

**Universitat de Lleida**

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**

**METODOLOGIES PER A L'ESTUDI DE COMPOSTOS  
FENÒLICS I ALCALOIDES EN EL CACAU (*THEOBROMA  
CACAO*) I LA GARROFA (*CERATONIA SILIQUA L.*):  
EXTRACCIÓ, CARACTERITZACIÓ I AVALUACIÓ DE LA  
DIGESTIBILITAT EN MODEL *IN-VITRO***

**Nàdia Ortega Olivé**

**Tesi Doctoral**

**Gener 2010**









**Universitat de Lleida**

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**

Programa de doctorat  
amb menció de qualitat  
"Sistemes Agrícoles, Forestals i Alimentaris"

**METODOLOGIES PER A L'ESTUDI DE COMPOSTOS FENÒLICS I  
ALCALOIDES EN EL CACAU (*THEOBROMA CACAO*)  
I LA GARROFA (*CERATONIA SILIQUA L.*):  
EXTRACCIÓ, CARACTERITZACIÓ I AVALUACIÓ DE LA  
DIGESTIBILITAT EN MODEL *IN-VITRO***

Memòria presentada per Nàdia Ortega Olivé per optar al grau de Doctora per la  
Universitat de Lleida

L'interessada:

Vist-i-plau de les Directores:

Nàdia Ortega Olivé

M<sup>a</sup> Paz Romero Fabregat

M<sup>a</sup> Jose Motilva Casado



Aquest treball s'emmarca dins el pla de treball del projecte CENIT de la convocatòria 2006, sota la designació "METODOLOGÍAS PARA EL DISEÑO, EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DEL ALZHEIMER (MET-DEV-FUN)", en el qual es pretén desenvolupar estratègies i seqüències metodològiques per a la formulació i validació d'un aliment funcional amb beneficis en la reducció del risc de patir malalties cardiovasculars i neurodegeneratives a partir d'ingredients d'origen natural.



Paral·lelament ha estat financada per :

- ✓ Beca FIE 2006 AGAUR "Ajuts a les empreses que tinguin projectes de recerca i hi vulguin contractar personal investigador a nivel predoctoral" durant el període comprès entre juliol 2007-juliol 2008.
  
- ✓ L'empresa La Morella Nuts, S.A.

**la Morella nuts**





**A l'avi Josep,  
als de casa, a baix i a dalt,  
i a l'Alfons**



## RESUM

Actualment hi ha un especial interès pels compostos fenòlics dels aliments en àmbits de la nutrició, salut i medicina en base a diferents evidències que suggereixen que poden actuar com a potents antioxidants i/o moduladors de funcions biològiques claus en els mamífers. Paral·lelament, hi ha una demanda per part dels consumidors en quant a la informació dels aliments que s'ingereix, de les necessitats nutricionals així com de la millora de salut. Tots aquest conceptes juntament amb la definició imminent de la legislació europea en relació als perfils nutricionals i les al·legacions de propietat de salut porta implícit la disponibilitat de metodologies adequades per a la caracterització dels aliments. Per a donar resposta a una necessitat actual, l'interès d'aquesta tesi es centra en el desenvolupament de metodologies que permetin la identificació, verificació, quantificació i eficiència de compostos bioactius. Aquestes metodologies representen eines de treball que han de facilitar la formulació de nous aliments amb al·legacions de propietat de salut.

Per assolir aquests objectius, aquest treball va seleccionar dues fonts d'origen vegetal per a l'obtenció i avaluació de compostos fenòlics: el cacau i la garrofa. Els extractes de cacau són una font reconeguda de compostos fenòlics, principalment procianidines, i alcaloides. En el present estudi l'interès es centra bàsicament en ampliar la seva caracterització fenòlica, avaluar la seva capacitat antioxidant i l'efecte del processament tecnològic. Per assolir aquesta fita es va treballar amb diversos productes derivats del processament del cacau, sent aquests la fava, el nib, el licor de cacau i el pols de cacau.

L'acceptació dels productes elaborats amb el cacau és universal i darrerament s'han publicat estudis que confirmen que els fenols presents en la xocolata, procedents del cacau, resulten beneficiosos per a la salut. Tot i això, l'alt contingut en greixos saturats, així com la riquesa en sucres són factors limitadors alhora d'aconsejar un increment del consum en una dieta equilibrada. Per aquest motiu es va proposar com a font alternativa la farina de garrofa, per a presentar un contingut baix de greixos i ser una font rica de fibra.

El fruit d'aquest treball es recull en el desenvolupament de tècniques cromatogràfiques que permeten identificar i quantificar el perfil fenòlic dels derivats del cacau i de la farina de garrofa (UPLC-MS/MS) així com tècniques espectrofotomètriques que es poden emprar com a eines ràpides de selecció d'extractes polifenòlics (Folin-Ciocalteu i l'assaig de Vainillina). Al mateix temps, s'han optimitzat dues metodologies d'extracció que han permès l'obtenció d'extractes rics en

compostos fenòlics d'ambdues fonts d'estudi. Els extractes polifenòlics obtinguts han estat avaluats en termes de la capacitat antioxidant a nivell *in-vitro* aplicant el mètode DPPH i posant a punt i aplicant el mètode ORAC. Finalment, s'ha avaluat l'estabilitat dels compostos fenòlics de les matrius d'estudi sota condicions fisiològiques del procés de digestió humana mitjançant el desenvolupament d'un model de digestió gastrointestinal *in-vitro*.

## RESUMEN

En la actualidad hay un especial interés por los compuestos fenólicos de los alimentos en los ámbitos de la nutrición, la salud y la medicina preventiva, basado en diferentes evidencias que indican que los compuestos fenólicos pueden actuar como potentes antioxidantes y/o moduladores de funciones biológicas claves en los mamíferos. Paralelamente, hay una demanda por parte de los consumidores de información acerca de los alimentos que se consumen y de las necesidades nutricionales, así como de la mejora de la salud. Todos estos conceptos, junto con la definición inminente de la legislación europea en relación a los perfiles nutricionales y a las alegaciones de propiedades saludables, lleva implícito la necesidad de disponer de metodologías adecuadas para la caracterización de los alimentos, especialmente para determinar su contenido en componentes minoritarios bioactivos. Para contribuir a dar respuesta a esta necesidad actual, la tesis tiene por objetivo el desarrollo de metodologías que permitan la identificación, verificación, cuantificación y eficiencia de compuestos bioactivos, concretamente de los compuestos fenólicos. Estas metodologías serán herramientas de trabajo de gran utilidad para facilitar la formulación de nuevos alimentos con alegaciones de propiedades saludables.

El trabajo se ha centrado en la obtención y evaluación de compuestos fenólicos de dos fuentes de origen vegetal, el cacao y la algarroba. Los extractos de cacao son una fuente reconocida de compuestos fenólicos, principalmente de procianidinas, y alcaloides. La aceptación de los productos elaborados a partir del cacao es universal y durante los últimos años son numerosos los estudios que confirman que los fenoles presentes en el chocolate, procedentes del cacao, tienen efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, el alto contenido en grasas saturadas, así como la riqueza en azúcares son factores limitadores para el consumo de chocolate en el contexto de una dieta equilibrada. Por este motivo se propuso el estudio de una fuente alternativa, la harina de algarroba, al presentar un contenido bajo de grasa y ser una fuente rica de fibra. El estudio se dirige básicamente hacia la ampliación de las herramientas para la caracterización de la fracción fenólica, y para evaluar tanto la capacidad antioxidante como el efecto del procesamiento tecnológico sobre los compuestos fenólicos. Para alcanzar este último hito se trabajó con diversos productos derivados del procesamiento del cacao, concretamente el haba de cacao, el nib, el licor de cacao y el polvo de cacao.

Los resultados de este trabajo comprenden el desarrollo de técnicas cromatográficas que permiten identificar y cuantificar el perfil fenólico de los derivados del cacao y de la harina de algarroba (UPLC-MS/MS), así como técnicas espectrofotométricas que se presentan como herramientas rápidas de selección de extractos fenólicos (Folin-Ciocalteu y el ensayo de Vainillina). Al mismo tiempo, se ha optimizado dos metodologías de extracción que han permitido la obtención de

extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de ambas fuentes de estudio. Los extractos polifenólicos obtenidos han sido evaluados en términos de la capacidad antioxidante a nivel *in-vitro* aplicando el método DPPH y poniendo a punto y aplicando el método ORAC. Finalmente, se ha evaluado la estabilidad de los compuestos fenólicos de las matrices de estudio en medios que simulan las condiciones fisiológicas del proceso de digestión humana, para lo que se ha desarrollado un modelo de digestión gastrointestinal *in-vitro*. Los resultados han mostrado un claro efecto de la composición de la matriz alimentaria sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión. Estos resultados serán de gran utilidad en la formulación de nuevos alimentos con alegaciones de propiedades saludables.

## ABSTRACT

Nowadays, there has been a growing interest in polyphenols because of their physiological health benefits, including antioxidant activity in the areas of nutrition, health and medicine. In parallel, there is increasing consumer demand for food information concerning nutritional needs as well as the improvement of health. All these concepts, together with the imminent definition of the European legislation in relation to the nutritional profiles and the allegations of health claims, involve the availability of suitable methodologies for food characterization. To respond to these requirements, this thesis is focused on the development of methodologies that allow the identification, verification and quantification of the bioactive compounds (polyphenols). These methodologies are presented as tools of work, which have to facilitate the formulation of new foods with alleged health benefits.

In order to reach these aims, this work selected two vegetable-origin sources to obtain and evaluate phenolic extracts: cocoa and carob. It is well-known that the polyphenol content of cocoa beans is mainly procyanidins, and alkaloids; however, this can vary greatly between different varieties and origins of the beans and also through the manufacturing processes. This work was focused on the evaluation of the cocoa bean and its by-products (nib, liquor and cocoa powder) as a potential source of bioactive compounds (polyphenols), which can be used as ingredients in the food and chocolate industry. The products elaborated from cocoa are universally accepted. In addition, different studies have shown recently that the consumption of cocoa and its products have positive and varied health effects. However, cocoa products contain high levels of saturated fatty acids and sugar, which limit the increase in their consumption in a balanced diet. For these reasons, carob flour was proposed as an alternative source with a marked nutritional value due to its high levels of dietary fiber and phenol compounds.

The results of this work are the development of several chromatographic techniques, which allow the phenolic profile of cocoa derivatives and carob flour (UPLC-MS/MS) to be defined and quantified. In addition, several spectrophotometrical techniques are proved as fast tools for monitoring the phenol yield efficiency of the obtained extracts (Folin-Ciocalteu and the Vainillin assay). Also, two optimized extraction methodologies have allowed phenol-rich extracts to be obtained from cocoa and carob. The phenol extracts obtained have been evaluated in terms of their antioxidant capacity using *in-vitro* methods, such as DPPH and ORAC. Finally, the stability of the phenolic compounds in cocoa and carob samples has been studied under human physiological digestion conditions through the development of an *in-vitro* gastrointestinal model.





## Zusammenfassung

Derzeit ist ein zunehmendes Interesse an Polyphenolen in Lebensmitteln zu beobachten, dies vor allem wegen deren antioxidativer Wirkung und positivem physiologischen Einfluss auf die Gesundheit. Dieses Interesse ist nicht auf Ernährungswissenschaften und Medizin beschränkt, sondern erstreckt sich von der Gesetzgebung bis hin zu den Verbrauchern, die besonders eine ihrer Gesundheit dienliche, umfassende Unterrichtung über Beschaffenheit und Wirkungen der Nahrungsmittel fordern. Ein Anspruch an gesunde Ernährung wird nicht infrage gestellt, die Verwirklichung ist jedoch schon allein wegen der Vielzahl der Begriffe trotz der geplanten Europäischen Gesetzgebung fragwürdig. Eine den Anforderungen gerechte Lebensmittelkennzeichnung setzt sowohl eine einheitliche Begrifflichkeit wie auch eine nachprüfbar Methodik voraus.

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, die eine Identifizierung, Prüfung und Quantifizierung der Polyphenole in Lebensmitteln ermöglichen. Als Ergebnis werden die Methoden vorgestellt, mit denen neue Lebensmittel auf ihre gesundheitlichen Wirkungen überprüft werden können.

Vorgehensweise: Es wurden zwei Lebensmittel, und zwar Kakao und Johannisbrot, zur Erlangung und Auswertung von Phenolextrakten ausgewählt. Der Polyphenolgehalt der Kakaobohne, vorwiegend Procyanidin und Alkaloide, ist zwar bekannt, Qualität und Menge hängen jedoch von unterschiedlichen Kakaobohnen und Herstellungsverfahren ab und unterscheiden sich von Produkt zu Produkt. In dieser Arbeit wurde die Kakaobohne und die aus ihr hergestellten Produkte wie Kakaopulver und Kakaobutter, die in der industriellen Herstellung von Schokolade und anderen kakaohaltigen Lebensmitteln verwendet werden, als potentielle Quelle von Polyphenolen untersucht. Die Akzeptanz kakaohaltiger Lebensmittel ist weltweit groß. In verschiedenen Studien wurden zudem positive Wirkungen des Kakaos auf die Gesundheit nachgewiesen. Kakaohaltige Produkte wie Schokolade enthalten jedoch in hohem Maße gesättigte Fettsäuren und Zucker, so dass ihr Verbrauch bei einer ausgewogenen Ernährung nicht erhöht werden sollte. Aus diesem Grunde wurde auch Johannisbrotmehl untersucht, das sowohl Polyphenole als auch Ballaststoffe in hohem Maße enthält und möglicherweise als alternatives Lebensmittel für die Kakaobohne verwendet werden kann.

Ergebnisse: Es wurden Chromatographische Techniken entwickelt, die eine Identifizierung und Quantifizierung des Polyphenolische des Kakaos und Johannisbrotmehls ermöglichen (UPLC-MS/MS). Darüber hinaus wurden mehrere spektrophotometrische Techniken (Folin-Ciocalteaus Vainillin Tests) als schnelle Methoden der Kontrolle evaluiert. Gleichzeitig wurden zwei verbesserte Extraktionsmethoden gefunden, die die Ausbeute von extrahierten Polyphenolen aus Kakao und Johannisbrotmehl erhöhen. Zudem sind die so erlangten Phenolextrakte mit Hilfe von *in-vitro* Methoden wie DPPH und ORAC auf ihre antioxidative Kapazität überprüft worden. Mit einem hierfür entwickelten Gastrointestinalmodell konnte schließlich die Stabilität der Phenolbestandteile in Kakao und Johannisbrotmehl unter physiologischen Verdauungsbedingungen des Menschen *in-vitro* untersucht werden.

## Abreviatures

**<sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub>**: oxigen singlet  
**AAPH**: 2,2'-azobis(2-amidino-propano)dihydrochloride  
**ACC**: acetil-CoA-carboxilasa  
**AOAC**: Association of Official Agricultural Chemists  
**APCI**: Ionització química a pressió atmosfèrica  
**APPI**: Fotoionització a pressió atmosfèrica  
**ASE**: Extracció amb solvents accelerada  
**AUC**: Àrea sota la corba  
**B-PE**: Ficoeritrina  
**C**: Carboni  
**CAT**: Catalasa  
**CBG**: Carob bean gum  
**CH<sub>3</sub>**: Metil  
**CO°**: Alcòxids  
**CO<sub>2</sub>**: Diòxid de carboni  
**COMT**: Catecol-O-metil transferasa  
**COO°**: Radicals carboxil  
**DAD**: Detector de fotodiodes en fila  
**DFR**: Dihidroflavonol-4-reductasa  
**DPPH**: Diphenyl-1-picrylhydrazyl  
**e**: Electrò  
**EFSA**: European Food Safety Authority  
**ESI**: Ionització en electroespray  
**F<sub>3</sub>H**: flavanona-3-hidrolasa  
**FDA**: Food and Drug Administration  
**FL**: Fluorescència  
**FLS**: Flavonol sintetasa  
**FN**: Fase normal  
**FR**: Fase inversa  
**FRAP**: Ferric reducing ability of plasma  
**FS**: flavanona sintetasa  
**FTMS**: Analitzador de masses transformada de Fourier  
**GPX**: Glutatió peroxidasa  
**GSH**: Glutatió  
**GSSG**: Glutatió oxidat  
**H**: Hidrogen  
**H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>**: Hidroxilasa  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peròxid d'hidrogen  
**HCIO**: Àcid hipoclorós  
**HILIC**: Hydrophilic interaction chromatography  
**H-ORAC**: Hidrophilic-ORAC  
**HPLC**: Cromatografia líquida d'alta resolució  
**HSS**: High strength silica  
**IPP**: Isopentenilpirofosfat  
**IS**: Isoflavona sintetasa  
**LDL**: Low density lipoprotein  
**LLE**: Extracció líquid-líquid  
**LPH**: Hidrolasa floridzina lactasa  
**m/z**: massa/càrrega  
**MDA**: Malondialdehid  
**MS/MS**: Espectrometria de masses en tàndem  
**MS**: Espectrometria de masses

**NADH:** Nicotinamide adenine dinucleotide  
**RMN:** Ressonància magnètica nuclear  
**NO<sup>-</sup>:** Anió nitroxil  
**NO<sup>·</sup>:** Òxid nítric  
**NO<sup>+</sup>:** Catió nitrosil  
**NO<sub>2</sub>:** Diòxid de nitrogen  
**O:** Oxigen  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Radical superòxid  
**O<sub>3</sub>:** Ozó  
**OH<sup>-</sup>:** Anió hidroxil  
**OH:** Grup hidroxil  
**ORAC:** Oxygen radical absorbance capacity  
**p:v:** pes:volum  
**PAL:** Fenilalanina amoni-liasa  
**PLE:** Extraccions pressuritzades  
**PUFA:** Àcids grassos poliinsaturats  
**RBrS:** Espècies reactives del brom  
**RCIS:** Espècies reactives del clor  
**RL:** Radical lliure  
**RNS:** Espècies reactives del nitrogen  
**RO<sup>·</sup>:** Radical alcòxid  
**ROO<sup>·</sup>:** Radical peròxid  
**ROS:** Espècies reactives d'oxigen  
**S-L:** Sòlid-liquid  
**SLE:** Extracció sòlid-liquid  
**SOD:** Superòxid dismutasa  
**SPE:** Extracció en fase sòlida  
**STS:** Estilbè-sintasa  
**T2DM:** Diabetis Mellitus tipus 2  
**TLC:** Cromatografia de capa fina  
**UDP-GT:** UDP-glucoronosil transferasa  
**UPLC:** Cromatografia d'ultra ràpida resolució  
**UV:** Ultraviolat  
**v:v:** volum:volum  
**v+v:** volum+volum  
**XI:** Calcona isomerasa  
**XS:** Calcona sintetasa

<b>Introducció</b> .....	1
<b>1. Ingredients d'origen vegetal</b> .....	1
<b>2. Fonts vegetals</b> .....	3
<b>2.1. <i>Theobroma cacao</i></b> .....	3
<b>2.2. <i>Ceratonia siliqua</i> L.</b> .....	6
<b>3. Compostos d'interès</b> .....	11
<b>3.1. Polifenols</b> .....	11
3.1.1. Concepte i diversitat estructural .....	11
3.1.2. Química i biosíntesi dels compostos fenòlics .....	16
3.1.3. Paper antioxidant dels polifenols .....	18
3.1.3.1. L'oxigen .....	18
3.1.3.2. Radical Lliure (RL) .....	19
3.1.3.3. Estrès oxidatiu .....	23
3.1.3.4. Mecanisme de defensa enfront l'estrès oxidatiu .....	24
3.1.4. Activitat i paper dels polifenols .....	27
<b>3.2. Alcaloides</b> .....	30
3.2.1. Concepte i diversitat estructural .....	30
3.2.2. Caracterització dels alcaloides .....	31
3.2.3. Alcaloides de <i>Theobroma cacao</i> i <i>Ceratonia siliqua</i> L. ....	33
<b>3.3. Extracció i purificació de polifenols en cacau i garrofa</b> . . .	34
<b>3.4. Metodologies analítiques per a la determinació de polifenols</b> .....	38
3.4.1. Anàlisis espectrofotomètriques dels polifenols .....	38
3.4.2. Anàlisis cromatogràfiques dels polifenols .....	39
3.4.3. Determinació de polifenols <i>Theobroma cacao</i> i <i>Ceratonia siliqua</i> L. ....	43
<b>3.5. Metodologies per a avaluar la capacitat antioxidant</b> .....	45
<b>3.6. Biodisponibilitat dels polifenols</b> .....	49
3.6.1. Fisiologia de l'aparell digestiu i models de digestió proposats per a reproduir-ne les condicions .....	50
3.6.2. Bioaccessibilitat, biodisponibilitat i metabolisme dels polifenols . .	53
3.6.3. Efecte matriu i processat de la bioaccessibilitat, biodisponibilitat i metabolisme dels polifenols .....	55
<b>Objectius</b> .....	58
<b>Pla de treball</b> .....	60
<b>Resultats</b> .....	63
<b>Treball 1: Comparative study of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine procyanidins and alkaloids in cacao samples</b> .....	63

<b>Treball 2:</b> Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flour by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry .....	79
<b>Treball 3:</b> Obtention and characterization of phenolic extracts from different cacao sources .....	85
<b>Treball 4:</b> Extracts of carob flour rich in flavonoids and phenolic acids: optimization of the extraction parameters .....	92
<b>Treball 5:</b> Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cacao polyphenol by an <i>in-vitro</i> digestion model terization of phenolic extracts from different cacao sources .....	107
<b>Treball 6:</b> Matrix effect on the digestibility of carob flour polyphenols by an <i>in-vitro</i> digestion model .....	114
<b>Discussió</b> .....	130
<b>Conclusions</b> .....	147
<b>Bibliografia</b> .....	160
<b>Annexos</b> .....	162
1. Informació addicional a l'obtenció dels extractes polifenòlics de <i>Theobroma cacao</i> i <i>Ceratonia siliqua</i> L. ....	162
1.1. Rendiments del desengreixat de les fonts de cacau .....	162
1.2. Rendiments de l'extracció fenòlica de les fonts de cacau .....	162
1.3. Caracterització fenòlica de les fonts de cacau .....	163
1.4. Rendiments del desengreixat i rentat de la farina de garrofa .....	164
1.5. Rendiments de l'extracció fenòlica de la farina de garrofa i la farina de garrofa rentada .....	165
2. Informació addicional a l'anàlisi cromatogràfica de polifenols de <i>Ceratonia siliqua</i> L. ....	166
3. Documentació científica presentada en congrés internacional de polifenols (ICP) .....	167

## Índex de figures

<b>Figura 1.</b> El fruit del <i>Theobroma cacao</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flux del processat de les faves del cacau per a l'obtenció dels seus derivats: el nib de cacau, el licor de cacau, la pols de cacau i la mantega de cacau .....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura del fruit de la garrofa .....	7
<b>Figura 4.</b> Diagrama del processat de les baines de garrofa .....	8
<b>Figura 5.</b> Llavor de garrofi constituïda per la cutícula, endosperma i l'embrió .....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura base d'un flavonoide .....	14
<b>Figura 7.</b> Esquema de les rutes de síntesi de les principals tipologies de compostos polifenòlics. ACC <i>acetil-CoA-carboxilasa</i> ; PAL <i>fenilalanina amoni-liasa</i> ; H <sub>1</sub> -H <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> <i>hidroxilases</i> ; STS <i>l'estilbè-sintasa</i> ; CS <i>calcona sintetasa</i> ; CI <i>calcona isomerasa</i> ; FS <i>flavanona sintetasa</i> ; IS <i>isoflavona sintetasa</i> ; FLS <i>flavonol sintetasa</i> ; F3H <i>flavanona-3-hidrolasa</i> ; DFR <i>dihidroflavonol-4-reductasa</i> .....	17
<b>Figura 8.</b> Formació de les principals espècies radicals i no radicals lliures a partir de l'oxigen .....	19
<b>Figura 9.</b> Mecanisme d'actuació dels radicals lliures (adaptació Kohen i col., 2002) .....	20
<b>Figura 10.</b> Danys per acció dels RL a nivell cel·lular: (1) alteracions ADN, (2) desestructuració de macromolècules, (3) modificació funcions cel·lulars, (4) inhibició regulació enzimàtica i (5) pèrdua de la integritat cel·lular .....	21
<b>Figura 11.</b> Reaccions en cadena de la peroxidació lipídica .....	21
<b>Figura 12.</b> Mecanisme d'actuació dels antioxidants (adaptació Kohen i col., 2002) .....	25
<b>Figura 13.</b> Estructura química de la quercetina .....	29
<b>Figura 14.</b> Estructura química de la cafeïna i teobromina .....	31
<b>Figura 15.</b> Diferents etapes de la purificació d'un extracte fenòlic per extracció en fase sòlida (SPE): (1) Condicionament del cartutx; (2) Addició de la mostra; (3) Eliminació d'analits interferents; (4) Elució de l'extracte .....	37
<b>Figura 16.</b> Representació de les parts que componen els models de digestió gastrointestinal <i>in-vitro</i> (boca, estómac i budells) per a reproduir les condicions fisiològiques dels polifenols sotmesos a la digestió .....	50
<b>Figura 17.</b> Esquema de les vies de circulació dels polifenols dins l'organisme (adaptació de Holst i col., 2009) .....	52
<b>Figura 18.</b> Quantitat total que disposa un aliment dels seus nutrients i que disminueixen en relació al seu processat però que augmenta la seva biodisponibilitat per supressió del efecte matriu (adaptació de Parada i col., 2007) .....	56

## Índex de taules

<b>Taula 1.</b> Principals categories de compostos fenòlics . . . . .	11
<b>Taula 2.</b> Estructura fenòlica dels principals àcids hidroxibenzoics i hidroxicinàmics . . . . .	12
<b>Taula 3.</b> Principals classes de flavonoides en la naturalesa (adaptació de Manach i col., 2004) . . . . .	14
<b>Taula 4.</b> Classificació de les metilxantines segons la seva estructura química . . . . .	31
<b>Taula 5.</b> Solvents emprats per l'optimització de l'extracció de procianidines en mostres de cacau (adaptació de Counet i col., 2003) . . . . .	35
<b>Taula 6.</b> Solvents emprats en la bibliografia per a l'extracció de compostos fenòlics en mostres de garrofa. . . . .	36
<b>Taula 7.</b> Rendiments de l'etapa de desengreixat de les mostres de cacau, expressat per g d'extracte desengreixat per 100g de mostra inicial . . . . .	162
<b>Taula 8.</b> Rendiments de l'etapa d'extracció fenòlica S-L i SPE, expressat per g d'extracte fenòlic brut i purificat per 100g de mostra inicial . . . . .	162
<b>Taula 9.</b> Condicions optimitzades de l'etapa d'extracció fenòlica SPE per l'obtenció d'extractes purificats del cacau . . . . .	163
<b>Taula 10.</b> Recuperacions de la catequina en l'etapa d'extracció SPE per l'obtenció d'extractes purificats de cacau . . . . .	163
<b>Taula 11.</b> Quantificació de procianidines, àcids fenòlics i flavonoides en les diferents matrius d'estudi del cacau: fava, nib, licor i pols de cacau . . . . .	163
<b>Taula 12.</b> Rendiments de l'etapa de desengreixat i rentat de la farina de garrofa, expressat en g de farina de garrofa desengreixada i rentada per 100g de mostra inicial, respectivament. Caracterització de les aigües de l'etapa de rentat de la farina de garrofa, expressat en °Brix . . . . .	164
<b>Taula 13.</b> Rendiments d'extracció fenòlica de la farina de garrofa i farina de garrofa rentada . . . . .	165
<b>Taula 14.</b> Condicions SRM per a l'anàlisi de polifenols i alcaloides per UPLC-MS/MS . . . . .	166



**“Todo científico creador sabe que el verdadero laboratorio es la mente; allí, más allá de toda ilusión, describe él las leyes de la verdad“.**

**Jagadis Chandra Bose  
(Físic i botànic indú)**









## 1. Ingredients d'origen vegetal

En les darreres dècades, s'ha constatat una evidència científica que dóna suport a la relació existent entre l'alimentació i la salut humana. Aquesta relació ja es va manifestar per Hipòcrates des de Grècia quan va predicar “*que el menjar sigui el teu aliment i l'aliment el teu medicament*”. Les propietats beneficioses que exerceixen els aliments d'origen vegetal superen les expectatives dels seus nutrients, vitamines i sals minerals; per tant, aquestes propietats s'han d'atribuir a la presència de quelcom addicional. Fruit de la necessitat de trobar una explicació a la relació esmentada, in comptables estudis científics en les darreres dècades han pogut demostrar que els aliments d'origen vegetal contenen quantitats considerables de compostos amb propietats beneficioses per a la salut humana anomenats substàncies fitoquímiques o fitonutrients (Espin i col., 2007). Aquestes substàncies es presenten en un gran nombre de fonts d'origen vegetal i es poden diferenciar en funció de la seva estructura química: els isoprenoides (ex., carotenoides, terpens); els polifenols (ex., àcids fenòlics, flavonoides, lignans); estructures de base proteica (ex., certs aminoàcids, seqüències peptídiques determinades); lípids (ex., àcids poliinsaturats i monoinsaturats); carbohidrats (ex., fructoligosacàrids i midons); minerals (ex., calci, seleni). Entre les diferents propietats que s'han atribuït a les substàncies fitoquímiques, la capacitat antioxidant ha estat la que més interès ha despertat, ja que la gran majoria dels processos oxidatius són l'origen de malalties actuals (cardiovasculars, neurodegeneratives, entre d'altres), que podrien veure's disminuïdes gràcies a un consum d'aquestes substàncies fitoquímiques (Bazzano i col., 2003; Calabrese i col., 2008)

Fruit de la publicació del reglament (CE) n° 1924/2006 en relació a les declaracions nutricionals i de propietats saludables dels aliments, es pretén proposar unes directrius que garanteixin l'elaboració i producció d'aliments saludables pels productors d'aquest sector. Una *al·legació de propietat de salut* s'entén com a qualsevol declaració que pugui emprar-se en l'etiquetat, comercialització o publicitat, on s'indica que la ingesta determinada d'un aliment o ingredient dóna lloc a beneficis per a la salut del consumidor. Perquè un aliment pugui presentar al·legacions de salut, aquest ha de garantir un *perfil nutricional*, que a la vegada es defineix segons la categoria a què pertany el producte alimentari. Tant la designació de l'atribut *al·legació de propietat de salut* com els valors i categories dels *perfils nutricionals* són conceptes que s'estan definint des de l'EFSA (European Food Safety Authority). Perquè un aliment o ingredient pugui al·legar propietats de salut s'han de presentar evidències científiques consolidades. Per aquest motiu, des de l'EFSA s'estudien cadascuna de les sol·licituds que componen una llista de gairebé 40.000 aliments. Entre

les substàncies fitoquímiques es poden trobar els polifenols procedents d'òrgens vegetals diversos com el raïm, el cacau o el te, entre d'altres; mentre que com a aliment s'ha identificat la xocolata per presentar flavonoides amb activitat antioxidant; i com a conseqüència, contra malalties cardiovasculars. La definició de la tipologia i dosis de polifenol present en la matriu alimentària a on s'ha d'incorporar; així com la pròpia definició de la composició de la matriu alimentària i la seva ingesta diària per assolir aquests efectes beneficiosos per a la salut són conceptes amb molta discordança entre les diferents sol·licituds presentades. La Comissió Europea té previst l'elaboració d'una "llista positiva" (anunciada per a principis de l'any 2010) de les declaracions de propietats de salut permeses i totes les condicions del seus usos en base a les diferents al·legacions que han presentat els diferents estats membres.

Aprofitant el coneixement sobre l'activitat de les substàncies fitoquímiques i la reglamentació vigent pendent de resolució, la indústria alimentària ha mostrat interès per a garantir la presència d'aquestes substàncies fitoquímiques així com satisfer als consumidors amb aliments ajustats a perfils nutricionals i amb al·legacions de propietat de salut. Amb l'objectiu d'assolir aquesta fita, en les darreres dècades s'han iniciat línies d'investigació focalitzades en les substàncies fitoquímiques. En aquest camp, els extractes vegetals assoleixen una importància vital per ser rics en substàncies fitoquímiques; destacant-ne els polifenols (Scalbet i col., 2005). Tot i això, encara roman un camí llarg en la cerca de fonts vegetals riques en polifenols o altres possibles substàncies fitoquímiques que presentin activitat biològica, així com en l'obtenció d'aquests compostos bioactius aïllats o concentrats per emprar-los com a ingredients. El punt de partida de la indústria alimentària per a sol·licitar i garantir qualsevol al·legació de propietat de salut és l'estudi i la caracterització de les matèries primes d'origen vegetal, sobre les quals s'haurà de definir quina és la seva activitat i biodisponibilitat.

Paral·lelament, en l'actualitat, els recursos naturals són escassos i limitats; per tant, és important el plantejament de la rendibilització al màxim de tots els recursos vegetals. Per assolir aquest objectiu s'ha de tenir en compte l'aprofitament de totes les parts que conformen els recursos d'origen vegetal; entre aquests, els més obvis són les llavors i fruits; però no cal renunciar a d'altres parts d'aquests com poden ser les fulles, tronc, closques, pells i arrels. D'altra banda, s'ha de plantejar la possibilitat d'aprofitar els subproductes generats per la pròpia indústria alimentària durant el processat d'aquests recursos vegetals. Els subproductes i residus que es generen en la indústria alimentària poden donar un valor afegit als aliments, i al mateix temps generar una font d'ingressos addicional per a la pròpia indústria.

## 2. Fonts vegetals

### 2.1. *Theobroma cacao*

Els primers indicis del cacau són datats del 2000 a.C., en una petita illa a la vall d'Ulúa a Hondures, fruit de la identificació de teobromina en restes de ceràmiques. Posteriorment s'ha descobert que el cacau va ser un producte de vital importància en l'àmbit de la religió i l'agricultura de la cultura Maia (200-900 d.C.) (www.barry callebaut.com, 2009). És sabut que tant els maies com els asteques preparaven una beguda a partir de les faves de cacau trossejades i torrades anomenada "xoxocoatl", "chocolatl" i "cacahuatl", que era reservada exclusivament per als alts càrrecs de la societat, i que amb els anys ha evolucionat cap al terme "xocolata" (Lupien i col., 1999). La llavor de cacau va ser tan apreciada i valorada que els asteques la van arribar a utilitzar com a moneda de canvi (Lupien i col., 1999). El cacau fou introduït a Europa, via Espanya l'any 1505, portant la llavor de cacau i les instruccions per a fer aquesta beguda destinada als aristòcrates de la societat de l'època.

Les evidències medicinals del cacau i la xocolata es remunten a les èpoques asteques, i aquesta saviesa fou transmesa cap a Europa. Des del segle XVII es poden identificar textos anglesos, francesos i espanyols on es describen les propietats beneficioses del cacau i la xocolata per a combatre símptomes com l'anèmia, la tuberculosi, la febre, el desig sexual o les digestions pesades, entre d'altres (Dillinger i col., 2000).

L'augment territorial del cultiu del cacau va fer disminuir el seu cost i com a conseqüència el va fer accessible a la resta de la societat. Conrad van Houten (Holanda), al 1828, va ser el primer a processar les llavors de cacau per a l'obtenció de pols de cacau (www.barry callebaut.com, 2009). Posteriorment Daniel Peters (Vevey, Suïssa) va desenvolupar un nou producte derivat del cacau, on hi va introduir altres ingredients com la llet (Borchers i col., 2000). A partir d'aquestes propostes i fins a l'actualitat, multitud de formulacions s'han desenvolupat per a generar un ventall ampli de productes a partir del cacau (www.barry callebaut.com, 2009).

L'arbre anomenat *Theobroma cacao* pertany a la família de les *Sterculiaceae* i es troba en climes càlids d'àrees pròximes a l'Equador. S'identifiquen principalment tres varietats: crioll, foraster i trinitari, sent la darrera un encreuament de les dues primeres. El fruit és una panotxa polisperma indehiscent de 10 a 30 cm de llargada i de 7 a 10 cm d'amplada, que presenta forma de carbassó allargat (Figura 1) (Bartley, 2005).

El fruit del cacau consta de tres parts: el pericarpí, el mesocarpí i l'endocarpí. El mesocarpí és una polpa mucilaginosa rosada, dolça i viscosa que presenta entre 30 i 50 llavors o faves de cacau. La tonalitat del fruit varia des de groc-verdosa a vermelloso-ataronjada en funció de l'estat de maduresa. L'endocarpí (les llavors) es caracteritza per presentar un alt percentatge de greix (50-55%), polifenols (responsables de la tonalitat marronosa-violeta de les llavors) i d'alcaloides, com la teobromina i la cafeïna.

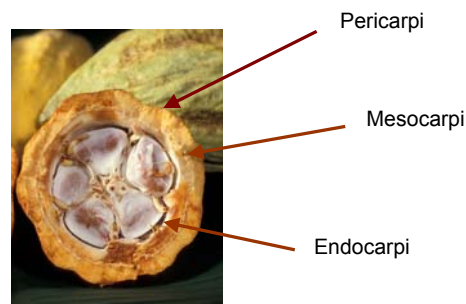
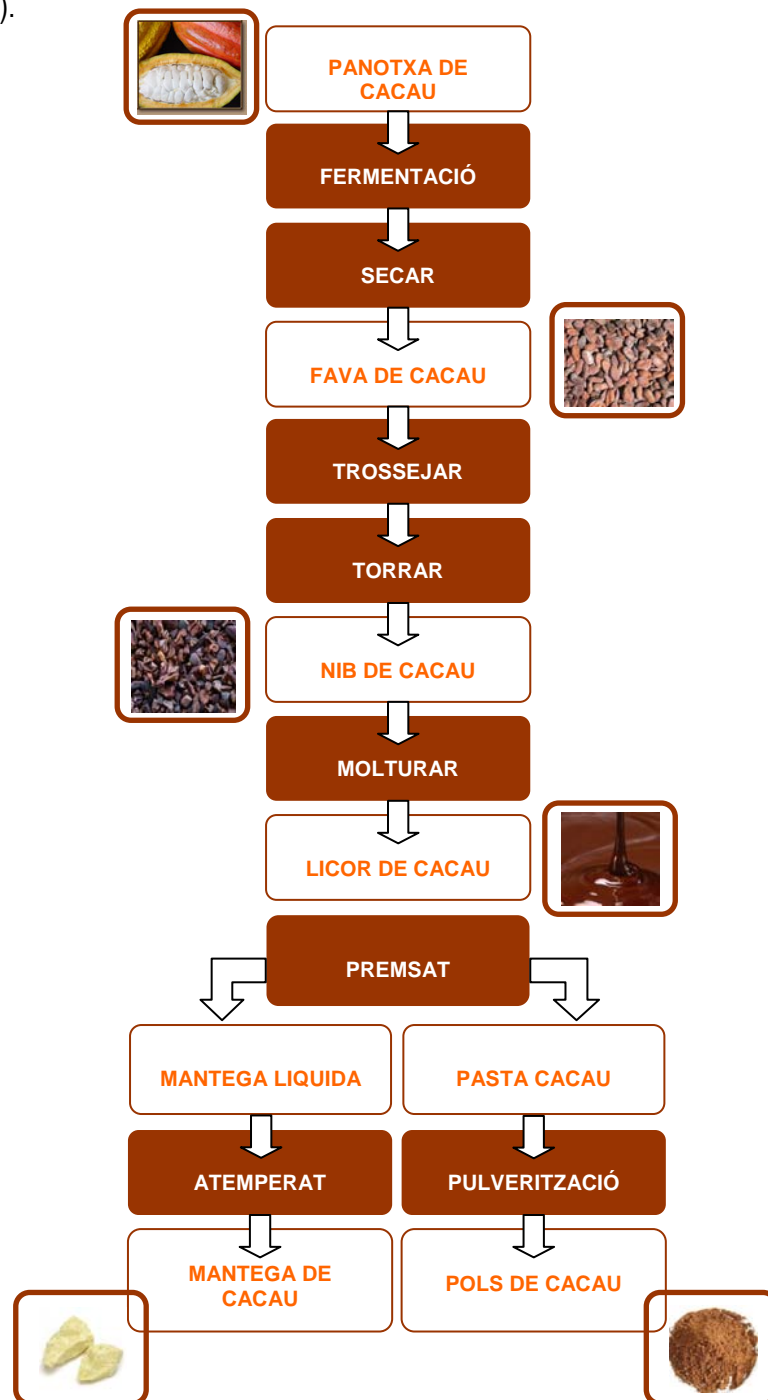


Figura 1. El fruit del *Theobroma cacao*

El processat del cacau s'inicia amb una recol·lecció de les llavors, i aquestes són sotmeses a un procés de fermentació en camp. Durant la fermentació, l'acció combinada de la temperatura, pH i humitat contribueixen a una disminució de l'amargor de la llavor desencadenant la formació de les aromes típiques del cacau. La duració d'aquesta etapa pot oscil·lar entre tres i vuit dies en funció de la varietat; *criolls* o cotilèdons blancs supera els tres dies, mentre que per cacaos *forasters* o cotilèdons púrpures poden arribar als vuit dies. Durant els primers dies de la fermentació, la polpa esdevé un líquid, i aquest es difon pel teixit vegetal. Els polifenols, presents en la polpa, es difonen conjuntament i emergeixen dels cotilèdons. En aquest procés els polifenols són sotmesos a reaccions d'oxidació, que tenen com a conseqüència la condensació i generació dels tanins condensats. Els polifenols que es troben lliures, com l'epicatequina, es veuen disminuïts fruit de la condensació entre diverses molècules donant lloc a la formació d'oligòmers; o per contra, es perden per difusió (Kim i col., 1984). En els darrers dies de la fermentació es mantenen les llavors a altes temperatures i s'agiten periòdicament per a garantir que té lloc la fermentació en tot el producte. Les condicions anaeròbiques, característiques de la fermentació, produeixen etanol i àcid acètic, que inhibeixen la possibilitat de la germinació de la llavor i donen lloc a canvis en el perfil enzimàtic i a nivell de substrats. Una vegada les llavors han fermentat, aquestes es sotmeten a un procés d'assecat per a reduir la humitat del producte i així garantir la seva estabilitat durant l'emmagatzematge i el transport (Kim i col., 1984).



