polifenols totals i el seu contingut en flavan-3-ols de cada extracte per al germen obtingut pel tractament tèrmic.

Extractes del germen (t)



6.3. Mètode de determinació de l'activitat antioxidant.

El mètode de determinació de l'activitat antioxidant està basat en l'estudi de la capacitat captadora de radicals lliures, responsables de l'oxidació. Per la qual cosa, s'utilitza un radical lliure com a referència ja que, segons s'ha vist a la bibliografia, aquest és el mecanisme d'acció antioxidant dels polifenols.

La capacitat antioxidant de les mostres s'expressa com a la quantitat de mostra necessària per disminuir al 50% la concentració de radicals lliures (EC_{50}). A menor valor de EC_{50} major és la seva capacitat antioxidant.

Es realitzaren una sèrie d'experiments per tal de posar a punt el mètode de determinació de l'activitat antioxidant dels productes objecte d'estudi usant el radical lliure 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH·) com a referència (Brand-Williams W., 1995).

Després de fer la recta de calibrat del radical lliure DPPH·, es varen dur a terme les reaccions amb DPPH· de diversos patrons químics dels quals es coneix la seva activitat antioxidant: (+)-catequina, àcid gàl·lic i DL- α -tocoferol (vitamina E).

La metodologia usada és la següent: una quantitat del patró químic es dissol en metanol a distintes concentracions i s'addiciona a una solució del radical lliure DPPH· preparada el mateix dia. Es mesuren les Absorbàncies a 515 nm en un espectrofotòmetre UV-Visible i es segueix la cinètica fins que la reacció arriba a un estat estacionari. La representació dels valors obtinguts versus les corresponents concentracions usades ens permet obtenir la quantitat d'antioxidant necessari per minvar la concentració inicial de DPPH· un 50%, és a dir, el valor de EC_{50} per a cada compost.

Els nostres resultats de la capacitat antioxidant dels patrons utilitzats concorden amb els valors ja descrits a la bibliografia.

Un cop obtinguts els extractes liofilitzats i el mètode de determinació de l'activitat antioxidant contrastat amb els patrons indicats s'està en disposició d'iniciar la mesura pròpiament dita del possible poder antioxidant dels gèrmens de garrofi.

6.4. Determinació de la capacitat antioxidant del germen de la garrova

Contratat ja el mètode de determinació de l'activitat antioxidant amb els patrons indicats, es va fer la mesura pròpiament dita del possible poder antioxidant dels extractes obtinguts dels dos tipus de gèrmens de garrofi.

A cadascun dels extractes que contenen una certa quantitat de polifenols totals –tots excepte els obtinguts amb acetona–, i fent servir aquest mètode, es realitzaren les cinètiques de les reaccions amb el radical lliure DPPH· a diferents concentracions de cadascun dels extractes. Aquestes proporcionen els valors a l'estat estacionari i la seva representació versus les concentracions usades permet obtenir els valors de la capacitat antioxidant, expressats com a EC_{50} , per a cada compost.

Els resultats obtinguts estan recollits a la Taula 7. Els valors de l'activitat antioxidant, donats com a EC_{50} (g/L), estan referits a l'extracte i al germen inicial sec. A **menor** valor de EC_{50} **major** és la seva capacitat antioxidant. Així mateix, es dona l'equivalència d'un gram d'extracte i d'un gram de germen inicial sec en mil·ligrams de vitamina E (un gram d'aquests té la mateixa capacitat antioxidant que els mil·ligrams de vitamina E indicats) és a dir, a **major** quantitat de vitamina E **major** és l'activitat antioxidant del producte.

De les dades de la Taula 7 es pot observar que els dos tipus de germen de garrofi obtinguts presenten activitat antioxidant. Ara bé, aquesta és bastant diferent segons el tipus de germen. Els extractes dels gèrmens que tenen millor activitat antioxidant són sempre els obtinguts amb acetona: aigua. Aquests extractes són els que contenen més quantitat de polifenols totals i, també, de flavan-3-ols (Taules 5 i 6). Per a tots els extractes, s'observa una relació directa entre les quantitats d'aquests compostos - polifenols totals i flavan-3-ols - i la seva activitat antioxidant. Aquesta relació directa concorda amb la descrita a la bibliografia pels polifenols totals i l'activitat antioxidant d'altres productes vegetals i cereals (Velioglu, Y.S., 1998).

Taula 7. Activitat antioxidant dels gèrmens de la garrova.

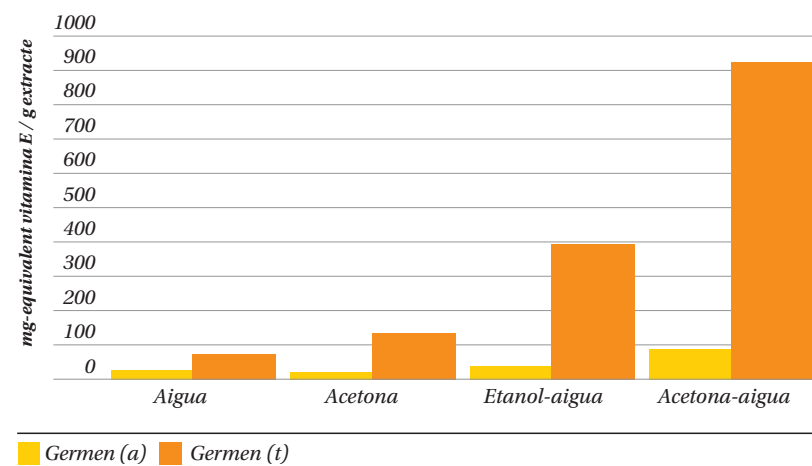
Germen Tipus	Dissolvent Extracció	Activitat antioxidant extracte	Activitat antioxidant germen	Equivalència activitat antioxidant Vitamina E	Equivalència activitat antioxidant Vitamina E
		EC ₅₀ (g/L)	EC ₅₀ (g/L)	(mg/g extracte)	(mg/g germen)
Germen (a)	Etanol	7,59	73,69	26	3
	Aigua	9,59	26,20	21	8
	Etanol: aigua	6,28	25,12	32	8
	Acetona: aigua	2,20	10,53	91	19
Germen (t)	Etanol	2,68	54,69	75	4
	Aigua	1,49	7,0	134	29
	Etanol: aigua	0,52	3,56	385	56
	Acetona: aigua	0,22	1,13	909	177

Comparant els dos tipus de gèrmens estudiats, **l'obtingut pel tractament tèrmic -germen (t)- presenta una activitat antioxidant deu vegades superior a l'obtingut pel tractament àcid -germen (a)-**. Així, els seus extractes d'acetona:aigua del germen (t) donen un valor de EC₅₀ de 0,22 g/L front a 2,2 g/L del germen (a), és a dir, deu vegades més petit, i de 1,13 g/L i 10,53 g/L respecte als gèrmens inicials, germen (t) i germen (a), respectivament.

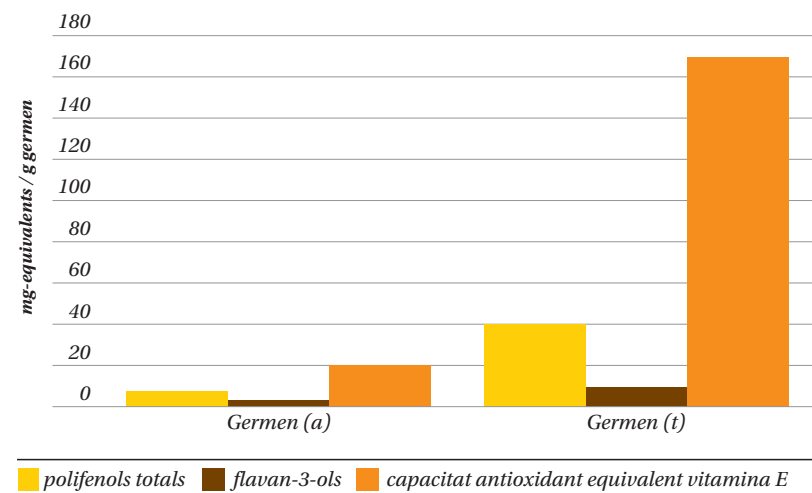
Aquest mateix fet, que el germen (t) presenta una activitat antioxidant 10 vegades superior al germen (a), s'observa a la Taula 7 si se comparen les seves activitats antioxidants-equivalents de vitamina E tant pels extractes -909 mg i 91 mg de vitamina E- com pels gèrmens inicials -177 mg i 19 mg de vitamina E-, respectivament.

De la Taula 7 cal ressaltar que fins i tot l'activitat antioxidant del germen inicial obtingut pel tractament tèrmic és superior (EC₅₀=1,13 g/L) a la de l'extracte d'acetona:aigua de l'altre germen (EC₅₀= 2,2 g/L).

És de notar que l'extracte del germen obtingut pel tractament tèrmic amb acetona:aigua presenta pràcticament la mateixa activitat antioxidant que la vitamina E pura i, per tant, que 1000 mg d'aquest extracte tenen la mateixa capacitat antioxidant que 909 mg de vitamina E (Figura 6).

Figura 6. Equivalència de l'activitat antioxidant dels extractes dels dos tipus de germen de la garrova amb la vitamina E.

A la Figura 7 se comparen, pels dos tipus de germen estudiats, les quantitats referides a un gram de germen inicial de polifenols totals, flavan-3-ols i de la seva capacitat antioxidant-equivalent a la vitamina E, i clarament el germen (t) és el que presenta millors valors.

Figura 7. Comparació dels dos tipus de germen de la garrova estudiats: quantitat de polifenols totals, de flavan-3-ols i capacitat antioxidant equivalent amb la vitamina E per gram de germen sec.

Els valors obtinguts pel germen (a) de la garrova, tant en polifenols totals com en capacitat antioxidant, són del mateix ordre als descrits pel germen de blat (Velioglu, Y.S., 1998). En el cas del germen de blat torrat s'observa que baixen aquests valors (Krings, U., 2001). Es pot dir que, tant el nostre germen (a) com el germen de blat descrit, presenten una moderada activitat antioxidant degut al seu contingut moderat en compostos polifenòlics. En canvi l'altre germen obtingut del garrofi -el germen (t)- té una capacitat antioxidant deu vegades superior.

Aquest germen (t) obtingut de la llavor de la garrova segons el tractament tèrmic presenta unes propietats antioxidants millors que altres productes naturals descrits a la bibliografia. Així, la seva equivalència amb l'activitat antioxidant de la vitamina E (177 mg-equivalent de vitamina E/ g germen) és superior a la de fibres obtingudes a partir de fruita: de raïm negre (100 mg-equivalent de vitamina E/ g producte), de raïm blanc (67 mg-equivalent de vitamina E/ g producte) descrites a una patent, i de pell de taronja (104 mg-equivalent de vitamina E/ g producte).

Cal fer constar que, aquestes propietats antioxidants del germen (t) augmenten en els seus extractes. Així, els extractes obtinguts tant amb etanol:aigua com amb acetona:aigua del germen (t), presenten unes propietats antioxidants molt millors que les descrites a la bibliografia abans comentades: 385 (mg-equivalent de vitamina E/ g producte) i 909 (mg-equivalent de vitamina E/ g producte), respectivament.

Considerant la vitamina E com un compost amb bones propietats antioxidants, cal ressaltar que l'extracte d'acetona:aigua del nostre germen (t) també ho és. Ambdós presenten un poder antioxidant molt similar.

De totes aquestes dades, en principi es pot considerar un factor important, per a la capacitat antioxidant dels gèrmens de la garrova estudiats, la presència de cutícula ja que és el principal factor que diferencia el germen obtingut pel tractament tèrmic -germen (t)- de l'obtingut pel tractament àcid -germen (a)-.

Així, en un futur, podria considerar-se interessant fer l'estudi de la cutícula del garrofi en quant al contingut de polifenols totals i al seu poder antioxidant que, segons aquests resultats, es preveu elevat.

7. ANÀLISI DELS EXTRACTES DELS GÈRMENS DE LA GARROVA PER HPLC

Els productes naturals, en general, i els seus extractes polifenòlics, en particular, solen contenir un nombre de components molt elevat i normalment el seu anàlisi sempre ha estat molt complicat per la necessitat de separar-los prèviament en les seves distintes classes químiques. Els anàlisis que requereixen unes purificacions preliminars molt tedioses no són bons per fer screenings de mesclures complexes.

La HPLC (cromatografia líquida d'alta resolució) en fase reversa és una tècnica molt usada per analitzar la composició fenòlica de diversos productes que provenen de vegetals, cereals i fruites com ordi, malta, vins i raïms (Oszmianski, J., 1990) (McMurrough, I., 1983) (Jaworski, A.W., 1987). No obstant, en els distintes procediments, segons els constituents que s'investiguin, han estat necessaris distintes tractaments de pre-purificació de les mostres. Aquests tractaments contenen diversos procediments com fraccionament per cromatografia en columna tant si és per sedàs molecular com per absorció, extracció per dissolvents a diferents pH i l'ús de cromatografia en capa fina (Janson, J.-C., 1967) (Joustra, M., 1967) (Oszmianski, J., 1988) (Ricardo da Silva, J.M., 1990). Per evitar aquests tractaments previs s'ha utilitzat una nova tècnica HPLC que, per injecció directa de les mostres permet la separació dels compostos fenòlics (Goupy, P., 1999) (Rosa, M., 1994). Aquest nou procediment utilitza un sistema de dissolvents de HPLC ternari que canvia el pH dels dissolvents eluents durant el curs d'un gradient d'augment de la hidrofobicitat, és a dir, va baixant la polaritat del medi a mesura que es fa el cromatograma de HPLC.