La producció de derivats del cacau té lloc a partir de la llavor de cacau fermentada rebuda en la indústria (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de flux del processat de les faves del cacau per a l'obtenció dels seus derivats: el nib de cacau, el licor de cacau, la pols de cacau i la mantega de cacau.

Després de diversos controls de recepció, normalment s'aplica un procés d'assecat. Posteriorment, es sotmet a diferents torrats per afavorir el desenvolupament final de les aromes i flavors del cacau que s'han originat en l'etapa de fermentació. El grau de torrat dependrà de les

variables temps i temperatura, que poden oscil·lar entre 0-120 minuts i 120–150°C, respectivament. Durant aquesta etapa, es perd la pel·lofa de les llavors de cacau (Kealey i col., 1998) i seguidament s'aplica un trossejat de la llavor per a obtenir els nibs. A continuació, els nibs són mòlts i refinats obtenint una pasta rica en greixos, anomenada licor de cacau. La fluïdesa del licor de cacau ve donada pel pas de la molturació dels nibs, ja que en aquest procés es produeix un trencament de les parets cel·lulars que afavoreix la sortida dels greixos del producte (Kealey i col., 1998). Finalment, el licor de cacau és premsat amb la finalitat d'extreure els greixos, la mantega de cacau, de la massa sòlida, anomenada pasta de cacau. La pasta de cacau és esmicolada en petits trossets i polvoritzada per donar lloc a la pols de cacau. En aquest cas, ambdós productes obtinguts del licor de cacau, la mantega i la pols de cacau, són ingredients bàsics en les formulacions de xocolates i els seus derivats (www.barry-callebaut.com, 2009).

Existeix la possibilitat de sotmetre qualsevol dels derivats que s'obtenen del processat del cacau (les llavors, els nibs, el licor i la pols) a un procés d'alcalinització. No és un etapa indispensable, però condiona les propietats sensorials del producte final com és el cas de l'obtenció de diferents intensitats de coloració de la pols de cacau segons el tractament alcalí rebut.

## **2.2. *Ceratonia siliqua* L.**

L'origen del garrofer s'atribueix a la regió est del Mediterrani (Brand, 1984; Kumazawa i col., 2002). Es creu que hauria estat difós pels grecs cap a Itàlia i un cop allí els àrabs, vorejant la costa nord d'Àfrica, l'introduirien a Espanya, des d'on seria distribuït a Portugal i al sud-oest de França. A l'edat mitjana, el quirat va ser una unitat de pes de materials preciosos, denominació que té origen en la paraula àrab "querat", sent el nom que rebien les llavors del garrofer. Aquest fet confirma d'una banda l'antiguitat i d'altra l'origen mediterrani del garrofer (Tous i col., 1990).

El nom científic de l'arbre garrofer (*Ceratonia siliqua* L.) deriva del grec *keras* (horn) i del llatí *siliqua* (fent referència a la duresa i forma de la beina). El nom comú pren origen de l'hebreu *kharuv*, d'on n'ha derivat el nom en d'altres llengües com *kharrub* (àrab), *algarrobo* (espanyol), *Johannisbrot* (alemany) o *garrofa* en català. La garrofa també és coneguda com St. John's bread o locust bean, en referència a la descripció que se'n fa com aliment per Joan Baptista en la Bíblia, d'on ha derivat també el nom en alemany *Johannisbrotbaum* (Batlle i col., 1997).

El garrofer és un arbre perenne que pertany a la família de les Papilionàcies. El fruit de la garrofa (Figura 3) és una síliqua o llegum indehiscent que presenta forma allargada, més o menys corbada de fins a 25 cm. En el fruit, es poden diferenciar tres estructures bàsiques: epicarpi o coberta exterior, de naturalesa fibrosa; mesocarpí o polpa, constitueix la part carnosa de la beina amb textura farinosa i molt rica en sucres; i l'endocarpí o capa interna, de naturalesa fibrosa i que divideix la llegum en espais destinats a allotjar les llavors. La part interna està constituïda per llavors el·lipsoidal·s vermel·lo·ses i llises, presentant-se entre 5-15 en cada beina (Batlle i col., 1997).

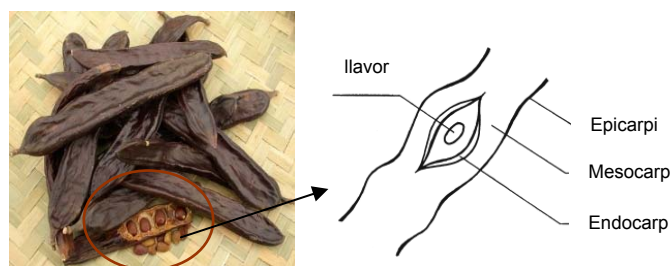


Figura 3. Estructura del fruit de la garrofa

La forma, color, grandària i composició química de cada beina i llavor difereix en funció de la varietat, localització i les pràctiques de cultiu. Les principals varietats de garrofer dels Països Catalans s'identifiquen segons regions (Batlle i col., 1997; Tous i col., 2001).

- Barcelona: Negra, Banya de cabra, Molla negra, Banya de marrà
- Tarragona: Negra, Rojal, Valencià, Costella de ruc, Negret de pom, Tendral, Mixt, Dolça
- Mallorca: D'en bugader; Rotge, De la mel, Costella d'ase, Pic d'abella, Duraió, De la canal, Mollar
- Eivissa: Panesca, Borda, Orellona i Boval
- Castelló: Negra, Ralladora, Banyeta, Costella de cavall, Tembril, Murtera, Matalafera
- València: Matafalera, Melera, Costella, Rocha, Negra, Chopa, Casuda, Caches, Llisa, Blanca
- Alacant: Llindar, Costella de bou, Vera, Fornera, Melera, Blanca, De la peña, Ramillete, Mojonera

El processat de les baines de la garrofa s'inicia amb un assecat del fruit amb l'objectiu de reduir el seu contingut d'aigua, de 15-20% fins a valors per sota el 8%, facilitant el seu emmagatzematge durant llargs períodes. Les baines de les garrofes presenten dos components majoritaris de gran interès per a la indústria: la polpa i les llavors. Així doncs, el processat de les baines de garrofa contempla dues línies diferents en funció de si es tracta de la polpa o de les llavors (Figura 4). La primera operació sobre les baines és una separació física mitjançant un tractament mecànic (kibbler) per tal d'obtenir els dos components que se'n deriven: la polpa i les llavors.

A la fracció de la polpa trossejada se l'anomena kibbles i es pot presentar en diferents granulometries, triturada o polvoritzada, en funció del destí final del producte, bé sigui alimentació animal o humana. La indústria alimentària aplica una sèrie de tractaments sobre els kibbles: deshidratació (en funció de la conservació del producte), torrat (els rangs oscil·len entre els 100-250 °C influint en la coloració final del producte); així com una molturació i polvorització intensa obtenint una pols fina anomenada pols o farina de garrofa, que presenta un aspecte sensorial molt similar a la pols de cacau (Yousif i col., 2000).

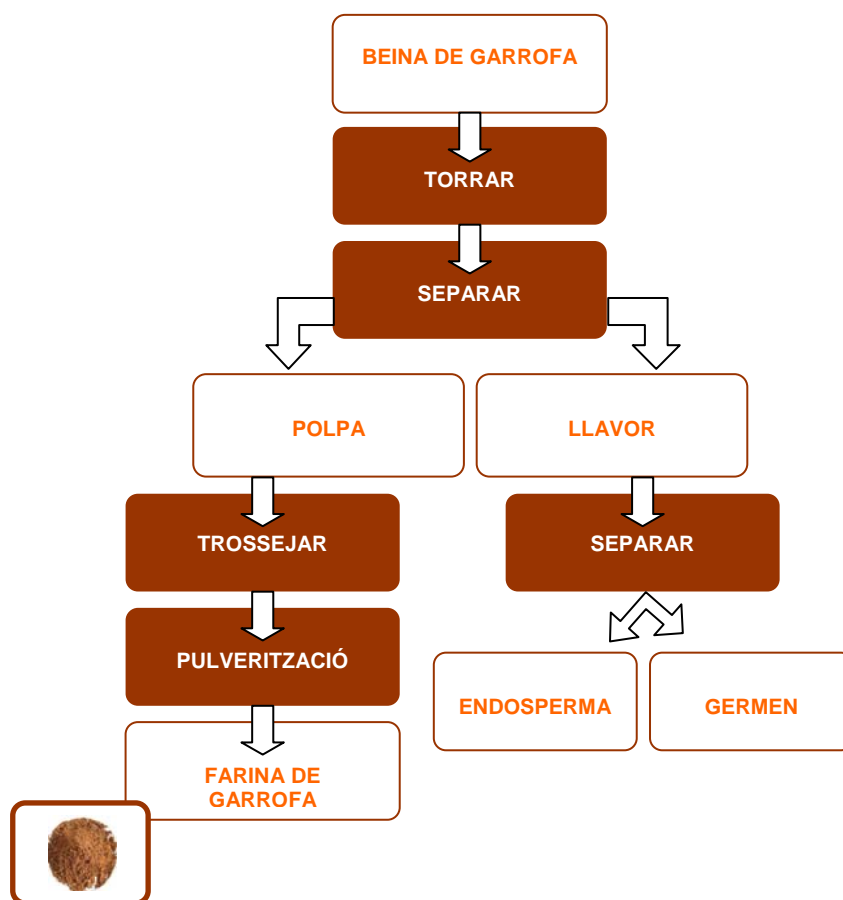
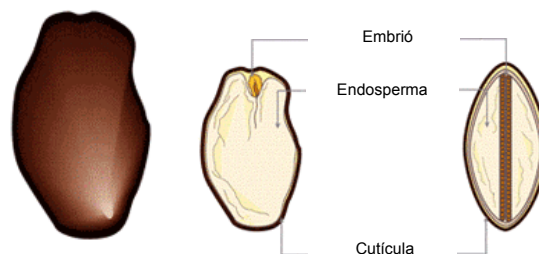


Figura 4. Diagrama del processat de les baines de garrofa

La polpa de garrofa constituïda pel mesocarpi representa un 90% en pes total del fruit (Tous i col., 2001). Es pot comercialitzar en forma trossejada, triturada o polvoritzada. La composició química varia en funció de l'origen, varietat i cultiu, però en qualsevol cas se'n pot destacar un alt contingut en sucres solubles (40-50%), baixos percentatges de proteïna (3-5%), greixos (0.2-1.5%) i cendres (2.5-3%) (Avallone i col., 1997). L'aplicació principal de la polpa de garrofa ha estat per a l'elaboració d'alimentació animal (pinsos) en format triturat o com una farina. Els kibbles s'han emprat principalment per a l'alimentació de cavalls, mentre que les fraccions més triturades per als

porcs i vedells. S'ha observat que l'administració de la polpa de garrofa en la nutrició animal disminueix el percentatge de proteïna digestible a conseqüència de l'alt percentatge de tanins condensats presents en aquesta fracció. Per aquest motiu, en la formulació de pinsos no es recomana sobrepassar l'ús de la polpa de garrofa en més d'un 20% (Caja i col., 1987; Esbenshade i col., 1986). Per contra, s'ha identificat que la presència de tanins de la polpa de garrofa té propietats antidiarriques, manifestant-se de gran interès a la solució de problemes intestinals (Saura-Calixto i col., 1982). En l'alimentació humana, la polpa s'ha utilitzat principalment en forma de farina torrada i en menys aplicacions com a polpa trossejada o kibbles. Una aplicació destacable de la farina de garrofa en l'alimentació humana és el seu ús per substituir la pols de cacau en productes derivats del cacau, en diferents productes com les xocolates, galetes o gelats, entre d'altres (Merwin i col., 1981). El motiu principal de la substitució de la pols de cacau per la garrofa recau en el baix contingut en greix i gairebé absència d'alcaloides com la teobromina i cafeïna que presenta la farina de garrofa (Craig, 1984).

Les llavors representen el 10% del pes de la beina aproximadament i es componen de tres fraccions, cadascuna de les quals presenta unes aplicacions específiques (Figura 5) (Tous i col., 1990):



**Figura 5.** Llavor de garroff constituïda per la cutícula, endosperma i l'embrió

(1) la cutícula (30-33%): és el tegument que envolta la llavor i està constituït principalment per cel·lulosa, lignina i tanins. A partir de la cutícula, es pot obtenir colorants, carbó actiu, extractes tànnics, entre altres.

(2) l'endosperma (42-46%): és el teixit de reserva de la llavor i està constituït majoritàriament per galactomanans (88%). Els galactomanans o goma de garroff són polisacàrids formats per la combinació molecular d'unitats de manosa i galactosa en proporció 1:4. Aquest producte presenta alta capacitat espessant, emulgent, gelificant i estabilitzant. La utilització principal d'aquesta fracció en el sector alimentari és per donar viscositat en productes processats (salses, sopes, cremes, flams, derivats làctics, etc.).

(3) l'embrió (23-25%): és la fracció de la llavor que presenta el poder germinatiu i està constituïda per l'embrió i els cotiledons. Durant el processat industrial es pot obtenir en forma granulada o, després d'una molturació, com a farina de l'embrió. Es caracteritza per presentar un elevat contingut proteic (~50%) així com un percentatge elevat d'aminoàcids. La farina de l'embrió s'utilitza en alimentació humana, principalment en preparats dietètics.

Les llavors de garrofa són de gran interès per a les indústries alimentàries per la seva aplicació com a gomes (additius espessants). La transformació industrial de la llavor es realitza mitjançant mètodes fisicoquímics complexes a causa de la duresa que presenten. El processat de la llavor consta bàsicament de tres etapes:

- eliminació de la cutícula, que pot fer-se mitjançant un tractament àcid, en el qual les llavors són tractades amb àcid sulfúric per carbonitzar la cutícula; o mitjançant un torrat de la llavor, que facilita la separació de la cutícula de la llavor.
- separació mecànica de l'embrió de l'endosperma.
- molturació de l'endosperma per tal d'obtenir la goma en estat pols amb una tonalitat blanquinosa, que es denomina goma de garrofa o garrofi (Carob bean gum, CBG). Paral·lelament, de l'embrió es pot purificar i obtenir un concentrat proteic (50%).

### 3. Compostos d'interès

#### 3.1. Polifenols

##### 3.1.1. Concepte i diversitat estructural

Els polifenols són productes del metabolisme secundari de les plantes que es troben àmpliament distribuïts en el regne vegetal. Tradicionalment s'han considerat productes sintetitzats com a resposta a la interacció amb el seu entorn. Ja a l'any 1916, Muriel Wheldale va fer una anàlisi de la funció dels antocians en fulles, arrels, fruits i altres òrgans vegetals i encara avui dia aquest debat roman obert. A més, el debat ha estat ampliat a l'anàlisi de la funcionalitat dels polifenols en la ingesta d'aquests pels organismes vius. Fa un temps, els tanins eren considerats com a antinutrients per la seva capacitat de precipitar amb les proteïnes, però darrerament han despertat interès per les propietats antioxidants i els efectes beneficiosos que s'han anat manifestant en la salut humana. Els animals no són capaços de sintetitzar aquest tipus d'estructures; per aquest motiu, existeix una dependència en la ingesta de productes d'origen vegetal per a poder incorporar aquestes substàncies dins el nostre organisme.

Els compostos fenòlics, amb més de 8000 estructures fenòliques descrites fins al moment (Harbone i col., 1989), s'anomenen així per presentar un o més anells aromàtic amb la presència de, com a mínim, un grup funcional hidroxil. El terme però s'utilitza per designar d'una manera simple i homogènia el conjunt de compostos fenòlics. L'estructura dels compostos fenòlics és molt complexa i com a conseqüència també ho és la seva denominació científica. Per aquest motiu, s'anomenen habitualment amb el nom de les primeres matèries primeres de les quals van ésser aïllades. Les classificacions no són fàcils i es basen en la complexitat de l'esquelet bàsic. A la Taula 1, es presenta la classificació dels compostos fenòlics més significatius proposada per Harbone i col., (1989) segons el seu esquelet carbonat, responsable de la diferenciació entre els grups.

Taula 1. Principals categories de compostos fenòlics

Esquelet	Categoria
C <sub>6</sub>	Fenols simples
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Àcids hidroxibenzoics
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Àcids hidroxicinàmics, Cumarines
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbens
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins condensats

La presència dels fenols en les plantes sol identificar-se amb molècules de sucres unides en el grup hidroxil o directament, formant glicòsids. Per aquest motiu, molts fenols són solubles en aigua i barreges aquoses de solvents orgànics (Shahidi i col., 1995). La tipologia del sucre associat als polifenols pot ser un monosacàrid, disacàrid o fins i tot oligosacàrids. La molècula de sucre més identificada ha estat la glucosa, seguida de la galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa i àcids glucorònics i galacturònics. També s'han identificat altres unions amb àcids carboxílics, àcids orgànics, amines, lípids i altres compostos fenòlics (Bravo i col., 1998). Addicionalment, dins de cada família es troben sots-categorïes basades en el grau de modificació del seu esquelet (oxidació, metilació, hidroxilació).

A continuació, s'esmenten les característiques dels compostos fenòlics més destacats:

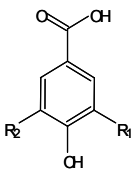
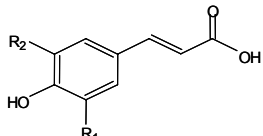
### Fenols simples

L'estructura bàsica d'aquests tipus de fenols és un anell aromàtic amb un, o més d'un, grup hidroxil com a substituents. Els fenols simples més rellevants són el fenol, el catecol i l'hidroquinona. Els fenols simples duen a terme funcions fisiològiques dins el regne vegetal com la regulació de la germinació, activació d'enzims o resistència a patògens.

### Àcids hidroxibenzoics i hidroxicinàmics

Les estructures dels àcids hidroxibenzoics i hidroxicinàmics es troben representades en la Taula 2.

Taula 2. Estructura fenòlica dels principals àcids hidroxibenzoics i hidroxicinàmics

Esquelet	Nom	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	<i>Àcids hidroxibenzoics</i>		
	àcid p-hidroxibenzoic	H	H
	àcid protocatèquic	OH	H
	àcid gàl·lic	OH	OH
	àcid vaníl·lic	OCH <sub>3</sub>	H
	àcid siringic	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
	<i>Àcids hidroxicinàmics</i>		
	àcid cafeic	OH	H
	àcid ferúlic	OCH <sub>3</sub>	H
	àcid sinàptic	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
	àcid p-cumàric	H	H

Els àcids hidroxibenzoics constitueixen components del complex estructural dels tanins hidrolitzables. Entre els més importants destaca l'àcid gàl·lic. La distribució dels àcids hidroxibenzoics en aliments és limitada i s'han detectat en baixes concentracions en fruita i



verdures (Tomás-Barberán i col., 2000); excepte en algunes fruites roges, ceba o pell de patata, on la seva presència suposa una fracció important del contingut polifenòlic (Herrman i col., 1989; Torronen i col., 1997; Lewis i col., 1998).

Els àcids hidroxicinàmics es troben més àmpliament distribuïts dins el regne vegetal i rarament es troben en forma lliure, a excepció d'aquells aliments sotmesos a operacions de processat com la congelació, fermentació i esterilització (Manach i col., 2004). Normalment es solen identificar com a derivats glicosilats o esters de l'àcid quínic, siquímic i tartàric; com és el cas de l'àcid clorogènic, producte de l'esterificació de l'àcid quínic amb l'àcid cafeic. De la mateixa manera s'identifica l'àcid ferúlic esterificat amb hemicel·luloses (Clifford i col., 2000).

### *Estilbens*

Els estilbens presenten un esquelet bàsic de 14 carbonis ( $C_6-C_2-C_6$ ) i són sintetitzats normalment per espècies vegetals superiors, entre elles la vinya (*Vitis vinifera*), el pi (*Pinus sylvestris*) així com també en el cacauet (*Arachis hypogaea*), localitzant-se normalment en l'escorça del tronc. El compost més representatiu dins d'aquest grup és el resveratrol, que ha demostrat activitats promotores de la salut com a antioxidant, antiinflamatori, antibacterià i antivíric (Jang i col., 1997; Sinha i col., 2002).

### *Lignans*

Els lignans són compostos derivats de dues unitats de fenilpropanoides ( $C_6-C_3$ ). El contingut de lignans en el món vegetal es troba principalment en les parts externes dels pinyols dels fruits, on predomina també la presència del contingut de fibra. Es troben principalment en llavors de lli i sègol en forma de secoisolariciresinol, matairesinol i pinoresinol (Heinonen i col., 2001). També s'han detectat altes concentracions d'aquests compostos en el fruit de l'oliva, i en menor presència en cereals (blat), llavors lleguminoses (llenties), fruita (prunes i peres) (Manach i col., 2004) així com en algunes espècies vegetals pròpies del Japó (Peñalvo i col., 2008).

### *Flavonoides*

Els flavonoides constitueixen el grup de compostos fenòlics amb major rellevància, ja que es presenten en concentració elevada i estan àmpliament distribuïts en els aliments d'origen vegetal que són ingerits per l'ésser humà. De fet, fins al moment ja s'han descrit més de 5000 flavonoides (Bravo i col., 1998). Totes les estructures dels flavonoides es caracteritzen per presentar un

esquelet difenilpropà ( $C_6C_3C_6$ ), format per dos anells aromàtics anomenats A i B, unit a un  $C_3$  que normalment es troba ciclitzat formant un *O*-heterocicle, que correspon a l'anell C (Figura 6).

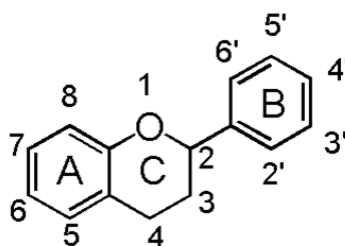


Figura 6. Estructura base d'un flavonoide

La diversitat estructural dels flavonoides ve donada per la variació en els patrons d'hidroxilació, l'estereoquímica dels centres quirals de l'anell C ( $C_2$ ,  $C_3$  i  $C_4$ ), així com la localització i ubicació de la unió interflavànica de l'anell C en posició 4 ( $C_4$ ). Els flavonoides es troben habitualment en forma glicòsid, sent la glucosa el sucre principalment identificat; i d'altres com la galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, disacàrids i oligosacàrids. Aquesta glicosilació pot tenir lloc com a *O*-glicòsids en les posicions 3, 7 i 4' dels anells C, A i B, respectivament; i menys freqüentment com a *C*-glicòsids en les posicions 6 i 8 de l'anell A (Figura 6). Com a conseqüència de la glicosilació, els flavonoides veuen augmentada la seva polaritat fet que afavoreix la seva solubilitat en aigua; i per tant, l'emmagatzematge en els vacúols cel·lulars de les plantes (Urquiaga i col., 2000).

Les variacions estructurals en els anells classifiquen els flavonoides en diferents sots-categories (Taula 3).

Taula 3. Principals classes de flavonoides en la naturalesa (Adaptació de Manach i col., 2004)

Nom	Anell A		Anell C		Anell B			
	$R_5$	$R_7$	$R_3$	$R_4$	6'	5'	4'	3'
<b>Flavona</b>								
Apigenina	OH	OH	H	O	H	H	OH	H
Luteolina	OH	OH	H	O	H	OH	OH	H
<b>Flavonol</b>								
Quercetina	OH	OH	OH	O	H	OH	OH	H
Miricetina	OH	OH	OH	O	H	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	OH	OH	O	H	H	OH	H
<b>Flavonona</b>								
Naringenina	OH	OH	H,H	O	H	H	OH	H
Naringin	OH	OH	O-glucosa	O	H	H	OH	H
<b>Flavanol</b>								
Catequina	OH	OH	OH	O	H	OH	OH	H
Gallocatequina	OH	OH	OH	O	H	OH	OH	OH

Principals grups flavonoides (Ros i col., 2005):

Flavonol: són el grup de flavonoides més identificats i es troben en gran abundància en la ceba, l'api o la farigola, entre d'altres. Es presenten en forma glicosilada i s'acumulen als teixits exteriors aeris, ja que la seva síntesi està estimulada per la llum. Els principals representats d'aquest grup són la quercetina i el kaempferol.

Flavona: no són tan ubiqües ni tan abundants en els aliments com d'altres grups de flavonoides. Principalment, es poden identificar en el julivert i l'api, sent la luteolina i l'apigenina les formes més destacables.

Flavonona: s'identifiquen principalment en fruites cítriques, en el tomàquet i en plantes aromàtiques com la menta. Es solen presentar en forma glucosídica i les formes més abundants són la naringenina i la naringina.

Flavanol: les formes monomèriques predominants són la catequina i l'epicatequina. La forma glucosídica dels flavanols és poc freqüent ja que normalment s'identifiquen en la seva forma aglicona. Les fonts principals de flavanols són el cacau, la poma, el te i el vi.

Un altre grup de flavonoides són les isoflavones, característiques per presentar l'anell B unit en la posició 3 de l'anell C com a diferència de la resta (Figura 6). Les isoflavones es troben principalment en lleguminoses i la font per excel·lència és la soja. Entre les isoflavones, se'n destaca la genisteïna i la daidzeïna. Aquestes presenten una estructura molt similar als fitoestrògens, fet que els proporciona la propietat d'actuar com a pseudohormones (Wiseman, 2006).

### *Tanins*

Els tanins es poden classificar segons la seva estructura química en tanins condensats i tanins hidrolitzables. Els tanins condensats són estructures formades per oligòmers o polímers d'unitats de flavan-3-ols. El seu pes molecular oscil·la entre 500 i 30.000 Da, depenent del grau de polimerització. En medi àcid i a alta temperatura els tanins condensats es despolimeritzen i donen lloc a una pigmentació vermellosa esdevenint les antocianidines, d'on pren origen el nom d'aquest grup (proantocianidines). Les procianidines poden presentar-se esterificades amb l'àcid gàl·lic o excepcionalment amb sucres (Serrano i col., 2009). Les fonts principals de procianidines són el cacau, la poma, el te i el vi. Els seus derivats, les antocianidines es caracteritzen per l'aportació de coloració en algunes flors i fruits de certs vegetals. En els aliments ingerits habitualment per l'home es troben en el vi negre, llavors del cacau, beines de garrofa, en certes varietats de cereals o

vegetals com la ceba, els pèsols; trobant-se en una gran abundància en les fruites roges com la cirera, les morenes, les prunes, entre d'altres. Entre les antocianidines cal destacar la cianidina, peonidina, delphinidina i malvidina (Andersen i col., 2006).

Els tanins hidrolitzables es caracteritzen perquè després d'un procés d'hidròlisi es forma àcid 3,4,5-trihidroxibenzoic (àcid gàl·lic) i glucosa. Els tanins hidrolitzables poden estar units amb més d'una molècula de sucre mitjançant enllaços en els grups –OH de l'àcid. Alguns tanins estan formats per l'àcid el·làgic, estructura dímera de l'àcid gàl·lic per un enllaç C-C, unit a dues molècules de sucre. En aquest cas reben el nom particular de el·lagitanins (Bohm, 1998).

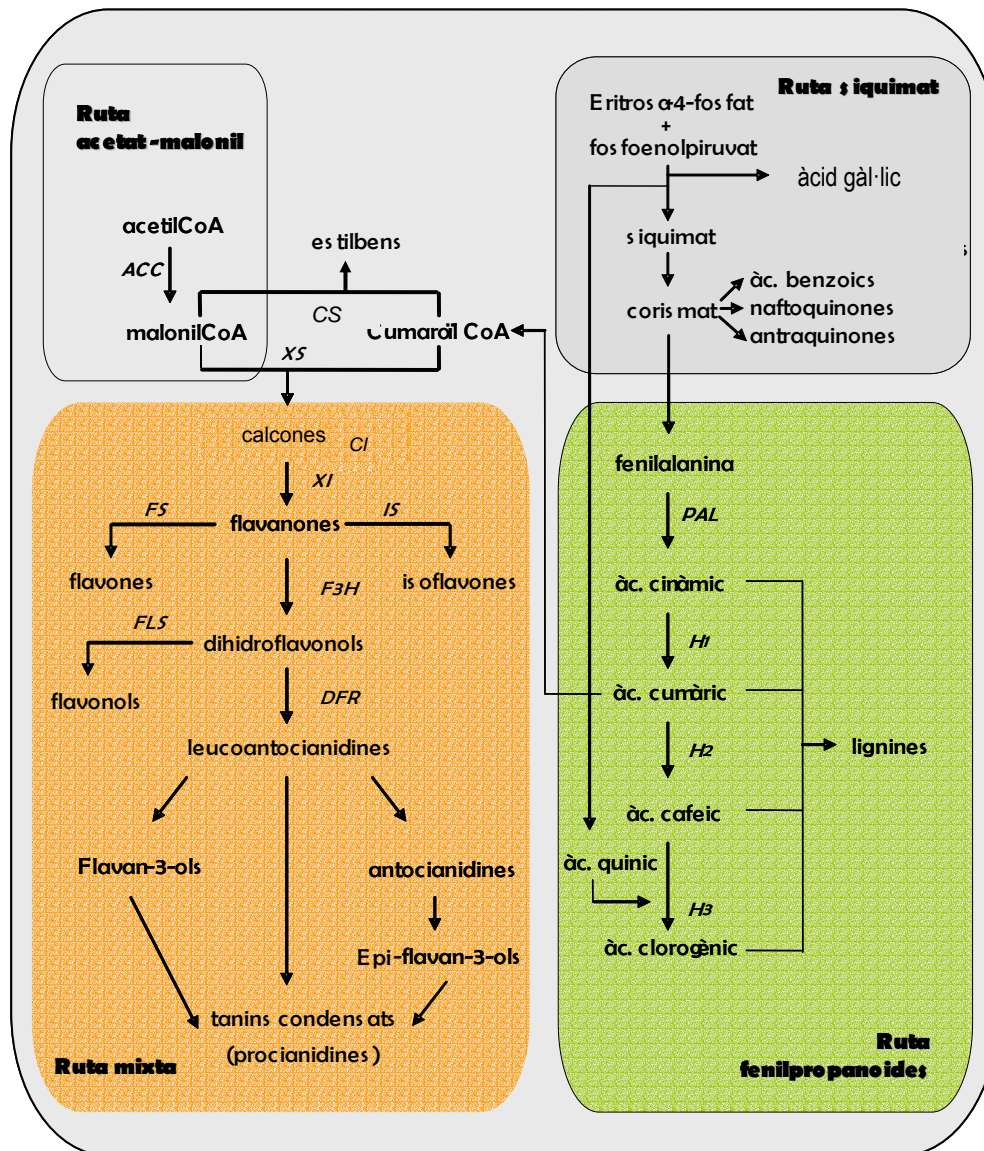
### 3.1.2. Química i biosíntesi dels compostos fenòlics

Els polifenols es sintetitzen a partir dels productes que deriven de rutes del metabolisme primari, principalment de les vies d'acetat-malonat i del siquimat (Figura 7).

La ruta del siquimat s'inicia amb la síntesi del fosfoenolpiruvat i l'eritrosa-4-fosfat per a la formació de l'àcid corsimat, compost important per a la biosíntesi de molts compostos aromàtics (fenilpropanoides, àcids benzoics, naftoquinones, antraquinones, entre d'altres). Paral·lelament, els productes intermediaris que es generen en aquest procés són el punt de partida per a la formació de molts compostos fenòlics com l'àcid gàl·lic i l'àcid quínic.

La ruta dels fenilpropanoides es produeix per acció de l'enzim fenilalanina amoni-liasa (PAL) sobre la fenilalanina per donar lloc a l'àcid cinàmic mitjançant una reacció d'oxidació. La síntesi dels àcids hidroxicinàmics (àcid cumàric, àcid cafeic i àcid clorogènic) té lloc dins d'aquesta ruta mitjançant hidroxilases (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> i H<sub>3</sub>).

La ruta de l'acetat-malonat s'inicia per la formació del malonilCoA a partir de l'acetilCoA mitjançant l'acció de l'acetil-CoA-carboxilasa (ACC). La síntesi del malonilCoA i el cumaroïlCoA (obtingut com a producte intermediari de la via dels fenilpropanoides a partir de l'àcid cumàric) dona lloc a la formació de calcones, molècula d'estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, precursors de les flavanones mitjançant l'acció de l'enzim calcona sintetasa (XS) (Springob i col., 2003). Al mateix temps, a partir del cumaroïlCoA i tres molècules de malonilCoA es poden generar estilbens mitjançant l'acció de l'estilbè-sintasa (STS), en aquest cas però amb patró de ciclació d'estructura C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> (Dewick i col., 2002).



**Figura 7.** Esquema de les rutes de síntesi de les principals tipologies de compostos polifenòlics. ACC *acetil-CoA-carboxilasa*; PAL *fenilalanina amoni-liasa*; H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub> *hidroxilases*; STS *l'estilbè-sintasa*; CS *calcona sintetasa*; CI *calcona isomerasa*; FS *flavanona sintetasa*; IS *isoflavona sintetasa*; FLS *flavonol sintetasa*; F3H *flavanona-3-hidrolasa*; DFR *dihidroflavonol-4-reductasa*.

En la ruta mixta és on té lloc la formació de les flavanones mitjançant l'activitat de la calcona flavanona isomerasa (XI), punt de partida de la síntesi de molts flavonoides (flavones, isoflavones, flavonols, antocianidines i procianidines). La formació de les flavones té lloc per acció de l'enzim flavanona-sintetasa (FLS) creant un doble enllaç entre les posicions 2 i 3 (Martens i col., 2005). Les isoflavones es formen per l'activitat de l'isoflavona sintetasa (IS), a partir de les quals se'n deriven la resta de compostos isoflavonoides. Els dihidroflavonols es sintetitzen per l'acció de la flavanona-3-hidrolasa (F3H), a partir de les quals es poden formar els flavonols (flavonol sintetasa, FL) i les leucoantocianidines (dihidroflavonol-4-reductasa, DFR). Les leucoantocianidines són el punt de

partida per a la biosíntesi dels tanins condensats (procianidines) per diferents vies: a partir dels flavan-3-ols o els epi-flavan-3,4-ols, que a la vegada poden ser obtinguts a partir de les antocianidines (Xie i col., 2005).

Finalment, existeix una tercera ruta de l'àcid mevalònic, a partir de la qual també s'obtenen els compostos fenòlics secoiridoides, compostos glicosídics obtinguts a partir del metabolisme secundari dels terpens. La biosíntesi de tots els terpenoides té lloc a partir dels metabòlits primaris, iniciant-se amb la síntesis del precursor fonamental IPP (isopentenilpirofosfat). L'addició de successius IPP mitjançant sintases específiques formen una sèrie homòloga de IPP que s'utilitza com a precursor dels diferents esquelets de terpenoides. Modificacions enzimàtiques secundàries sobre aquests esquelets, normalment reaccions redox, donen lloc a la gran diversitat d'aquesta família atorgant diferents propietats químiques a cadascun d'aquests.

### **3.1.3. Paper antioxidant dels polifenols**

#### **3.1.3.1. L'oxigen**

L'oxigen és una molècula essencial per als organismes eucariotes i procariotes per a la producció de l'energia necessària per al correcte desenvolupament de les funcions biològiques. Paradigmàticament, tots els organismes aerobis estan sotmesos a la dependència de l'oxigen per a la seva supervivència durant la respiració cel·lular; però al mateix temps, l'oxigen dona lloc a compostos tòxics i nocius. Inicialment es va pensar que la toxicitat de l'oxigen en les cèl·lules venia donada per la inactivació de l'oxigen sobre certs enzims cel·lulars; fins que el 1954 es va publicar l'estudi de Gilbert i Gersham, on suggerien que els efectes nocius de l'oxigen eren causats per la generació de radicals lliures derivats del propi oxigen. Aquest descobriment va desencadenar multitud d'estudis focalitzats en el coneixement dels radicals, específicament els radicals derivats de l'oxigen. Un avenç crucial en el camp de la toxicitat de l'oxigen va esdevenir quan McCour i col. (1969) van descobrir l'existència de la superòxid dismutasa (SOD), un enzim que catalitza la reacció de dismutació del radical superòxid ( $O_2^-$ ), en gairebé totes les cèl·lules aeròbiques (Fridovich i col., 1995). El reconeixement per Boveris, Cadenas i Chance (1972-1976) que els mitocondris produeixen  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  en condicions biològiques, va complementar les observacions sobre el superòxid dismutasa (SOD) i va desencadenar noves línies d'investigació en el terreny dels radicals lliures en condicions patològiques.

### 3.1.3.2. Radical Lliure (RL)

Un radical lliure és una molècula o fragment d'aquesta que conté un o més d'un electró desaparellat en la seva estructura molecular. La presència dels electrons desaparellats confereixen a la molècula gran reactivitat, que es tradueix amb una tendència a cedir i/o guanyar un electró d'una altra molècula. Aquest comportament caracteritza als radicals lliures d'instables i d'una baixa especificitat química, reaccionant amb tot tipus de molècules (lípid, proteïnes, ADN, hidrats de carboni). Concretament amb la designació "espècies reactives d'oxigen" (ROS) s'anomena a les espècies radicalàries o no-radicalàries, siguin agents oxidants i/o que es puguin transformar fàcilment en radicals, derivats de l'oxigen. De manera anàloga als ROS, existeixen espècies reactives del nitrogen (RNS), del clor (RCIS) i del brom (RBrS) (Halliwell i col., 2006). A continuació es citen les espècies radicalàries i no radicalàries més implicades en la biologia redox de l'organisme (Kohen i col., 2002):

- Radicals: anió superòxid ( $O_2^-$ ), anió hidroxil ( $OH^-$ ), alcòxid ( $RO^\bullet$ ), peròxid ( $ROO^\bullet$ ), òxid nítric ( $NO^\bullet$ ) i diòxid de nitrogen ( $NO_2$ ).
- No radicals: peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), àcid hipoclorós ( $HClO$ ), ozó ( $O_3$ ), oxigen singlet ( $^1\Delta O_2$ ), catió nitrosil ( $NO^+$ ) i l'anió nitroxil ( $NO^-$ ).

Els radicals derivats de l'oxigen (ROS) es produeixen principalment per una reducció seqüencial del mateix (Figura 8).

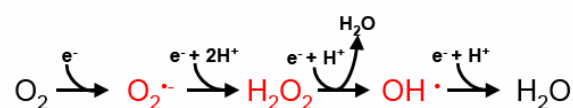


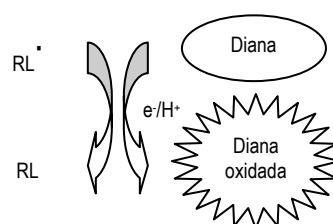
Figura 8. Formació de les principals espècies radicals i no radicals lliures a partir de l'oxigen.

El primer radical que es forma en aquesta reducció és l'anió superòxid ( $O_2^-$ ). La seva formació té lloc en el transport mitocondrial cel·lular, concretament en el complex I (NADH deshidrogenasa) i en el complex III (citocrom bc1) (Bernard i col., 2003). L' $O_2^-$  és un di-radical que té dos electrons desaparellats. Els spins dels dos electrons desaparellats de l'oxigen tenen la mateixa direcció, per això, aquest no és un dels radicals més reactius (Halliwell i col., 2006). La dismutació de dues molècules de  $O_2$  juntament amb la seva reducció per dos electrons porta a la formació del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) (Fridovich i col., 1995). El peròxid d'hidrogen, tot i ser un ROS no radical, és una molècula bastant estable. Aquest radical presenta facilitat de difusió a través de les membranes

cel·lulars i pot intervenir en la reacció de Fenton (descrita l'any 1894 per primer cop per la reacció entre el  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en qualsevol punt de la cèl·lula. El radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ), altament reactiu, es pot formar a partir de la fissió homolítica de l'aigua (Halliwell i col., 2006) o per la reacció catalitzada per metalls d'oxidació baixa ( $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^{2+}$ ) mitjançant la reacció de Fenton.

Els radicals lliures es poden generar tant per via exògena com endògena a l'organisme. A part de les ja citades vies de formació de radicals derivats de l'oxigen (Figura 8), principalment en la cadena de transport en el mitocondri, existeixen altres fonts endògenes amb caràcter més puntual; entre aquestes, hi ha sistemes enzimàtics (NO sintetasa) i altres alteracions (desordres en la concentració de metalls), entre altres (Kohen i col., 2002). Al mateix temps s'identifiquen causes exògenes de formació de ROS i NOS que poden atacar als sistemes biològics. De les causes exògenes es pot parlar dels contaminants presents en l'atmosfera o bé de la generació per irradiació de llum UV, rajos X o rajos  $\gamma$ . Els propis aliments de la dieta en el seu estat d'origen, durant el seu processat o bé per reaccions durant la seva ingesta en l'organisme també són substàncies generadores de radicals. Finalment cal considerar les toxines i els xenobiòtics com a generadors o participants de la formació de radicals lliures (Kohen i col., 2002).

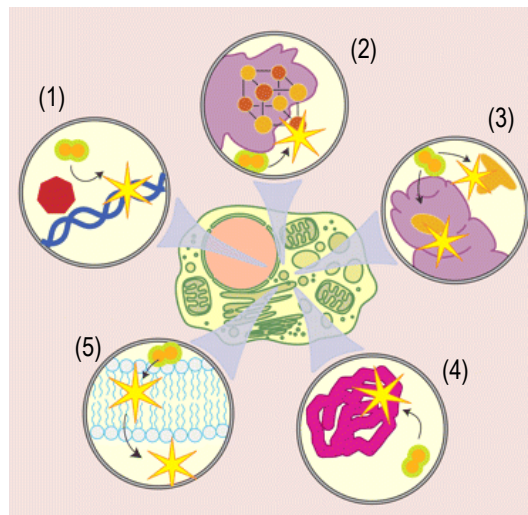
Els mecanismes que desencadenen la formació dels radicals lliures, tant a l'exterior com a l'interior del nostre organisme, poden manifestar-se pel trencament homolític d'un enllaç covalent d'una molècula neutra; per una pèrdua d'un electró a molècula neutra; o bé, per l'addició d'un electró a una molècula neutra. El mecanisme més comú d'actuació dels radicals lliures sobre les macromolècules biològiques s'inicia quan el radical lliure sostrau un àtom d'hidrogen o un electró a una molècula diana (Figura 9). Fruit d'aquesta reacció, l'electró desaparellat del radical lliure esdevé un parell d'electrons estables, donant estabilitat al propi radical lliure, mentre la molècula diana s'oxida. Aquest mecanisme característic dels radicals lliures atribueix la consideració d'aquests com a agents prooxidants (Boots i col., 2008).



**Figura 9.** Mecanisme d'actuació dels radicals lliures (RL)  
(adaptació Kohen i col., 2002)



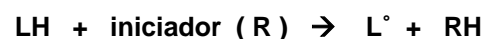
Les molècules que esdevenen dianes per als radicals lliures són principalment els fosfolípids, les proteïnes i els àcids nucleics (Kohen i col, 2002). Com a conseqüència, es generen danys a nivell cel·lular. Entre aquests se'n destaca les alteracions a nivell d'ADN, desestructuració de macromolècules, modificació de funcions cel·lulars, inhibició de la regulació enzimàtica, modificació de la fluïdesa i permeabilitat de la membrana cel·lular, entre d'altres (Figura 10).



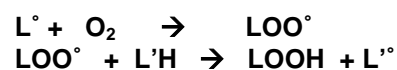
**Figura 10.** Danys per acció dels RL a nivell cel·lular: (1) alteracions ADN, (2) desestructuració de macromolècules, (3) modificació funcions cel·lulars, (4) inhibició regulació enzimàtica i (5) pèrdua de la integritat cel·lular.

Els lípids són molècules molt susceptibles a ser atacades pels radicals lliures. Concretament, el radical hidroxil (OH·) té com a objectiu els àcids grassos poliinsaturats (PUFA) que formen part de la fase lipídica de la membrana cel·lular. El procés d'oxidació sobre els lípids és conegut com la peroxidació lipídica i consta de tres etapes: iniciació, propagació i terminació (Figura 11) (Halliwell i col., 1993).

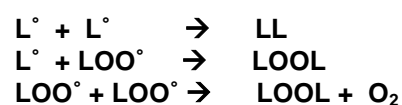
Iniciació



Propagació



Finalització



**Figura 11.** Reaccions en cadena de la peroxidació lipídica

La reacció s'inicia mitjançant la pèrdua d'un electró d'un doble enllaç d'un àcid gras (LH) donant lloc a un radical ( $L^\bullet$ ). L'origen de la iniciació poden ser diversos factors: la radicació ionitzant, l'impacte de fotons en l'espectre ultraviolat, ions metàl·lics, radicals lliures, entre d'altres. El radical lliure format ( $L^\bullet$ ) pot reaccionar amb l'oxigen i formar un altre radical ( $LOO^\bullet$ ). Els radicals lliures formats són tòxics per sí mateixos i molt reactius. Per aquest motiu, aquests poden actuar com a iniciadors del dany oxidatiu atacant un segon substrat lipídic proper, i donar lloc a un hidroperòxid lipídic ( $LOOH$ ) o bé generar un nou radical ( $L'^\bullet$ ). D'aquesta manera es desencadena l'etapa de propagació, on poden reaccionar entre sí els radicals que es van generant.

La darrera etapa de la reacció, anomenada finalització, té lloc quan es manifesta alguna de les següents situacions: s'esgota el consum de les molècules lipídiques, hi ha absència d'oxigen, té lloc la formació de radicals amb poca reactivitat o els radicals reaccionen entre sí esdevenint estructures estables, sense capacitat de seguir reaccionant, entre d'altres.

Tot i que la reacció arribi a la seva fi, productes derivats dels radical formats ( $LOOH$ ) poden descompondre's a la vegada en aldehids i diens conjugats. Com a conseqüència de la reacció de peroxidació dels lípids i dels productes que se'n deriven, es produeix principalment la desestructuració i l'alteració de la fluïdesa de les membranes cel·lulars. La peroxidació lipídica s'associa a patologies com l'aterosclerosi, càncers i al procés d'envelliment cel·lular. Paral·lelament, els productes derivats de la peroxidació, com ara el malondialdehid (MDA) reaccionen ràpidament amb d'altres molècules biològiques, bases del DNA i proteïnes, i danyar-les (Esterbauer i col., 1991).

Les lesions a proteïnes s'atribueixen principalment als radicals hidroxil i alcòxids, així com a algunes espècies reactives del nitrogen. El radical hidroxil pot actuar com a iniciador del dany de les proteïnes atacant el carboni alfa ( $\alpha$ ) o sobre les cadenes laterals dels aminoàcids. En qualsevol dels casos, la reacció dóna lloc a la formació d'un radical carboni ( $C^\bullet$ ) que pot reaccionar amb l'oxigen tot generant radicals carboxils ( $COO^\bullet$  i  $CO^\bullet$ ). Aquests radicals poden ser estabilitzats per la sostracció d'un hidrogen d'una altra molècula, promovent una reacció en cadena o un trencament de l'esquelet de les proteïnes (Stadman i col., 2003; Toledano i col., 2003). En absència d'oxigen, dos radicals carbonils poden reaccionar entre ells (paral·lisme amb el procés de peroxidació lipídica), produint entrecreuaments del tipus carboni-carboni. A més d'aquestes reaccions, les cadenes laterals d'algunes proteïnes es poden oxidar fàcilment mitjançant sistemes d'oxidació catalitzats per ions metàl·lics. El dany oxidatiu causat sobre les proteïnes ve donat per la interacció directa o indirecta amb els radicals lliures, per alteració en residus d'alguns aminoàcids, canvi en la

seva estructura terciària, degradació i/o fragmentació de les mateixes, etc. Algunes d'aquestes accions deriven en la pèrdua de l'activitat d'alguns enzims, la modificació de funcions cel·lulars com la producció d'energia, o interferències en la creació de potencials de membranes (Davis i col., 1987).

No es presenta tant coneixement dels mecanismes pels quals es manifesten els danys sobre l'ADN. És sabut que aquests danys tenen lloc mitjançant la modificació de les seves bases o pèrdua d'aquestes, per entrecruaments entre l'ADN-proteïna i alteracions del sistema reparador propi de l'ADN, entre d'altres; principalment atribuïbles a l'acció dels radicals hidroxils (Kohen i col., 2002). Una de les causes dels danys esmentats sobre l'ADN són les accions que tenen els radicals que resulten de la peroxidació dels lípids o proteïnes. S'ha descrit, per exemple, que el MDA forma adductes amb les bases o que el radical hidroxil és el responsable d'una gran quantitat de modificacions que tenen lloc en l'ADN (Cadet i col., 1997). Les lesions a l'ADN tenen lloc sota condicions metabòliques normals i moltes d'elles esdevenen mutacions. Tot i que en l'organisme s'identifica un grup d'enzims que tenen com a funció principal la de reparar aquestes lesions, aquests no són totalment eficaços. És per aquest motiu, que les lesions oxidatives es van acumulant o generant mutacions irreparables que poden contribuir al desenvolupament de malalties com el càncer (Wiseman, 2006).

### 3.1.3.3. Estrès oxidatiu

La formació dels radicals lliures, per via endògena o exògena, és inevitable i està associada a la vida sota condicions aeròbiques. El problema radica quan es manifesta una acumulació d'aquests radicals en l'organisme. Sies (1991) va definir aquest estat com a l'alteració entre el balanç prooxidant-antioxidant, a favor de la formació de les primeres, donant lloc a un dany significatiu per a l'organisme anomenat estrès oxidatiu.

Quan l'equilibri es decanta per una major presència de radicals lliures en l'organisme, aquests esdevenen tòxics i presenten alta capacitat per alterar qualsevol estructura molecular, bé sigui lípids, proteïnes o ADN. Com a conseqüència, els processos bioquímics i fisiològics es veuen afectats negativament, desencadenant disfuncions cel·lulars específiques en teixits i òrgans. La relació entre l'estrès oxidatiu i el dany causat sobre l'organisme està associada al procés

d'acumulació de components cel·lulars procedents de l'oxidació d'àcids nucleics, lípids i proteïnes; i per tant, s'estableix com l'origen i la causa de processos d'envelliment de l'organisme.

El fenomen d'envelliment ha estat l'objectiu d'interès en els darrers anys de molts estudis. Respecte les diferents teories emeses, la que situa l'estrès oxidatiu com a l'origen del procés i els antioxidants com a mecanisme d'aturar-lo és la que ha assolit més pes. Arran d'aquests estudis, s'ha demostrat que els organismes que viuen més són aquells que presenten major quantitat i qualitat de defenses antioxidants tot i tenir una taxa metabòlica elevada; per contra del que inicialment s'havia proposat, que era per aquells organismes amb taxes metabòliques baixes i independència del contingut d'antioxidants (Frankel i col., 2000). No és d'estranyar, doncs, la presumpció d'una correlació entre l'estrès oxidatiu i l'aparició de malalties com ara l'aterosclerosi, la carcinogènesi, les inflamacions, les malalties neurodegeneratives (Alzheimer i Parkinson), les cataractes o la diabetis, entre d'altres.

### 3.1.3.4. Mecanismes de defensa enfront l'estrès oxidatiu

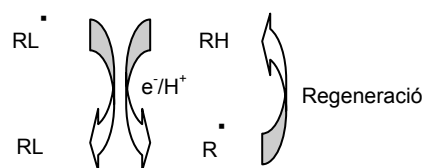
L'organisme ha desenvolupat sistemes de defensa per a la regulació enfront del dany oxidatiu i/o com a mesura de la prevenció de l'acció dels radicals lliures. A aquests sistemes de defensa se'ls denomina antioxidants, i sota aquest concepte s'entén qualsevol substància que retarda i/o prevé significativament el dany oxidatiu d'una molècula diana reaccionant amb anticipació amb els radicals lliures. Els antioxidants es poden classificar segons el seu mecanisme d'acció (enzimàtic o no enzimàtic) i en funció de la seva procedència (endògens o exògens).

Entre els sistemes antioxidants enzimàtics es poden identificar els enzims superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i la glutatió peroxidasa (GPX):

- la superòxid dismutasa (SOD) és un metal·loenzim que catalitza la dismutació de l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) mitjançant la seva transformació en oxigen ( $O_2$ ) i peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ).
- la catalasa (CAT) és un enzim àmpliament distribuït en bacteries, plantes i animals, localitzat principalment en els peroxisomes i que participa en la reacció d'eliminació del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ , generat en una reacció catalitzada per la SOD) per a formar aigua ( $H_2O$ ) i oxigen ( $O_2$ ).
- la glutatió peroxidasa (GPX) és un enzim dependent del seleni que catalitza la reducció de peròxids d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i hidroxiperòxids derivats de la peroxidació lipídica (LOOH) emprant

el glutatió (GSH) com a donador d'electrons, generant el glutatió oxidat (GSSG). La regeneració del glutatió oxidat és el que es coneix com a cicle de glutatió (Kohen i col., 2002; Halliwell i col., 2006).

El mecanisme d'actuació enfront els radicals lliures dels antioxidants enzimàtics es dona per reacció directa amb aquests. En aquesta reacció té lloc la donació d'un hidrogen o electró al radical lliure, generant un radical derivat de l'antioxidant inert ( $R^\bullet$ ) més estable, que presenta menys activitat de reaccionar a posteriori amb una altra molècula diana, i per tant, és més fàcilment regenerable (Figura 12) (Kohen i col., 2002).



**Figura 12.** Mecanisme d'actuació dels antioxidants  
(adaptació de Kohen i col., 2002)

En relació als sistemes antioxidants no enzimàtics, no sempre reaccionen directament amb el radical lliure; ja que poden participar com a agents quelants de metalls. Entre aquests es pot diferenciar:

- el glutatió, la funció del qual no és la de reaccionar directament amb el radical lliure sinó mantenir un nivell mínim de la seva concentració en l'organisme, ja que és la seva forma reduïda la que actua com a donador en reaccions enzimàtiques antioxidants (reaccions catalitzades per la glutatió peroxidasa), així com pot actuar també com a agent quelant.
- la bilirubina i àcid úric poden unir-se a metalls i evitar que tingui lloc la reacció de Fenton.
- la presència d'algunes proteïnes com la ceruloplasmina, transferrina o lactoferrina intervien en la quelació de metalls.

El propi organisme presenta diferents sistemes antioxidants descrits anteriorment per a combatre les situacions d'estrès oxidatiu. Tot i això, l'exposició a situacions ambientals contínues afavoreix la generació de radicals lliures, i per tant la limitació dels sistemes antioxidants propis de l'organisme. Aquest fet condueix a una indispensable aportació via exògena d'antioxidants per evitar les situacions d'estrès oxidatiu, ja que aquests sistemes antioxidants exògens es

consumeixen actuant dins l'organisme. És per aquest motiu que la ingesta de substàncies exògenes amb capacitat antioxidant assoleix un paper important en l'equilibri entre els radicals lliures i els antioxidants en l'organisme. Els antioxidants exògens s'identifiquen principalment en matèries primes d'origen vegetal. Així doncs, dur a terme una dieta rica i variada (fruita, verdura, llegums i cereals) podria ser garantia d'una bona defensa antioxidant. Entre aquestes fonts exògenes es poden identificar certs aminoàcids essencials, lípids mono i poliinsaturats, vitamines, així com certs minerals.

En relació a les vitamines es pot diferenciar l'activitat antioxidant tant de vitamines liposolubles (vitamina E) com hidrosolubles (vitamina C). La vitamina E és l'antioxidant liposoluble més abundant, ubicat en totes les membranes cel·lulars, on juga un paper important en la protecció dels lípids davant l'oxidació, evitant la formació d'enllaços covalents entre les cadenes laterals dels àcids grassos. La vitamina E pot eliminar directament determinats radicals lliures com l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) o l'anió hidroxil ( $OH^-$ ) (Upson i col., 1999; Azzi i col., 2000). De la mateixa manera, la vitamina C (l'àcid ascòrbic) es considera un antioxidant hidrosoluble identificat en la majoria de cèl·lules, que actua com a antioxidant de radicals lliures citoplasmàtics, reduint radicals lliures com l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), l'anió hidroxil ( $OH^-$ ) o el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), entre d'altres. Paral·lelament a les vitamines, s'identifiquen els  $\beta$ -carotens, un grup nombrós d'antioxidants liposolubles amb menor activitat que l' $\alpha$ -tocoferol. L'activitat principal dels  $\beta$ -carotens és la d'eliminar el radical anió superòxid ( $O_2^-$ ) (Krinsky i col., 1993). Els carotens també presenten activitat antioxidant davant l'oxidació de lípids, actuant sinèrgicament amb la vitamina E.

S'ha observat, doncs, que les dietes riques en aliments d'origen vegetal com la fruita i verdura afavoreixen el manteniment de l'equilibri radical-antioxidant; i per tant, com a mesura preventiva i pal·liativa al desenvolupament de malalties vinculades amb l'estrès oxidatiu. Aquests efectes s'han atribuït principalment a la presència de vitamines,  $\beta$ -carotens i minerals. Tot i això, s'ha detectat que aquests aliments també presenten unes substàncies fitoquímiques denominades polifenols, que poden jugar un paper molt important en l'activitat antioxidant. La presència dels polifenols amb altres substàncies antioxidants (vitamines,  $\beta$ -carotens i minerals, entre d'altres) podrien actuar sinèrgicament augmentant els beneficis i propietats biològiques en l'organisme. Darrerament s'ha demostrat que alguns polifenols també tenen efectes anticancerígens i antimutagènics, ja que poden intervenir en la desactivació de compostos carcinògens, inhibir l'expressió de gens mutants així com activar enzims implicats en la desintoxicació de xenobiòtics, entre altres (Bravo i col.,

1998). Per contra, no es pot obviar que una concentració molt elevada de polifenols en l'organisme podria actuar en determinades condicions com a prooxidant (radical lliure). Així doncs, s'ha de vigilar la recomanació de la ingesta diària i/o l'enriquiment dels compostos fenòlics a matrius alimentàries a fi de garantir l'efecte beneficiós enlloc d'afavorir resultats perjudicials (Halliwell i col., 2007).

### 3.1.4. Activitat i paper dels polifenols

Les plantes, a diferència dels animals, sintetitzen els polifenols en el seu metabolisme, ja que la via del siquimat només es dona en plantes i microorganismes. La síntesi dels polifenols en les plantes s'esdevé per les múltiples funcions que exerceixen dins d'aquestes. Entre les funcions descrites a continuació s'esmenten les més destacables (Harbone i col., 2000):

- ❑ Estructural: els polifenols s'acumulen en les parets cel·lulars, esdevenint polímers que contribueixen a l'estabilització i estructura de la planta, aportant força i resistència.
- ❑ Pigmentació: les antocianines representen el grup de pigments visual a l'ull humà juntament amb les clorofil·les. Ambdós grups constitueixen una gamma de colors dispersos en les diferents parts de les plantes.
- ❑ Protecció enfront de la llum ultraviolada (UV): una de les respostes freqüents de les plantes davant la radiació excessiva ultraviolada és la biosíntesis de flavonoides, ja que són absorbents de la llum ultraviolada. La barreja de flavonoides actua de protecció enfront de la llum ultraviolada en les cèl·lules epidèrmiques de les plantes on té lloc la fotosíntesi. Sota aquestes condicions també presenten efecte antimutagènic.
- ❑ Interacció: s'ha observat l'activitat dels polifenols davant d'interaccions entre plantes, entre planta i microorganismes patògens, així com entre plantes i predadors. La resistència de les plantes davant possibles atacs externs està correlacionada amb una resposta hipersensible, traduïda per exemple en el reforçament de les parets cel·lulars. En aquest punt intervien els fenols mitjançant l'increment de dipòsits de lignines i síntesi d'isoflavanoides, estilbens i àcids hidroxicinàmics conjugats. Paral·lelament, l'actuació de la planta davant del predador està vinculada als polifenols mitjançant una activitat fitoestrògena (per acció de la genisteïna) o bé per la formació de complexos entre polifenols (tanins) de les plantes amb glucoproteïnes del depredador que disminueixen l'activitat enzimàtica de la digestió del depredador, entre d'altres.

Per contra a les funcions principals que protagonitzen els polifenols en les plantes, un cop aquests són aïllats del seu origen i són ingerits per l'ésser humà exerceixen principalment activitat antioxidant. S'ha observat que els polifenols presenten major activitat antioxidant *in-vitro* que d'altres antioxidants naturals com és el cas de les vitamines E i C (Rice i col., 1996). Aquesta activitat antioxidant dels polifenols en l'organisme es pot manifestar per diferents mecanismes: l'habilitat per captar radicals lliures; l'activació i/o inhibició d'enzims involucrats en la formació dels radicals lliures; la quelació de metalls de transició capaços de promoure la síntesi de radicals lliures, la interacció amb senyals cel·lulars, la regeneració d'antioxidants endògens, entre d'altres (Huang i col., 2005; Han i col., 2007).

El mecanisme d'acció més estudiat dels polifenols com a agents antioxidants és la inactivació dels radicals lliures i aquest està molt vinculat a l'estructura química dels mateixos. L'activitat del polifenol ve principalment condicionada pel nombre i localització dels grups hidroxils donadors d'electrons, el grau de polimerització i la presència de sucres en l'estructura. D'aquesta manera, quan un fenol cedeix un electró a un radical lliure, el propi fenol resta amb un electró desaparellat, que s'estabilitza mitjançant la deslocalització dels dobles enllaços presents en la seva estructura.

El mecanisme dels àcids fenòlics davant de l'oxidació dels lípids s'ha demostrat per la donació d'un electró o bé captació d'un radical generant una estructura més estable. L'impediment estèric per grups veïns al fenol (grups metoxi) millora l'activitat antioxidant; com és el cas de l'àcid cafeic, proporcionant major inhibició de l'oxidació. Al mateix temps, l'impediment estèric generat per substituents en la regió radical fa disminuir la velocitat de les reaccions de propagació on està implicat el propi radical fenoxil, contribuint a la seva estabilització (Robards i col., 1999).

Fruit de l'estudi de l'estructura dels fenols enfront de la seva capacitat antioxidant, Dziedzic i col. (1983) van observar que la major capacitat antioxidant està vinculada al nombre i localització dels grups fenòlics veïns en la molècula i que la presència de com a mínim dos grups és imprescindible per exercir aquesta activitat antioxidant. L'estructura del fenol *per se* no presenta activitat antioxidant; per contra, l'*orto*- i *para*-difènèlics sí que en presenten.

En el cas dels àcids benzoics, presenten menor activitat antioxidant quan el grup hidroxil es situa en posició *orto* o *para*, en relació al grup funcional carboxil que si es situa en posició *meta* (Robards i col., 1999). Els seus derivats, els hidroxibenzoics presenten major activitat antioxidant



en relació creixent al grau d'hidroxilació; com és el cas de l'àcid gàl·lic (que presenta tres grups hidroxils). Per contra, la substitució dels grups hidroxils per grups metoxi en les posicions 3 i 5 redueix la seva activitat (Rice i col., 1996). En el treball dut a terme per Fori i col. (1996), on es va estudiar l'activitat antioxidant de certs flavonoides, cumarines i àcids cinàmics en un sistema de micelles d'àcid linoleic tamponat a pH 7.4, es va observar la influència de la posició, on es trobaven els grups hidroxils, en l'aportació de l'activitat antioxidant. Aquesta activitat és major si la presència dels grups fenòlics es troben en posició *orto*. Paral·lelament es va observar que la presència del grup carbonil en l'anell aromàtic o la forma esterificada de l'àcid també augmenten l'activitat antioxidant. L'activitat també es veu incrementada quan el grup carbonil està separat de l'anell benzènic. Aquest fet es reflecteix en l'activitat antioxidant que presenten els àcids cinàmics en comparació als àcids hidrogenzoics. Pel que fa als àcids hidroxicinàmics, l'increment de la seva activitat ve donat per la presència del doble enllaç conjugat del grup C<sub>3</sub> (-CH=CO-COOH), ja que aquest incrementa la donació d'electrons en relació al grup carbonil dels àcids hidroxibenzoics (Rice i col., 1996). L'estudi de la relació estructura-activitat antioxidant dels compostos fenòlics ha posat de manifest que l'estructura amb més capacitat correspon al catecol; fet que justifica que l'àcid clorogènic i l'àcid cafeic tinguin més activitat antioxidant que l'àcid ascòrbic (Rice i col., 1996).

Els flavonoides es presenten com a cas particular justificat per la seva complexa varietat estructural. L'absència i/o presència de grups hidroxils i formes glucosídiques modifiquen la capacitat captadora de radicals lliures dels flavonoides (Rice i col., 1997). Nieto i col. (1993) van estudiar la capacitat antioxidant de diferents flavonoides (catequina, hesperidina, morina, naringenina, quercetina i rutina) i van observar que quan un flavonoide presenta una forma glucosídica en la posició R<sub>3</sub> de l'anell C (exemple, la rutina) no presenta tanta activitat antioxidant. Aquest fet concorda amb l'estudi de Das i col. (1990) on es presenta major activitat antioxidant en aquells flavonoides sense substitució en el R<sub>3</sub> o amb un grup hidroxil (OH) en l'anell C (exemple, la quercetina) que no pas amb la presència d'un glucòsid. Es pot resumir un seguit de característiques estructurals que afavoreixen el paper antioxidant dels flavonoides (Rice i col., 1997):

3. grup catecol en l'anell B
4. grups hidroxils en posició: 5 i 7 en l'anell A, 4' i 5' en l'anell B i 3 de l'anell C
5. doble enllaç entre la posició 2 i 3 de l'anell C en conjugació amb el grup carbonil de la posició 4 del mateix anell.

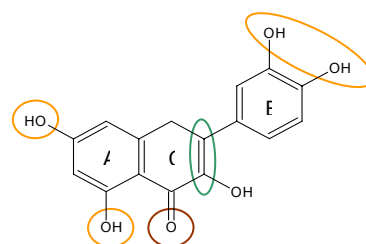


Figura 13. Estructura química de la quercetina

La quercetina (Figura 13) és un exemple de flavonoide que reuneix totes les propietats, i per tant a priori li són favorables per ser un bon antioxidant.

El mecanisme de quelació de metalls es pot considerar com una acció preventiva, ja que els polifenols no actuen directament sobre el radical lliure, sinó que interaccionen amb els metalls que catalitzen les reaccions de formació i/o descomposició dels radicals lliures. Els flavonoides presenten gran capacitat de quelació de certs metalls. El punt preferencial d'actuació dels flavonoides és el grup o-difenòlic en la posició 4'-5'-dihidroxi en l'anell B (Rice i col., 1997) i és imprescindible el grup carbonil en la posició 4 de l'anell C. La presència del grup hidroxil (OH-) en la posició 3 de l'anell C, en la posició 5 de l'anell A o en ambdues afavoreix la quelació amb els metalls (quercetina) o bé també es afavorida per la presència d'un nombre molt elevat de grups hidroxils (àcid tànnic).

Alguns fenols també presenten la propietat d'inhibir alguns enzims, com la xantina-oxidasa, responsables de la producció d'espècies reactives d'oxigen. És el cas d'alguns flavonoides que inhibeixen l'activitat dels enzims mitjançant el doble enllaç entre les posicions 2 i 3 de l'anell C i els grups hidroxils en les posicions 5 i 7 de l'anell A. Per contra, la presència de grups glicosilats en les posicions 6 i 8 de l'anell C, permet disminuir l'activitat inhibidora de la formació d'enzims per interaccions estèriques (Cos i col., 1998).

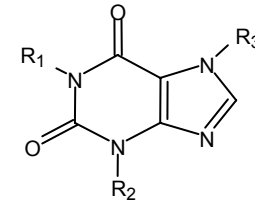
## **3.2. Alcaloides**

### **3.2.1. Concepte i diversitat estructural**

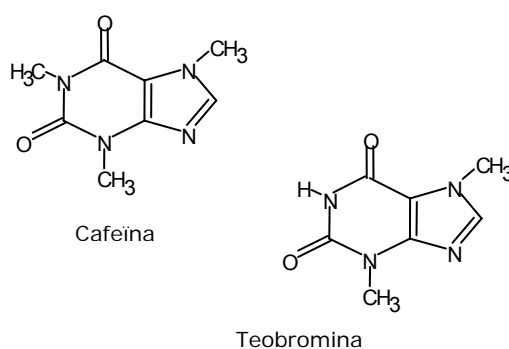
Els alcaloides són metabòlits secundaris, derivats de nucleòtids, identificats aproximadament en 100 espècies dins el regne vegetal (Zulak i col., 2006). El terme alcaloide va ser introduït per Carl Meissner al 1819 definint-los com a substàncies de naturalesa bàsica dins el regne vegetal. La seva designació prové de l'àrab *al-qali* (sosa) i del grec *eidos* (aspecte). Posteriorment, Winterstein i Trier (1910) van definir els alcaloides en un sentit més ampli com compostos bàsics nitrogenats d'origen vegetal o animal.

Els alcaloides majoritaris trobats als aliments d'estudi en aquest treball són les metilxantines, entre elles la teobromina i la cafeïna. Aquestes són classificades com a bases púriques (Taula 4) i presenten una estructura comuna (Figura 14).

**Taula 4.** Classificació de les metilxantines segons la seva estructura química  
(adaptació de Ashihara i col., 2008)

Esquelet	Compost	Nom comú	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
	<i>Metilxantines</i>				
	Xantina		H	H	H
	1-metilxantina		CH <sub>3</sub>	H	H
	3-metilxantina		H	CH <sub>3</sub>	H
	7-metilxantina		H	H	CH <sub>3</sub>
	1,3-dimetilxantina	Teofil·lina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
	1,7-dimetilxantina	Paraxantina	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
	3,7-dimetilxantina	Teobromina	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
	1,3,7-trimetilxantina	Cafeïna	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Ambdues substàncies alcaloides, teobromina i cafeïna, seran objecte d'estudi en aquest treball en les dues fonts vegetals estudiades (*Theobroma cacao* i *Ceratonia siliqua* L.). Les metilxantines presenten característiques pròpies com és el seu comportament amfòter, la solubilitat en aigua a temperatures pròximes al seu punt d'ebullició i presenten un efecte estimulants sobre el sistema nerviós central, originant un augment de la capacitat d'alerta i d'insomni. A aquests compostos se'ls ha atribuït participació fisiològica i farmacològica en el sistema nerviós central, cardiovascular, gastrointestinal, respiratori i renal (Nehlig i col., 1992).



**Figura 14.** Estructura química de la cafeïna i teobromina

### 3.2.2. Caracterització dels alcaloides

Des de principis del segle XX, l'extracció de les metilxantines ha estat estudiada en matrius com el cafè, el te i el cacau amb la finalitat de preparar aliments sense efectes secundaris i tolerables per a la majoria de la població. En els estudis realitzats per Gerritsma i col. (1953) i Jalal i col. (1975), es va utilitzar el cloroform amb una base d'amoni en lloc del solvent tricloretà que havia proposat anteriorment Wadsworth i col. (1921). En d'altres estudis, es va plantejar l'ús de l'aigua

com a solvent d'extracció, sota un rang de temperatures oscil·lant entre temperatura ambient fins a la del seu punt d'ebullició. Aquestes extraccions van mostrar poca selectivitat en l'extracció de metilxantines, ja que s'arrossegaven d'altres compostos solubles, sobretot quan l'aigua d'extracció arribava a temperatures elevades (Saldana i col., 2002; AOAC International, 1995). Pura Naik i col. (2001), amb la finalitat d'eliminar interferents, va proposar una etapa d'extracció en fase sòlida (SPE) sobre els extractes de metilxantines obtinguts amb les extraccions anteriorment descrites, usant un cartutx Sep-Pack amb farciment C<sub>18</sub>, obtenint extractes més concentrats en aquests compostos. Recentment, Brunetto i col. (2007) també han dut a terme una etapa de purificació en línia acoblada a l'injector del cromatògraf dels extractes de metilxantines obtinguts de pols de cacau amb aigua a 80°C.

Amb l'objectiu de minimitzar l'ús de solvents orgànics i disminuir la complexitat i durada de les extraccions sòlid-liquid (S-L), així com etapes posteriors de purificació mitjançant extraccions en fase sòlida (SPE), s'ha fet ús de tècniques sota condicions supercrítiques amb CO<sub>2</sub> per a l'extracció d'aquests compostos. Aquestes extraccions han presentat major selectivitat per les metilxantines i no afavoreixen tant la contaminació del medi ambient. Sambarato (1984) va demostrar bona selectivitat de la teobromina de les llavors del cacau emprant aquesta tècnica. Paral·lelament, Li i col. (1992) van obtenir teobromina i fracció grassa de llavors de cacau sotmeses a condicions supercrítiques amb CO<sub>2</sub> (150 bars i 60°C). Aquesta tècnica ha mostrat ser molt eficient per l'extracció de cafeïna en d'altres llavors com el cafè. En l'actualitat, hi ha plantes d'extracció a escala industrial per a descafeïnar el cafè mitjançant l'aplicació de condicions supercrítiques amb CO<sub>2</sub> (Brennecke i col., 1996). Amb la tècnica de fluids supercrítics es poden emprar cosolvents (polars i apolars), amb la finalitat d'incrementar la selectivitat d'extracció per a determinats compostos o fraccions de nutrients. En el mateix estudi dut a terme per Li i col. (1992), la utilització d'un cosolvent polar com l'etanol va permetre l'extracció selectiva de la mantega de la llavor de cacau. Johannsen i col. (1995) van investigar la selectivitat de les metilxantines (cafeïna, teobromina i teofil·lina) amb l'ús de metanol com a cosolvent sota condicions supercrítiques amb CO<sub>2</sub>. En aquest estudi es va observar major selectivitat d'aquests compostos en comparació a les condicions sense la presència del cosolvent.

En relació a la determinació dels alcaloides, l'any 1921 Wadsworth i col. van desenvolupar un mètode volumètric per a la determinació de teobromina en mostres de cacau. Jalal i col. (1975) van emprar la cromatografia de capa fina (TLC) amb l'objectiu de separar els diferents alcaloides

presentes en el cacau abans de la seva determinació espectrofotomètrica. Els mètodes espectrofotomètrics van presentar molts errors en les determinacions per ser poc específics. Per aquest motiu, posteriorment a aquests estudis, s'han desenvolupat mètodes principalment basats en cromatografia líquida en fase inversa per a la determinació dels alcaloides en mostres de cacau així com en el cafè i el te, entre d'altres. Kreiser i col. (1974) van desenvolupar un mètode per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per a la determinació de teobromina i cafeïna en mostres de cacau. En aquest mètode s'injectava l'extracte d'alcaloides obtingut mitjançant l'ús d'aigua a temperatures pròximes al seu punt d'ebullició en una columna C<sub>18</sub> amb fase mòbil composta per metanol:aigua:àcid acètic en proporció 20:79:1 (v:v:v). En l'estudi dut a terme per Blanch i col. (1983) van emprar com a fase mòbil acetonitril/aigua en una proporció de 8:92 (v:v). Posteriorment, Naik i col., 2001, van fer servir la mateixa fase mòbil que Blanch i col. (1983) variant la proporció a 20:80 (v:v). La detecció d'aquests compostos s'ha fet principalment emprant l'ultraviolat visible (Tereda i col., 1984; Naik i col., 2001; Bispo i col., 2002; Brunetto i col., 2007).

### 3.2.3. Alcaloides de *Theobroma cacao* i *Ceratonia siliqua* L.

Forsyth i col. (1963) van identificar la presència de teobromina en llavors de cacau. La teobromina és l'alcaloide majoritari en mostres de cacau, on suposa el 4% del pes sobre la llavor desengreixada, mentre que la cafeïna només es pot trobar en un 0.2%. Els cotilèdons de les llavors madures presenten valors de 2.2-2.7 % de teobromina (del pes sec) mentre que només un 0.60-0.80% és de cafeïna. En les capes més externes de la llavor de cacau aquests valors són més similars, 0.6-0.7% i 0.5-0.6% de teobromina i cafeïna, respectivament (Sesanayake i col., 1971; Sotelo i col., 1991). Posteriorment, Pur Naik (2001) va confirmar la teobromina com a alcaloide majoritari en mostres derivades del cacau. D'aquesta manera, Blanch i col. (1993) van determinar la seva presència en begudes de xocolata calenta en uns rangs de valors que oscil·laven entre 1-8 mg i 40-80 mg de cafeïna i teobromina, respectivament. Aquests continguts ens indiquen que les metilxantines resisteixen part del processat a què es sotmeten les mostres de cacau per elaborar els seus productes.

En la darrera dècada, s'han dut a terme estudis que demostren les propietats saludables d'ambdós alcaloides, teobromina i cafeïna, a certes dosis. Per exemple, Eteng i col. (2000) van mostrar que una dosi de teobromina de 700 mg per kg de pes reduïa significativament els lípids en rates hiperlipídiques. Paral·lelament, l'administració de 5 mg de cafeïna per kg de pes va mostrar

reduccions en l'estímul d'insulina en ingestes de glucosa en voluntaris que presentaven diabetis mellitus tipus 2 (T2DM) i una vida sedentària (Lee i col., 2005). Tot i aquests efectes, queda pendent de demostrar sota quines concentracions els alcaloides actuen com a antioxidant o prooxidant (Vinson i col., 1999). L'estudi dut a terme per Kelly i col. (2005) suggereix considerar que l'elevada capacitat antioxidant que presenten els derivats de cacau pot ser generada com a sinergisme dels polifenols i els alcaloides.