Amb aquesta idea, per tal de caracteritzar el contingut polifenòlic dels extractes dels gèrmens de la garrova obtinguts s'ha utilitzat un mètode usant la tècnica HPLC en fase reversa amb un sistema de dissolvents ternari: àcid acètic 2,5%; àcid acètic 8% i acetonitril.

La detecció s'ha fet utilitzant un detector fotodiode array UV-visible (DAD) (Waters 996) i com a fase estacionària una columna C18 de Waters. El protocol de temps llarg, 130 min, i gradient de tres dissolvents en condicions extremes permet una millor separació de compostos amb característiques estructurals molt similars. L'elució dels compostos es dona en un ordre de més a menys polaritat.

Tots els compostos fenòlics es detecten a 280 nm ja que tots ells absorbeixen a aquesta longitud d'ona. No obstant, els pics a 360 nm són indicatius de la presència de flavonols on tenen el màxim d'absorbància (Rosa, M., 1994). Els cromatogrames de HPLC realitzats als diferents valors d'absorbància anteriors permetran veure la presència o no d'aquestes classes de compostos.

En el nostre protocol experimental dissenyat per fer la cromatografia de HPLC, i a 280 nm, en primer lloc s'elueixen els compostos fenòlics més polars: flavan-3-ols, polimèrics i monomèrics -per aquest ordre- (0-60 min) després els àcids fenòlics (60-90 min), seguits dels flavonols (90-100 min) i en darrer lloc els compostos fenòlics menys polars (100-120 min).

7.1. Comparació dels gèrmens de la garrova per hplc

A les figures 8 i 9 es donen els cromatogrames de HPLC a 280 nm dels extractes dels dos tipus de germen, germen (a) i germen (t), obtinguts amb el millor dissolvent d'extracció dels polifenols: acetona:aigua. Els seus cromatogrames HPLC són bastant diferents el que indica que la seva composició també és diferent. Així, l'extracte del germen (t) presenta els pics més grossos abans dels 10 minuts i entre els 90-100 minuts, en canvi, l'extracte d'acetona:aigua del germen (a) té els pics màxims entre els 60-90 minuts i entre els 100-110 minuts.

Dels màxims dels dos cromatogrames de HPLC, i segons el temps on apareixen, es pot dir que l'extracte d'acetona:aigua dels germen (t) conté, sobretot, flavan-3-ols polimèrics (varies unitats de catequines) ($t < 10$ min.) i flavonols (90-100 min.), i en canvi, l'extracte d'acetona:aigua dels germen (a) conté sobretot derivats d'àcids fenòlics (60-90 min.) i compostos fenòlics poc polars (100-110 min.).

Ambdós extractes tenen en comú que els seus cromatogrames presenten moltes senyals a les distintes zones, moltes d'elles no ben resoltes el que indica que poden correspondre a més d'un compost, fet que dona una idea de que els extractes són una mescla d'un gran nombre de diferents compostos.

Per permetre una visió més clara de la complexitat dels cromatogrames dels dos extractes d' acetona:aigua del germen (a) i germen (t), cadascun d'aquests es dona en dues meitats, de 0-60 min. i de 60-120 min. (Figures 8-a, 8-b, 9-a, 9-b) on alguns dels pics més grossos surten d'escala per poder veure millor els més petits.

De tots els cromatogrames HPLC anteriors es pot dir que el germen obtingut pel tractament tèrmic -germen (t)- conté sobretot (pics màxims) flavan-3-ols (catequines i proantocianidines) i flavonols i en quantitats més petites àcids fenòlics i compostos fenòlics poc polars. L'altre germen, germen (a), conté també totes aquestes castes de compostos però en aquest cas són els derivats d'àcids fenòlics els majoritaris seguits dels compostos poc polars. Aquest diferent perfil podria explicar el fet que aquest darrer tipus de germen, germen (a), tingui una menor capacitat antioxidant que l'altre, germen (t), pel seu menor contingut en flavan-3-ols (catequines i proantocianidines) i en flavonols, compostos de reconeguda elevada capacitat antioxidant (Rice-Evans, C.A., 1995).

Figura 8. Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (a).