L'estudi centrat en l'excreció de nitrogen en aliments rics en polifenols com el cacau, el te i la garrofa dut a terme per Shahkhalili i col. (1989), on s'aplicaven diferents dietes a rates amb els aliments citats, van identificar la presència d'un 0.3% de teofil·lina en mostres de garrofa.

### **3.3. Extracció i purificació de polifenols en cacau i garrofa**

Els polifenols es troben àmpliament distribuïts pel regne vegetal de forma heterogènia entre les diferents parts d'aquest. Es poden presentar en formes solubles *per se* en els espais intracel·lulars, entenent aquells compostos que poden ser extrets amb barreja de solvents orgànics i aigua; o bé de forma insoluble, units a estructures del propi vegetal com és el cas de la paret cel·lular, fent referència a aquells compostos fenòlics que romanen en el residu de l'extracció.

El desenvolupament del mètode d'extracció comprèn des del tractament de les mostres fins a l'obtenció de l'extracte fenòlic, i la principal font d'error prové del tractament de la mostra. Per tant, l'extracció té com a finalitat l'aïllament dels polifenols de la matriu d'estudi. En molts casos, donada la complexitat de les matrius alimentàries, es duen a terme etapes prèvies a l'extracció pròpiament dels polifenols per a eliminar possibles interferències, com és el cas de l'eliminació de la fracció grassa i dels sucres o la precipitació de proteïnes.

Les extraccions més emprades per a l'obtenció de compostos polifenòlics han estat l'extracció líquid-líquid (LLE); sòlid-líquid (SLE) i extraccions pressuritzades (PLE). La selecció d'una tècnica d'extracció pot estar condicionada per la tipologia i naturalesa dels polifenols, així com la complexitat de la matriu d'estudi. Per contra, si la finalitat de l'obtenció d'un extracte fenòlic és conèixer les seves propietats o fer una caracterització química, pot ser convenient purificar o concentrar per eliminar compostos que puguin donar lloc a interferències. L'extracció en fase sòlida (SPE) és la tècnica disponible més ràpida i eficaç per a fer una purificació i/o concentració.

Juntament a la tècnica d'extracció, hi ha diferents variables que condicionen l'eficàcia de l'extracció i la composició de l'extracte fenòlic obtingut. Entre elles es pot nombrar: el solvent, el temps, la temperatura, l'agitació o l'agent de dispersió, la proporció mostra:solvent i el nombre d'extraccions que es realitzen. No hi ha descrita cap combinació d'aquestes variables per a l'extracció d'una determinada fracció fenòlica, ja que en darrer terme també influeixen aspectes relacionats amb la pròpia matriu de la qual es volen extreure els polifenols, com ara la composició i la textura.

La solubilitat dels polifenols vindrà condicionada per les propietats del solvent que s'utilitzi. Els solvents més freqüents en extraccions dels polifenols en mostres vegetals han estat el metanol, l'acetona, l'etanol i les seves barreges respectives amb aigua a diferents proporcions (Sun i col., 2005). Hammerstone i col. (1999) van proposar la proporció acetona:aigua:acètic 70:29.5:0.5 (v:v:v) com la barreja òptima per a l'extracció de procianidines en mostres de cacau. Posteriorment, Adamson i col. (1999) van detectar que el rendiment d'extracció de procianidines de cacau s'obtenia amb més eficiència després de l'eliminació completa de la fracció grassa de la matriu. Amb aquesta observació, Counet i col. (2003) van estudiar la influència de diferents solvents orgànics per a l'obtenció d'un màxim rendiment de procianidines en mostres de cacau. Per a fer-ho, van estudiar combinacions de solvents, tant per a l'eliminació de la fracció grassa com per a l'extracció sòlid-líquid (S-L) de procianidines en mostres de licor de cacau (Taula 5).

Counet i col. (2003) van observar que el rendiment d'extracció d'oligòmers (de monòmers a hexàmers) augmentava lleugerament amb l'ús d'un 2% d'àcid acètic en lloc de la proposta de Hammerstone i col. (1999) d'un 0.5%.

**Taula 5.** Solvents emprats per l'optimització de l'extracció de procianidines en mostres de cacau (adaptació de Counet i col., 2003)

<b>Barreja de solvents per l'extracció S-L de procianidines en mostres de cacau</b>	<b>Proporcions (v:v)</b>
Acetona:aigua:acètic	70:29.5:0.5
Acetona:aigua:acètic; Metanol:aigua:acètic; Etanol:aigua:acètic	70:28:2
Acetona, Metanol, Etanol	100
Acetona:aigua; Metanol:aigua; Etanol:aigua	50:50
Acetona:aigua; Metanol:aigua; Etanol:aigua	70:30
Acetona:aigua; Metanol:aigua; Etanol:aigua	30:70

Per a extraccions polifenòliques en mostres de productes derivats de la garrofa, barreges aquoses amb solvents orgànics similars han estat emprades per a les extraccions de polifenols per

diferents autors (Taula 6). L'ús d'aigua a temperatura ambient o al punt d'ebullició ha estat àmpliament aplicat per l'extracció de polifenols en mostres de garrofa (Taula 6). Papagiannopoulos i col. (2004) van proposar l'obtenció d'extractes de garrofa aplicant tècniques pressuritzades, concretament l'extracció amb solvents accelerada (ASE), que permet treballar a pressions i temperatures més elevades que les condicions atmosfèriques. En aquest treball, s'observa que la proporció d'acetona present en la barreja de solvent influeix en la selectivitat del polifenols que s'extrauen. Concretament, a proporcions d'acetona inferiors al 50%, s'obté un extracte ric en tanins hidrolitzables però pobre en flavonols glicòsids; mentre que si la presència d'acetona és superior al 50%, l'extracte presenta el perfil invers.

**Taula 6.** Solvents emprats en la bibliografia per a l'extracció de compostos fenòlics en mostres de garrofa

Barreja de solvents	Proporcions (v:v)	Tècnica Extracció	Referència
Acetona:aigua	70:30	S-L	Avallone i col. (1997)
Acetona, Metanol	100		
Aigua (T <sup>a</sup> punt d'ebullició)	100	S-L	Corsi i col. (2002)
Aigua (cicles T <sup>a</sup> ambient i T <sup>a</sup> punt d'ebullició)	100	S-L	Kumazawa i col. (2002)
Aigua; Acetona; Metanol	v: v	PLE (ASE)	Papagiannopoulos i col. (2004)
Acetona:aigua; Metanol:aigua			
Acetat d'etil	100		
Metanol	100	S-L	Makris i col. (2004)
Acetona:aigua; metanol:aigua; acetonitril:aigua	80:20		

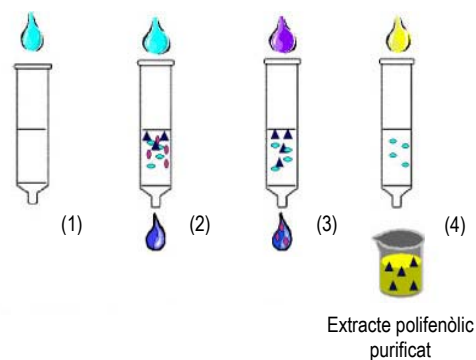
Arlorio i col. (2005) van sotmetre també mostres de pellofa de cacau a extraccions pressuritzades (PLE) amb l'objectiu d'obtenir extractes fenòlics, escollint l'extracció supercrítica amb CO<sub>2</sub>. Els extractes que es van obtenir presentaven residus de fraccions lipídiques, sent necessària un etapa prèvia de desengreixat. Poca selectivitat de polifenols va ser detectada en aquests extractes; mentre que es va recuperar un percentatge elevat de la cafeïna. Aquestes observacions van permetre concloure la necessitat d'un cosolvent per millorar l'extracció fenòlica fent ús d'aquesta tècnica.

El temps i temperatura d'extracció també són factors que s'han considerat d'influència en el rendiment i les propietats de l'extracció de polifenols. Azizah i col. (1999) van estudiar l'efecte temperatura (30, 40, 50, 70 i 90°C) sobre la capacitat antioxidant de diferents extractes polifenòlics obtinguts de nib, pols i pellofa de cacau. En aquest estudi van observar que a partir dels 50°C la capacitat antioxidant dels extractes obtinguts disminueix dràsticament. Aquest efecte també s'ha



observat en l'estudi de Papagiannopoulos i col. (2004) en extractes fenòlics de garrofa, on a partir de temperatures superior als 60°C els rendiments d'extracció disminuïen.

Les extraccions a temperatura i pressió atmosfèriques amb barreja de solvents orgànics i aigua no són gaire selectives ja que s'arrosseguen altres analits en l'extracte fenòlic com és el cas de sucres en mostres de cacau o garrofa (Hammerstone i col., 1999; Kumazawa i col., 2002). Per aquest motiu s'apliquen extraccions en fase sòlida sobre els extractes fenòlics obtinguts amb la finalitat de purificar-los. La figura 15 esquematitza el procés de purificació mitjançant extracció en fase sòlida. L'optimització del procés de purificació consisteix en seleccionar correctament la fase estacionària o farciment del cartutx, així com el volum, flux i naturalesa dels solvents emprats.



**Figura 15.** Diferents etapes de la purificació d'un extracte fenòlic per extracció en fase sòlida (SPE): (1) Condicionament del cartutx; (2) Addició de la mostra; (3) Eliminació d'analits interferents; (4) Elució de l'extracte.

L'objectiu de l'aplicació de l'extracció en fase sòlida sobre extractes polifenòlics obtinguts amb extraccions S-L del cacau i de la garrofa ha estat centrat en l'eliminació de sucres com a analits interferents. Tant Hammerstone i col. (1999) com Counet i col. (2003) van utilitzar com a farciment del cartutx un C<sub>18</sub> per a purificar extractes de cacau; mentre que Papagiannopoulos i col. (2004) van emprar poliamida per als extractes de garrofa. En funció del farciment que s'utilitzi, els solvents de condicionament, de rentat, així com de l'elució variaran. Per al cartutx amb farciment C<sub>18</sub>, el metanol i l'aigua destil·lada van ser els solvents de condicionament. En el cas del farciment de poliamida, el condicionament es va dur a terme només amb aigua destil·lada. En l'etapa de rentat es va utilitzar aigua en ambdues matrius per a l'eliminació dels sucres. Finalment, per a l'elució dels polifenols Hammerstone i col. (1999) i Counet i col. (2003) van fer ús de la barreja de solvents

orgànics emprats per a l'extracció de polifenols de cacau (acetona:aigua:acètic, 70:29.5:0.5 i 70:28:2, respectivament); mentre que per la garrofa, Papagiannopoulos i col. (2004) van utilitzar dimetilformamida:aigua:v+v, on v+v era la proporció de la barreja de solvents orgànics utilitzats per a l'extracció de polifenols de la garrofa.

### **3.4. Metodologies analítiques per a la determinació de polifenols**

La determinació dels polifenols s'ha desenvolupat arrel de la coneixença de les seves propietats sensorials. Entre aquestes es destaquen la pigmentació i l'astringència en fruites, verdures i vins (Paronetto, 1975). Paral·lelament, s'ha mostrat també interès a causa de l'evidència d'efectes beneficiosos per a la salut humana relacionats amb la ingesta d'aliments rics en polifenols (Scalbert i col., 2000).

Les primeres tècniques desenvolupades van permetre mesurar el contingut total de fenols o de determinades famílies de fenols mitjançant mètodes espectrofotomètrics, caracteritzant-se per ser mètodes ràpids i semi-quantitatius, però amb limitacions en la informació aportada. La necessitat d'identificar el perfil fenòlic ha desencadenat el desenvolupament de mètodes cromatogràfics que proporcionen informació individual de la tipologia dels polifenols i que permeten la seva quantificació en matrius alimentàries. Els avenços realitzats en les tècniques cromatogràfiques han permès generar gran quantitat de mètodes per a la determinació de polifenols, en molts casos específics a la tipologia de compostos fenòlics i selectius per a cada matriu. A continuació, es descriuen principalment les diferents metodologies que s'han emprat per a les matrius de cacau i garrofa, ambdues objecte d'aquest treball.

#### **3.4.1. Anàlisis espectrofotomètriques dels polifenols**

Entre els mètodes espectrofotomètrics més emprats per a la determinació de polifenols se'n destaquen tres: el mètode Folin-Ciocalteu, el mètode blau de Prússia i l'assaig de Vainillina.

En el mètode Folin-Ciocalteu, el polifenols són oxidats quan entren en contacte amb el reactiu de Folin (reactiu format per una barreja d'àcid fosfotungstínic i l'àcid fosfomolibdic) en medi bàsic, donant lloc a una reducció del reactiu de Folin que es tradueix en un canvi de tonalitat del mateix (Singleton i col., 1965). El reactiu Folin-Ciocalteu no és selectiu i per tant, reacciona amb d'altres estructures com sucres o alcaloides.

El mètode blau de Prússia fou suggerit per Price i col. (1977) per a la determinació de fenols en grans de cereals. La reducció d'un complex fèrric a ferrós, anomenat blau de Prússia, per acció dels polifenols esdevé la reacció que té lloc en aquest mètode. L'habilitat dels polifenols a reduir el complex està vinculada amb el grau d'hidroxilació.

En ambdós mètodes, Folin-Ciocalteu i Prússia, el producte de la reacció redox presenta una tonalitat blavosa, que pot llegir-se a l'espectrofotòmetre a longituds d'ona de 720-725 nm. La resposta obtinguda és un indicatiu de la riquesa fenòlica i el resultat s'expressa com a equivalent d'una substància fenòlica de referència. La catequina i l'àcid gàl·lic han estat les substàncies de referència més emprades per a les mostres de cacau i garrofa, respectivament. L'ús del mètode Folin-Ciocalteu ha estat aplicat principalment per a la determinació de polifenols totals en les baines de garrofa (Avallone i col., 1997; Kumazawa i col., 2002 i Makris i col., 2004).

L'assaig de Vainillina és específic per a la determinació de flavan-3-ols, dihidrocalcones i procianidines que presenten un enllaç simple en la posició 2-3 i que no presenten grups metahidroxils en l'anell B (Figura 6) (Butler i col., 1982). La reacció es basa en una condensació de la vainilla protonada amb una molècula de flavan-3-ol en medi àcid. El producte de la condensació presenta una tonalitat rogenca que permet ser llegida a longituds d'ona de 500 nm. Normalment, s'utilitza la catequina com a estàndard de referència i dóna informació específica el contingut de flavan-3-ols en la mostra. Waterhause i col. (1996) i Vinson i col. (1999) van aplicar aquest mètode a mostres de cacau per determinar el contingut de flavan-3-ols. Per la matriu garrofa, no s'ha aplicat tant aquesta determinació (Kumazawa i col., 2002), ja que la presència del grup flavan-3-ol no predomina dins la seva fracció fenòlica.

### **3.4.2. Anàlisis cromatogràfiques dels polifenols en *Theobroma cacao* i *Ceratonia siliqua* L.**

La gran majoria de mètodes d'anàlisi de polifenols en matrius alimentàries descrites en la bibliografia es basen en cromatografia líquida. Dins d'aquesta tècnica, principalment s'ha fet servir la cromatografia líquida d'alta resolució en fase normal (HPLC-FN) i en fase inversa (HPLC-FR). L'aplicació d'aquesta tècnica respecte d'altres està justificada per l'alta resolució, eficiència i reproductibilitat. A més a més, aquesta tècnica presenta major versatilitat a l'hora del seu acoblament amb diferents detectors (Wollgast i col., 2000).

La determinació de polifenols en mostres de cacau s'ha centrat en la determinació de procianidines, i per a fer-ho la cromatografia líquida en fase normal ha estat la tècnica més àmpliament utilitzada. L'ús de la fase normal ha permès la separació de les procianidines eluint aquestes segons l'ordre creixent dels graus de polimerització (Rigaud i col., 1993). Rigaud i col. (1993) van desenvolupar un mètode amb aquesta tècnica utilitzant una columna de sílica i un gradient de diclorometà en metanol amb un 4% d'àcid fòrmic:aigua (1:1, v:v); mitjançant el qual es van poder separar procianidines presents en llavors de cacau i de raïm. Posteriorment, Lazarus i col. (1999) i Gu i col. (2002) van modificar lleugerament el mètode descrit per Rigaud i col. (1993) amb la finalitat no només de la caracterització de procianidines sinó per al seu fraccionament i aïllament en mostres de cacau.

Totes les determinacions de procianidines en fase normal presenten la coelució de les formes monomèriques, la catequina i l'epicatequina, així com la d'alguns dímers entre sí, per exemple B<sub>2</sub> i B<sub>5</sub> (Porter i col., 1991). A més a més, mitjançant l'aplicació d'aquesta tècnica, no s'ha assolit la separació i identificació d'altres estructures fenòliques, com és el cas de les clovamides i alguns flavonoides (Kealey i col. 1998, Adamson i col., 1999; Hammerstone i col., 1999, Natsume i col., 2000). És per aquest motiu que en treballs posteriors s'ha aplicat també la cromatografia líquida en fase inversa amb l'objectiu de separar ambdues estructures monomèriques. Per contrapartida, l'aplicació de la fase inversa no manté l'ordre d'elució dels graus de polimerització de les procianidines i presenta limitacions en la resolució d'oligòmers majors de sis o set unitats (Wollgast i col., 2001).

En els darrers anys, millores tecnològiques en la cromatografia líquida han permès el desenvolupament de la cromatografia d'ultra ràpida resolució (UPLC). Aquesta tècnica presenta molts avantatges en relació a l'HPLC, com la reducció en la mida de la partícula de les columnes; fet que condiciona la llargada d'aquestes. Com a conseqüència, és possible reduir el temps d'anàlisi així com assolir límits de detecció i quantificació més baixos. Cooper i col. (2007) van aplicar aquesta tècnica, UPLC en fase inversa, pel desenvolupament d'una metodologia com a eina de control ràpida caracteritzant sis compostos del cacau: els dos monòmers, els dímers B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, un trímer i un tetràmer en mostres de xocolata en menys de 3 min.

La cromatografia líquida permet amb facilitat el seu acoblament a diferents detectors. Entre ells, els més emprats per a la determinació de polifenols han estat l'ultraviolat-visible i el detector de fotodíodes en fila (UV/DAD), fluorescència (FL) i l'espectrometria de masses (MS).

La detecció dels fenols mitjançant UV/DAD té lloc en base al registre del seu espectre. Per a la seva quantificació s'utilitza l'àrea dels pics amb màxima absorbància obtinguts a unes determinades longituds d'ona. Es defineix una longitud d'ona característica per a les diferents famílies fenòliques: 278 nm per als àcids fenòlics i procianidines, i 339 nm per als flavonoides. D'aquesta manera, en una mateixa anàlisi l'acoblament UV/DAD permet registrar diferents famílies fenòliques presents en la mostra. Els primers estudis realitzats per Rigaud i col. (1993) es van determinar les procianidines del cacau utilitzant un detector (UV/DAD). Posteriorment Lazarus i col. (1999) van observar que la resposta de les procianidines del cacau era major si s'acoblava a un detector de fluorescència (FL). Tot i això, l'acoblament de la cromatografia líquida al detector d'espectrometria de masses va significar un salt a nivell qualitatiu en la identificació d'analits a nivells de traces en matrius del cacau (Hammerstone i col., 1999; Adamson i col., 1999; Lazarus i col., 1999).

En les darreres dècades, l'espectrometria de masses ha mostrat ser una tècnica amb alta sensibilitat i especificitat en la identificació i quantificació d'analits seleccionant tècniques d'ionització i analitzadors de masses adequades. Acoblant el detector de MS, es poden trobar tres tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica que cobreixen el rang de polaritat dels productes a analitzar: la ionització en electroespray (ESI), la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI). La tècnica d'ionització ESI és una tècnica suau i s'aplica a compostos polars i iònics. Aquesta tècnica també ha estat emprada en la identificació de polifenols en mostres de cacau (Wollgast i col., 2001).

La qualitat de detecció en espectrometria de masses es basa en la capacitat de separar valors pròxims al quocient massa/càrrega ( $m/z$ ). Els diferents analitzadors de masses es poden classificar segons la resolució sigui alta o baixa. Els de baixa resolució (la trampa d'ions i el quadrupol) presenten valors de  $m/z$  inferiors a 1000; mentre que els analitzadors de masses considerats d'alta resolució estan proveïts d'una resolució mínima de  $m/z$  de 15000, com ara el temps de vol (TOF), o per sobre dels 50000 quan es tracta de l'analitzador de masses transformada de Fourier (FTMS) ([www.niobio.grasa.csic.es/jrrios/weblab/analizador.html](http://www.niobio.grasa.csic.es/jrrios/weblab/analizador.html)).

En el cas centrat de compostos polifenòlics del cacau, Hammerstone i col. (1999) van aplicar el seu mètode en fase normal acoblat a un detector de masses, que va permetre identificar procianidines de grau de polimerització de deu unitats en diferents mostres de licors de cacau. Paral·lelament, l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS), ha incrementat la identificació d'aquests compostos, ja que genera informació addicional d'una major elucidació estructural (Yilmazer i col., 2001). Wollgast i col. (2001) van fer ús del tàndem masses per primera vegada acoblat amb una fase inversa, podent identificar fins a set graus de polimerització en mostres de cacau i reduint el temps d'anàlisi. Rabaneda i col. (2003) han fet servir aquesta metodologia per a la identificació d'altres grups fenòlics, àcids fenòlics i flavonoides, en mostres de cacau.

Hi ha pocs estudis centrats en l'elució dels compostos fenòlics en mostres de garrofa i els seus derivats, i en tots aquests s'ha fet ús de la cromatografia líquida de fase inversa. Corsi i col. (2002) van fer ús d'aquesta tècnica per a la identificació d'àcids fenòlics, principalment per l'àcid gàl·lic, catequines i epigal·locatequines en mostres de baines de garrofa. Posteriorment, Owen i col. (2003) i Papagiannopoulos i col. (2004) van modificar el mètode incorporant l'acoblament del detector de masses a la cromatografia líquida, fet que va permetre la identificació d'un ventall més ampli de compostos fenòlics en mostres de fibra de garrofa i derivats de garrofa, respectivament. Entre els compostos fenòlics principalment identificats destaquen tant els tanins hidrolitzables (epigal·locatequines i l'àcid gàl·lic) com els flavonoides glucosilats (quercetines, kaempferols i miricetines).

Altres tècniques menys utilitzades per a la caracterització de fenols han estat la cromatografia de gasos, l'electroforesi capil·lar i la cromatografia en capa fina. La utilització de la cromatografia de gasos per a la determinació de polifenols ha estat escassa principalment per l'inevitable derivatització dels compostos fenòlics prèviament a la seva anàlisi. Els polifenols són compostos molt poc volàtils, sobretot els polifenols que presenten estructures de gran pes molecular com poden ser les procianidines. Owen i col. (2003) van utilitzar la cromatografia de gasos per complementar la identificació de la fibra de garrofa prèviament realitzada mitjançant cromatografia líquida i la ressonància magnètica nuclear (RMN). Posteriorment, Balaban (2004) també va fer ús d'aquesta tècnica per a la identificació dels compostos majoritaris presents en el tronc del garrofer.

### 3.4.3. Determinació de polifenols en *Theobroma cacao* i *Ceratonia siliqua* L.

L'any 1909 Ultée i col. van identificar la primera estructura polifenòlica en llavors de cacau corresponent a la fórmula empírica  $C_{16}H_{16}O_6$ , anomenada "Kakaool". L'avanç en les tècniques analítiques va permetre una millor purificació d'aquest compost, aclarint que la fórmula empírica era  $C_{15}H_{14}O_6$ . Erròniament, es va atribuir a aquest compost la designació de "l-acacatechin" per ser una catequina present en acàcies (*Acacia catechu*). Forschy i col. (1955) van confirmar que l'estructura s'associava a la forma monomèrica, catequina i epicatequina, i que ambdós isòmers es presentaven en les llavors del cacau.

Se sap a ciència certa, des dels anys 50, que el perfil de polifenols en *Theobroma cacao* està principalment constituït per compostos fenòlics del grup flavan-3-ols: les formes monomèriques (catequina i epicatequina) i els seus oligòmers (Forschy i col., 1955). A més dels flavan-3-ols en mostres derivades del cacau, Jalal i col. (1977) van detectar per primera vegada traces de flavonoides glicòsids en els cotilèdons de les llavors de cacau. Principalment es van identificar derivats de la quercetina i de l'àcid clorogènic. L'aplicació de tècniques cromatogràfiques van permetre a Hammerstone i col. (1999) identificar oligòmers de fins a dotze graus de polimerització en llavors de cacau no fermentades i Adamson i col. (1999) i Natsume i col. (2000) van confirmar aquesta presència en derivats del cacau i xocolates. Altres estudis també han confirmat la presència d'altres compostos fenòlics no flavan-3-ol en mostres de licor i pols de cacau (Sanbongi i col. 1998; Lamuela-Raventós i col., 2001; Sánchez-Rabaneda i col., 2003).

La quantificació dels polifenols en les llavors de cacau i els seus derivats es troben en els estudis més recents. Les primeres aproximacions es van dur a terme per Waterhouse i col. (1996) mitjançant el mètode espectrofotomètric Folin-Ciocalteu, i van determinar la presència de 8.4 mg polifenols per g mostra de xocolata amb un alt contingut de cacau; 5 mg polifenols per g xocolata amb llet, així com 20 mg polifenols per g pols de cacau, expressant els resultats com a mil·liequivalents d'àcid gàl·lic per g de mostra. En general les determinacions colorimètriques estan sobrequantificades si es comparen amb les determinacions realitzades per cromatografia líquida com es pot observar en l'estudi portat a terme per Adamson i col. (1999). En aquest treball, la quantificació fou 1.7 mg de procianidines per g xocolata amb alt contingut de cacau; 0.7 mg de procianidines per g xocolata amb llet i 19.4 mg procianidines per g de licor de cacau.

Estudis recents elaborats per Miller i col. (2006) i Gu i col. (2006) han permès la quantificació d'un ampli ventall de productes derivats del cacau adquirits a diferents supermercats d'Estats Units. La caracterització de productes d'àmplia diversitat, obtinguts mitjançant processats i orígens diferents, mostraven rangs de concentracions de procianidines entre 0.37-22.4 mg per g de producte. Aquest treball va permetre també observar com influeix en la quantificació de polifenols el processat, l'origen, així com els ingredients que acompanyen les formulacions del producte final. Ja, anteriorment, Counet i col. (2003) havien estudiat i verificat diferències en el perfil fenòlic en funció de la varietat i l'origen en mostres de licor de cacau. És de gran importància, doncs, conèixer les condicions del processat dels productes que contenen polifenols, ja que aquestes poden influir directament en el seu perfil polifenòlic i per tant, en les seves propietats.

En mostres de garrofa, majoritàriament, s'ha aplicat el mètode espectrofotomètric Folin-Ciocalteu per a la quantificació del contingut de polifenols totals. Els valors que es presenten oscil·len entre 17.5-20.9 mg per g de beina de garrofa, emprant l'àcid gàl·lic com a patró de referència (Avallone i col., 1997; Kumazawa i col., 2002; Papagiannopoulos i col., 2004 i Turhan i col., 2006). En els treballs d'Avallone i col. (1997), Kumazawa i col. (2002) i Papagiannopoulos i col. (2004) es presenta també el contingut de flavan-3-ols determinat mitjançant l'assaig de la Vainillina, expressats en referència a la catequina i sent aquests valors molt inferiors en relació al contingut de polifenols totals mitjançant el Folin-Ciocalteu (2.0 - 4.3 mg per g de mostra).

La determinació del contingut de polifenols mitjançant cromatografia líquida s'ha aplicat a diferents fraccions de la garrofa. Corsi i col. (2002) van quantificar 1.36 i 6.28 mg de polifenols per g d'extracte fenòlic de beina de garrofa i fulles de garrofer, respectivament. A posteriori, Owen i col. (2003) van identificar i quantificar els fenols associats a la fibra de la garrofa, identificant-ne principalment àcids fenòlics i flavonoides. Papagiannopoulos i col. (2004) van caracteritzar diferents derivats de la garrofa quantificant continguts de polifenols que oscil·laven entre 0.45, 1.08, 4.14 i 1.21 mg per g de kibble, xarop, fibra i farina de garrofa, respectivament. En tots aquests estudis es va observar que l'àcid gàl·lic és el compost polifenòlic majoritari de qualsevol de les fraccions o derivats de la garrofa analitzades.



### **3.5. Metodologies analítiques per a avaluar la capacitat antioxidant**

A principis del 1990, es va despertar l'interès sobre la capacitat antioxidant dels aliments, fet que va desencadenar la necessitat de desenvolupar mètodes per a la seva determinació. L'activitat antioxidant es defineix com la capacitat d'un compost per a inhibir o prevenir la degradació oxidativa; oferint informació sobre la duració de l'acció antioxidant i del retard a iniciar la degradació oxidativa.

Els antioxidants poden reaccionar amb els radicals lliures mitjançant diferents mecanismes: per transferència d'un àtom d'hidrogen o d'un electró. En el primer cas, el mètode d'avaluació mesurarà la capacitat de l'antioxidant a reaccionar amb el radical lliure mitjançant la donació d'un àtom d'hidrogen. Aquest tipus de reaccions són ràpides i depenen del pH i solvent en què tenen lloc (Prior i col., 2005). Per contra, en el segon cas, el mètode determinarà el potencial d'un antioxidant per a transferir un electró i reduir un radical lliure, com és el cas de carbonils (Prior i col., 2005). En aquest segon cas, les reaccions tendeixen a ser lentes. En ambdós casos es poden identificar molècules interferents, com és el cas dels metalls, que emmascaren els resultats de la capacitat antioxidant mesurada (Prior i col., 2005).

En base als mecanismes d'actuació dels antioxidants, s'han desenvolupat diferents mètodes amb l'objectiu de mesurar l'activitat antioxidant de compostos individuals i de matrius complexes. A continuació, es mencionen els principals mètodes *in-vitro* per a la mesura de la capacitat antioxidant de compostos polifenòlics aplicats en les matrius d'estudi.

El mètode DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) va ser suggerit als anys 1950 quan es va descobrir la capacitat dels materials de donar hidrògens. Aquest test es basa en la capacitat de cedir hidrògens d'un antioxidant davant d'un radical estable lliure, el DPPH. Posteriorment, s'ha emprat en la determinació de la capacitat antioxidant de compostos fenòlics, mostres alimentàries i biològiques. Aquest radical mostra coloració a l'espectre ultravisible i aquesta presenta una disminució quan capta protons d'altres analits. La mesura es realitza mitjançant la lectura de la disminució d'intensitat de color del radical a longituds d'ona de 525nm. El resultat s'expressa en relació a la quantitat necessària d'antioxidant per a reduir al 50% de la concentració inicial del radical estable, DPPH, ( $EC_{50}$ ).

Els treballs inicials de Glazer i col. (1990) i Ghiselli i col. (1995) i que a posteriori van ser optimitzats per Cao i col. (1993), van permetre el desenvolupament del mètode ORAC (oxygen radical absorbance capacity), que mesura la degradació oxidativa d'una molècula fluorescent sotmesa a l'acció del radical AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano)dihydrochloride) en presència de l'antioxidant objecte d'estudi. En la primeria del seu desenvolupament, es va emprar la ficoeritrina (B-PE) com a substància fluorescent; tot i que en anys posteriors va ser substituïda per la fluoresceïna, que és una substància més estable i menys reactiva sota les condicions del mètode. La pèrdua de fluorescència no presenta un comportament lineal i per tant, es registra la funció de la corba de la disminució de la fluorescència al llarg de l'assaig i per quantificar la capacitat es calcula l'àrea sota la corba generada (AUC). Simultàniament, en el mateix assaig, es fa la mesura de l'activitat d'un antioxidant de referència (Trolox), cosa que permet expressar els resultats com a microequivalents de Trolox per g de mostra. La utilització d'una font de radicals biològics (AAPH) i la mesura tant del temps com de la quantitat d'inhibició en una mateixa determinació són atributs que proporcionen a aquest mètode un valor biològic en comparació a d'altres mètodes que mesuren també l'activitat antioxidant. Addicionalment, Prior i col. (2003) en els seus darrers treballs han adaptat aquest mètode tant per a mostres hidrofíliques com lipofíliques, generant així un mètode molt versàtil. El mètode ORAC ha assolit tanta rellevància que des de la Food and Drug Administration (FDA) s'ha elaborat una taula amb els valors de capacitat antioxidant d'ingredients i aliments per a ser considerats com a valors de referència (<http://www.ars.usda.gov/>).

Hi ha interès a posar a punt metodologies basades en l'activitat sobre substrats biològics que puguin representar una major aproximació a les condicions fisiològiques. Un d'aquests mètodes *in-vitro* és l'oxidació de les LDL (low density lipoprotein). Les LDL són aïllades a partir de mostres de sang humana i el desenvolupament del mètode consisteix a iniciar una oxidació mitjançant el radical azo (AAPH) o per ions metàl·lics com el  $\text{Cu}^{2+}$ . La peroxidació és monitoritzada passat un temps d'incubació mitjançant la lectura dels diens conjugats formats com a producte de la reacció a la longitud d'ona de 234 nm (Prior i col., 2005). L'avantatge que presenta aquest mètode és la d'utilitzar el radical azo (AAPH), radical que reproduïx l'acció que té lloc en les condicions *in-vivo*. Handelman i col. (1999) van trobar correlació entre els resultats d'aquest mètode i l'ORAC per a un seguit de mostres sempre que s'utilitzaven els radicals azo com a punt inicial de l'oxidació. En el mateix estudi es va observar que quan l'oxidació de LDL es duia a terme amb ions metàl·lics, no s'establia correlació amb els resultats del mètode ORAC. La procedència de les LDL té lloc a partir

de mostres de sang humanes, fet que condiciona que aquest mètode presenti major variabilitat (Prior i col., 2005).

L'aplicació d'aquests dos mètodes descrits, ORAC i DPPH, ha estat emprada en estudis per a mostres de cacau i garrofa. Waterhouse i col. (1996) van estudiar la capacitat d'extractes de cacau enfront la inhibició de l'oxidació de LDL humanes, mostrant un 87% d'inhibició de l'oxidació per part de la catequina. Hammerstone i col. (1999) van avaluar l'activitat antioxidant del licor de cacau i productes derivats del seu processat (xocolates) mitjançant l'ORAC, i va establir una correlació entre l'activitat i la concentració de procianidines. Hirano i col (2000) van mostrar que el licor de cacau inhibia l'oxidació de les LDL en una relació dosis-concentració a valors de 0.1-0.5 mg per dL. Posteriorment, Lee i col. (2003) van posar de manifest que l'activitat dels derivats del cacau presentaven major capacitat antioxidant que mostres de vi o de te mitjançant l'avaluació del resultat del mètode DPPH. Counet i col., (2003) van fer un pas endavant estudiant les diferències entre els elevats graus de polimerització de flavan-3-ols a l'hora d'atribuir capacitat antioxidant, conclouent que a mesura que augmenta la complexitat en l'estructura oligomèrica augmenta la seva capacitat antioxidant. Amb posterioritat, s'ha posat en dubte que els graus de polimerització de procianidines tinguessin tanta rellevància biològica *in-vivo*, ja que no s'ha demostrat la seva biodisponibilitat.

El mètode més emprat per avaluar la capacitat antioxidant en mostres de garrofa ha estat el mètode DPPH. Kumazawa i col. (2002) van aplicar-lo a extractes polifenòlics obtinguts de baines de garrofa. La capacitat d'aquests extractes va ser inferior que la dels polifenols de referència de l'estudi, la catequina i quercetina. Papagiannopoulos i col. (2004) van estudiar la capacitat antioxidant utilitzant també el mètode DPPH de diferents productes derivats de la garrofa, entre ells els kibbles, xarops concentrats, la fibra i la farina de garrofa. Papagiannopoulos i col. (2004) van poder observar que la farina i fibra de garrofa presentaven major capacitat antioxidant que els kibbles i xarops, fet que coincidia amb el contingut de polifenols en cada fracció. Makris i col. (2004) van comparar la capacitat antiradicalària d'extractes de garrofa amb estàndards fenòlics (catequina, àcid gàl·lic, àcid cafeic, àcid tànnic i quercetina). Els extractes de garrofa van presentar major activitat que l'àcid tànnic, valors comparables amb la catequina i inferiors a la resta d'estàndards utilitzats. Recentment, el mateix autor ha avaluat la capacitat antioxidant de subproductes de la indústria agroalimentària: del processat del vi, fulles d'olivera, pells de poma, patata, ceba i baines de garrofa. Tant la beina de garrofa com les pells de patata van presentar menor activitat que la resta de subproductes (Makris i col., 2007).

La gran quantitat de metodologies proposades implica certa dificultat en la interpretació dels resultats. De fet, moltes vegades, la capacitat antioxidant dels extractes polifenòlics mostra poca correlació aplicant els diferents mètodes descrits. No s'ha definit la mateixa activitat antioxidant entre flavonoides, antocians, àcids hidroxicinàmics i catequines del te mitjançant l'oxidació LDL induïda per coure i les mesures realitzades mitjançant els mètodes ORAC i FRAP (ferric reducing ability of plasma) (Frankel i col., 2000). Prior i col. (2005) van concloure que l'ORAC i l'oxidació de les LDL podrien ser considerats els mètodes amb major rellevància a partir d'una comparació dels mètodes descrits en termes de la seva senzillesa, la instrumentació necessària, el punt final de la mesura així com l'aplicabilitat dels diferents mètodes en funció del caràcter de la mostra problema.

Encara que els models *in-vitro* són àmpliament emprats en estudis d'investigació, cal destacar les limitacions que aquests presenten en la no representació de les condicions fisiològiques cel·lulars. És per això que s'han desenvolupat models *ex-vivo* que assoleixen amb major fidelitat informació sobre els mecanismes d'acció i eficàcia protectora de substàncies pures i extractes antioxidants. En el cas del model cel·lular, es pot nomenar l'eritròcit pel seu resultat en l'avaluació de la toxicitat sobre biomembranes (Singh i col., 2008). L'oxidació de la membrana dels eritròcits es du a terme per descomposició tèrmica d'un compost azo en un medi que presenti oxigen. Els assajos amb eritròcits permeten caracteritzar els processos oxidatius induïts per radicals lliures i valorar la naturalesa i potència de la protecció realitzada dels antioxidants (Zou i col., 2001). Kumazawa i col. (2002) van aplicar aquest model a extractes fenòlics derivats de les baines de garrofa per a caracteritzar la seva capacitat antioxidant. Els sistemes de cultius cel·lulars són especialment útils per a l'estudi de l'estrès oxidatiu en termes de toxicitat, respostes adaptatives cel·lulars i verificadors dels efectes reguladors dels antioxidants en alteracions cel·lulars (Gille i col., 1992). En aquesta tipologia de models, la selecció de la línia cel·lular vindrà condicionada pels efectes, mecanismes, propietats i activitats a avaluar. L'estudi dut a terme per Klenow i col. (2009) treballa amb les línies cel·lulars HT29 de còlon humà i d'adenomes cel·lulars LT97 per avaluar el potencial preventiu d'extractes fenòlics de garrofa sobre l'estrès oxidatiu de les cèl·lules humanes del còlon. En els models cel·lulars *ex-vivo* també s'identifiquen limitacions, entre les quals cal destacar que no reproduïxen certes funcions de l'organisme com poden ser el sistema nerviós o l'endocrí (O'Brien i col., 2000).

Finalment, es troben els models *in-vivo* amb animals i/o humans, els quals representen a priori més fidelment les respostes biològiques. La consideració d'aquests mètodes són la variació

interindividual, en el cas dels humans, i la translació als humans dels efectes detectats en animals . A més a més de la possible problemàtica ètica que es pugui manifestar davant de certs experiments tant en animals com en humans, cal destacar que el pressupost d'aquests estudis és més elevats i són més lents en comparació als mètodes anteriorment descrits. Com a conseqüència, resulten poc aconsellables en els primers estadis d'investigació de l'activitat antioxidant d'extractes o productes d'interès.

### **3.6. Biodisponibilitat dels polifenols**

Els efectes biològics que s'han descrit dels polifenols depenen directament de la quantitat diària ingerida així com de la seva biodisponibilitat en el cos humà, i aquesta pot variar àmpliament en funció del polifenol d'estudi i la matriu que el conté. Existeixen un seguit de conceptes vinculats amb la ingesta d'un nutrient (Parada i col., 2007):

Digestibilitat: fracció de nutrient que s'allibera de la matriu alimentària ingerida i digerida, que es troba en forma disponible en el tracte intestinal.

Bioaccessibilitat: fracció de nutrient que s'allibera de la matriu alimentària ingerida i digerida, que podria ser potencialment absorbida en el tracte intestinal.

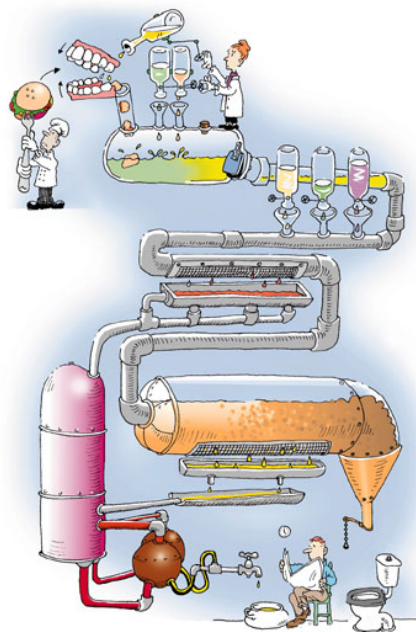
Biodisponibilitat: fracció de nutrient digerida i que és absorbida; per tant, d'utilització per desenvolupar funcions fisiològiques i d'emmagatzematge per part de l'organisme.

En els darrers anys s'han proposat models per a avaluar la bioaccessibilitat i biodisponibilitat dels polifenols. Entre aquests es poden diferenciar models a diferents nivells d'aproximació a les condicions fisiològiques de l'ésser humà: *in-vivo* i *in-vitro*. Els models que determinen la biodisponibilitat dels nutrients tenen implícita la presència humana o d'animals, essent estudis de digestió *in-vivo*. Normalment en aquests models, la valoració de la biodisponibilitat es du a terme després de la ingesta d'una quantitat de nutrient aïllat o en una matriu alimentària, aportant informació molt valuosa de la biodisponibilitat i metabolisme dels nutrients. Per contrapartida, aquesta tipologia d'estudis presenta inconvenients com ara són el temps d'execució, la complexitat i selecció dels voluntaris, així com el cost que aquests models assoleixen. Addicionalment, s'ha observat que hi ha una gran variació interindividual que dificulta l'extrapolació dels resultats dels

estudis d'intervenció (Kroon i col., 2004). Com a conseqüència, en els darrers anys s'han desenvolupat models de digestió *in-vitro* que permeten estimar la digestibilitat i bioaccessibilitat de nutrients com els polifenols sota condicions fisiològiques d'una manera ràpida i segura, sense presentar les restriccions ètiques dels models *in-vivo*. Els models *in-vitro* simulen les condicions de la digestió i el procés d'absorció. El procés de digestió es du a terme sota condicions controlades utilitzant enzims comercials que reproduïxen les etapes de boca, estómac i intestí prim (alfa-amilasa, pepsina, pancreatina i sals bilials). Per a l'estudi *in-vitro* del procés d'absorció s'ha generalitzat l'ús de cultius cel·lulars Caco-2 (Parada i col., 2007).

### 3.6.1. Fisiologia de l'aparell digestiu i models de digestió proposats per a reproduir-ne les condicions

La fisiologia humana de l'aparell digestiu contempla diferents etapes i els models de digestió intenten reproduir aquestes condicions amb la finalitat d'avaluar la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols (Figura 16).



**Figura 16.** Representació de les parts que componen els models de digestió gastrointestinal *in-vitro* (boca, estómac i budells) per a reproduir les condicions fisiològiques dels polifenols sotmesos a la digestió.

La digestió s'inicia en la boca, on les dents molars trossegen l'aliment ingerit, durant la qual les glàndules salivars segreguen saliva (fins a 1,5 L diaris). La saliva conté principalment dues tipologies d'enzims,  $\alpha$ -amilases i mucina. Els primers actuen trencant enllaços de midó i la mucina

té la funció de lubricar l'espai bucal. En la saliva també hi són presents quantitats de sodi, clorurs, potassi i carbonats.

En l'estómac, les glàndules gàstriques segreguen pepsina i àcid clorhídric assolint un pH pròxim a 2 focalitzat fisiològicament per a la digestió de les proteïnes. Un cop s'ha format el bol alimentari en l'estómac (quim), aquest continua cap a l'intestí prim, on es segreguen sucres pancreàtics, formats per enzims proteolítics, amilases i lipases, per a la digestió de proteïnes, carbohidrats i lípids, respectivament.

Al mateix temps, en l'intestí prim la bilis segrega les sals biliars, i aquestes tenen un paper important en l'emulsió i digestió del greix i en el transport de les substàncies digerides cap a la mucosa intestinal (Figura 17). La segregació de bicarbonat en aquesta etapa fa canviar les condicions de pH, assolint valors de 6.5-7.5. La part biodisponible de nutrients en aquesta etapa de la digestió es considera com la fracció potencialment a absorbir a través de l'epiteli intestinal (Figura 17). Concretament, una vegada els fenols són absorbits, aquests són sotmesos a reaccions de conjugació, bé siguin metilacions, sulfatacions, glucoronidacions o combinacions d'aquestes, que formen part del procés de detoxificació que pateixen els xenobiòtics per facilitar la seva eliminació biliar i urinària (Figura 17). El control d'aquestes reaccions es du a terme per enzims com la UDP-glucuronosil transferasa (UDPGT), que forma part dels enzims dins el reticle endoplasmàtic; la catecol-O-metil transferasa (COMT), responsable de la metil·lació dels polifenols; i les sulfotransferases, que són els enzims citosòlics que catalitzen la conjugació d'un grup sulfat amb els compostos fenòlics.

La darrera etapa de la digestió té lloc en l'intestí gruixut (còlon), on hi accedeixen tots aquells compostos que no s'han absorbit prèviament en l'intestí prim i encara romanen estables. A més a més, aquells polifenols absorbits i metabolitzats al fetge, via intestí prim, poden retornar a l'intestí gruixut via circulació enterohepàtica (Figura 17). El còlon es caracteritza per presentar un potencial catalític i hidrolític, donant lloc a reaccions de desconjugació ràpidament. A més a més, en aquesta darrera fase els compostos fenòlics poden ser metabolitzats per les bacteries, implicant una ruptura dels anells fenòlics i generant àcids aromàtics simples. Aquests tipus de metabòlits presenten grups fenòlics lliures i per tant, capacitat reductora.

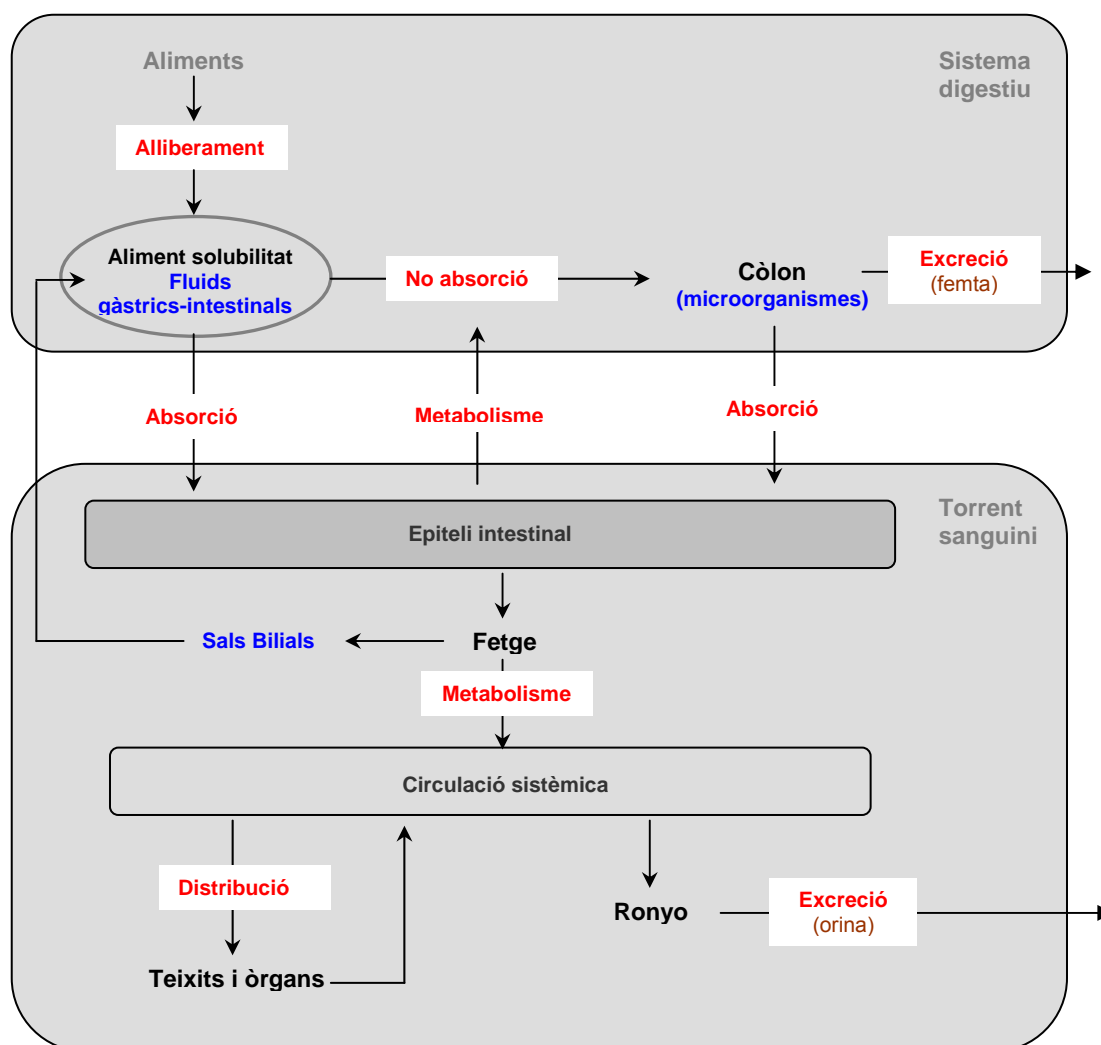


Figura 17. Esquema de les vies de circulació dels polifenols dins l'organisme (adaptació de Holst i col., 2009)

S'han desenvolupat diferents models *in-vitro* per a reproduir tot el procés gastrointestinal de substàncies com minerals, contaminants i més darrerament també dels polifenols. Aquests models permeten la simulació del procés gastrointestinal; és a dir, la reproducció del què succeeix en boca, estómac i intestí prim i gruixut, durant la masticació, digestió i absorció, respectivament. En termes generals es poden diferenciar dos models gastrointestinals: estàtics i dinàmics. Els models estàtics reproduïxen les condicions de la digestió sense reproduir el moviment i esforç mecànic que l'aliment o nutrient rep durant aquest procés, com les forces de masticació en boca, els moviments en estómac i budells. En canvi, els models dinàmics incorporen processos fisico-mecànics durant almenys alguna etapa de la digestió. A part de les tipologies dels models (estàtic i dinàmic), s'identifica la possibilitat de dialitzar el digerit. La fracció dialitzable s'assumeix com la fracció que pot ser potencialment absorbida; és a dir, bioaccessible. Per contra, els models que no dialitzen el



digerit aporten informació sobre la fracció de nutrient que s'allibera de la matriu alimentària ingerida i digerida i que es troba en forma disponible en el tracte intestinal, és a dir, s'avalua la digestibilitat.

Miller i col. (1981) van definir un model digestiu *in-vitro* per estudiar la biodisponibilitat de minerals. Aquest model presenta una primera etapa gàstrica amb l'addició de pepsina i àcid clorhídric, i posteriorment una etapa duodenal amb una bossa de diàlisi, que presenta bicarbonat calci. Un cop la barreja procedent de la primera etapa gàstrica entra en contacte amb la bossa de diàlisi i assoleix el pH característic del budell prim (pH 6.5), s'addicionen les sals bilials i pancreatina, i roman durant dues hores a temperatura corporal humana (37°C). Un cop finalitzada aquesta etapa s'avalua la biodisponibilitat dels minerals sobre la fracció dialitzada (Miller i col., 1981). Gil-Izquierdo i col. (2002), a partir del model proposat per Miller i col. (1981), van desenvolupar un model més senzill per a l'estudi de la biodisponibilitat de fenols en matrius alimentàries. En aquest cas, la segona etapa del model, que simula l'intestí prim, presenta un tub de diàlisi, que permet la separació del digerit en dues fraccions, l'interior i l'exterior del tub, associant-*l'*ho a la fracció bioaccessible i no bioaccessible, respectivament. Bermúdez i col. (2007) posteriorment, amb un model molt similar al proposat per Gil-Izquierdo i col. (2002), van estudiar l'estabilitat gàstrica i pancreàtica dels fenols presents en fruites roges.

La combinació d'aquest model gastrointestinal *in-vitro* (boca-estómac-budell prim) acoblat a una línia de cèl·lules Caco-2 va ser proposat com a model per a l'estimació de la biodisponibilitat de carotenoides de diferents aliments (espinacs, tomàquet, pastanaga) com a una eina ràpida i de baix cost (Garett i col., 1999). Finalment, models més complexos s'han arribat a desenvolupar per a ser comercialitzats com és el cas del model TIM-1 (TNO gastrointestinal model) que simula la secreció, motilitat i absorció de les dues primeres etapes de la digestió, estómac i intestí prim (Minekus i col., 1995). El model inclou la simulació del moviment de l'aliment en estómac i reproduïx acuradament els valors de canvi de pH i les concentracions de les sals biliars.

Recentment, s'han presentat altres models i prototips similars comercials ([www.modelgut.com](http://www.modelgut.com); [http://www.ainia.es/html/sites/09/noticias/Presentacion\\_virtual\\_digestor.swf](http://www.ainia.es/html/sites/09/noticias/Presentacion_virtual_digestor.swf)).

### **3.6.2. Bioaccessibilitat, biodisponibilitat i metabolisme dels polifenols**

S'identifiquen pocs estudis centrats en la influència de la primera etapa de la digestió sobre els polifenols, en la que s'inicia la seva alliberació de la matriu alimentària. Spencer i col. (2001) no van

observar degradació d'oligòmers de procianidines després de la incubació d'aquests durant 30 min amb saliva.

En un estudi previ, Spencer i col. (2000) reproduint les condicions químiques que tenen lloc en l'estómac, en absència d'enzims, van observar que oligòmers de procianidines (hexàmers i heptàmers) s'hidrolitzaven en barreges de monòmers i dímers. Paral·lelament, Salas i col. (2003) van sotmetre sota les mateixes condicions malvidin-3-o-glucoside i dímers de procianidines observant la formació d'un adducte antocià-flavanol a valors de pH de 2 i 3.8. Contràriament, Rios i col., (2002), en estudis *in-vivo*, van observar la despolimerització de procianidines del cacau en l'estómac, suggestionant que el pH àcid de l'estómac és tamponat pel bolus alimentici; i per tant, les procianidines no estan tant exposades a les condicions àcides. Per contra, Tsang i col. (2005) mantenen que les procianidines d'alt grau de polimerització no són despolimeritzades en formes monomèriques en el seu pas per l'etapa gàstrica i duodenal. No obstant, estudis *in-vitro* amb procianidines han observat la seva hidròlisi en l'etapa prèvia (gàstrica) i per tant, l'assoliment del budell prim en forma monomèrica, estructura que si permetria ser absorbida (Manach i col., 2004).

L'absorció en intestí prim està directament vinculada a l'estructura del compost fenòlic, destacant la limitació en el seu elevat pes molecular en el cas de les procianidines i la forma en què es presenten (Rios i col., 2002). Principalment està relacionada amb el grau de glicosilació, acilació i esterificació dels compostos fenòlics. Ader i col. (1996) van descriure el transport actiu de membrana sodi-dependent involucrat en l'absorció de l'àcid ferúlic i cinàmic en el jejú d'una rata. En relació als fenols glucòsids poden ser transportats al teixit epitelial dintre d'eritròcits per un transportador de glucosa sodi dependent (SGLT1) (Henry i col., 2005), on es poden hidrolitzar a través de les  $\beta$ -glucosidases citosòliques (Henry-Vitrac i col., 2006). Les  $\beta$ -glucosidases per contra, no són capaces d'hidrolitzar els flavonoides ramnòsids, com és el cas del flavonol rutina present en el cacau (quercetina-3-O-ramnoglucòsid), la qual sí podrà alliberar en etapes posteriors sota l'acció de les  $\alpha$ -ramnosidases presents en la microflora intestinal. Una altra via d'absorció de les formes glucòsids en l'intestí prim pot ser mitjançant l'acció de l'hidrolasa floridzina lactasa (LPH), una glucosidasa de la membrana del raspall de l'intestí prim que catalitza la hidròlisi extracel·lular d'alguns glucòsids, i conseqüentment té lloc una difusió de les formes aglicones a través del raspall de l'intestí prim (Day i col., 2003). Els flavanols del cacau es presenten en forma aglicona, fet que els permetria ser absorbits sense la necessitat de l'actuació de la  $\beta$ -glucosidasa. Pel que fa a oligòmers de procianidines, per exemple del cacau, pot variar el grau d'absorció en funció al seu

pes molecular; l'estructura complexa d'aquestes limitaria l'absorció en el budell prim de més de tres unitats unides (Manach i col., 2004). Tot i això, encara es desconeix quins són els mecanismes de l'absorció gastrointestinal de molts compostos polifenòlics.

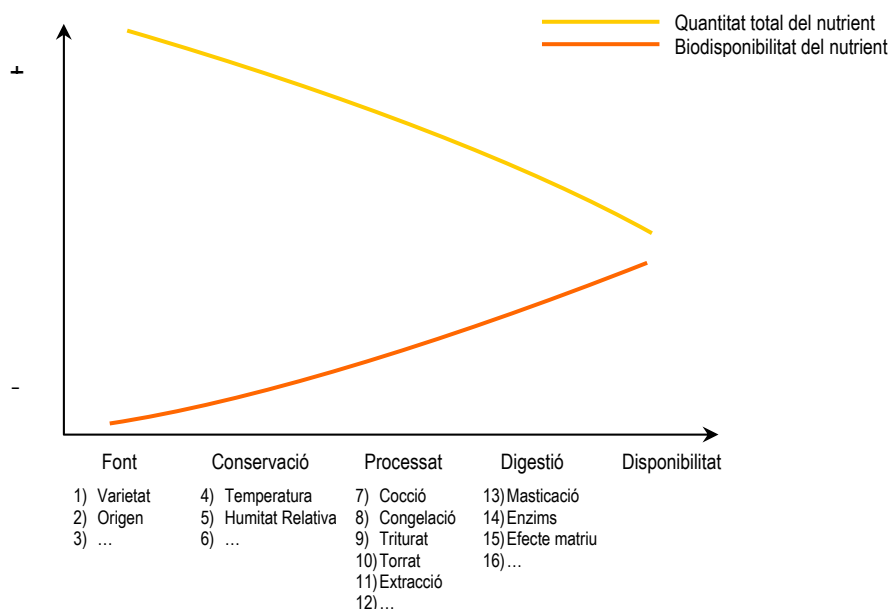
A l'intestí gruixut les procianidines de grau de polimerització majors de tres unitats, que arribarien intactes, podrien ser metabolitzades en diversos àcids de baix pes molecular per la flora intestinal i en aquest cas es podrien absorbir i exercir la seva activitat (Rice-Evans i col., 2001). L'activitat en aquesta etapa està condicionada a la composició microbiòtica interindividual. En darrer terme els compostos que no han reaccionat o absorbits són eliminats.

### **3.6.3. Efecte matriu i processat de la bioaccessibilitat, biodisponibilitat i metabolisme dels polifenols**

Els aliments vegetals, com la fruita i la verdura, són fonts d'origen vegetal que contenen compostos polifenòlics, que són ingerits amb un mínim processat; per tant, el perfil de polifenols no es veu molt condicionat a cap alteració que no sigui la pròpia dels vegetals (estats de maduresa, influència del cultiu, varietats, entre d'altres). Per contra, els aliments processats, sotmesos a condicions diverses de temperatura, pressió, esforços físics o mecànics, entre d'altres; així com l'elaboració pròpiament de nous aliments, on la matriu es compon de diferents ingredients, el perfil fenòlic pot veure's alterat i per tant, la seva bioaccessibilitat i biodisponibilitat. Es defineix, doncs, l'estudi de l'efecte matriu com la influència de les condicions de processat i la presència de macronutrients, que constitueixen la matriu alimentària (proteïnes, carbohidrats, greixos), sobre el perfil fenòlic.

L'objectiu dels estudis dels models anteriorment descrits recau en poder fer una estimació de la biodisponibilitat dels polifenols de la matriu d'estudi per a poder definir les condicions d'aquestes i obtenir un efecte positiu dels fenols per a la salut humana. Així doncs, un factor que cal tenir en compte és la matriu d'aliment on es troben els polifenols; ja que algunes unions dels polifenols entre sí o la presència de macronutrients com les proteïnes, carbohidrats o lípids podrien condicionar la biodisponibilitat d'aquests. D'altra banda es presenta l'efecte processat dels aliments, com per exemple el trossejat, fermentat o torrat en matèries primes; així com processos de congelació, cocció o el fregit, un cop s'ha elaborat l'aliment final. Tots aquests processos poden influir en la desestructuració de la paret cel·lular dels aliments d'origen vegetal i per tant, poden conduir a l'alliberament del nutrient de la matriu per a ser exposat a condicions que el poden desestabilitzar i degradar. Parada i col. (2007) proposen un gràfic on queda reflectida la disminució

del nutrient disponible a mesura que és exposat a diferents processos des de l'origen fins a la seva ingesta; però com a contrapartida es veu incrementada la disponibilitat del mateix per haver estat alliberat de la matriu d'origen (Figura 18).



**Figura 18.** Quantitat total que disposa un aliment dels seus nutrients i que disminueixen en relació al seu processat però que augmenta la seva biodisponibilitat per supressió del efecte matriu (adaptació de Parada i col., 2007).

La influència de l'efecte matriu en la biodisponibilitat dels compostos fenòlics ha estat molt poc estudiada i en els darrers anys ha despertat interès. La gran majoria d'estudis s'han realitzat mitjançant l'administració de compostos fenòlics purificats o compostos purs comercials, sense la presència de la matriu alimentària. Serafini i col. (1996) van estudiar la interacció dels polifenols amb les proteïnes i van suggerir que hi havia una interacció entre aquests fruit d'observar que l'activitat antioxidant del te disminuïa quan en aquest s'hi addicionava llet. Posteriorment, Keogh i col. (2007) van demostrar que l'addició de llet en una beguda de cacau no influïa en la disponibilitat dels fenols presents en la mostra de cacau.

Aherne i col. (2002) van arribar a la conclusió que la biodisponibilitat dels flavonoides es veia disminuïda un cop processades certes matrius com les cebes, pomes i faves respecte la matriu d'origen natural. En relació a l'efecte processat Stewart i col. (2000) van observar que els diferents tractaments sobre tomàquets afavorien la biodisponibilitat dels flavonols gràcies al seu alliberament de la matriu. Simonetti i col. (2005) ho van confirmar observant la biodisponibilitat de la rutina en

tomàquet, un cop aquest va ser processar obtenint-lo com a puré. Per contra, anteriorment Balasundram i col. (2006), ja havien conclòs que la biodisponibilitat dels polifenols pot venir influïda per diferents aspectes: la localització d'aquests nutrients en la pròpia font vegetal, les variacions en les estructures de les parets vegetals, la localització de les formes glicosídiques en les cèl·lules vegetals i la interacció dels polifenols amb la matriu alimentària. Altres efectes com els processos de la indústria alimentària o les operacions de cuinat que hom aplica abans d'ingerir els aliments també han mostrat un efecte en l'absorció dels polifenols; en alguns casos de forma positiva i en d'altres negativa. Aquestes observacions contradictòries assenyalen que es necessita obrir una porta per aprofundir en els estudis de l'efecte matriu alimentària sobre la biodisponibilitat i absorció dels polifenols.



**OBJECTIUS**





Els *objectius* del present treball s'emmarquen dins el pla de treball del projecte CENIT de la convocatòria 2006 (MET-DEV-FUN), en el qual es pretén desenvolupar estratègies i seqüències metodològiques per a la formulació i validació d'un aliment funcional amb beneficis en la reducció del risc de patir malalties cardiovasculars i neurodegeneratives a partir d'ingredients d'origen natural.

Actualment, existeix un especial interès pels compostos fenòlics dels aliments en àmbits de la nutrició, salut i medicina en base a diferents evidències que suggereixen que poden actuar com a potents antioxidants.

L'*objectiu general* del treball està orientat en el desenvolupament de metodologies per avançar en la caracterització química i l'activitat antioxidant de la fracció fenòlica de les fonts d'estudi, en l'optimització de l'obtenció d'extractes rics en polifenols de les fonts d'estudi i en l'avaluació de la seva bioaccessibilitat en funció de l'efecte matriu. Les fonts vegetals seleccionades han estat la llavor del cacau i els seus derivats i la farina de garrofa.

Els *objectius específics* es poden concretar per a cada un dels tres blocs que constitueixen el present document:

(1) Metodologies per a la caracterització química i l'activitat antioxidant de la fracció fenòlica i alcaloides del cacau i la garrofa:

- a) Desenvolupar un mètode per a la identificació i quantificació dels compostos fenòlics i alcaloides dels extractes fenòlics de cacau i garrofa per cromatografia líquida amb detector d'espectrometria de masses (MS-MS).
- b) Mesurar la capacitat antioxidant dels extractes fenòlics de cacau i garrofa adoptant com a referència els mètodes de DPPH i l'ORAC.

(2) Metodologies per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols de les fonts d'estudi seleccionades:

- a) Optimitzar el procés d'obtenció d'extractes fenòlics del cacau a partir de la mateixa llavor crua així com productes intermedis del procés d'elaboració de la xocolata, sent aquests el nib de cacau, el licor de cacau i la pols del cacau.

3) Metodologies d'avaluació de la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols en matrius derivades del cacau i la garrofa:

- a) Desenvolupar i aplicar un model de digestió *in-vitro* contemplant l'etapa bucal, gàstrica i duodenal per estudiar la digestibilitat dels polifenols de les matrius d'estudi.
- b) Desenvolupar i aplicar l'etapa duodenal dialitzada del model de digestió *in-vitro*: model estàtic i dinàmic per estudiar la bioaccessibilitat dels polifenols de les matrius d'estudi.
- c) Avaluar l'efecte matriu en la digestibilitat i bioaccessibilitat dels compostos fenòlics del cacau i garrofa.

PLA DE  
TREBALL



## **PLA DE TREBALL (Juny 2006-Desembre 2009)**

Per a poder assolir les fites dels objectius citats es proposa dur a terme el següent pla de treball:

### **Revisió bibliogràfica**

S'ha dut a terme una recerca i recopilació d'articles tècnics i científics en relació a cadascun dels apartats tractats en el transcurs del treball (veure en el cronograma la seva distribució temporal).

Concretament aquesta recerca s'ha centrat en:

- Desenvolupar tècniques cromatogràfiques per a la caracterització del perfil fenòlic i la presència d'alcaloides del cacau i de la garrofa
- Aplicació de tests espectrofotomètrics per a l'avaluació del contingut polifenòlic en mostres vegetals
- Aplicació de tests per a l'avaluació de la capacitat antioxidant en mostres vegetals
- Desenvolupar una tècnica d'obtenció d'extractes rics en polifenols del cacau i la garrofa
- Desenvolupar un model de digestió *in-vitro*
- Desenvolupar un model de digestió *in-vitro* dialitzat

El treball s'ha dividit en tres blocs:

### **1) La caracterització química i l'activitat antioxidant de la fracció fenòlica del cacau i la garrofa:**

#### **a. Caracterització cromatogràfica del perfil fenòlic dels extractes de cacau i garrofa**

Aplicació de mètodes bibliogràfics basats en HPLC-MS/MS per a la determinació de procianidines en extractes fenòlics del cacau.

Desenvolupament de mètodes per a la identificació i quantificació de la fracció fenòlica (procianidines) en extractes fenòlics del cacau per UPLC-MS/MS.

Desenvolupament de mètodes per a la identificació i quantificació de la fracció fenòlica (àcids fenòlics i flavonoides) en extractes fenòlics del cacau per UPLC-MS/MS.

Desenvolupament de mètodes per a la identificació i quantificació de la fracció fenòlica (àcids fenòlics i flavonoides) en extractes fenòlics de la garrofa per UPLC-MS/MS.

2) **Obtenció d'extractes rics en polifenols procedents del cacau i la garrofa**

a. **Optimitzar el mètode d'obtenció dels extractes fenòlics de cacau i garrofa**

Aplicació i optimització de mètodes descrits a la bibliografia per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols a partir de cacau i derivats del mateix i de la farina de garrofa.

b. **Caracterització espectrofotomètrica del perfil fenòlic dels extractes de cacau i garrofa**

Determinació del contingut de polifenols totals dels extractes fenòlics del cacau i la garrofa mitjançant Folin-Ciocalteu.

Determinació del contingut de flavan-3-ols dels extractes fenòlics del cacau mitjançant l'assaig de Vainillina.

c. **Avaluació de l'activitat antioxidant dels extractes polifenòlics de cacau i garrofa**

Avaluació de l'activitat antioxidant mitjançant l'aplicació del mètode DPPH.

Posta a punt i avaluació de l'activitat antioxidant mitjançant l'aplicació del mètode ORAC.

3) **Avaluació de la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols en matrius derivades del cacau i la garrofa**

a. **Simulació de la digestió *in-vitro***

Desenvolupament i aplicació del model de digestió *in-vitro*: etapa bucal, gàstrica i duodenal en matrius del cacau i de la garrofa.

b. **Avaluació de la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols del cacau i garrofa**

Desenvolupament i aplicació de l'etapa duodenal del model de digestió *in-vitro* dialitzada: model estàtic i dinàmic en matrius del cacau i de la garrofa.

c. **Avaluació de l'efecte matriu en la digestibilitat i bioaccessibilitat dels compostos fenòlics del cacau i garrofa**

Avaluació de la fracció lipídica i la presència de sucres com a efecte matriu en el cacau i la garrofa, respectivament.

**CRONOGRAMA DEL PLA DE TREBALL**

Concepte	Any 1				Any 2				Any 3				Any 4
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>
<b>1. Formació acadèmica i científica</b>													
1.1. Aprenentatge del maneig instrumental científic i metodologies d'anàlisi	■												
1.2. Cursos de doctorat		■	■										
1.3. Assistència a cursos complementaris					■		■						
<b>2. Obtenció d'extractes polifenòlics de les fonts d'estudi</b>													
2.1. Extractes fenòlics bruts de cacau		■	■	■	■	■	■						
2.2. Extractes fenòlics purificats de cacau			■	■	■	■	■						
2.3. Extractes fenòlics de garrofa						■	■	■	■	■			
<b>3. Caracterització dels extractes polifenòlics i alcaloides de les fonts d'estudi</b>													
3.1. Desenvolupament mètode cromatogràfic procianidines i alcaloides del cacau i derivats			■	■	■	■	■			■	■	■	■
3.2. Desenvolupament mètode cromatogràfic àcids fenòlics i flavonoides de cacau i derivats				■	■	■	■			■	■	■	■
3.3. Desenvolupament mètode cromatogràfic àcids fenòlics i flavonoides de garrofa						■	■	■	■	■	■	■	■
3.4. Determinació polifenols totals per aplicació mètode Folin-ciocalteu					■	■	■	■		■	■	■	■
3.5. Determinació flavan-3-ols per aplicació mètode Vainillina					■	■	■	■		■	■	■	■
3.6. Avaluació activitat antioxidant mitjançant mètode DPPH					■	■	■	■		■	■	■	■
3.7. Posta a punt i avaluació activitat antioxidant mitjançant mètode ORAC					■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>4. Desenvolupament de models de digestió <i>in-vitro</i></b>													
4.1. Model de digestió <i>in-vitro</i> . Aplicació matrius de cacau i garrofa								■	■	■	■	■	■
4.2. Model de digestió <i>in-vitro</i> , etapa duodenal dialitzada estàtica Aplicació matrius de cacau i garrofa								■	■	■	■	■	■
4.3. Model de digestió <i>in-vitro</i> , etapa duodenal dialitzada dinàmica Aplicació matrius de cacau i garrofa									■	■	■	■	■
<b>5- Redacció de documentació</b>													
Consulta documentació científica		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5.1. Elaboració treballs dels cursos doctorat		■	■	■									
5.2. Elaboració article científic 1					■	■	■	■					
5.3. Elaboració article científic 2						■	■	■	■				
5.4. Elaboració pòsters congrés								■	■	■	■	■	■
5.5. Elaboració del document per assolir el Diploma D'estudis Avançats (DEA)									■	■	■	■	■
5.6. Elaboració article científic 3									■	■	■	■	■
5.7. Elaboració article científic 4										■	■	■	■
5.8. Elaboració article científic 5											■	■	■
5.9. Elaboració article científic 6												■	■
5.10. Elaboració document Tesis Doctoral													■







**RESULTATS**



## Capítol 1

**Comparative study of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine procyanidins and alkaloids in cacao samples**

Journal of Food and Analysis Composition  
Acceptat novembre 2009



## Comparative study of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples

Nàdia Ortega<sup>1,2</sup>, Maria-Paz Romero<sup>1</sup>, Alba Macià<sup>1</sup>, Jordi Reguant<sup>2</sup>, Neus Anglès<sup>2</sup>, José-Ramón Morelló<sup>2</sup>, Maria-Jose Motilva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Technology, XeRTA, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Tarragona, Spain

\*Corresponding Author. Tel: +34 973 702817; Fax: +34 973 702596;

E-mail address: motilva@tecal.udl.es

### Abstract

This study develops a method using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to identify and quantify procyanidins, monomers to oligomers, and alkaloids, theobromine and caffeine, in cocoa samples. UPLC analyses were carried out using an Acquity HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm particle size) and gradient elution with water/acetic acid (99.8/0.2, v/v) and acetonitrile. This method was compared with an HPLC-MS/MS method in terms of speed, sensitivity, selectivity, peak efficiency, linearity, reproducibility, detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs). Both methodologies were applied and compared to identify and quantify procyanidins and alkaloids from samples of cocoa nib. The results obtained showed that the UPLC-MS/MS methodology allow to determine procyanidins up to nonamers at low concentration levels in a short analysis time, i.e. less than 12.5 minutes.

**Keywords:** Alkaloids; Procyanidins; Phenols; Cocoa; HPLC; UPLC; MS/MS

### 1. Introduction

Cocoa products are known to be rich in polyphenols, especially procyanidins, the concentrations of which vary depending on their origin (Counet et al., 2004; Niemenak et al., 2006), and processing conditions (Wollgast and Anklam et al., 2000; Summa et al., 2006). The procyanidins identified in cocoa can range in size from monomers to long-chain polymers, such as tannins, and are usually

bound to carbohydrates, which constitute repeating subunits of high molecular weight polymers. Moreover, cocoa has been found to be beneficial for health because of its antioxidant (Adamson et al., 1999; Counet and Collin, 2003; Lee et al., 2003; Othman et al., 2007), anti-inflammatory (Ramiro et al., 2005;) and anti-atherosclerotic activity (Vinson et al., 2006) in *in vitro* and *in vivo* studies (Sies et al., 2005). Due to the possible beneficial implications of procyanidins for human health, there is interest in analyzing their content and the specific oligomers and polymers in cocoa. Apart from procyanidins, cocoa samples are also known to contain alkaloids, such as theobromine and caffeine. These compounds affect the flavor of cocoa products (Luna et al., 2002) and have received increasing attention because of their physiological effects (Buchelli et al., 2001,).

The alkaloid compounds in cocoa samples have been analyzed by capillary electrophoresis (CE) (Gotti et al., 2006) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Naik, 2001; Brunetto et al., 2007). The detection system most frequently employed in these studies was ultraviolet detection (UV). On the other hand, procyanidin monomers (catechin and epicatechin) and oligomers in cocoa samples have been mainly analyzed by HPLC in the normal phase (Adamson et al., 1999; Hammerstone et al., 1999; Lazarus et al., 1999; Natsume et al., 2000; Gu et al., 2002; Rabaneda et al., 2003) and in the reversed-phase (Natsume et al., 2000; Wollgast et al., 2001; Cooper et al., 2007). Apart from the normal and reversed HPLC modes, hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has also been used to analyze procyanidins in cocoa samples and successful results were reported when the diol stationary phase was used (Kelm et al., 2006). Apart from HPLC, other techniques, such as thin-layer chromatography (TLC) (Porter et al., 1991) and CE (Gotti et al., 2006) have also been used.

Several detection systems have been explored for characterizing procyanidins in cocoa samples by HPLC. Photodiode array (PDA) (Rigaud et al., 1993) and fluorescence (Adamson et al., 1999; Lazarus et al., 1999) have been shown to be efficient. However, the coupling of HPLC with mass spectrometry (MS) (Hammerstone et al., 1999; Natsume et al., 2000; Gu et al., 2002; Kelm et al., 2006) and tandem MS (MS/MS) (Wollgast et al., 2001; Rabaneda et al., 2003; Cooper et al., 2007) has been shown to be an effective tool for identifying procyanidins at low concentration levels for the analysis of complex matrices, such as cocoa samples.

Unfortunately, all these methods require a long analysis time to determine procyanidins by HPLC. This takes between 50 and 80 min per sample. In addition, when analyses are carried out in the normal phase, this requires the use of toxic chlorinated solvents that are considered an ecological hazard (Gu et al., 2002).

Recently, there have been improvements in the LC technique with the development of ultra-performance liquid chromatography (UPLC). This technique takes full advantage of chromatographic principles to perform separations using columns packed with smaller particles (1.7  $\mu\text{m}$ ) and/or at higher flow rates. This leads to a shorter analysis time, higher peak efficiency and higher resolution. The reversed phase UPLC-MS/MS technique has been applied by Cooper et al. (2007) to quantify the major chocolate polyphenols: catechin, epicatechin, dimers B<sub>2</sub> and B<sub>5</sub>, trimer C<sub>1</sub> and tetramer D. The application of this technique to the analysis of 68 chocolate samples showed that epicatechin concentrations can be used to predict the content of other polyphenols, especially B<sub>2</sub> and C<sub>1</sub>, and the total polyphenol content in an analysis time of only three minutes.

Thus, UPLC opens up new possibilities for improving the analytical methods for complex food samples that usually require high resolution and long analysis time. The aim of this study was to develop a rapid, reproducible and sensitive method to determine procyanidins (from monomers to oligomers) and alkaloids (caffeine and theobromine) by UPLC-MS/MS. The method developed was compared to HPLC-MS/MS method in the normal phase in terms of selectivity, sensitivity, analysis time, peak efficiency, operating costs, and quality parameters: linearity, reproducibility, detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs). A further aim was to apply the developed methodologies and compare their potential for identifying and quantifying the procyanidins and alkaloids in cocoa nibs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Standards of (-)-epicatechin, (+)-catechin, theobromine and caffeine were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Procyanidin B<sub>2</sub> was purchased from Fluka Co. (Buchs, Switzerland). A stock standard solution of 2 mg/ml of (-)-epicatechin, (+)-catechin, procyanidin B<sub>2</sub> and caffeine was dissolved in acetonitrile. Meanwhile, theobromine was dissolved in acetone/MilliQ water/acetic acid (70/29.5/0.5, v/v/v). The standard working solution was prepared weekly by diluting the stock standard solutions in solvent extraction, acetone/water/acetic acid (70/29.5/0.5, v/v/v) and these were stored in dark-glass flasks at 4° C. Dichloromethane, methanol, acetonitrile and acetone were HPLC grade (Scharlab, Barcelona, Spain); multisolvent grade acetic acid and hexane were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

## 2.2. Chromatographic methods

The HPLC and UPLC analyses were performed using a Waters Acquity Ultra-Performance™ liquid chromatography system (Waters, Milford MA, USA), equipped with a binary pump system (Waters, Milford, MA, USA).