Germen (a)- acetona: aigua

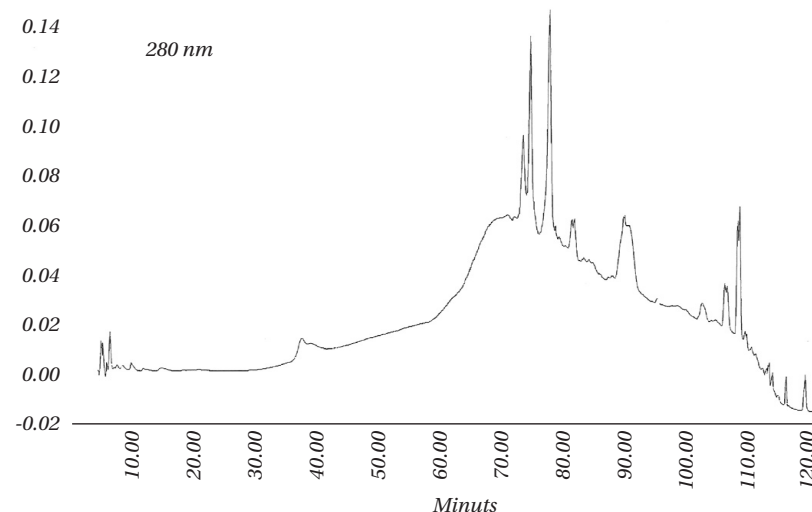


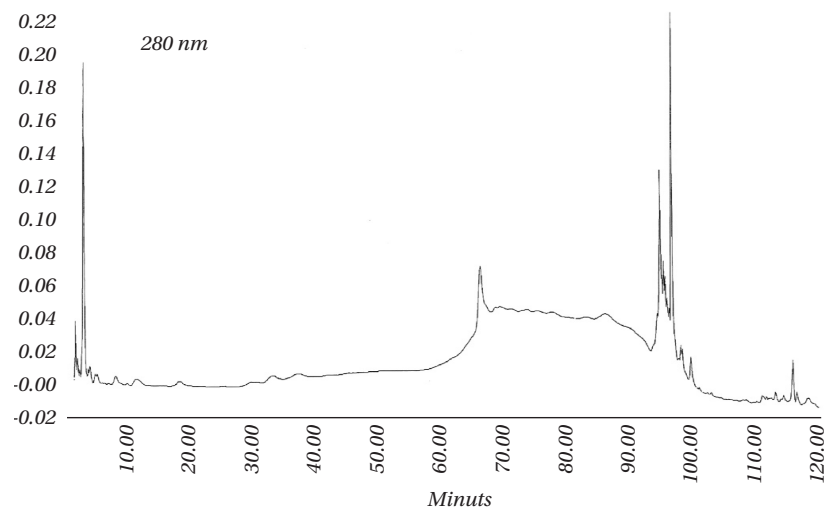
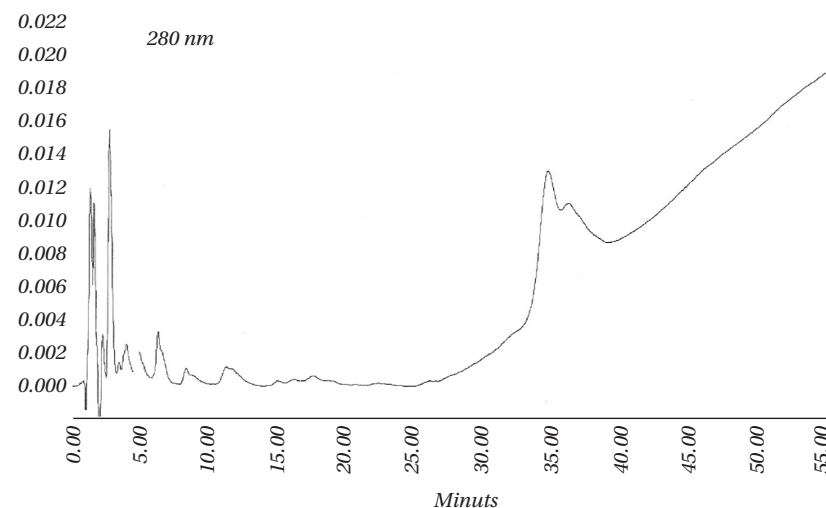
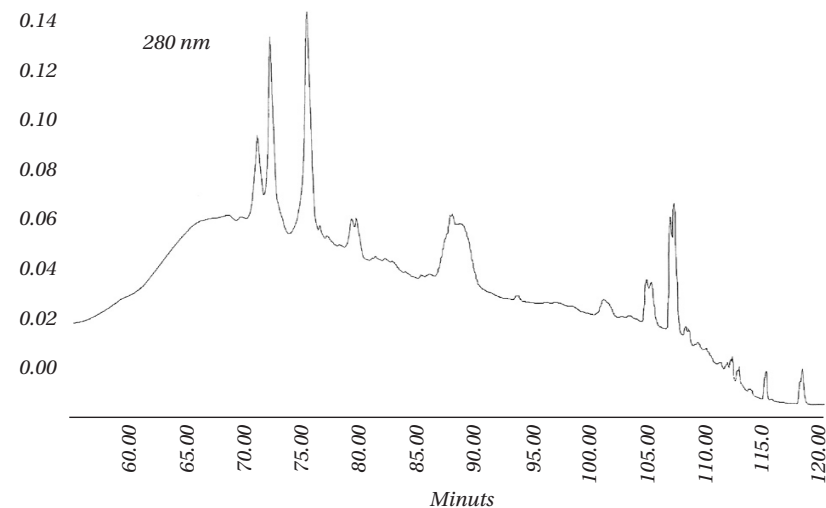
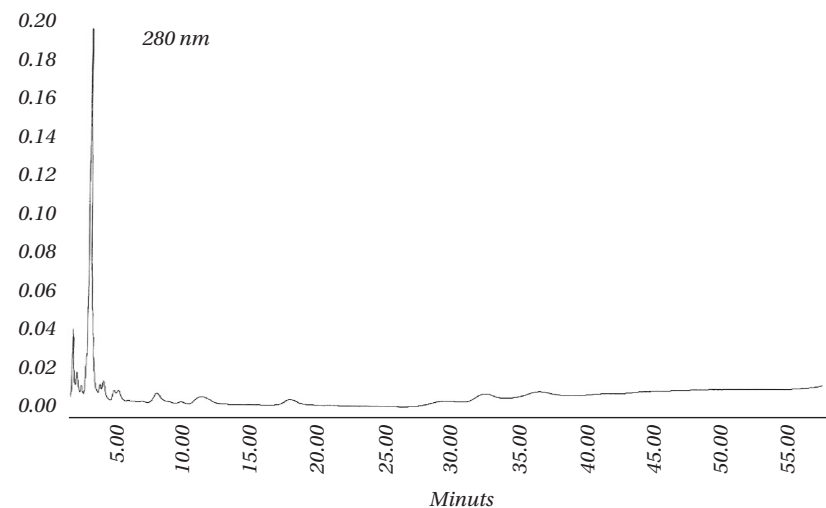
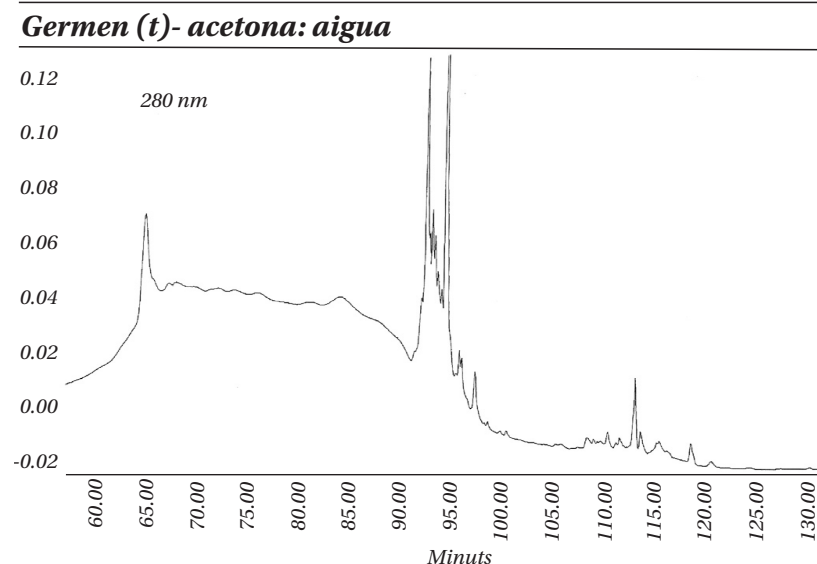
Figura 9. Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (t).**Germen (t)- acetona: aigua****Figura 8-a.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (a), de 0 a 60 minuts.**Germen (a)- acetona: aigua****Figura 8-b.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (a), de 60 a 120 minuts.**Germen (a)- acetona: aigua****Figura 9-a.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (t), de 0 a 60 minuts.**Germen (t)- acetona: aigua**

Figura 9-b. Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (t), de 60 a 120 minuts.



Els cromatogrames HPLC a 360 nm són indicatius de la presència de flavonols a la mostra. Així, el cromatograma HPLC de l'extracte d'acetona: aigua del germen (t) (Figura 10) dóna exclusivament senyals als 90-100 minuts que ens indiquen la presència de diferents flavonols a aquest germen. Aquest fet corrobora el que s'ha indicat al cromatograma a 280 nm vist abans (Figura 9). En canvi, el cromatograma HPLC de l'extracte d'acetona: aigua del germen (a) dóna senyals més petites indicatives de la menor quantitat d'aquests compostos.

Per una altra banda, els cromatogrames de HPLC a 280 nm (Figures 8 i 9), on els flavan-3-ols tenen un màxim d'absorbància, corroboren la major quantitat d'aquests a l'extracte d' acetona: aigua del germen (t) ja vista a l'apartat 6.2 d'aquest treball on hi ha la quantificació dels flavan-3-ols: 49,3 versus 6,3 mg-equivalents (+)-catequina/g extracte, per l' acetona: aigua i l'etanol: aigua, respectivament.

Per tant, de la tècnica de HPLC en fase reversa aplicada als extractes dels dos tipus de germen es pot deduir que la presència de cutícula exterior

del garrofi al germen obtingut pel tractament tèrmic -germen (t)- fa que aquest contengui més quantitat de flavan-3-ols i de flavonols que l'altre germen -germen (a)-. Aquestes dues classes de flavonoids tenen una elevada activitat antioxidant (Rice-Evans, C.A., 1995) el que explica que aquest germen de la garrova -germen (t)- presenti una activitat antioxidant 10 vegades superior a l'altre -germen (a)-.

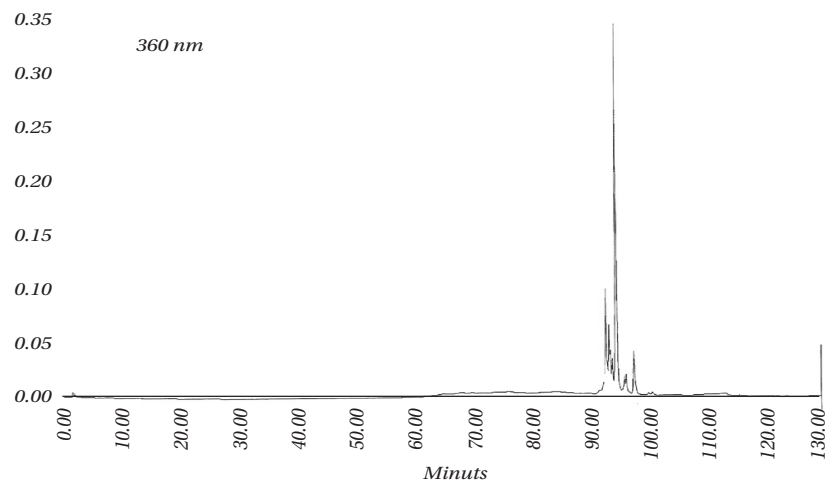
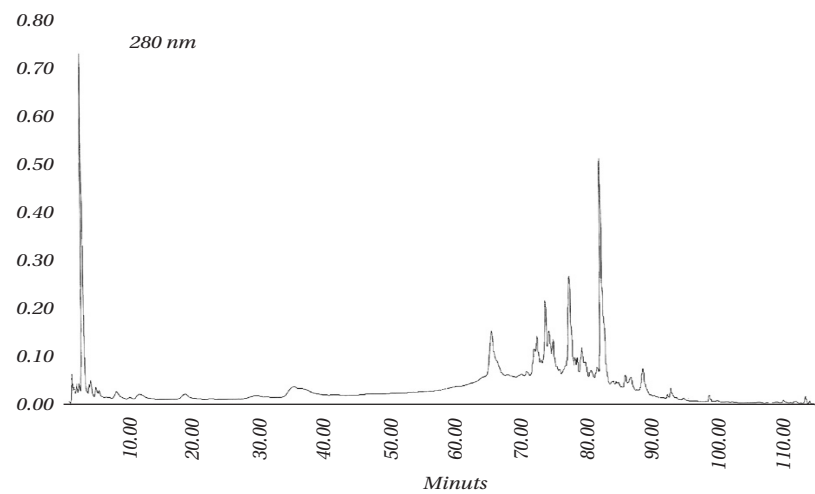
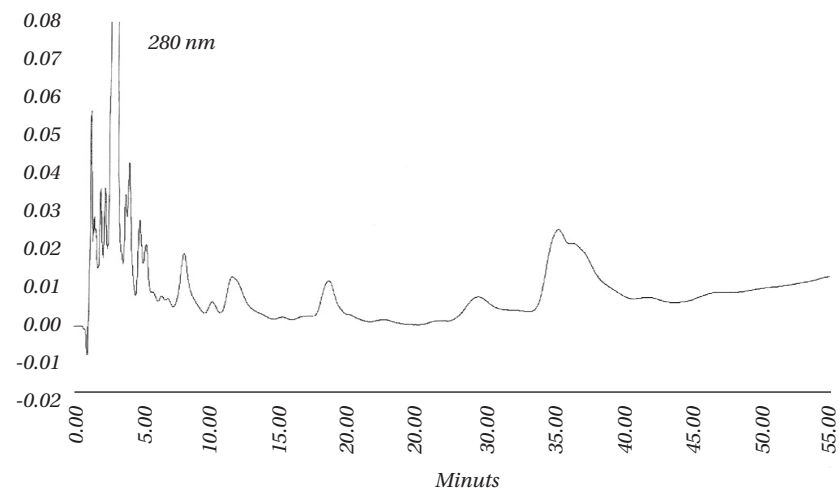
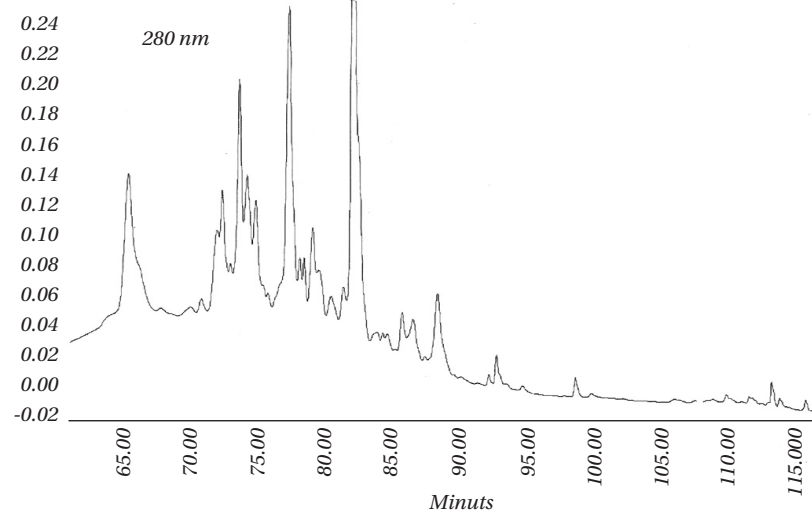
7.2. Comparació dels extractes dels gèrmens de la garrova per HPLC