The HPLC normal phase separations were carried out on a Phenomenex Luna silica column (25 cm x 4.60 mm, 5 µm) at 30° C, equipped with a silica precolumn (5 µm, 1 cm x 4.6 mm) (Technokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase was dichloromethane (eluent A), methanol (eluent B), and water/acetic acid (50/50, v/v) (eluent C). The elution gradient at 30°C was of B into A a constant 4% C at a flow-rate was 1 ml/min as follows: elution starting with 14% B in A; 14-28.4% B in A, 0-30 min; 28.4-39.2% B in A, 30-45 min; 39.2-86% B in A, 45-50 min.

The UPLC analyses were performed using an Acquity HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm particle size) (Waters, Milford MA, USA) with a binary phase at a flow-rate of 0.4 ml/min. The eluent A was water/acetic acid (99.8/0.2, v/v) and B was acetonitrile. The elution gradient at 30° C was: 0-10 min, 5-35% B; 10-10.10 min, 35-80% B; 10.10-11 min, 80% B isocratic; 11-11.10 min, 80-5% B; 11.10-12.50 min, 5% B isocratic.

## 2.3. MS/MS conditions

Both the HPLC and UPLC systems were coupled to a triple quadrupole detector (TQD) mass spectrometer (Waters, Milford MA, USA) using an electrospray ionization (ESI) source Z-spray™. For all the standards and samples, the MS was simultaneously operated in negative and positive modes to analyze the procyanidins and the alkaloids (caffeine and theobromine) respectively in a single run. The data were acquired by selected reaction monitoring (SRM). The working conditions for the ionization source were as follows: capillary voltage, 3 kV; source temperature, 150° C; cone gas flow rate, 80 l/h and desolvation gas flow rate, 800 l/h; desolvation temperature, 400° C. Nitrogen (>99% purity) and argon (99% purity) were used as nebulizing and collision gases respectively. The cone voltages and collision energies were optimized for each analyte by infusing 10 µg/ml of each standard, and two transitions were acquired, one for quantification and the other for confirmation purposes. These results are shown in Table 1. The dwell time established for each transition was 100 ms for HPLC and 30 ms for UPLC. Data acquisition was carried out by MassLynx v 4.1 software.



#### 2.4. Quality parameters

The quality parameters of the two chromatographic methods, the HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, were studied by using a serial dilution of the stock solution of the standards: catechin, epicatechin, dimer B<sub>2</sub>, caffeine and theobromine. The parameters considered were linearity, calibration curve, reproducibility, LOD and LOQ.

**Table 1.** Optimized SRM conditions for the analysis of catechin, epicatechin, dimer B<sub>2</sub>, caffeine and theobromine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS

Compound	[M-H]	SRM <sub>1</sub> (quantification)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)	SRM <sub>2</sub> (confirmation)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)
ESI (-)							
Catechin	[M-H]	289 > 245	45	10	289 > 205	45	15
Epicatechin	[M-H]	289 > 245	45	10	289 > 179	45	15
Dimer B <sub>2</sub>	[M-H]	577 > 289	45	20	577 > 425	45	15
ESI (+)							
Caffeine	[M-H] <sup>+</sup>	195 > 138	45	15	195 > 110	45	20
Theobromine	[M-H] <sup>+</sup>	181 > 163	45	15	181 > 140	45	10

The calibration curves (based on the integrated peak area) were calculated using five points at different concentrations (from 0.002 to 50 µg/ml) and each standard solution was injected three times. The reproducibility, expressed by relative standard deviations (RSDs) of the concentration, was studied at two concentrations, 1 and 10 µg/ml, at three different days and one injection each day. The LODs and LOQs were calculated using a signal-to-noise-criterion of 3 and 10, respectively.

#### 2.5. Cocoa phenol extraction and analysis

The cocoa nib samples corresponded to the Forastero variety from Ghana (West Africa). The cocoa nibs are obtained from roasted cocoa beans separated from their husks and broken into small bits. They are the essence of chocolate.

The extraction of procyanidins from the cocoa nibs was based on the work by Hammerstone et al. (1999), slightly modified. The cocoa nibs were ground in a laboratory mill for 30 s before phenol extraction to obtain a homogenous material. In order to achieve maximum extraction efficiency during the sample preparation, 15 g of this sample was firstly defatted four times with 125 ml of hexane for 20 min in an orbital shaker (Selecta, Barcelona, Spain) at 200 rpm and subsequently centrifuged for 15 min at 15000 g. The defatted cocoa sample was then extracted four

times with solvent extraction (acetone/MilliQ water/acetic acid, 70/29.5/0.5, v/v/v) at a ratio of 1:5. After the addition of extraction solvent, the tubes were vortexed for 3 min and centrifuged. The supernatants from the centrifuged tubes were combined and filtered through glass wool. The organic solvent was removed by rotary evaporation (Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) under partial vacuum at 30° C. Finally, the water extract was freeze-dried in Lyobeta 15 equipment (Ima-Telstar, Spain) to obtain the cocoa phenolic extracts and these were stored in inert atmosphere with nitrogen before the chromatographic analysis.

The lyophilized phenolic extracts were dissolved in extraction solvent (10 mg/ml) and filtered through 0.45 µm and 0.22 µm nylon filters prior to chromatographic analysis by HPLC and UPLC, respectively. The sample volume injected was 10 µl for HPLC and 2.5 µl for UPLC.

The quantification was performed by using external calibration. The dimers were quantified by using the calibration curve of procyanidin B<sub>2</sub>, and the oligomer procyanidins were tentatively quantified by using the calibration curve of the monomer catechin. The results of the quantification of the catechin, epicatechin and dimer B<sub>2</sub> were expressed as µg of the corresponding standard per gram of phenolic extract. The results were expressed as mg of catechin per gram of phenolic extract. The results for the alkaloids were expressed as mg of the corresponding standard per gram of phenolic extract.

### *2.6. Statistical Analysis*

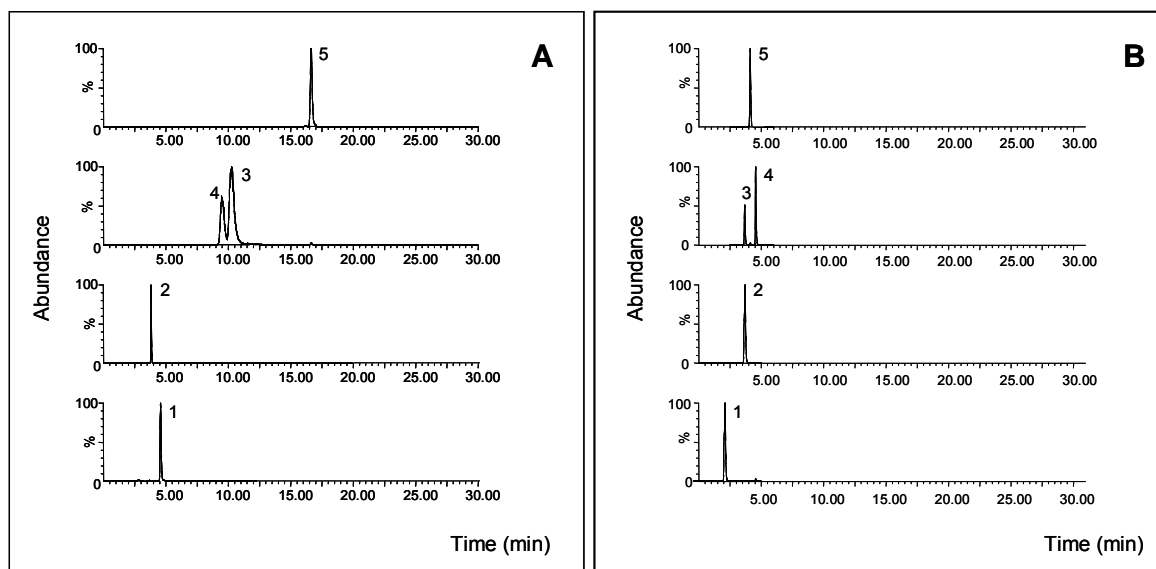
The data from the comparative quantification of procyanidins and alkaloids in phenolic cocoa extracts by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS were expressed as mean ± standard deviation. The data were analyzed by a one-way ANOVA test to assess differences between quantification by HPLC and UPLC. A significant difference was considered at level of  $p < 0.05$ . All of the statistical analyses were carried out using STATGRAPHICS Plus 5.1.

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Comparative analysis by HPLC and UPLC of the procyanidins and the alkaloids in standard solutions*

During the first part of the study, the analysis times using HPLC and UPLC were compared. The initial analyses were carried out with HPLC in the normal phase as the most widely used method for analyzing the cocoa phenols in the literature (Adamson et al., 1999; Hammerstone et al., 1999; Lazarus et al., 1999; Natsume et al., 2000) using MS/MS detection. A silica column was used as the stationary phase and dichloromethane, methanol, water and acetic acid as the mobile phase.

Figure 1A shows the extracted ion chromatograms for the analysis of the five compounds studied in standard solutions by HPLC-MS/MS in the normal phase. The concentration of all the analytes was 10  $\mu\text{g/ml}$ . These were eluted in order of increasing polarity and increasing size. Thus, caffeine (peak 2) eluted before 5 min, whereas dimer B<sub>2</sub> (peak 5) showed the longest retention time at 17 min.



**Figure 1.** Extracted ion chromatograms for the analysis of the phenolic compounds by HPLC-MS/MS (A) and UPLC-MS/MS (B) in the standard solution. The concentration of the analytes was 10  $\mu\text{g/ml}$ . The peak designation was (1) theobromine, (2) caffeine, (3) catechin, (4) epicatechin, and (5) dimer B<sub>2</sub>.

UPLC-MS/MS was applied with the aim of decreasing the analysis time. To date, silica columns for UPLC in normal phase have still to be developed, and therefore the studied compounds were resolved in the reversed or “aqueous normal” phase. Three columns were investigated for this purpose. These were the BEH C<sub>18</sub>, the BEH HILIC and the new high strength silica (HSS) T3 (Waters, Milford MA, USA). The first, the BEH C<sub>18</sub>, is the universal column choice for most UPLC separations. The second, the BEH HILIC, uses a polar stationary phase and the mobile phase contains high concentrations of apolar solvents and low concentrations of polar aqueous solvents, similar to those in the reversed-phase ([www.waters.es](http://www.waters.es)). This column is designed to retain and separate very basic polar compounds. Successful results were reported for diol and HILIC columns for the analysis of procyanidins in cocoa (Kelm et al., 2006) and apple (Yanagida et al., 2007) samples. Finally, the HSS T3 column, 100% silica particle, is used to retain and separate smaller, more water-soluble polar organic compounds than the BEH C<sub>18</sub> and HILIC columns. As a result of the application of the three columns in this study to the analysis of the standard solutions of

procyanidins and alkaloids (data not shown), the HSS T3 column was chosen to provide higher retention for the polar analytes, such as oligomers.

The mobile phase was 0.2 % acetic acid as eluent A, acid acetic was used to improve the peak shape, and acetonitrile as eluent B. Acetonitrile was selected since, like dichloromethane, it is a non-polar aprotic solvent. Both solvents have shown similar relative properties for hydrogen-bonding and dipole interaction (Snyder, 1978). Next, by using a calculator software tool (version 1.1.1), the gradient HPLC method was converted to the gradient UPLC method. Figure 1B shows the extracted ion chromatograms for the analyses of five compounds in standard solutions studied by UPLC-MS/MS. The concentration for all the analytes was 10 µg/ml. In this case, the analytes were eluted according to their apolarity and increasing size.

By comparing the chromatograms obtained from analyzing the compounds by HPLC-MS/MS (Fig. 1A) and UPLC-MS/MS (Fig. 1B) a shorter analysis time was observed for the latter. For instance, the retention time of catechin was 10.99 min in HPLC, but only 3.56 min in UPLC.

The studied standards compounds (Table 2) were eluted in less than 5 min by the application of UPLC method. However, the elution gradient of this method was carried out for 12.5 min because the aim of this work was also focused on the determination and characterization of the oligomers in cocoa samples.

Apart from the analysis time, other differences between the two methodologies were observed. A different elution order of the analytes was shown as a consequence of the different partitioning of the analytes between the two stationary and mobile phases. For instance, caffeine eluted before theobromine in HPLC-MS/MS (normal phase) (Fig. 1A), while it eluted after theobromine in UPLC-MS/MS (reversed-phase) (Fig. 1B). The dimer B<sub>2</sub> eluted after the monomer epicatechin in HPLC-MS/MS, and this compound eluted between the monomers catechin and epicatechin in UPLC-MS/MS. The elution order of the monomers catechin and epicatechin was also different in the two methodologies.

Another difference between the chromatograms is the resolution of the monomers catechin and epicatechin. In the UPLC methodology (reversed phase), the two monomers were baseline-separated but, in contrast, these compounds were not completely separated in the HPLC methodology (normal phase). Other difference between the two methodologies is the coelution of catechin and caffeine in UPLC-MS/MS, which was not a problematic because these compounds have different molecular weight and these are ionized in different modes, catechin in the negative mode and caffeine in the positive mode.

### 3.2. Quality parameters

The quality parameters of the two methodologies, HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, for the analysis of the phenolic compounds in standard solutions are shown in Table 2. The linear response of procyanidins was in the concentration range of 0.01 to 50  $\mu\text{g/ml}$  and 0.01 to 40  $\mu\text{g/ml}$  for HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, respectively. The linear response of the alkaloids was in the concentration range of 0.002 to 50  $\mu\text{g/ml}$  and 0.002 to 20  $\mu\text{g/ml}$  for HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, respectively. The correlation coefficients ( $R$ ) of the calibration curves were higher than 0.996 for all the compounds in both methods.

The reproducibility, expressed by relative standard deviations (RSDs) of the concentration, was studied at two concentrations, 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ , on three different days. As can also be seen in Table 2, the RSDs rose as the level of concentration decreased, and the RSDs in the UPLC-MS/MS were lower than the RSDs in the HPLC-MS/MS for both concentrations studied, except for the epicatechin standard. For instance, these values were below 3.2 % and 1.9 % for the analysis of the compounds studied by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS respectively at a concentration level of 10  $\mu\text{g/ml}$ .

**Table 2.** Retention time, linearity, calibration curves, reproducibility, LODs and LOQs for the analysis of the studied compounds by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS in standard solutions.

Methodology	Compound	RT (min)	Linearity ( $\mu\text{g/ml}$ )	Calibration curve*	RSD% ( $n=3$ )		LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )
					10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$		
HPLC-MS/MS	Catechin	10.99	0.05-50	$y = 4438.7x + 3149.3$	3.0	3.6	0.02	0.08
	Epicatechin	10.27	0.1-50	$y = 4713.1x + 6233.1$	0.6	1.8	0.05	0.2
	Dimer B <sub>2</sub>	16.54	0.01-20	$y = 8204.5x - 895.5$	3.7	4.7	0.009	0.02
	Caffeine	3.77	0.002-50	$y = 48502x - 12900$	2.8	3.5	0.001	0.003
	Theobromine	4.56	0.05-50	$y = 20823x - 2974.5$	3.2	4.3	0.03	0.1
	UPLC-MS/MS	Catechin	3.68	0.02-40	$y = 1129.5x + 336.4$	1.9	2.6	0.01
Epicatechin	4.56	0.05-20	$y = 1871.8x + 404.7$	1.5	1.9	0.03	0.09	
Dimer B <sub>2</sub>	4.12	0.01-20	$y = 2763.2x - 217.0$	1.4	3.0	0.007	0.01	
Caffeine	3.69	0.002-20	$y = 39062x + 6351.7$	1.9	3.0	0.001	0.003	
Theobromine	2.13	0.05-20	$y = 6592.5x + 756.0$	0.7	2.2	0.03	0.1	

\*Calibration curve:  $y=mx+b$  where  $y$  is the integrated peak area and  $x$  the concentration in  $\mu\text{g/ml}$ .

RT: retention time

The LODs for the procyanidin analysis were in the 0.009-0.02  $\mu\text{g/ml}$  range for HPLC-MS/MS and 0.007-0.01  $\mu\text{g/ml}$  for UPLC-MS/MS. In reference to the analysis of alkaloids, the LODs were similar, being between 0.001 and 0.03  $\mu\text{g/ml}$  for the analysis of caffeine and theobromine. The LOQs for the analysis of procyanidins were in the 0.02-0.2  $\mu\text{g/ml}$  range for HPLC-MS/MS and 0.01-0.09  $\mu\text{g/ml}$  for UPLC-MS/MS, respectively. The LOQs were also similar, being between 0.003 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  for the analysis of caffeine and theobromine. The LODs and LOQs were slightly lower with the UPLC-MS/MS methodology than the HPLC-MS/MS for the procyanidin standards (catechin,

epicatechin and dimer B<sub>2</sub>). Although the HPLC-MS/MS methodology was less sensitive, the calibration curves showed higher slopes than with UPLC-MS/MS.

The LOD and LOQ values obtained by UPLC-MS/MS in this study, which ranged between 0.03 and 10 µg/ml. were similar to, or lower than, those reported in the literature for the analysis of these compounds by CE-UV (Gotti et al., 2006), HPLC-MS (Adamson et al., 1999), and HPLC-UV (Brunetto et al., 2007).

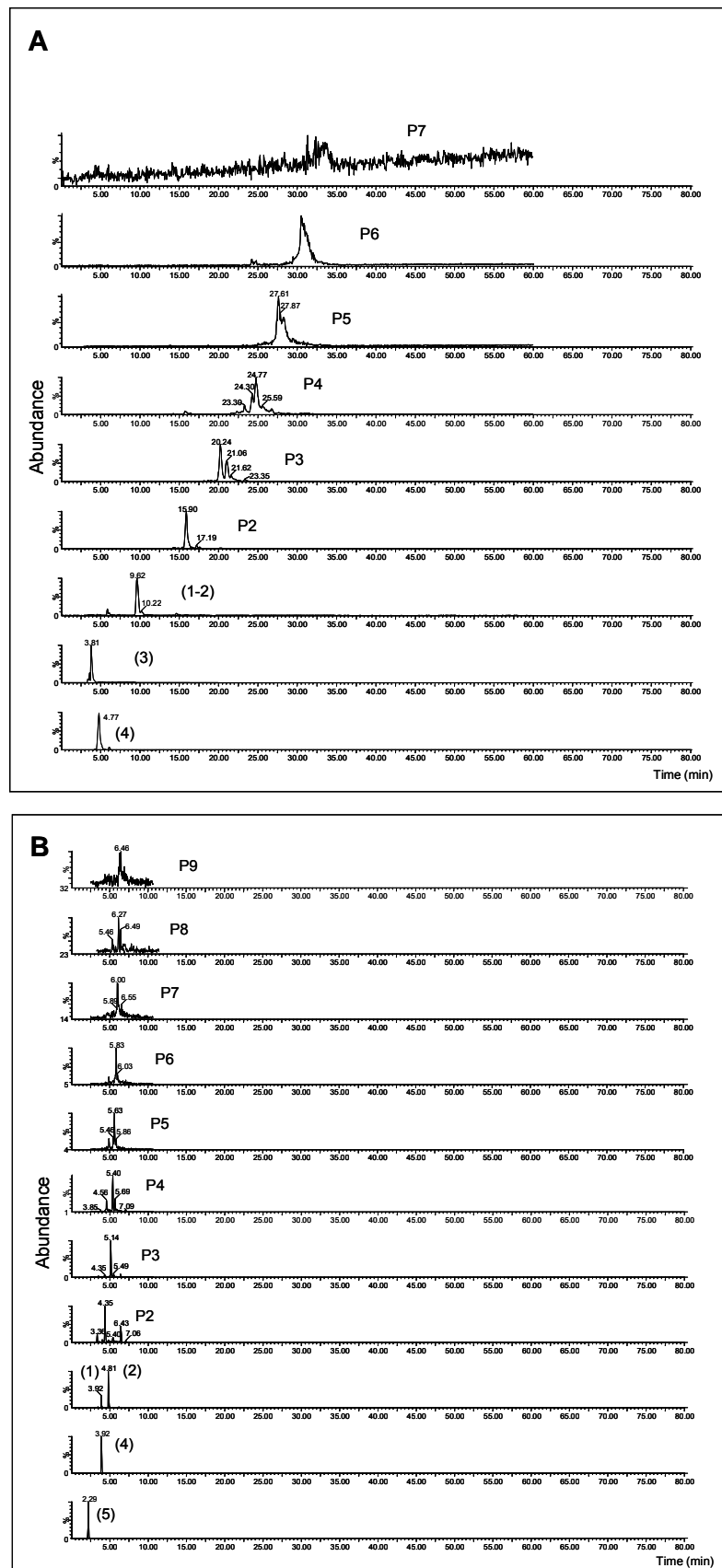
### *3.3. Application of the chromatographic methods*

The HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS chromatographic methods were applied to quantify procyanidins and alkaloids in samples of cocoa nibs. The phenolic extracts were prepared as described in section 2.5 of Material and Methods.

Before the analysis of the phenolic extract, the matrix effect was evaluated. Matrix effects result from co-eluting matrix components that compete for ionization capacity, and this effect is observed by an decrease or increase in the analyte signal in a matrix extract with the same analyte present in the organic solvent, respectively (Choi et al., 2001). In our study, signal suppression was evaluated by comparing the detector response of the compounds studied spiked in organic solvent (solvent extraction) with those from the cocoa extract, at two different concentrations, 20 and 0.2 µg/ml. Either a positive or negative effect was observed, which is an increase or decrease in the detector response, respectively, lower than 17 % (data not shown). This effect could be considered small and probably has no a significant effect on signal suppression.

Apart from quantifying the monomers and dimers of procyanidins, attention was also paid to the oligomers with a high degree of polymerization. For this purpose, the SRM conditions, cone voltage and collision energy of these compounds should be investigated. However, there are no commercial standards of polymeric procyanidins available. With the aim of overcoming this, the MS/MS parameters were optimized by analyzing a phenolic extract of the cocoa nibs at a concentration of 10 mg/ml by UPLC-MS/MS. The results are shown in Table 3 and these were the same as those obtained by HPLC-MS/MS.

Figs. 2A and 2B show the extracted ion chromatograms for the analysis of procyanidins (from monomers to oligomers) and alkaloids in cocoa nib phenolic extracts by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, respectively.



**Figure 2.** Extracted ion chromatograms for the analysis of procyanidins and the alkaloids by HPLC/MS-MS (A) and UPLC-MS/MS (B) in the phenolic extract of cocoa nib at a concentration of 10 mg/ml.

As can be seen, it is possible to identify procyanidins from monomers to nonamers by UPLC-MS/MS (Fig. 2B). In contrast, when the same sample was analyzed by HPLC-MS/MS, this method was only able to identify up to hexamers. This fact could be explained by the higher peak efficiency of the UPLC-MS/MS methodology. Additionally, the peak broadness of certain oligomers was solely induced by the number of isomers, which increased exponentially with the degree of polymerization.

**Table 3.** Optimized SRM conditions for the analysis of procyanidin oligomers by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS.

Compound	[M-H]	SRM <sub>1</sub> (quantification)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)	SRM <sub>2</sub> (confirmation)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)
ESI (-)							
Trimer	[M-H]	865 > 577	60	20	865 > 695	60	25
Tetramer	[M-H]	1153 > 865	70	20	1153 > 575	70	30
Pentamer	[M-H]	1441 > 1028	80	25	1441 > 1151	80	30
Hexamer	[M-H]	1729 > 1153	80	30	1729 > 863	80	30
Heptamer	[M-2H] <sup>-2/2</sup>	1008 > 865	60	20	1008 > 575	60	20
Octamer	[M-2H] <sup>-2/2</sup>	1152 > 875	65	25	1152 > 983	65	25
Nonamer	[M-2H] <sup>-2/2</sup>	1296 > 577	50	30	1296 > 1152	50	30

The analysis time was another remarkable difference between the two chromatographic methods. The total analysis time by HPLC for the complete elution of the procyanidin oligomers with a high degree of polymerization, cleaning the column with 100% of methanol, and reequilibrating the column to return to the initial analysis conditions was 80 min. The long analysis time is an important limitation when a high number of samples have to be analyzed. Thus, the UPLC methodology reduced the run time by a factor of around seven in comparison with the HPLC methodology, precisely 12.50 min as against 80 min (Figs. 2A and 2B).

The last part of the study was focused on the comparative quantification of procyanidins and alkaloids by the two chromatographic methods applied to cocoa nib phenolic extract (Table 4). The average concentrations of monomers (catechin and epicatechin), and the alkaloids were expressed as mg of the respective standard per g of phenolic extract. The several identified dimers were expressed as mg of dimer B<sub>2</sub> per g of phenolic extract. The oligomers were tentatively quantified using the calibration curve of catechin.

The main differences in the quantification by the two chromatographic methods were based on the possibility for individual quantification of catechin and epicatechin by UPLC, which was not possible by HPLC as a consequence of the coelution of these compounds. In addition, UPLC allowed the detection and quantification of oligomers from trimer to nonamers, whereas with HPLC, it was only possible to quantify up to hexamers. Thus, when the extract was analyzed by UPLC, the concentration of procyanidins was significant higher ( $p < 0.05$ ) that when the analysis was done by



HPLC. As expected base on data from Table 2, there were no significant differences between the two chromatographic methods when quantifying alkaloids.

**Table 4.** Comparative quantification by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS of procyanidins, expressed as mg catechin/g of phenolic extract, and alkaloids, expressed as mg theobromine or caffeine/ g of phenolic extract, respectively.

Procyanidin*	HPLC-MS/MS**	UPLC-MS/MS
Catechin	5.8 ± 0. <sup>a</sup>	1.9 ± 0.02 <sup>b</sup>
Epicatechin		4.0 ± 0.07 <sup>b</sup>
Dimer	6.5 ± 0.22 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.40 <sup>b</sup>
Trimer	3.1 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.04 <sup>b</sup>
Tetramer	0.60 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.08 <sup>b</sup>
Pentamer	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.00 <sup>b</sup>
Hexamer	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.00 <sup>b</sup>
Heptamer	n.d.	0.03 ± 0.00
Octamer	n.d.	0.03 ± 0.00
Nonamer	n.d.	0.01 ± 0.00
Total Procyanidins	16.2 ± 0.36 <sup>a</sup>	19.3 ± 0.23 <sup>b</sup>
<b>Alcaloid*</b>		
Theobromine	19.4 ± 0.52 <sup>a</sup>	18.5 ± 0.38 <sup>a</sup>
Caffeine	0.09 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.07 <sup>a</sup>

\*Different letters in the same row indicate significative differences ( $p < 0.05$ ) between HPLC and UPLC quantification.

\*\*The quantification of catechin and epicatechin by HPLC-MS/MS is expressed by the sum of both compounds.

n.d.: not detected

To sum up, the current study develops a rapid and sensitive method for analyzing procyanidins and alkaloids in cocoa nibs based on UPLC-MS/MS. By determining procyanidins (from monomers to nonamers) and alkaloids, theobromine and caffeine in less than 12.5 minutes, UPLC chromatography can have a major role in improving productivity for the routine analysis of compounds in the field of trace analysis. In addition to simplicity and speed, the higher separation efficiency of the LC system allows catechin and epicatechin to be quantified separately, whereas the chromatographic coelution of these two compounds by HPLC normal phase analysis required their quantification as catechin + epicatechin. Additionally, the efficiency of the peaks by UPLC allowed the procyanidin nonamers to be identified in contrast with the hexamers by HPLC-MS/MS. In addition, the UPLC methodology allowed a reduction of the run time by a factor of around seven in comparison with the HPLC methodology, thus reducing the total analysis time for a cocoa phenolic extract from 80 min by HPLC to 12.50 min by UPLC, including cleaning the column with 100% of methanol, and reequilibrating the column to return to the initial conditions. Therefore, the UPLC system represents a faster and more cost-effective method for analyzing the cocoa phenols than the HPLC system.

## REFERENCES

- Adamson, G.E., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Prior, R.L., Cao, G., Jacobs, P.H., Kremens, B.G., Hammerstone, J.F., Rucker, R.B., Ritter, K.A., Schmitz, H.H. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *47*, 4184-4188.
- Brunetto, M.R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G., Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, *100*, 459-467.
- Buchelli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Lavoie, M., McCarthy, J. (2001). Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 5046-5051.
- Choi, B.K., Hercules, D.M., Gusev, A.I. (2001). Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *Journal of Chromatography A*, *907*, 337-342.
- Cooper, K.A., Giménez, E.C., Alvarez, D.J., Nagy, K., Donovan, J.L., Williamson, G. (2007). Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *55*, 2841-2847.
- Counet, C., Collin, S. (2003). Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *51*, 6816-6822.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavour contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*, 6243-6249.
- Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Cavrini, V. (2006). Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1112*, 345-352.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R.L. (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*, 4852-4860.

- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R., Schmitz, H.H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using High-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 490-496.
- Kelm, M.A., Johnson, J.C., Robbins, R.J., Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H. (2006). High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 1571-1576.
- Lazarus, S.A., Adamson, G.E., Hammerstone, J. F. Schmitz, H.H. (1999). High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of procyanidins in food and beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3693-3701.
- Lee, K. W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7292-7295.
- Luna, F., Crouzillat, D., Cirou, L., Buchelli, P. (2002). Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3527-3532.
- Naik, J.P. (2001). Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3579-3583.
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., Yoshiba, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 2581-2587.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumon, D.O., Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L) clones in terms of their phenolic compounds and anthocyanins content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 612-619.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100, 1523-1530.
- Porter, L.J., Ma, Z., Chant, B.G. (1991). Cocoa procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, 30, 1657-1663.
- Rabaneda, F.S., Jáuregui, O., Casals, I., Lacueva, C.A., Pulido, M.I., Raventós, R.L. (2003). Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35-42.

- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Cano, F.P., Permanyer, J., Pulido, M.I., Castell, M. (2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 8506-8511.
- Rigaud, J., Escribano-Bailon, M., Prieur, C., Bouquet, J.M., Cheynier, V. (1993). Normal-phase high-performance liquid chromatography separation of procyanidins from cocoa beans and grape seeds. *Journal of Chromatography*, 654, 255-260.
- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C. Kelm, M. (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 304S-12S.
- Snyder, L.R. (1978). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography Sciences*, 16, 223-234.
- Summa, C., Raposo, F.C., McCourt, J., Lo Scalzo, R., Wagner, K.H., Elmadfa, I., Anklam, E. (2006). Effect of roasting on the radical scavenging of cocoa beans. *European Food Research Technology*, 222, 368-375.
- Vinson, J.A., Proch, J., Bose, P., Mucheler, S., Taffera, P., Shuta, N., Agbor, G.A. (2006). Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8071-8076.
- Yagagida, A., Murao, H., Kameyama, M.O., Yamakawa, Y., Shoji, A., Tagashira, M., Kanda, T., Shindo, H., Shibusawa, Y. (2007). Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143, 153-161.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.
- Wollgast, J., Pallaroni, L., Agazzi, M.E., Anklam, E. (2001). Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 926, 211-220.
- Waters Cromatografia, S. A. Chromatography columns information. Retrieved November, 2007 from <http://www.waters.es>.

## Capítol 2

**Rapid Determination of Phenolic Compounds  
and Alkaloids of Carob Flour by Improved  
Liquid Chromatography Tandem Mass  
Spectrometry**

**Journal Agricultural of Food Chemistry  
2009, 57, 7239-7244**



## Rapid Determination of Phenolic Compounds and Alkaloids of Carob Flour by Improved Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

NÀDIA ORTEGA,<sup>†,‡</sup> ALBA MACIÀ,<sup>†</sup> MARIA-PAZ ROMERO,<sup>†</sup> ESTHER TRULLOLS,<sup>‡</sup>  
JOSE-RAMÓN MORELLO,<sup>‡</sup> NEUS ANGLÈS,<sup>‡</sup> AND MARIA-JOSE MOTILVA<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Food Technology Department, XaRTA-UTPV, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain, and <sup>‡</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Spain

An improved chromatographic method was developed using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to identify and quantify phenolic compounds and alkaloids, theobromine and caffeine, in carob flour samples. The developed method has been validated in terms of speed, sensitivity, selectivity, peak efficiency, linearity, reproducibility, limits of detection, and limits of quantification. The chromatographic method allows the identification and quantification of 20 phenolic compounds, that is, phenolic acids, flavonoids, and their aglycone and glucoside forms, together with the determination of the alkaloids, caffeine and theobromine, at low concentration levels all in a short analysis time of less than 20 min.

**KEYWORDS:** Phenols; alkaloids; carob flour; ultra performance liquid chromatography; tandem MS

### INTRODUCTION

Carob (*Ceratonia siliqua* L.) is a typical tree in the Mediterranean area, whose pods and seeds are harvested mainly for use as ingredients in the food industry. The commercial value of the carob has been mainly attributed to the seeds, which have several applications in the food and cosmetic industries. As a byproduct, the pods have usually been used for animal feed, given their high content of carbohydrates and dietary fiber and their low fat content (1, 2). Furthermore, recent studies have attributed an antioxidant capacity to the carob pod due to the presence of polyphenols, principally condensed tannins (3, 4).

The process of producing carob flour starts by deseeding carob pods to yield the kibbles. These kibbles are first ground to different sizes and then roasted. Finally, the samples are milled into a fine powder called flour. The time and temperature conditions during the roasting process could affect the stability of the polyphenols by reducing the hydrolyzable tannins into an increased content of simple phenolic compounds. However, there is still little information about the characterization of the phenol compounds, such as flavonoids and phenolic acids, after processing the carob pods.

The possibility of obtaining carob flour by roasting and milling the pods has increased its relevance as a food ingredient. For example, several applications have been assigned to carob flour, that is, as in the preparation of cocoa substitute drinks and as a sweetener for children (2, 5, 6). Moreover, carob flour has also attracted interest due to its high fiber content (7). Because of the increasing demand for healthy food products, recent studies have also used carob flour to enrich functional products, such as biscuits (8, 9).

With regard to the alkaloids, caffeine and theobromine, they have been found to be absent from the carob pod and derivatives (10), which is important for its use as a cocoa substitute in the formulation of infant foods. Nevertheless, as carob flour could be proposed as a cocoa substitute, it should guarantee the absence or a minor content of caffeine and theobromine. In this sense, the use of improved chromatographic techniques and sensitive detector systems is necessary to detect and confirm the absence or presence of these alkaloids in trace levels in the carob flour samples.

There is very limited data about the chromatography methods performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) for determining polyphenols in carob derivatives, such as carob flour, and these have been found to require a long analysis time, ranging from 40 to 102 min (7, 11, 12). Because of the complexity of the carob matrix and the need to determine a wide range of phenols and alkaloids in the carob samples at low concentration levels, the development of an efficient, fast, and reliable analytical method is quite a challenge. As efficiency and speed of analysis have become of great importance in many applications of liquid chromatography, especially in the area of functional food formulation, it is important to increase throughputs and reduce analysis costs. In these sense, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) could play a significant role. UPLC uses analytical columns packed with 1.7  $\mu\text{m}$  particles, which offers the advantages of increasing speed and improving sensitivity, selectivity, and specificity as compared to conventional HPLC. The higher efficiency of small particles enables shorter columns to be used, reducing analysis time and solvent consumption.

Recent studies have used UPLC to improve the phenol analysis in beverages, with the detection of 17 phenolic compounds in 9.5 min (13). Moreover, coupling UPLC to tandem mass spectrometry (MS/MS) allows a better identification and confirmation of

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 973 702817. Fax: +34 973 702596. E-mail: motilva@tecal.udl.cat.

some polyphenol compounds, as compared to HPLC, for example, the determination of procyanidins up to nonamers in different cocoa sources in less than 12.5 min (14). Furthermore, this technique has also been used to analyze marine toxins (15) and pesticides residues (16, 17) in foods in response to the demand to monitor a wide range of compounds in a single analysis, to determine analytes at lower concentration levels in a shorter analysis time, and to avoid the use of environmentally hazardous solvents.

Taking into account that carob flour could be used as a natural ingredient in the formulation of new functional foods, based on its high content in fiber and low levels of fat, as well as the low content of alkaloids (caffeine and theobromine) (10), the aim of this study was focused on developing a rapid and sensitive methodology based on UPLC-MS/MS to determine the different classes of phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonoids, and alkaloids (caffeine and theobromine). The quality parameters of the developed method [linearity, calibration curve, reproducibility, detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs)] were studied. Then, the method was applied to determine polyphenols in carob flour samples.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Reagents.** Caffeine, theobromine, syringic acid, naringenin, and myricetin were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Kaempferol came from Fluka Co. (Buchs, Switzerland). Ferulic acid, *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, cinamic acid, quercetin, apigenin, genistein, and luteolin were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Gallic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

For each phenol, a stock standard solution of 1 mg/mL was prepared in methanol. Then, standard working solutions, containing a mixture of all standard phenols at increasing concentrations, were prepared weekly by diluting the stock standard solution in methanol. These solutions were stored in dark-glass flasks at 4 °C.

**Chromatographic Analysis.** UPLC. The chromatographic analyses were performed using a Waters Acquity Ultra-Performance liquid chromatography system (Waters, Milford, MA), equipped with a binary pump system (Waters). The column used was a 100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm, Acquity High Strength Silica (HSS) T3 from Waters. The mobile phase was Milli-Q water/acetic acid (0.2%), as solvent A, and acetonitrile, as solvent B. The gradient elution was as follows: 0–2 min, 5% B isocratic; 2–6 min, 5–18% B; 6–7 min, 18–21% B; 7–10 min, 21% B isocratic; 10–12 min, 21–21% B; 12–16 min, 21–40% B; 16–16.1 min, 40–100% B; 16.1–18 min, 100% B isocratic; 18–18.1 min, 100–5% B; 18.1–20 min, 5% B isocratic. The flow rate was 0.4 mL/min, and the temperature was set at 30 °C.

The UPLC was coupled to an Acquity UPLC PDA detector and a TQD mass spectrometer (Waters). The wavelengths in the PDA detector were set at 278 and 339 nm.

**MS/MS.** The tandem MS analyses were carried out on a TQD mass spectrometer (Waters) equipped with a Z-spray electrospray (ESI) interface. The analyses were done in a single run, in negative mode for all of the phenolic compounds and in positive mode for the alkaloids, and the data were acquired by selected reaction monitoring (SRM). The ionization source working conditions were as follows: capillary voltage, 3 kV; source temperature, 150 °C; cone gas flow rate, 80 L/h; desolvation gas flow rate, 800 L/h; and desolvation temperature, 400 °C. Nitrogen (>99% purity) and argon (99% purity) were used as nebulizing and collision gases, respectively. Cone voltages and collision energies were optimized by infusion of a standard solution of 10 mg/L of each standard in a mixture of acetonitrile:water (50:50, v/v) at a flow rate of 10 μL/min. First, full-scan mode was acquired to select the most abundant *m/z* value, and the cone voltage was optimized. In all cases,  $[M - H]^-$  or  $[M - H]^+$  ions were found to be the most abundant. These ions were selected as the precursor ions, and afterward, the collision energies were studied to find the most abundant product ions. Therefore, the most sensitive transition for each phenol was selected for quantification purposes and the second one for confirmation (Supporting Information). For cinamic acid, no second transition SRM was available for its confirmation, and to consider only one ion is a problem for its correct identification according to EU criteria. In this work, one transition and LC retention time were the criteria applied

for the purposes of identifying and quantifying this phenolic acid. The dwell time established for each transition was 30 ms. Data acquisition was carried out with the MassLynx v 4.1 software.

**Quality Parameters.** The quality parameters of the developed method were studied by analyzing a serial dilution of the standard solutions, which contained the phenolic compounds and the two alkaloids, by UPLC-MS/MS. The parameters considered were linearity, calibration curve, reproducibility, LOD, and LOQ.

The calibration curves (based on the integrated peak area) were calculated using five points at different concentrations (from 0.0005 to 62.5 μg/mL), and each standard solution was injected three times. The reproducibility, expressed by relative standard deviations (RSDs) of the concentration, was studied at two concentration levels, 1 and 10 μg/mL, on three different days and with one injection per day (interday). The LODs and LOQs were experimentally calculated using signal-to-noise criteria of 3 and 10, respectively.

**Carob Flour Phenol Extraction.** Commercial carob flour sample was kindly provided by La Morella Nuts, S. A. (Reus, Catalonia, Spain). To obtain the flour, carob pods were crushed mechanically using a kibbler, which provided two important products: the carob kernels (10% of the pod's weight) and the kibbles (the remaining pulp, 90% of the pod's weight). The kibbles were roasted (between 150 and 250 °C) and milled to obtain a fine powder, the carob powder, or carob flour.

The extraction of phenolic compounds and alkaloids, caffeine and theobromine, from the carob flour was similar to the method reported in our previous work for cocoa sources (14). Briefly, the sample was defatted once for 20 min at a ratio of 1:5 with hexane in an orbital shaker (Selecta, Barcelona, Spain) at 200 rpm and subsequently centrifuged for 15 min at 15000g. The obtained residue (defatted carob flour) was extracted four times with a 70% acetone–aqueous solvent mixture at a ratio of 1:5. After the addition of the extraction solvent mixture, the sample was extracted by Polytron (Branson, Danbury, CT) for 5 min and then centrifuged for 8 min at 12500g at 4 °C. The supernatants (four) were combined, and the organic solvent (acetone) was removed by rotary evaporation (Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) under a partial vacuum at 30 °C. Finally, the phenolic extract was freeze-dried (BMG Labtech, Offenburg, Germany) and stored at –80 °C in an N<sub>2</sub> atmosphere.

**Identification and Quantification of Carob Flour Phenolic Fraction.** The lyophilized phenolic extract was dissolved in 70% acetone aqueous at a concentration of 10 mg/mL and filtered through 0.22 μm nylon filters before the chromatographic analysis by UPLC, as described before. The sample volume injected was 2.5 μL.

Apart from the phenolic compounds included in the validation method (flavonoids, phenolic acids, and alkaloids), the application of the method to analyze the carob flour phenolic extract revealed the presence of methyl gallate and flavonoids in their glucoside form. To identify and quantify them, analyses in MS (full-scan mode) and MS/MS (based on product ion scan mode) from carob flour phenolic extract were performed. Thus, two transitions were obtained.

The quantification of the different phenols was performed by using external calibration. The results of the quantification of the phenolic acids, the aglycone flavonoids, and the alkaloids (caffeine and theobromine) were expressed as μg standard per g of carob flour. Methyl gallate was quantified as gallic acid. All of the flavonoid glucosides were quantified as μg of the corresponding aglycone. The results of the quantification were expressed as μg per g of carob flour. All data were expressed as means ± standard deviations.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Optimization of the Chromatographic Method.** Several studies have been focused on the characterization of carob derivatives, like pods, kibbles, and fiber fraction (7, 11, 12), but there are a few reports based on the identification and quantification of phenol compounds in carob flour. The quantification of phenols in carob products has shown that gallic acid is the main phenolic acid (11), while myricetin, quercetin, and kaempferol and their glucoside forms were the major compounds quantified from the flavonoids group (11). Thus, two different phenolic groups (phenolic acids and flavonoids) were selected in the present study to develop and validate the chromatographic method. Because of the interest in



Table 1. Retention Time (RT), Linearity, Calibration Curve, RSD (%) in Concentration, LOD, and LOQ for the Analysis of the Studied Compounds by UPLC-MS/MS in Standard Solutions

compound	RT <sup>a</sup> (min)	linearity ( $\mu\text{g/mL}$ )	calibration curve <sup>b</sup>	% RSD ( $n = 3$ )		LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
				10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$		
theobromine	1.78	0.05–20	$y = 6592.5x + 756.0$	0.9	1.9 <sup>c</sup>	0.03	0.09
caffeine	2.69	0.002–20	$y = 39062x + 6351.7$	1.9	2.9	0.001	0.003
gallic acid	1.47	0.25–12.5	$y = 2157.8x - 616.9$	1.0	1.8	0.1	0.7
syringic acid	3.14	0.05–10	$y = 1255.5x + 105.2$	2.1	1.4	0.03	0.09
ferulic acid	4.84	0.04–10	$y = 4437.8x + 153.4$	1.0	0.6	0.02	0.05
<i>o</i> -coumaric acid	7.16	0.04–50	$y = 6424.1x + 1964.1$	3.0	2.4	0.02	0.06
<i>p</i> -coumaric acid	4.14	0.04–10	$y = 7522.1x + 1045.2$	1.1	1.6 <sup>c</sup>	0.02	0.06
myricetin	8.57	0.6–12.5	$y = 448.1x - 179.4$	2.9	5.3	0.3	1.0
cinamic acid	12.35	0.025–62.5	$y = 2848.7x + 2124.4$	1.2	2.5	0.015	0.05
quercetin	13.51	0.1–10	$y = 3141.7x - 463.3$	2.9	3.6 <sup>c</sup>	0.04	0.15
luteolin	13.69	0.004–50	$y = 4409.1x + 2851.1$	2.7	2.5	0.002	0.007
naringenin	15.24	0.0005–50	$y = 7947.9x + 3861.8$	2.0	1.0	0.0003	0.0010
genistein	15.41	0.005–62.5	$y = 1143.9x + 1318.5$	2.5	3.9	0.003	0.010
apigenin	15.52	0.003–5	$y = 14368x + 1005.1$	1.8	0.3 <sup>d</sup>	0.001	0.005
kaempferol	15.78	0.2–10	$y = 476.8x - 69.3$	1.0	1.5 <sup>c</sup>	0.1	0.4

<sup>a</sup> RT, retention time. <sup>b</sup> Calibration curve:  $y = mx + b$ , where  $y$  is the integrated peak area and  $x$  is the concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . <sup>c</sup> A 2  $\mu\text{g/mL}$  amount was used to calculate the % RSD. <sup>d</sup> A 0.5  $\mu\text{g/mL}$  amount was used to calculate the % RSD.

carob flours for use as a cocoa substitute, caffeine and theobromine, two common alkaloids in cocoa derivatives, were also included.

The initial experiments were based on the chromatographic conditions described by Owen et al. (7). First, the HPLC elution gradient reported by these authors was converted to UPLC elution gradient by using the Acquity UPLC Columns calculator (Waters). Two UPLC columns were tested for the stationary phase, the conventional C<sub>18</sub> and the HSS T3. The flow rate was changed from 1 to 0.4 mL/min to be the optimum in these columns, whose particle size is 1.8  $\mu\text{m}$ . In our study, the solvent B methanol was replaced with acetonitrile because the use of methanol led to pressures higher than the maximum permitted in the equipment (15000 psi). By using the conventional C<sub>18</sub> column, some analytes coeluted at the end of the LC gradient, such as the flavonoids. In contrast, the resolution of these phenolic compounds was improved when the HSS T3 column was used. This column has the advantage that it retains the polar compounds better than the conventional C<sub>18</sub>, thus improving the resolution of the peaks. Afterward, the elution gradient, obtained in the Acquity UPLC Columns calculator, was slightly modified and optimized to improve the resolution of some peaks of flavonoids using the HSS T3 column. This methodology allows the studied compounds to be analyzed within 20 min.

**Quality Parameters.** Once the UPLC-MS/MS method was developed, its quality parameters, including linearity, reproducibility, LODs, and LOQs, were studied. The results of these quality parameters for the analysis of the studied compounds in standard solutions are shown in Table 1.

For each compound, the linearity range was determined by analyzing different dilution solutions. The calibration curves were obtained based on the integrated peak area, and these were linear over the range of study. The determination coefficients ( $R^2$ ) of these calibration curves were higher than 0.995 for all of the compounds.

The reproducibility, expressed by % RSDs of the concentration, was studied at two concentration levels, namely, 10 and 1  $\mu\text{g/mL}$ , except for theobromine, *p*-coumaric acid, quercetin, and kaempferol, which were studied at 2  $\mu\text{g/mL}$ , and for apigenin at 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . As Table 1 shows, good RSDs values were achieved in all of the compounds studied, ranging from 0.9 to 3 for 10  $\mu\text{g/mL}$  and from 0.6 to 5.3 for 1  $\mu\text{g/mL}$ .

The LODs ranged from 0.0003 to 0.3  $\mu\text{g/mL}$ , and the LOQs ranged from 0.001 to 0.10  $\mu\text{g/mL}$ , depending on the compound.

The obtained results (LODs and LOQs) were lower than those reported in the literature for the analysis of these compounds by HPLC-PDA (12, 18, 19). For example, it should be noted that the LODs and LOQs obtained in our study for phenolic acids and flavonoids were lower than those reported by Muñoz et al. (18) and Kumar et al. (19), respectively, while for theobromine and caffeine, the values obtained in our study were between 25 and 200 times lower than those described by Peng et al. (20).

One significant drawback of ESI mass spectrometer is that the ionization source is highly susceptible to matrix signal suppression effects, in which the coextracted matrix components can alter the signal response, causing either suppression or enhancement, resulting in poor analytical accuracy. Therefore, the detector response obtained from standard solutions and food matrix samples may differ significantly. To evaluate this matrix effect, the detector responses of the phenolic compounds spiked in elution solvent (70% acetone aqueous) were compared to those spiked in phenolic extract of carob flour at different concentrations. Either a positive or a negative effect of less than 20% was observed (data not shown), which meant an increase or decrease in the detector response. To minimize this effect, the extract was diluted 1:2 to prevent it, but this dilution produced a decrease of sensitivity. Then, no dilution of the sample was done because this effect (20%) could be considered small in the complex matrix of carob flour.

**Application of the Developed Method to the Analysis of Carob Flour Phenols.** The UPLC-MS/MS developed method was applied to identify and quantify the phenolic fraction of carob flour. Figure 1 shows the extracted ion chromatograms of the phenolic compounds studied and the two alkaloids, caffeine and theobromine, from the phenolic carob flour extract. Apart from the phenols included in the validation of the chromatographic method, flavonoid glucosides and a gallic acid derivative, such as methyl gallate, were also identified in carob samples, similarly to that previously reported by other authors (7, 11). Some of the flavonoid glucosides are not available as commercial standards. To identify and quantify these in phenolic extracts, full-scan mode and product ion scan experiments were performed. In these experiments, first the precursor ion and the cone voltage were selected, and in the second experiment, the most sensitive product ions and the collision energy were obtained. Thus, two transitions were obtained, and then, these phenolic compounds were analyzed by SRM at the highest selectivity and sensitivity mode in LC-MS/MS. Seven flavonoid glucosides were identified, these

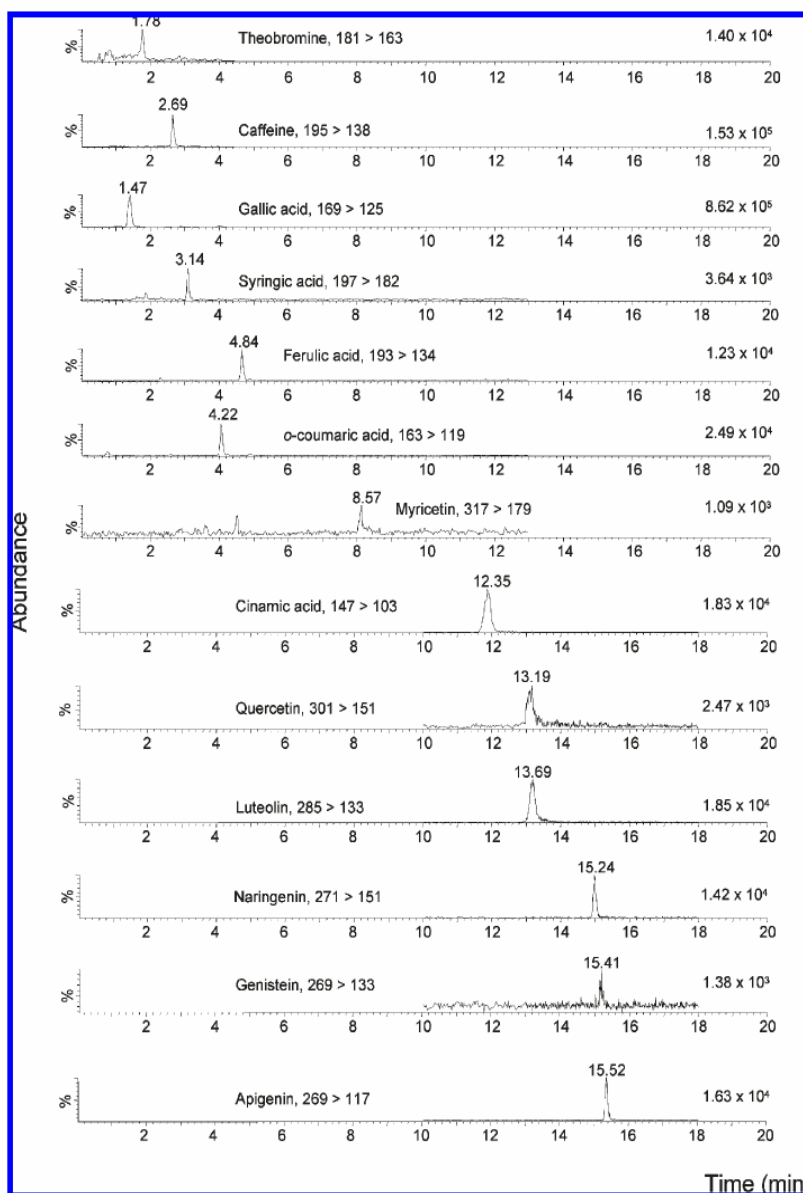


Figure 1. Extracted ion chromatograms of the studied phenolic compounds in carob flour sample. The concentration of the sample was 10 mg/mL.

being apigenin glucoside, kaempferol rhamnoside, quercetin arabinoside, quercetin rhamnoside, quercetin glucoside, myricetin rhamnoside, and myricetin glucoside and methyl gallate as a gallic acid derivative. Figure 2 shows the extracted ion chromatograms of the flavonoid glucosides and the gallic acid derivative (methyl gallate) identified and their MS spectra.

The spectra generated by ESI-MS in negative acquisition mode for the compound eluting at 4.66 and 4.89, 5.53, 5.92, and 6.47, and 7.00 min showed an intense ion at  $m/z$  463, 433, and 447, respectively, and a product ion at  $m/z$  301 and 151, which demonstrated the presence of the quercetin molecule. Therefore, these ions could be explained by the loss of the glucose molecule (162 units), the arabinose molecule (132 units), and the rhamnoside molecule (146 units), respectively.

Two ions with precursor ions of  $m/z$  479 and 463, which eluted at 3.56 and 4.50 min and whose product ions were  $m/z$  317 and  $m/z$  179, were identified as myricetin glucose and myricetin

rhamnoside, respectively. These could be explained by the loss of 162 ( $m/z$  317) and 146 units ( $m/z$  317) that could correspond to the glucose and rhamnoside molecules, respectively.

The two ions with a precursor ion of  $m/z$  431 that eluted at 5.29 and 7.39 min were identified as apigenin glucose, due to the loss of 162 units ( $m/z$  269) that corresponded to the glucose molecule. On the other hand, the precursor ion of  $m/z$  431 that eluted at 9.25 min was identified as kaempferol rhamnoside due to the loss of 146 units ( $m/z$  269) that corresponded to the rhamnoside molecule. Finally, methyl gallate was identified to give a precursor ion of  $m/z$  184 and a product ion of  $m/z$  124. This product ion is explained by the loss of the methyl group (14 units).

Besides the sensitivity, the UPLC-MS/MS developed method allows the phenolic compounds and the alkaloids, caffeine and theobromine, in carob flour samples to be determined in 20 min. This analysis time is between two (7, 12) and five times (11) shorter than the other methods reported in the literature for the analysis

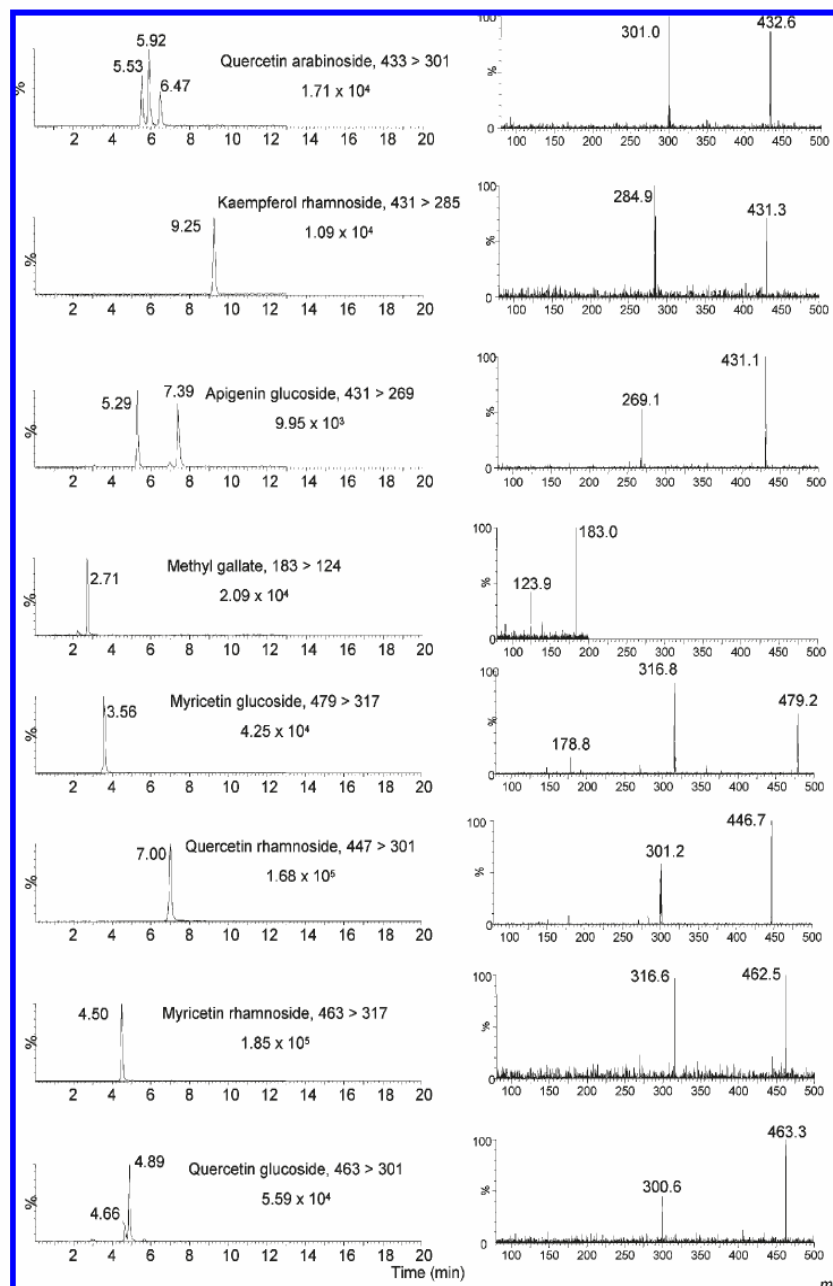


Figure 2. Extracted ion chromatograms and mass spectra of the flavonoid glucosides and methyl gallate identified in the carob flour sample.

of similar samples. This significant reduction in the analysis time was due to the improvements in the LC technique, which uses shorter columns that are packed with smaller size particles ( $1.8 \mu\text{m}$ ) than the conventional HPLC technique ( $5 \mu\text{m}$ ).

Table 2 shows the composition and quantification of the phenols in the carob flour. During the characterization, three different phenolic groups were distinguished, phenolic acids, flavonoid aglycones, and glucosides. Among the phenolic acids, gallic acid was the predominant compound, and its concentration was  $2675 \mu\text{g/g}$  of carob flour. Owen et al. (7) have described  $1647 \mu\text{g}$  of gallic acid/g of carob fiber, which supposes 50% of the carob flour composition. On the other hand, the values obtained in our study are four times higher than those reported by

Papagiannopoulos et al. (11) in different roasted carob flours, which ranged from  $264.1$  to  $685.6 \mu\text{g/g}$  of flour. These authors attributed the differences in the gallic acid content between samples to the roasting process, mainly to the air and temperature treatment, used to obtain the carob flour (11). Among all of the flavonoid aglycones, myricetin and luteolin were the compounds with the highest concentration, at around  $108$  and  $41 \mu\text{g/g}$  of flour, respectively (Table 2). With regard to the flavonoid glucosides, attention should be paid to the high concentration of myricetin rhamnoside, at  $1665 \mu\text{g/g}$  of flour.

The results shown for the quantification of polyphenols in carob flour in our work are partially in agreement with those reported by Papagiannopoulos et al. (11). The differences mainly

**Table 2.** Quantification by UPLC-MS/MS of Phenolic Compounds (Phenolic Acids, Flavonoid Aglycones, and Glucosides) and Alkaloids (Caffeine and Theobromine) in Carob Flour<sup>a</sup>

compounds	$\mu\text{g/g}$ carob flour
cinamic acid	44.0 $\pm$ 14.9
p-coumaric acid	9.9 $\pm$ 2.7
gallic acid	2675.6 $\pm$ 143.3
ferulic acid	38.0 $\pm$ 1.1
syringic acid	11.0 $\pm$ 3.3
total phenolic acids	2778 $\pm$ 145
genistein	3.8 $\pm$ 2.2
apigenin	1.6 $\pm$ 0.6
naringenin	9.3 $\pm$ 2.2
luteolin	41.3 $\pm$ 9.3
kaempferol	0.0 $\pm$ 0.0
quercetin	17.6 $\pm$ 1.65
myricetin	108.3 $\pm$ 11.6
total flavonoid aglycones	182.6 $\pm$ 11.8
methyl gallate	54.5 $\pm$ 8.2
apigenin glucose	0.5 $\pm$ 0.0
kaempferol rhamnoside	174.4 $\pm$ 45.7
quercetin arabinoside	88.0 $\pm$ 13.8
quercetin rhamnoside	470.3 $\pm$ 120.4
quercetin glucose	140.7 $\pm$ 28.1
myricetin rhamnoside	1665.4 $\pm$ 252.3
myricetin glucose	530.3 $\pm$ 121.6
total flavonoid glucosides	3123.7 $\pm$ 254.4
total polyphenols	6081.9 $\pm$ 238.3
caffeine	38.5 $\pm$ 4.8
theobromine	24.8 $\pm$ 3.3
total alkaloids	63.3 $\pm$ 4.9

<sup>a</sup> Values are expressed as means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

concern the high concentration of free phenolic acids, such as gallic acid. Curiously, in our work, no condensed tannins were found in the carob flours, although these have been described in other carob fruit and pods (2–4, 12). This could be due to the technological process for obtaining the carob flour. For instance, the roasting temperature could hydrolyze these types of polyphenols, resulting in an amount of simple phenolic acids. This could explain the higher concentration of the simple phenolic acids observed in our study in comparison with other carob byproducts reported in the literature (11).

Finally, the two alkaloids, caffeine and theobromine, were also identified and quantified. Their concentrations were 38.5 and 24.8  $\mu\text{g/g}$  of carob flour, respectively, and these values were significantly lower (around 50 times) than the amount found in cocoa derivatives (14). The high sensitivity of the developed chromatographic methods allowed the quantification of these alkaloids by the first time in carob flour samples. This low content of alkaloids, especially theobromine, could reinforce interest in carob flour as a substitute for cocoa ingredients in the food formulation.

**Supporting Information Available:** Table of SRM conditions for the analysis of the phenolic compounds and the alkaloids by UPLC-MS/MS. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

#### LITERATURE CITED

- Marakis, S. Carob bean in food and feed: current status and future potentials—A critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.* 1996, 33, 365–383.
- Avallone, R.; Plessi, M.; Baraldi, M.; Monzani, A. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Compos. Anal.* 1997, 10, 166–172.
- Kumazawa, S.; Taniguchi, M.; Suzuki, Y.; Shimura, M.; Kwon, M. S.; Nakayama, T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 373–377.
- Makris, D.; Kefalas, P. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* 2004, 42 (2), 105–108.
- Yousif, A.; Alghzawi, H. Processing and characterization of carob powder. *Food Chem.* 2000, 69, 283–287.
- Calixto, F. S.; Canellas, J. Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* 1982, 33, 1319–1323.
- Owen, R. W.; Haubner, R.; Hull, W. E.; Erben, G.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H.; Haber, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* 2003, 41, 1727–1738.
- Šebečić, B.; Vedralina-Dragojević, I.; Vitali, D.; Hečimović, M.; Dragičević, I. Raw materials in fibre enrich biscuits production as source of total phenols. *Agric. Conspec. Sci.* 2007, 72–3, 265–270.
- Vitali, D.; Vedralina-Dragojević, I.; Šebečić, B. Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chem.* 2008, 114 (4), 1462–1469.
- Craig, W.; Nguyen, T. Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J. Food Sci.* 1984, 49, 302–306.
- Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.; Mellenthin, A.; Haber, B.; Galensa, R. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3784–3791.
- Corsi, L.; Avallone, R.; Cosenza, F.; Baraldi, C.; Baraldi, M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* 2002, 73, 674–684.
- Gruz, J.; Novák, O.; Strnad, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2008, 111, 789–794.
- Ortega, N.; Romero, M. P.; Macià, A.; Reguant, J.; Anglès, N.; Morelló, J. R.; Motilva, M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 9621–9627.
- Fux, E.; McMillan, D.; Bire, R.; Hess, P. Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxic. *J. Chromatogr. A* 2007, 1157, 273–280.
- Leandro, C.; Hancock, P.; Fussell, R.; Keely, B. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2006, 1103, 94–101.
- Leandro, C.; Hancock, P.; Fussell, R.; Keely, B. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. *J. Chromatogr. A* 2007, 1144, 161–169.
- Muñoz, A.; Charles, A.; Gutiérrez, H.; Cervantes, J. Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of aging markers in tequila. *J. Chromatogr. A* 2008, 1213, 218–223.
- Kumar, N.; Bhandari, P.; Singh, B.; Gupta, A.; Kaul, V. Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 262–267.
- Peng, L.; Song, X.; Shi, X.; Li, C.; Ye, C. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21, 559–563.

Received May 15, 2009. Revised manuscript received July 6, 2009. Accepted July 9, 2009. This work was supported by the CENIT program from the Spanish Minister of Industry and by the consortium led by La Morella Nuts S. A. (Reus, Catalonia, Spain) with the following companies: KRAFT; BTSa, Biotecnologías Aplicadas, S. L.; Selección Batallé, S. A.; Industrial Técnica Pecuaria, S. A.; Neuron BioPharma, S. A.; Shiota Functional Foods, S. L.; Grupo Leche Pascual, S. A. U.; and Innaves, S. A.

## Capítol 3

Obtention and characterization of phenolic  
extracts from different cocoa sources

Journal Agricultural of Food Chemistry  
2008, 56, 9621-9627



## Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources

NÀDIA ORTEGA,<sup>†,§</sup> MARIA-PAZ ROMERO,<sup>†</sup> ALBA MACIÀ,<sup>†</sup> JORDI REGUANT,<sup>§</sup>  
NEUS ANGLÈS,<sup>§</sup> JOSÉ-RAMÓN MORELLÓ,<sup>§</sup> AND MARIA-JOSE MOTILVA<sup>\*†</sup>

Food Technology Department, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria, Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain, and R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Spain

The aim of this study was to evaluate several cocoa sources to obtain a rich phenol extract for use as an ingredient in the food industry. Two types of phenolic extracts, complete and purified, from different cocoa sources (beans, nibs, liquor, and cocoa powder) were investigated. UPLC-MS/MS was used to identify and quantify the phenolic composition of the extracts, and the Folin–Ciocalteu and vanillin assays were used to determine the total phenolic and flavan-3-ol contents, respectively. The DPPH and ORAC assays were used to measure their antioxidant activity. The results of the analysis of the composition of the extracts revealed that the major fraction was procyanidins, followed by flavones and phenolic acids. From the obtained results, the nib could be considered the most interesting source for obtaining a rich phenolic cocoa extract because of its rich phenolic profile content and high antioxidant activity in comparison with the other cocoa sources.

**KEYWORDS:** Antioxidant activity; cocoa sources; phenolic compound; DPPH; ORAC; UPLC-MS/MS

### INTRODUCTION

In recent years, there has been a growing interest in polyphenols because of their physiological health benefits, including antioxidant (1–3), anti-inflammatory (4), and antiatherogenic effects (5), among others. Cocoa beans and derivative are an important food source rich in polyphenolic compounds. Different studies have shown that the consumption of cocoa products has positive and various health effects (6, 7). These benefits have been mainly attributed to the high antioxidant activity of the cocoa samples. Currently, the protective health potential of cocoa polyphenols has been also related to the protection of the oxidative modification of low-density lipoproteins (LDL), a consequence of oxidative stress (8).

The most abundant polyphenol group in cocoa is the procyanidins (flavan-3-ol), which can range in molecular weight from monomers (catechin and epicatechin) to long-chain polymers (with degree of polymerization higher than decamers). Moreover, in smaller amounts, galliccatechin and epigallocatechin, have also been quantified (9). The procyanidins have been ascribed as the main group responsible for the antioxidant activity of the cocoa beans, and this activity could also be related with their degree of polymerization (1, 10). However, the

phenolic fraction of the cocoa is complex and contains other phenolic groups that could also contribute to the health benefits of cocoa.

Despite the high polyphenol content in the beans and their derivative products, this can vary greatly between different varieties and origins of cocoa beans and also through the manufacturing procedures (2, 11). The processing of raw cocoa includes a number of stages, in which cocoa beans are transformed into nibs, liquor, and cocoa powder that are used as ingredients in the formulation of the different cocoa-based foods. The first step, bean fermentation, is crucial for bringing out the desirable flavor for the cocoa derivative. The next step involves roasting and grinding the beans to obtain the nibs. The time and temperature conditions during the roasting process affect the polyphenol stability as well as the taste of the cocoa products (11). The result of nib grinding is a liquid paste known as cocoa liquor. Finally, the last step involves pressing the cocoa liquor to remove a high percentage of the cocoa butter, leaving a solid cake, which is milled into a fine powder cocoa.

Numerous analytical techniques have focused on the identification and quantification of the procyanidins in cocoa samples using different chromatography techniques (3, 10, 12). Among all of the methods used, the coupling of liquid chromatography and mass spectrometry has been shown to be a powerful tool for identifying procyanidins in cocoa products. For instance, Sanchez-Rabaneda et al. (13) identified some other phenolic groups in powder cocoa, such as flavonol and flavone glycosides. Nevertheless, there is not much information available about the determination of phenolic groups, such as flavonoids and phenolic acids, in cocoa beans and derivative.

\* Corresponding author (telephone +34 973 702817; fax + 34 973 702596; e-mail motilva@tecal.udl.es).

<sup>†</sup> Universidad de Lleida.

<sup>§</sup> La Morella Nuts, S.A.

Several assays have been used to measure the antioxidant activity available in plant sources; however, all of the methods differ in their principle. The TRAP and ORAC methods are based on the measurement of the scavenging of free radicals. In contrast, other methods, such as DPPH or APPH, measure the antioxidant scavenging ability toward stable radical species. Several methods, such as APPH (1), DPPH (14), and ORAC (4, 15), have been mainly used to determine the antioxidant capacity of cocoa samples.

The interest of this work was focused on the evaluation of the cocoa bean and its derivative as potential sources of bioactive polyphenols, which can be used as ingredients in the food and chocolate industry. Therefore, bearing in mind that the polyphenol content can be modified during the processing of the cocoa, the first aim of this study was to characterize the composition of two different phenolic cocoa extracts obtained from several cocoa sources (beans, nibs, liquor, and powder) to evaluate the most interesting source and the effect of the technological process on the phenolic composition. Furthermore, this study evaluates the antioxidant activity of the different phenolic extracts using the DPPH and ORAC assays with the aim of establishing which phenolic group would best describe the antioxidant activity from the different cocoa sources.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Reagents.** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (+)-catechin, (-)-epicatechin, caffeine, theobromine, caffeic acid, syringic acid, protocatechuic acid, epigallocatechin, hydroxybenzoic acid, naringenin, and myricetin were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Fluorescein (FL), Folin-Ciocalteu reagent, kaempferol, dimer B<sub>2</sub>, vanillic acid, and quercetin-rhamnoside were from Fluka Co. (Buchs, Switzerland). Ferulic acid, coumaric acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, quercetin, kaempferol-rutinoside, apigenin, apigenin-glucoside, luteolin, kaempferol-glucoside, and luteolin-glucoside were purchased from Extrasynthese (Genay, France); and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were from Acros Organics (Fair Lawn, NJ).

**Phenol Extract Preparation.** *Samples.* A total of four different cocoa sources were considered in the study: cocoa beans, cocoa nibs, cocoa liquor, and cocoa powder. All cocoa samples corresponded to Forastero variety from Ghana (West Africa). The Forastero variety is easy to cultivate and has a pungent aroma.

The four cocoa sources were obtained by the typical manufacturing process. The "cocoa bean" is obtained by fermentation and roasting of the fresh cocoa bean. During roasting, the bean color changes to a rich brown, and the aroma of chocolate comes through. After roasting, the cocoa bean shells are cracked and removed, leaving the essence of pure chocolate called the "nib". For Dutch roasts, an alkaline solution is added to produce nibs that are darker and less acidic in flavor. The roasted nibs are milled through a process that liquefies the cocoa butter in the nibs and forms "cocoa liquor". The cocoa liquor is pressed, and the remaining cakes of cocoa solids are pulverized into "cocoa powder".

Two kinds of phenolic extracts were obtained from the four cocoa sources, the phenol cocoa extract (CE), by solid/liquid extraction, and the purified extract (PCE), by solid phase extraction (SPE).

**Phenol Cocoa Extract (CE).** The phenol CE extraction was based on the work by Hammerstone et al. (10), slightly modified. Cocoa beans and cocoa nibs were ground in a laboratory mill for 30 s before the phenol extraction to obtain a homogeneous material. To achieve maximum extraction efficiency during the sample preparation, 15 g of raw material was first defatted four times with 125 mL of hexane for 20 min in an orbital shaker (Selecta, Barcelona, Spain) at 200 rpm and subsequently centrifuged for 15 min at 15000g. The defatted cocoa sample was then extracted four times with solvent extraction at a ratio of 1:5. After the addition of this solution, the tubes were vortexed for 3 min and then were centrifuged for 15 min at 15000g. The supernatants were combined from the centrifuged tubes and filtered with glass wool.

The organic solvent was removed by rotary evaporation (Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) under partial vacuum at 30 °C. Finally, the water extract was freeze-dried in Lyobeta 15 equipment (Ima-Telstar, Spain) to obtain the CE.

**Purified Phenol Cocoa Extract (PCE).** CE (100 mg suspended in 1 mL of Milli-Q water) was purified by off-line SPE using a SPE manifold (Visiprep, Supelco). The cartridge was C<sub>18</sub>, 1 g (Waters). The cartridge was preconditioned with methanol and then with Milli-Q water. After the freeze-dried CE had been loaded, the cartridge was cleaned by passage of Milli-Q water. Finally, the polyphenols were eluted with solvent extraction solution. The eluted fraction was concentrated by rotary evaporation under a partial vacuum at 30 °C and was finally freeze-dried to obtain the PCE.

**Chromatographic Analysis of the Phenolic Extracts.** *Ultraperformance liquid chromatography.* (UPLC) analyses were performed using a Waters Acquity ultraperformance liquid chromatography system (Waters, Milford, MA), equipped with a binary pump system (Waters).

The UPLC analyses were performed using an Acquity High Strength Silica (HSS) T3 column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm particle size) (Waters) with a binary mobile phase. Solvent A was water/acetic acid (0.2%) and B was acetonitrile. Two chromatography methods were developed to characterize the phenolic profile in the cocoa samples: the first one, to analyze procyanidins and alkaloids, and a second one to analyze the flavonoids and phenolic acids. The analysis of the procyanidins in the cocoa samples was as reported in our previous work (16). For the analysis of the phenolic acids and flavonoids, the gradient elution at 30 °C was as follows: 0–2 min, 5% B isocratic; 2–6 min, 5–18% B; 6–7 min, 18% B isocratic; 7–10 min, 18–21% B; 10–12 min, 21–23% B; 12–16 min, 23–40% B; 16–16.10 min, 40–100% B; 16.10–18 min, 100% B isocratic; 18–18.10 min, 100–5% B; 18.10–20 min, 5% B isocratic. In both analytical methods, the flow rate was 0.4 mL min<sup>-1</sup> and the sample volume injected was 2.5 μL.

The lyophilized CE and PCE were dissolved in solvent extraction solution and filtered through 0.22 μm nylon filters prior to chromatographic analysis. The stock standard solutions of (+)-catechin, (-)-epicatechin, caffeine, theobromine, and dimer B<sub>2</sub> were dissolved in solvent extraction solution. Meanwhile, the rest of the standards were dissolved in methanol. All stock standard solutions were prepared weekly and stored in a dark glass flask at -80 °C. The results of the quantification of the procyanidins were expressed as milligrams of catechin per gram of lyophilized phenolic extract; the phenolic acids and the aglycon flavonoids were expressed as micrograms of standard per gram of lyophilized phenolic extract. All of the flavonoid glycosides were quantified as micrograms of the corresponding aglycon per gram of lyophilized phenolic extract.

**MS/MS Conditions.** The UPLC system was coupled to a TQD mass spectrometer (Waters) using a Z-spray electrospray ionization (ESI) source. The MS was operated in negative mode to analyze the phenolic compounds. In contrast to the analysis of the alkaloids (caffeine and theobromine), the MS was operated in the positive mode. However, both analyses were done in a single run. The data were acquired in selected reaction monitoring (SRM). The ionization source working conditions were as follows: capillary voltage, 3 kV; source temperature, 150 °C; cone gas flow rate, 80 L h<sup>-1</sup>; desolvation gas flow rate, 800 L h<sup>-1</sup>; desolvation temperature, 400 °C. Nitrogen (>99% purity) and argon (99% purity) were used as nebulizing and collision gases, respectively. The dwell time established for each transition was 30 ms. Data acquisition was carried out with MassLynx v 4.1 software.

**Total Polyphenol Content.** *Total polyphenol content (TP).* was determined according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method. An aliquot of lyophilized phenolic extract dissolved in solvent extraction was diluted to 5 mL of Milli-Q water, and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added. After 3 min, 1 mL of sodium carbonate was added and the content was mixed to obtain a final volume of 10 mL with Milli-Q water. After 60 min of standing in darkness, the color was measured in the spectrophotometer at 725 nm.