Per tal de comparar l'efecte del dissolvent d'extracció, s'han realitzat els cromatogrames HPLC dels dos extractes del mateix germen que contenen més quantitat de polifenols totals, és a dir, l'extracte d'acetona: aigua i d'etanol: aigua del germen obtingut pel tractament tèrmic, germen (t), que és el que en té més.

Així, a les Figures 11, 11-a i 11-b, apareixen els cromatogrames a 280 nm de l'extracte d'etanol: aigua del germen (t) sencer (0-120 min.) i, per claredat, en dues meitats (0-60 min.) i (60-120 min.). La seva comparació amb els cromatogrames HPLC de l'extracte d'acetona: aigua del mateix germen (t) (Figures 9, 9-a i 9-b, vistes abans) mostra clarament una diferència a la zona de 90 a 100 minuts (flavonols) on només aquest darrer extracte presenta senyals. Així, ambdós extractes del mateix germen (etanol: aigua i acetona: aigua) contenen quantitats importants de flavan-3-ols (sobretot polímers, 0-10 min.) i de àcids fenòlics (60-90 min.) –més ben resolt i en major quantitat pel cas de l'extracte d'etanol: aigua-, en canvi només l'extracte d'acetona: aigua conté senyals importants a la zona dels flavonols (90-100 min.) el que indica que l'etanol: aigua no els extreu.

Aquesta diferència en els cromatogrames HPLC explica que el contingut en polifenols totals i la seva activitat antioxidant sigui superior per l'extracte d'acetona: aigua que per l'extracte d'etanol: aigua.

Els dos dissolvents etanol: aigua i acetona: aigua extreuen els flavan-3-ols (catequines i proantocianidines) del germen (t) de la garrova, fet ja quantificat a l'apartat 6.2 d'aquesta memòria: més quantitat per l'acetona: aigua que l'etanol: aigua (49,3 versus 23,2 mg-equivalents (+)-catequina/g extracte), però l'etanol: aigua no extreu en quantitats significatives els flavonols i l'acetona: aigua sí ho fa, fent que els seus extractes tinguin més activitat antioxidant.

Figura 10. Cromatograma HPLC a 360 nm de l'extracte d'acetona: aigua del germen (t).**Germen (t)- acetona: aigua****Figura 11.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'etanol: aigua del germen (t).**Germen (t)- etanol: aigua****Figura 11-a.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'etanol: aigua del germen (t), de 0 a 60 minuts.**Germen (t)- etanol: aigua****Figura 11-b.** Cromatograma HPLC a 280 nm de l'extracte d'etanol: aigua del germen (t), de 60 a 120 minuts.**Germen (t)- etanol: aigua**

8. CONCLUSIONS

Segons els objectius fixats en aquesta investigació aplicada i d'acord amb els resultats obtinguts es poden presentar les següents conclusions:

1. S'han obtingut dos tipus de germen de garrofi usant dos procediments diferents de separació de la resta de la llavor de garrova. Germen (a): obtingut pel mètode habitual, degradatiu, d'obtenció de la goma de garrofi; i germen (t): obtingut seguint un mètode no contaminant de separació mecànic precedit d'un curt procés tèrmic. Ambdós gèrmens de la garrova presenten un elevat valor nutritiu amb un contingut en proteïna pròxim al 50% pel germen (a) i al 40% pel germen (t). La resta de propietats és similar pels dos gèrmens, excepte pel que fa a la quantitat de fibra i de polifenols en que el germen (t) presenta un contingut superior. Aquestes principals diferències s'atribueixen a la presència de cutícula exterior de la llavor en el germen (t).
2. Els dos tipus de germen obtinguts presenten activitat antioxidant. El germen (t) és casi deu vegades més actiu que el germen (a). Aquesta diferència està directament relacionada amb el seu contingut en polifenols totals i també en flavan-3-ols. Les capacitats antioxidants de 1 g de germen sec, expressades com a capacitat de captació de radicals lliures, són les mateixes que les que tenen 19 mg i 177 mg de vitamina E, pel germen (a) i germen (t), respectivament.
3. S'han obtingut extractes del germen (a) i del germen (t) més rics en polifenols totals que ells. S'ha determinat que, d'entre diversos dissolvents, el millor sistema d'extracció és acetona: aigua, seguit d'etanol: aigua.
4. Els extractes obtinguts amb acetona: aigua suposen, per ambdós gèrmens de garrofi, aproximadament un 20% del pes del germen inicial. Aquests extractes del germen (t) i del germen (a) contenen unes quantitats de polifenols totals bastant diferents i representen un 20,07% i un 3,25% del pes de l'extracte, respectivament.
5. Les capacitats antioxidants dels extractes són superiors a les dels gèrmens inicials per ambdós tipus de germen. Existeix una clara relació directa entre la quantitat de polifenols totals i de flavan-3-ols i l'activitat antioxidant dels extractes. Pels dos gèrmens estudiats, l'extracte que presenta més activitat antioxidant és l'obtingut

amb acetona: aigua, així, la capacitat antioxidant de 1 g d'aquest extracte, expressada com a capacitat de captació de radicals lliures, és equivalent a 91 mg de vitamina E pel germen (a) i a 909 mg de vitamina E pel germen (t).

6. L'extracte obtingut per l'acció de l'acetona: aigua del germen (t) té una capacitat antioxidant 10 vegades superior al corresponent a l'altre germen, germen (a), i és del mateix ordre que la que té la vitamina E pura.
7. Les anàlisis dels extractes realitzades per la tècnica de HPLC en fase reversa mostren que contenen una mescla complexa de molts i diferents compostos polifenòlics. La comparació dels cromatogrames HPLC dels extractes d'acetona: aigua i d'etanol: aigua del germen (t), que són els que contenen més polifenols totals i més activitat antioxidant, permet diferenciar-los. Així es veu que l'acetona: aigua és millor sistema d'extracció de polifenols totals perquè extreu diferents tipus de compostos fenòlics, i en més quantitat, com flavan-3-ols (catequines i proantocianidines), àcids fenòlics, flavonols, i altres compostos fenòlics poc polars. En canvi, l'etanol: aigua no dona senyals a la zona dels flavonols encara que sí a les altres.
8. La comparació dels cromatogrames HPLC dels extractes d'acetona: aigua del germen (a) i del germen (t) permet diferenciar la seva composició. El germen (t) conté molt més quantitat de flavonoids, en concret flavan-3-ols (catequines i proantocianidines) i de flavonols, que el germen (a). Tot això confirma la seva millor capacitat antioxidant ja que aquests flavonoids tenen una reconeguda activitat antioxidant.
9. Com a resum i conclusió final es pot dir que el germen de la garrova obtingut segons el mètode que s'usa habitualment per obtenir la goma de garrofi presenta unes propietats antioxidants moderades i són comparables a les descrites pel germen de blat. En canvi, el germen obtingut segons un procediment tèrmic, no degradatiu, i que conté restes de la cutícula exterior, presenta unes propietats antioxidants deu vegades superior a l'altre. Un dels extractes d'aquest darrer germen, l'obtingut amb acetona: aigua, presenta un poder antioxidant –captador de radicals lliures– molt similar al de la vitamina E pura i, per tant, pot considerar-se un extracte natural amb bones propietats antioxidants.

9. ANNEX

Mètodes usats per a la determinació de la composició general:

Cendres:

Per mineralització per via seca, mitjançant calcinació en una mufla a 550 C durant cinc hores. Es pesa el producte resultant i s'expressa el resultat en percentatge. (AOAC, 1980).

Proteïna:

Pel mètode semimicro Kjeldhal, mitjançant digestió en calent amb àcid sulfúric concentrat en presència del catalitzador Se-CuSO₄-K₂SO₄. L'amoníac format es recull sobre una dissolució de bòric al 2%. Finalment es realitza una valoració amb HCl de concentració coneguda, emprant com a indicador vermell de metil (rojo de metilo). La transformació del contingut d'amoníac es recalcula a nitrogen i s'empra el factor 6,25 per calcular la proteïna.

Oli:

Per extracció amb èter etílic durant 24 hores, utilitzant un extractor soxhlet. S'eliminen les traces d'aigua de l'oli amb sulfat de sodi, es pesa el producte i es dona el resultat expressat com a percentatge de la matèria inicial. (AOAC, 1980).

Sucres solubles:

Es fa una extracció amb alcohol etílic al 80% amb agitació constant durant 30 minuts 50 C, seguit d'una segona extracció. A l'extracte es determinen els sucres utilitzant el mètode de Haas i Fleison modificat per Yadar i Weisler. El reactiu emprat és una dissolució d'antrona a l'1% en sulfúric del 84% v/v. Després de posar en contacte reactiu i mostra durant 10 minuts en un bany maria, es fa una determinació espectrofotomètrica a 620 nm. El patró de referència fou glucosa. (Dee-Snell, F., 1971).

Pectines:

S'eliminen prèviament l'oli (tractament amb èter etílic) i sucres solubles (etanol al 90%) de les mostres. Es fa una extracció amb HCl 0,5M a 80 C i sobre l'extracte es determinen les substàncies pèctiques utilitzant

carbazol com a reactiu i lectura espectrofotomètrica a 520 nm. El patró de referència es àcid galacturònic. (McComb E.A., 1952).

Fibra dietètica (NDF, fibra neutra detergent):

Tractament de la mostra (desengreixada prèviament amb èter etílic) amb una solució neutra detergent (solució aquosa de sulfat lauril de sodi, borat de sodi, etilendiamotetracetat de disodi, hidrogenfosfat de sodi i etilenglicol) durant 1 hora a reflux. El residu, un cop rentat amb aigua, etanol, èter i acetona i assecat és la fibra, que s'expressa com a percentatge de la mostra inicial. (van Soest P.J., 1973) (van Soest P.J., 1976) (van Soest, P.J., 1979).

Polifenols solubles:

Es fan dues extraccions aquoses successives a 30°C., d' una hora cadascuna. Es valora amb KMnO₄ en presència d'Indigo Carmin, fins a l'aparició d'una coloració groga-or. El patró utilitzat és D-catequina. (AOAC, 1980).

Tanins condensats:

Sobre l'extracte anterior, un cop eliminats els polifenols solubles, es fa un tractament amb HCL al 5% en butanol (v:v), durant dues hores a reflux. Es llegeix l'absorbància a 550 nm front a un patró de tanins condensats subministrats per Nestlé (Reed. J.D., 1982).

Aminoàcids:

S'extreu la proteïna mitjançant una extracció aquosa seguida de dues extraccions successives amb Na(OH) 0,05 M sobre el germen prèviament desengreixat. L'extracte s'hidrolitza amb HCL 6M que conté un 4% d'àcid tioglicòlic durant 21 hores a 110° C i atmosfera de nitrogen. Els aminoàcids foren determinats amb un Beckman 119°C analitzador automàtic, usant una columna de resina AA-20. S'empraren buffers de pH 3,25, 4,12 i 6,40 a 50°C. Per a la quantificació s'empra la reacció amb nihidrina, amb lectures espectrofotomètriques a 570 nm, excepte la prolina que fou mesurada a 440 nm.

10. BIBLIOGRAFIA

Amarowicz, R. and Shahidi, F. (1996) "A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea" *Food Res. Int.* **29**, 71-76.

AOAC (1980) "Official Methods of Analysis". Edit AOAC, Washington DC.

Auroma, O.I. (1994) *Food Chem. Toxic.* **32**, 671.

Beutner, S.; Bloedorn, B.; Frixel, S.; Hernandez Blanco I.; Hoffmann, T.; Martin, H.-D.; Mayer, B.; Noack, P.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Schulke, I.; Sell, S.; Ernst, H.; Haremza, S.; Seybold, G.; Sies, H.; Stahl, W. and Walsh, R. (2001). "Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of *b*-carotene in antioxidant functions." *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 559-568.

Brand-Williams W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *Lebensm. Wiss. Technol.* **28** (1), 25-30.

Branen, A.L. (1975) "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene" *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.

Burr, M.L. (1994) *J. Human Nutr. Diet.* **7**, 409.

Caragay, A.B. (1992) "Cancer-preventive foods and ingredients." *Food Technol.* **45**, 65-68.

Chen, Q., Huang, S. and Ho, C.-T. (1992). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 999.

Dee-Snell, F. and Ettre, S.L. (1971) "Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. Vol 18" Interscience Publishers. New York, 274-276.

Frankel, E.N. and Meyer, A.S. (2000) *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1925.

Fukuda, Y., Osawa, T., Namiki, M. and Ozaki, T. (1985) "Studies on antioxidative substances in sesame [*Sesamum indicum*] seed." *Agric. Biol. Chem.* **49**, 301-306.

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P. and Amiot, M.J. (1999). "Antioxidant composition and activity of barley and malt extracts and of isolated phenolic compounds." *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1625-1634.

Henning, B. and Toborek, M. (1993) *J. Optimal Nutr.* **2**, 213.

Iverson, F. (1999) "In vivo studies on butylated hydroxyanisole" *Food Chem. Toxicol.* **37**, 993-997.

Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D. and Madhavi, D.L. (1996). "In Food Antioxidants: Technological and Health Perspectives", ed. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K.. Marcel Dekker, New York, 5-64.

Janson, J.-C. (1967) "Adsorption phenomena on Sephadex" *J. Chromatogr.* **28**, 12-20.

Jaworski, A.W. and Lee, C.Y. (1987). "Fractionation and HPLC determination of grape phenolics." *J. Agric. Food Chem.* **35**, 257-259.

Jitoe, A., Masuda, T., Tengah, I.G.P., Suprpta, D.N., Gara, I.W. and Nakatani, N. (1992) "Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids" *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1337-1340.

Joustra, M., Söderqvist, B. and Fischer, L. (1967). "Gel filtration in organic solvents" *J. Chromatogr.* **28**, 21-25.

Krings, U. and Berger, R.G. (2001). "Antioxidant activity of some roasted foods." *Food Chem.* **72**, 223-229.

Mabry, T.J., Markham, K.R. and Chari, V.M. (1982) In: "The Flavonoids, Advances in Research" (eds JR Harborne, TJ Mabry, eds) Chapman and Hall, London, 52-134.

MacManus, S.M. (1999). "The handbook of natural flavonoids. Volumes 1 and 2" Harborne, J.M. and Baxter, H. (editors), Wiley, Chichester.

Madsen, H.L., Bertelsem, G. and Skilsted, L.H. (1997). In "Spices Flavor Chemistry and Antioxidant Properties", Ed. By Risch S.J. and Chi-tang H., American Chemical Society, Washington, DC, pp 176-187.

McComb E.A. and McReady R.M. (1952) "Extraction and determination of total pectic materials in fruits." *Anal. Chem.* **24**, 1630.

McMurrough, I., Loughrey, M. J. and Hennigan, G.P. (1983). "Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in Barley and malt grain" *J. Sci. Food Agric.* **34**, 62-72.

Mikamo, E., Okada, Y., Semma, M., Ito, Y., Morimoto, T. and Nakamura, M. (2000). "Studies on structural-correlation with antioxidant activity of flavonoids". Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi, 7 (2), 97-101.

Middleton, E. and Kandaswani, C. (1992). "Effects of flavonoids on immune and inflammatory function". Biochemical Pharmacology 43, 1167-1179.

Oszmianski, J., Ramos, T. and Bourzeix, M. (1988). "Fractionation of phenolic compounds in red wine". Am. J. Enol. Vitic. 39, 259-262.

Oszmianski, J. and Lee, C.Y. (1990). "Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes". Am. J. Enol. Vitic. 41, 204-206.

Paker, L. (1996) in "Proceedings of the International Symposium on Natural Antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects" Paker, L. Traber, M.G. and Xim, W. Eds; AOCS Press, Champaign, IL, 9-23.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., and Kawakishi, S. (1989) "Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid" J. Agric. Food Chem. 37, 316-319.

Reed, J.D., McDowell, R.E., Van Soest, P.J. and Horwath, P.J. (1982). "Condensed tannins: A factor limiting the use of cassava forage". J. Sci. Food Agric. 33, 213-220.

Ricardo da Silva, J.M., Rosec, J.-P., Bourzeic M. and Heredia, N. (1990). "Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance liquid chromatography". J. Sci. Food Agric. 53, 85-92.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B. (1995). "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids". Free Rad. Res. 22, 375-383.

Rosa, M., Lamuela-Raventós and Waterhouse, A.L. (1994). "A direct HPLC separation of wine phenolics". Am. J. Enol. Vitic. 45, 1-5.

Shahidi, F. and Nacz, M. (1995) in "Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications", Technomic Publ. Co., Lancaster and Basel, 235-277.

Swain, T. and Hillis, W.E. (1959) "The phenolics constituents of prunus domestica. I.- The quantitative analysis of phenolics constituents". J. Sci. Food Agric. 10, 63-68.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. Jr. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents". Am. J. Enol. Vit. 16, 144-158.

Singleton, K. (1981) Flavonoids, In: Advances in Food Research (eds CO Childester, EM Mrak, GF Stewart, eds). Academic Press, New York, vol. 27, 149-242.

Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H. and German, J.B. (1996) "Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines" J. Sci. Food Agric. 70, 55-61.

Terao, J., Piskuli, M. and Yao, Q. (1994). "Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers". Archives of Biochemistry and Biophysics 308, 278-284.

Thompson, L.U. (1994) "Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains" CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34, 473-479.

van Soest P.J. (1973) J. Assoc. Off. Agric. Chem. 56, 780.

van Soest P.J. (1976) J. Assoc. Off. Agric. Chem. 59, 50.

van Soest, P.J. and Robertson, J.B. (1979) "Proceedings of Standards Analytical Methodology for feeds". Ottawa.

Velioglu, Y.S., Mazza, G. Gao, L. and Oomah, B.D. (1998) "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products". J. Agric. Food Chem. 46, 4113-4117.

Wanasundara, U., Amarowicz, R. and Shahidi, F. (1994) "Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal" J. Agric. Food Chem. 42, 1285-1290.

Wanasundra, U.N., and Shahidi, F. (1994) "Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil". J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 817-822.

Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. and Whysner, J. (1999) "Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives". Food Chem. Toxicol. 37, 1027-1038.



**Obtenció d'un producte
comercialitzable amb
 propietats antioxidants a
partir del germen de garroff**

ISBN 84-606-4181-0



9 788460 641810



**Govern
de les Illes Balears**

Conselleria d'Agricultura i Pesca > Direcció General d'Agricultura