**Total Flavan-3-ol (TF).** The content of flavan-3-ols in the phenolic extracts was measured with the vanillin assay described by Sarker et al. (17). The total volume fixed was 6 mL, the lyophilized cocoa extract, CE or PCE, was dissolved in 1 mL of methanol, 2.5 mL of 1% vanillin in methanol, and 2.5 mL of HCl. The reaction mixture was incubated



**Table 1.** Optimized SRM Conditions for the Analysis of Procyanidins, Phenolic Acids, Flavones and Alkaloids by UPLC-MS/MS

standard	[M - H]	SRM <sub>1</sub> (quantification)	cone voltage (V)	collision energy (eV)	SRM <sub>2</sub> (confirmation)	cone voltage (V)	collision energy (eV)
ESI (-)							
<b>procyanidins</b>							
catechin	[M - H] <sup>+</sup>	289 > 245	45	10	289 > 205	45	15
epicatechin	[M - H] <sup>+</sup>	289 > 245	45	10	289 > 179	45	15
procyanidin B2	[M - H] <sup>+</sup>	577 > 289	45	20	577 > 425	45	15
epigallocatechin	[M - H] <sup>+</sup>	305 > 125	40	15	305 > 165	40	15
<b>phenolic acids</b>							
hydroxybenzoic acid	[M - H] <sup>+</sup>	137 > 93	30	15			
vanillic acid	[M - H] <sup>+</sup>	167 > 123	30	10	167 > 152	30	15
caffeic acid	[M - H] <sup>+</sup>	179 > 135	35	15	179 > 117	35	20
syringic acid	[M - H] <sup>+</sup>	197 > 153	30	10	197 > 182	30	15
ferulic acid	[M - H] <sup>+</sup>	193 > 134	30	15	193 > 178	30	10
vanillin	[M - H] <sup>+</sup>	151 > 136	20	10	151 > 92	20	15
coumaric acid	[M - H] <sup>+</sup>	163 > 119	25	10	163 > 117	25	25
cinnamic acid	[M - H] <sup>+</sup>	147 > 103	20	10			
chlorogenic acid	[M - H] <sup>+</sup>	353 > 191	30	10	353 > 127	30	30
protocatechuic acid		153 > 109	45	15	153 > 91	45	25
<b>flavones</b>							
quercetin	[M - H] <sup>+</sup>	301 > 151	40	15	301 > 125	40	20
quercetin-glucoside	[M - H] <sup>+</sup>	463 > 300	50	25	463 > 151	45	30
quercetin-rutinoside	[M - H] <sup>+</sup>	609 > 300	45	25	609 > 151	45	35
quercetin-arabinoside	[M - H] <sup>+</sup>	433 > 300	45	20	433 > 151	45	25
dihydroquercetin	[M - H] <sup>+</sup>	303 > 285	45	10	303 > 177	45	10
dihydroxykaempferol	[M - H] <sup>+</sup>	287 > 259	45	10	287 > 269	45	10
kaempferol-rutinoside	[M - H] <sup>+</sup>	593 > 285	50	25	593 > 255	50	40
naringenin	[M - H] <sup>+</sup>	271 > 151	40	15	271 > 119	40	20
naringenin-glucoside	[M - H] <sup>+</sup>	433 > 271	45	10	433 > 164	45	25
myricetin-glucoside	[M - H] <sup>+</sup>	479 > 316	45	20	479 > 179	45	30
luteolin	[M - H] <sup>+</sup>	285 > 133	55	25	285 > 151	55	25
luteolin-glucoside	[M - H] <sup>+</sup>	447 > 285	50	25	447 > 256	50	40
apigenin	[M - H] <sup>+</sup>	269 > 117	60	25	269 > 151	60	25
apigenin-glucoside	[M - H] <sup>+</sup>	431 > 268	45	25	431 > 311	45	30
ESI (+)							
<b>alkaloids</b>							
caffein	[M - H] <sup>+</sup>	195 > 138	45	15	195 > 110	45	20
theobromine	[M - H] <sup>+</sup>	181 > 163	45	15	181 > 140	45	10

for 15 min in the dark, and the absorbance at 500 nm was measured. The TP and TF contents were calculated from the calibration curve using catechin as a standard and expressed as milligrams of catechin per gram of lyophilized phenolic extract.

**Antioxidant Activity. DPPH Assay.** The scavenging activity of the phenolic extracts toward the stable free radical DPPH was measured. An aliquot of 50  $\mu$ L, at concentrations varied from 4–6 to 2.5–4 mg mL<sup>-1</sup> for CE and PCE in the solvent extraction solution respectively, was mixed with 2.95 mL of 0.1 mM methanolic DPPH solution. The mixture was shaken and left to read for 5 min in the spectrophotometer at 517 nm. The scavenging activity of the DPPH radical was calculated using the equation

$$\text{scavenging activity (\%)} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

where *A* is the initial absorbance of the mixture and *B* is the absorbance after 5 min. Triplicate measurements were carried out for each sample. The EC<sub>50</sub> was determined from the plotted graph of the scavenging activity against the concentration of the cocoa extracts.

**ORAC Assay.** The ORAC assay was performed as described by Ou et al. (18), slightly modified, in a FLUORstar optima spectrofluorometric (BMG GmbH, Offenbach, Germany). The reaction was carried out in phosphate buffer (pH 7.4). AAPH was used as a peroxy generator (prepared in assay buffer at 37 °C immediately before each assay), Trolox as a standard (concentration range from 12.5 to 100  $\mu$ M), and assay buffer as a blank. The ORAC values were calculated by a linear regression equation between Trolox or the sample concentration and the net area under the FL decay curve. The results are expressed as micromoles of Trolox equivalent per gram of lyophilized phenolic extract.

**Statistical Analysis.** All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed by a one-way ANOVA test to assess differences between means. A significant difference was considered at

level of *p* < 0.05. All of the statistical analyses were carried out using STATGRAPHICS Plus 5.1.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Analysis of the Phenolic Profile of CE and PCE by UPLC-MS/MS.** In this study, two types of phenolic extracts, CE and PCE, from different cocoa sources (bean, nib, liquor, and powder) were analyzed to evaluate differences in their polyphenol content and the relationship with the technological treatment of the cocoa sources. Most of the studies carried out on the phenolic fraction of cocoa and its derivatives have focused on the procyanidin group (1, 10). Thus, a UPLC-MS/MS method was applied to quantify the procyanidins in the cocoa extracts, as in our previous work (16). Additionally, a chromatographic method was developed to identify and quantify other phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids, using phenol standards. Accordingly, to obtain the structural information of each phenolic compound, the deprotonated molecule was first studied by the negative mode [M - H]<sup>-</sup> in full-scan mode (by scanning from *m/z* 80 to 800). Then the fragmentation of these precursors ions was investigated under various conditions to study their molecular structure through the use of different collision energies. The optimal collision energy, cone voltage, and transition chosen for the SRM experiment are listed in Table 1. Two characteristic SRM transitions were selected for each compound: SRM<sub>1</sub> for quantification and SRM<sub>2</sub> for confirmation.

The concentrations of the phenolic compounds identified in CE and PCE are shown in Tables 2 and 3, respectively. The components of the phenolic extracts were classified into four

**Table 2.** Quantification by UPLC-MS/MS of Phenolic Compounds (Procyanidins, Phenolic Acids and Flavones) and Alkaloids in CE from Different Cocoa Sources<sup>a</sup>

phenol	bean	nib	liquor	powder
Milligrams of Catechin per Gram of Lyophilized CE				
<b>procyanidins</b>				
catechin	0.335 ± 0.083a	2.374 ± 0.090b	1.223 ± 0.127c	1.803 ± 0.321d
epicatechin	3.011 ± 0.053a	5.638 ± 0.061b	3.873 ± 0.217c	0.922 ± 0.074d
dimer	8.214 ± 0.521a	13.20 ± 0.157b	8.341 ± 0.481a	2.914 ± 0.174c
trimer	4.411 ± 0.283a	6.216 ± 0.410a	3.776 ± 0.182b	0.398 ± 0.022c
tetramer	1.768 ± 0.287a	1.571 ± 0.080b	1.191 ± 0.111c	0.028 ± 0.021d
pentamer	0.046 ± 0.017a	0.157 ± 0.015b	0.021 ± 0.010a	nd
hexamer	0.156 ± 0.064a	0.100 ± 0.040a	0.115 ± 0.082a	nd
heptamer	0.027 ± 0.009a	0.018 ± 0.003a	0.021 ± 0.013a	nd
octamer	0.023 ± 0.010a	0.017 ± 0.001a	0.012 ± 0.017b	nd
nonamer	0.020 ± 0.010a	0.011 ± 0.000b	0.009 ± 0.012b	nd
epigallocatechin	0.090 ± 0.011ab	0.167 ± 0.042c	0.109 ± 0.263a	0.061 ± 0.030b
Milligrams of Alkaloid per Gram of Lyophilized CE				
<b>alkaloids</b>				
theobromine	43.42 ± 4.541a	39.12 ± 1.212b	44.62 ± 3.612c	38.72 ± 0.133d
caffeine	4.500 ± 0.124a	2.941 ± 0.082b	3.624 ± 0.200a	3.303 ± 0.272bc
Micrograms of Standard per Gram of Lyophilized CE				
<b>phenolic acids</b>				
hydroxybenzoic acid	40.25 ± 12.34a	31.30 ± 9.112b	40.03 ± 5.034a	51.84 ± 1.183c
vanillic acid	26.40 ± 6.492a	18.76 ± 4.178b	17.44 ± 11.06ab	15.13 ± 3.325b
caffeic acid	74.43 ± 7.607a	74.25 ± 4.462a	72.83 ± 8.116a	71.59 ± 4.968a
syringic acid	8.073 ± 0.314a	9.514 ± 2.597a	8.170 ± 2.393a	12.26 ± 3.093b
ferulic acid	3.316 ± 0.274a	2.472 ± 0.131b	1.495 ± 1.296bc	2.111 ± 0.195b
vanillin	4.822 ± 1.839a	3.080 ± 0.572b	2.752 ± 0.443b	1.720 ± 0.127c
coumaric acid	25.90 ± 5.086a	24.14 ± 2.860a	18.29 ± 1.102b	24.52 ± 1.581a
cinnamic acid	13.36 ± 5.354a	6.442 ± 2.748b	17.06 ± 5.820a	28.81 ± 5.341c
chlorogenic acid	23.63 ± 4.538a	27.68 ± 3.393a	35.18 ± 4.020b	18.14 ± 0.342c
protocatechuic acid	478.2 ± 74.08a	380.6 ± 106.4b	478.2 ± 53.64a	1055 ± 155.1c
Micrograms of Standard per Gram of Lyophilized CE				
<b>flavones</b>				
quercetin	102.1 ± 26.79a	201.6 ± 56.91b	238.9 ± 35.30b	57.37 ± 3.512c
quercetin-glucoside	2940 ± 192.9a	3094 ± 230.9b	2215 ± 262.3c	590.5 ± 58.65d
quercetin-rutinoside	21.77 ± 1.532a	24.77 ± 1.235b	24.72 ± 2.214b	23.17 ± 1.168b
quercetin-arabinoside	3169 ± 51.15a	3429 ± 103.0a	2706 ± 87.57b	664.9 ± 15.61c
dihydroquercetin	95.64 ± 6.253a	132.2 ± 16.37b	111.9 ± 2.377c	60.27 ± 4.672d
dihydroxykaempferol	712.7 ± 51.84a	1012 ± 85.07b	725.5 ± 31.17a	171.4 ± 4.521c
kaempferol-rutinoside	502.2 ± 19.07a	648.8 ± 56.28b	551.7 ± 39.38a	579.0 ± 99.99a
naringenin	23.91 ± 0.342a	26.26 ± 0.693ab	27.05 ± 3.360ab	5.076 ± 0.766b
naringenin-glucoside	70.96 ± 4.701a	92.43 ± 10.59b	64.60 ± 8.234a	20.18 ± 1.580c
myricetin-glucoside	118.6 ± 17.92a	143.2 ± 8.530b	138.2 ± 11.00c	161.3 ± 125.7d
luteolin	90.09 ± 20.80a	82.87 ± 14.02b	106.4 ± 18.53c	29.06 ± 1.713d
luteolin-glucoside	179.9 ± 52.02a	251.8 ± 76.51b	226.5 ± 72.27b	157.1 ± 53.33a
apigenin	2.722 ± 0.172a	2.354 ± 0.208a	3.826 ± 1.195b	0.967 ± 0.129c
apigenin-glucoside	0.890 ± 0.088a	1.268 ± 0.264b	1.051 ± 0.182c	0.735 ± 0.155a
total polyphenols content (TP)	259.9 ± 8.413a	302.5 ± 5.157a	257.5 ± 5.982a	123.9 ± 10.41b
total flavan-3-ol (TF)	163.5 ± 17.87a	175.2 ± 10.70a	168.8 ± 6.047a	49.53 ± 5.143b

<sup>a</sup> Determination of total polyphenol content by Folin–Ciocalteu and flavan-3-ol by vanillin assay in CE. Values in the same row followed by different letters are significantly different (*p* < 0.05). nd, not detected.

groups: procyanidins, alkaloids, phenolic acids, and flavones. The procyanidin content varied significantly in relation to the cocoa source, mainly in the CE extracts. The results indicated that the nib could be the most interesting cocoa source for phenolic extracts. This could be related to the grinding and roasting operations during the transformation of the cocoa beans into nibs. Grinding and roasting could increase the damage to the cell that leads to a breakdown of the cell wall. These changes in the cytoplasmic material, especially the loss of cell disruption, lead to major solubility and diffusion of the phenols compounds. As a consequence, these modifications in the cell wall structure during the roasting and grinding process could explain the increased phenolic compound content found in the cocoa nib extracts in comparison with the cocoa bean extracts.

On the other hand, lower concentration in the cocoa liquor has been observed. Also, it could be due to the pressing and milling processes that could produce a loss of the phenolic compounds.

During these manufacturing steps oxidation and condensation reactions are present, which could contribute as well to a loss in the phenol content. However, it depends on the pressing and milling conditions to influence the loss of the phenolic compounds. It has been seen that mild condition in these processes did not really influence the variation on the phenolic content (9). In this work, the procyanidin content for liquor CE and PCE decreased in comparison with nib CE and PCE; however, these contents are nearly the same as those of the cocoa bean CE (Figure 1). Therefore, in this case, it can be concluded that mild conditions were applied to the nib to obtain the liquor.

The lowest phenolic content observed in the powder CE and PCE (Tables 2 and 3) in comparison with the phenolic extracts of the other cocoa sources could be attributed to the degradation as consequence of the temperature during the pressing process of the cocoa liquor, to obtain the cocoa butter and the “cocoa cakes” that are finally pulverized into cocoa power. In addition

**Table 3.** Quantification by UPLC-MS/MS of Phenolic Compounds (Procyanidins, Phenolic Acids and Flavones) and Alkaloids in PCE from Different Cocoa Sources<sup>a</sup>

phenol	bean	nib	liquor	powder
Milligrams of Catechin per Gram of Lyophilized PCE				
<b>procyanidins</b>				
catechin	0.434 ± 0.055a	3.119 ± 0.319b*	1.532 ± 0.261a	6.974 ± 0.288c*
epicatechin	4.314 ± 0.371a*	6.147 ± 0.727b	4.721 ± 0.300c*	2.344 ± 0.241d*
dimer	10.43 ± 1.804a	14.81 ± 3.356a	10.38 ± 1.067b*	10.67 ± 0.429c*
trimer	6.369 ± 0.890a*	7.600 ± 0.466b	5.232 ± 0.652c*	1.027 ± 0.004d*
tetramer	2.879 ± 0.129a*	2.512 ± 0.069b*	1.889 ± 0.054a*	0.120 ± 0.027c*
pentamer	0.079 ± 0.013a*	0.077 ± 0.010a*	0.040 ± 0.007b*	0.009 ± 0.001c
hexamer	0.359 ± 0.014a*	0.286 ± 0.069ab*	0.221 ± 0.031b*	nd
heptamer	0.042 ± 0.001a	0.033 ± 0.003b	0.023 ± 0.002b	nd
octamer	0.033 ± 0.004a	0.029 ± 0.003a	0.020 ± 0.002b	nd
nonamer	0.032 ± 0.004a	0.025 ± 0.003a*	0.018 ± 0.002b	nd
epigallocatechin	0.117 ± 0.039a	0.176 ± 0.069b	0.113 ± 0.391a	0.096 ± 0.0382c
Milligrams of Alkaloid per Gram of Lyophilized PCE				
<b>alkaloids</b>				
theobromine	70.27 ± 4.016a*	64.87 ± 1.532a*	65.74 ± 3.266a*	89.66 ± 8.914b*
caffeine	7.195 ± 0.918a*	4.991 ± 0.156b*	5.169 ± 0.270a*	9.030 ± 0.257c*
Micrograms of Standard per Gram of Lyophilized PCE				
<b>phenolic acids</b>				
hydroxybenzoic acid	21.15 ± 7.526ab*	17.07 ± 7.105b*	17.91 ± 5.606b*	42.77 ± 9.904a
vanillic acid	20.95 ± 7.620a	21.50 ± 16.13a	20.70 ± 11.66a	41.74 ± 19.78a*
caffeic acid	88.88 ± 18.42a	76.72 ± 9.509a	78.18 ± 11.34a	99.76 ± 46.12a*
syringic acid	13.14 ± 3.526a*	11.49 ± 3.003a	15.22 ± 1.610a	26.10 ± 5.295b*
ferulic acid	4.515 ± 0.805a	3.667 ± 1.740a	3.367 ± 0.741ab*	3.445 ± 2.054b
vanillin	3.573 ± 0.954ab	3.208 ± 1.119b	2.242 ± 0.660b	9.027 ± 3.584b*
coumaric acid	41.97 ± 9.513ab*	34.89 ± 5.534ab*	51.87 ± 5.006b*	30.47 ± 6.386a
cinnamic acid	24.98 ± 4.980a*	25.02 ± 4.506a*	31.43 ± 1.821a*	91.28 ± 23.15b*
chlorogenic acid	31.38 ± 10.69a*	32.33 ± 1.883a	54.21 ± 12.01b*	21.91 ± 6.720c
protocatechuic acid	134.6 ± 55.93a*	69.07 ± 36.76a*	64.14 ± 31.61a*	226.0 ± 86.33b*
Micrograms of Standard per Gram of Lyophilized PCE				
<b>flavones</b>				
quercetin	140.4 ± 41.80a	259.9 ± 76.13b	263.2 ± 80.40b	93.17 ± 27.00c
quercetin-glucoside	3649 ± 1005a	3464 ± 914.5a	3066 ± 748.5b	1284 ± 300.8c*
quercetin-rhamnoside	29.12 ± 5.189a	19.39 ± 3.433ab	14.67 ± 1.285b	18.15 ± 6.310c
quercetin-rutinoside	99.64 ± 23.66a*	18.53 ± 1.632b*	17.87 ± 1.561b*	21.52 ± 8.301c
quercetin-arabinoside	4501 ± 749.8a*	4215 ± 499.5a	3629 ± 783.7b	1622 ± 285.4c*
dihydroquercetin	96.68 ± 35.17a	95.44 ± 32.87b	86.09 ± 27.59b	76.09 ± 58.13b
dihydroxykaempferol	781.0 ± 134.6a	878.9 ± 103.7b	753.5 ± 96.58a	378.7 ± 115.4c*
kaempferol-rutinoside	834.9 ± 25.94a*	741.4 ± 70.67a	701.3 ± 68.59a*	1144 ± 395.9b*
kaempferol-glucoside	1198 ± 233.1a	14.07 ± 1.070b	14.46 ± 1.267b	17.31 ± 6.809b
naringenin	23.38 ± 7.664a	25.92 ± 6.980a	30.91 ± 8.047a	8.775 ± 2.721b
naringenin-glucoside	65.59 ± 20.28a	79.28 ± 27.65b	69.38 ± 17.84a	42.43 ± 18.58c
myricetin-glucoside	91.10 ± 10.10a	107.7 ± 13.42a*	108.3 ± 16.33a*	71.91 ± 60.57a
luteolin	182.0 ± 3.250a*	111.7 ± 30.29b	159.8 ± 64.57a	75.01 ± 15.38c*
luteolin-glucoside	486.9 ± 273.2a*	255.7 ± 94.27b	247.6 ± 110.0b	362.0 ± 170.9b*
apigenin	2.736 ± 1.182a	3.034 ± 1.249a	3.883 ± 1.710b	1.753 ± 0.837c
apigenin-glucoside	1.714 ± 0.368a*	1.048 ± 0.195a	1.187 ± 0.310a	1.310 ± 0.490a
total polyphenols content (TP)	399.9 ± 28.14a*	437.2 ± 25.12a*	378.8 ± 11.39a*	296.5 ± 22.28b*
total flavan-3-ol (TF)	292.2 ± 7.256a*	306.6 ± 3.873a*	275.9 ± 3.894a*	117.2 ± 7.450b*

<sup>a</sup> Determination of total polyphenol content by Folin–Ciocalteu and flavan-3-ol by vanillin assay in PCE. Values in the same row followed by different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). An asterisk indicates significant difference from the CE ( $p < 0.05$ ). nd, not detected.

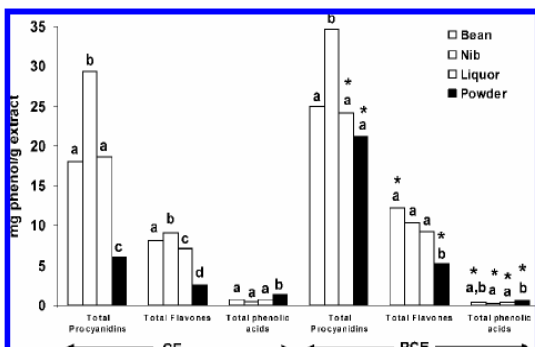
with this last step, it is noteworthy that the content of catechin is higher for the powder CE and PCE than for the other cocoa source extracts. This could be due to an isomerization of the epicatechin to catechin or to the monomerization of procyanidins during the manufacturing process of the cocoa powder.

By comparison of the complete and purified extracts, CE and PCE, respectively (Tables 2 and 3), it is interesting to analyze the procyanidin content, especially the monomer and dimer contents. Particularly, the purification step of the phenolic extract of powder supposed a significant increase in the procyanidins, mainly monomers to trimers. In contrast, the concentration of the oligomers (higher than hexamers) was not significantly increased by the purification of the phenolic extract.

In relation to the alkaloid content, it is worth noting the main content of theobromine in both cocoa extracts, CE and PCE,

for all cocoa sources. In addition, all PCEs showed a significant difference in the alkaloid content in comparison with the CE. However, the higher theobromine and caffeine contents were quantified in the PCE from the cocoa powder, despite the lower procyanidin content.

With regard to the flavone content, which was almost 2 times lower than the procyanidin concentration in all of the CEs and PCEs, it was mainly characterized by flavonol type, quercetin-glycoside forms, dihydroxykaempferol, and kaempferol. The total flavone content was significantly different for all CEs, which ranged from 2.5 to 9.1 mg per lyophilized phenolic extract. In contrast, only the cocoa powder PCE showed the lowest and significantly different content in comparison with the other PCEs. Conversely, in powder PCE the concentration of the main flavonol type, catechin, as well as other flavones

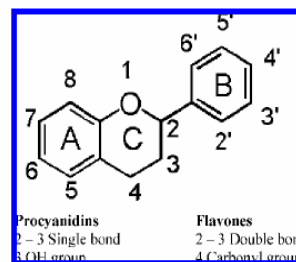


**Figure 1.** Content of total procyanidins, flavones, and phenolic acids in CE and PCE from different cocoa sources, expressed as milligrams of phenol per gram of cocoa extract. For each phenolic group (procyanidins, flavones, and phenolic acids) for CE and PCE, respectively, means with different letters indicate significant differences between cocoa sources (bean, nib, and powder) at the level of  $p < 0.05$ . Values with an asterisk indicate significant difference for each of the phenolic group (procyanidins, flavones, and phenolic acids) content between CE and PCE ( $p < 0.05$ ).

such as luteolin and luteolin-glucoside were doubled in comparison with the other PCEs. As can be observed in **Figure 1**, the total flavone content also increased in the nib CE in comparison with the other cocoa CEs. However, this trend cannot be seen for the PCE. Only a lower and significant difference in the flavone content is shown in the powder PCE in comparison with the other PCEs.

Protocatechuic acid was found to be the main phenolic acid in all of the CEs and PCEs. However, the total content of the phenolic acid group in all of the cocoa extracts was found as the minor fraction in comparison with the procyanidin and flavone contents (**Figure 1**). Nevertheless, it is interesting to note that the poorest phenolic extracts in terms of procyanidins and flavones, CE and PCE powders, were the richest in phenolic acids (**Tables 2 and 3**). This could be due to the process used to obtain the cocoa powder. Curiously, it was also observed that the phenolic acid profile in all of the cocoa sources decreased in all of the PCEs. These slightly lower values could be attributed to the fact that phenolic acids are the most hydrophilic molecules, so they could be removed with the clean water during the cleanup step in the purification procedure (SPE).

Parallel to the chromatographic analysis of the phenolic extracts, the total phenols were quantified according to the Folin–Ciocalteu and vanillin methods, which are faster and easier methods. The total contents of polyphenolic compounds in all of the extracts were expressed by milligrams of catechin per gram of lyophilized cocoa extract. The results are shown in **Tables 2 and 3**, and these values ranged from 123.9 to 302.5 and from 296.5 to 437.2 for CE and PCE, respectively. The total polyphenol content followed the order nib  $\approx$  bean  $\approx$  liquor  $>$  powder for CE and PCE (significant difference,  $p < 0.05$ ). The TP content expressed by the Folin–Ciocalteu was higher than the total sum of polyphenol compounds determined by UPLC-MS/MS. It is generally known that the Folin–Ciocalteu is not a specific test for phenol quantification and that it detects other hydrophilic compounds, such as residual sugars. Therefore, the vanillin assay was considered to be a more specific method for quantifying procyanidins due to the presence of procyanidins as the main phenolic group in cocoa extracts. This test shows more sensitivity and specificity to a narrow range of procyanidins because it is limited to flavonoids with meta-oriented



**Figure 2.** Basic structure and numbering system of procyanidins and flavones.

**Table 4.** Antioxidant Activity of Lyophilized CE and PCE Based on DPPH and H-ORAC Assays<sup>a</sup>

cocoa source	DPPH <sup>b</sup>		H-ORAC <sup>c</sup>	
	CE	PCE	CE	PCE
bean	0.09 ± 0.01a	0.05 ± 0.00ab	3778.19 ± 296.92a	5534.18 ± 283.36a
nib	0.09 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	3640.44 ± 181.63a	6930.99 ± 568.10b
liquor	0.09 ± 0.01a	0.06 ± 0.00b	3610.27 ± 15.70a	6393.77 ± 265.46b
powder	0.18 ± 0.00b	0.10 ± 0.00c	1683.64 ± 204.20b	5556.91 ± 239.94a

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± standard deviation ( $n = 3$ ). Means in the same column followed by different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> EC<sub>50</sub> value is defined as the mg of cocoa extract necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50%. <sup>c</sup>  $\mu$ mol equiv Trolox/g of lyophilized cocoa extract.

unsubstituted hydroxyls and a saturated C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> bond and lacking a C<sub>4</sub> carbonyl (see **Figure 2**). As a consequence, the number of procyanidins is proportional to the absorbance of the solution (17). Thus, according to the values shown in **Tables 2 and 3**, the cocoa extracts were also classified in the same order as followed in the Folin–Ciocalteu test. Moreover, the values from the vanillin assay in CE powder and PCE were the lowest, which also correlated with the content of procyanidins identified by UPLC-MS/MS, especially with procyanidins with a degree of polymerization higher than the pentamers.

According to the results of the phenolic quantification by UPLC-MS/MS, the total polyphenol content by Folin–Ciocalteu and the total flavanol content by vanillin tests, the purification step of the CE by SPE supposed an important enrichment of the phenolic content, mainly in the extracts from cocoa powder, probably as consequence of the loss of the carbohydrates, which may have been eluted in the cleanup step. As a consequence of the SPE step, the total polyphenolic content increased from CE to PCE around 30–35% for the bean, nib, and liquor extracts, whereas for CE powder the SPE step increases by 58% the phenolic content of the PCE.

**Antioxidant Activity Measured of CE and PCE.** The cocoa sources have been shown to be subject to change in polyphenol content during the steps of processing. To assess the antioxidant activity in the cocoa products obtained, two different assays were applied. The first one was the DPPH assay, in which the free radical scavenging activities were expressed as EC<sub>50</sub>, defined as the total antioxidant necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50%. Thus, the lowest EC<sub>50</sub> indicates the strongest antioxidant capacity. As can be observed in **Table 4**, the EC<sub>50</sub> values for the phenolic extracts from the cocoa bean, nib, and liquor were not significantly different, ranging from 0.04 to 0.06 and 0.09 for CE and PCE, respectively. In contrast, the CE powder and PCE showed the lowest antioxidant activity, expressed as the highest EC<sub>50</sub> (being 0.18 and 0.10, respectively).

Total antioxidant activity in most cocoa and chocolate samples assayed by the ORAC method was mainly attributed to the hydrophilic ORAC (H-ORAC) because H-ORAC made up  $\geq 90\%$

of the total antioxidant capacity (19). For that reason, in this study, only the H-ORAC from all of the cocoa extracts was also measured (Table 4). The rank order of the antioxidant activity was the same as the DPPH results for the CE. However, the antioxidant activity for the PCE followed the order nib  $\approx$  liquor > bean  $\approx$  powder (significant difference  $p < 0.05$ ). It is noteworthy that the purification step of the PCE powder increased the H-ORAC activity in comparison with the effect of the purification of the PCE of the other cocoa sources. This fact could be explained due to the concentration of some phenolic compounds in this extract such as catechin monomer, which showed statistically the highest content of all the PCEs, and also the levels of some flavones, such as dihydroxykaempferol, kaempferol, luteolin, and quercetin and their glucoside forms increased by at least twice (Tables 2 and 3). As Figure 2 shows, all of these phenolic compounds showed a catechol group in the B ring, capable of attributing the major antioxidant activity to the PCE powder. It could thus appear that the increase in these phenolic compounds was the consequence of the increased antioxidant activity detected by the H-ORAC assay in PCE powder.

Differences in the antioxidant activity of the PCE powder obtained by the DPPH and H-ORAC assays could be due to the fact that the two antioxidant methods are based on different responses to the radical source. The ORAC assay uses a biologically relevant radical source and combines inhibition time and degree of inhibition into a single quantity. It is based on the ability of an antioxidant to quench free radicals by hydrogen donation. In contrast, the DPPH assay is based on the detection of a potential antioxidant to transfer one electron to reduce the DPPH free radical. In addition, by the DPPH method a number of flavonols and procyanidins were shown to be active, although some flavones, such as apigenin, naringin, naringenin, and others, showed no activity (18). Moreover, the 2,3-double bond and the 3-OH group, which is also shown in the flavone structures (Figure 2) quantified in the cocoa phenolic extracts of this study, appeared to intensify the radical scavenging power. Apparently in our study the flavone content seemed to increase the radical scavenging response of the cocoa phenolic extracts in the DPPH method. Thus, the lowest flavone content in powder PCE, in comparison with the other cocoa sources, could be an explanation for the different antioxidant activity values expressed by DPPH and H-ORAC.

**Conclusion.** According to the aim of the study, focused on obtaining a rich phenolic cocoa extract for use as an ingredient in the food industry, the nib was shown to be the most interesting source for obtaining a rich phenolic cocoa extract, which showed the highest polyphenol content and also antioxidant activity. These are probably related to the effect of the grinding and roasting operations, which disrupt the cells of the bean tissue, which could explain the greater solubilization of the phenols.

#### LITERATURE CITED

- Counet, C.; Collin, S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6816–6822.
- Othman, A.; Ismail, A.; Ghani, N. A.; Adenan, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1523–1530.
- Adamson, G. E.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Prior, R. L.; Cao, G.; Jacobs, P. H.; Kremers, B. G.; Hammerstone, J. F.; Rucker, R. B.; Ritter, K. A.; Schmitz, H. H. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4184–4188.
- Sies, H.; Schewe, T.; Heiss, C.; Kelm, M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 304S–12S.
- Vinson, J. A.; Proch, J.; Bose, P.; Muchler, S.; Taffera, P.; Shuta, N.; Samman, N.; Agbor, G. A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8071–8076.
- Lamuela, R. M.; Romero, A. I.; Lacueva, C.; Tornero, A. Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Sci. Technol. Int.* **2005**, *11*, 159–176.
- Cooper, K. A.; Donovan, J. L.; Waterhouse, A. L.; Williamson, G. Cocoa and health: a decade of research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 1–11.
- Engler, M. B.; Engler, M. H. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr. Rev.* **2006**, *64* (3), 109–118.
- Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 423–447.
- Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Rucker, R.; Schmitz, H. H. Identification of procyanidins in cocoa and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 490–496.
- Summa, C.; Raposo, F. C.; McCourt, J.; Lo Scalzo, R.; Wagner, K.; Elmadfa, I.; Anklam, E. Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 368–375.
- Wollgast, J.; Pallaroni, L.; Agazzi, M. E.; Anklam, E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometry and tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *926*, 211–220.
- Rabaneda, F. S.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Lacueva, C. A.; Pulido, M. I.; Raventós, R. L. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 35–42.
- Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7292–7295.
- Gu, L.; House, S. E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4057–4061.
- Ortega, N.; Romero, M. P.; Macía, A.; Reguant, J.; Angles, N.; Morello, J. M.; Motilva, M. J. Comparative study of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determinate procyanidins and alkaloids in cocoa samples *Food Chem.* **2008**, submitted for publication.
- Sarkar, S. K.; Howarth, R. E. Specificity of the vanillin test for flavonols. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *24*, 317–320.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
- Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4026–4037.

Received for review May 8, 2008. Revised manuscript received August 29, 2008. Accepted September 4, 2008. This work was supported by the CENIT program from the Spanish Minister of Industry and by the consortium of companies led by La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain) with the following companies: Nabisco Iberia, S.L.; BTSA, Biotecnologías Aplicadas, S.L.; Selección Batallé, S.A.; Industrial Técnica Pecuaria, S.A.; Neuron BioPharma, S.A.; Shirota Functional Foods, S.L.; Grupo Leche Pascual, S.A.U.; and Innaves, S.A. Nàdia Ortega is supported by FIE 2006 program from the Catalan government (Interdepartmental Commission for Research and Technological Innovation).

JF8014415



## Capítol 4

Extracts of carob flour rich in flavonoids and phenolic acids: optimization of the extraction parameters sources

Journal Agricultural Food and Chemistry  
enviat al novembre 2009





## Extracts of Carob Flour Rich in Flavonoids and Phenolic Acids: Optimization of the Extraction Parameters

NÀDIA ORTEGA<sup>†,‡</sup>, MARIA-PAZ ROMERO<sup>†</sup>, ALBA MACIÀ<sup>†</sup>, JOSE-RAMON MORELLO<sup>‡</sup>,  
JORDI REGUANT<sup>‡</sup>, MARIA-JOSE MOTILVA<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Food Technology Department, XeRTA-UTPV, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria  
Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

<sup>‡</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Spain

\*Corresponding Author. Tel: +34 973 702817; Fax: + 34 973 702596;

E-mail address: motilva@tecal.udl.es (Dra. Maria-José Motilva)

### Abstract

The aim of this study was to optimise different extraction parameters to obtain a phenol extract rich in flavonoids and phenolic acids from carob flours for potential use as an ingredient in the formulation of new functional foods. The parameters evaluated to obtain the maximal phenolic yield were: (i) a first step of washing with water to remove the soluble sugars fraction from the carob flour; (ii): solvent extraction mixture (methanol, ethanol and acetone, with different water proportions); (iii): mechanical polytron and sonicator extraction systems. The maximal phenolic yield of the carob flour extract was obtained by the combination of a washing step with water and using acetone:water (70:30, v/v) as a solvent extraction mixture. Indeed, a wide range of phenolic acids and flavonoid compounds were identified and quantified in the carob flour phenolic extracts obtained, among which gallic acid and myricetin-glycosides were the predominant phenol compounds.

Keywords: carob flour, phenols, phenol extraction, antioxidant activity, ORAC, UPLC-MS/MS

### 1. Introduction

Phenolic compounds are common dietary components of fruit, vegetables and grains. Over the last decade, several studies have suggested that polyphenols may protect against many degenerative diseases (1). In addition, most of the beneficial characteristics of these compounds have been related to their antioxidant activity (2, 3). As a consequence, there is increasing interest in polyphenol compounds as natural antioxidants due to their reported potential nutritional benefit. Economically, one of the best polyphenol sources are those obtained from by-products during the manufacture of vegetable products.

The carob tree, *Ceratonia siliqua*, is a specie of flowering evergreen shrub or tree from the pea family, Fabaceae, that is native to the Mediterranean region. The carob was eaten in Ancient Egypt and it was also a common sweetener represented in the hieroglyph for "sweet". In ancient civilisations, the carob pods were an important source of sugar before cane sugar and sugar beet became widely available. Apart from the pods, the carob tree provides carob seeds, which have been traditionally used in animal feed and as locust bean gum in the food industry (4), respectively. The modern uses of carob in the food industry are based on the slightly sweet taste of the dried or roasted carob, used in powder or chip form as an ingredient in cakes and cookies. Besides these applications, the carob is used as a substitute for chocolate in some food formulations, mainly for baby-foods. As well as its use as a sweetener, recent studies have demonstrated that carob pods and their derivatives are an interesting and cheaper source of food polyphenols (5, 6).

There are several methods for extracting polyphenols from plant materials depending on the solvents, equipments and conditions used. All these extraction variables are essential for the final phenolic content of the extract and for its antioxidant activity. The effect of solvent mixtures on polyphenol extraction have been the most widely researched factor in the extraction of polyphenols from plant material (7) and have shown that extraction yield efficiency is mainly dependent on the solvent and extraction system. Similarly to other plant sources water, aqueous mixtures of ethanol, methanol and acetone have been commonly used to extract polyphenols from carob pods (6, 8). Also, several studies have used cool or boiling water to extract polyphenol compounds from carob pods (4, 9-10). Nevertheless, the use of water as a phenolic extraction solvent could also solubilise the sugar fraction, thus affecting the total polyphenol recovery. Other aqueous solvent mixtures, such as methanol and acetone (6, 8) or absolute methanol and ethyl acetate (6), have been used for the polyphenol extraction from carob pods. Makris *et al.* (6) did a first approach to the efficiency of several solvents in carob pods testing ethylacetate, methanol and several aqueous mixtures (methanol 80:20, v/v; acetone 80:20, v/v and acetonitrile 80:20, v/v). They described acetone mixture (80:20, v/v) extracts as the most effective for phenol extraction. Nonetheless, no further polyphenol structure identification was carried out to characterize the obtained polyphenol extract. With the same aim, Papagiannopolous *et al.* (11) studied extraction efficiency using several acetone-water percentages, demonstrating the impact of the solvent percentage on the polyphenol extraction selectivity due to the different polarity of the phenol compounds in carob derivatives (kibbles, syrup, fiber and flour). However, the results are difficult to compare because the phenols were analyzed by different methods and most of them are only reported as the total phenolic content.

Several authors reported antioxidant activity in carob pods, suggesting that pod derivatives could be a source of natural antioxidants due to the condensed tannin fraction (5, 8). Furthermore, some studies have also paid attention to the functionality of carobs as a technological tool for the food industry. For example, Botega *et al.*, (12) evaluated Exxenterol® (a denatured carob fiber rich in non-extractable tannin extract) as a protector to reduce tocopherol losses, triacylglycerol polymerization and oxidation in sunflower oil heated to frying temperatures. From this point of view, Bastida *et al.* (13) also evaluated Exxenterol® to prevent lipid oxidizing during chilling and frozen storage of cooked pork meat. Finally, in a recent study, Klenow *et al.* (14) showed a chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells from an aqueous carob extract, rich in condensed tannins and gallic acid as the main free phenolic compound.

Taking the potential use of and interest in the carob derivatives into account, the aim of this work was focused on optimising the phenolic extraction procedure from carob flours in order to obtain the maximum flavonoid and phenolic acid yield. Different variables were considered for this: (i) a prior water-washing step of the dry material to enhance the efficiency of extraction, (ii) six solvent mixtures and (iii) two mechanical procedures. Two parameters were considered for monitoring the phenol yield efficiency: the total phenol content and the antioxidant activity of the obtained extracts. After the optimization of the phenol extraction, the richest phenol extract was characterized to give a detailed phenolic profile. This research will give the food industry useful information about choosing suitable conditions for obtaining rich phenol extracts from carob flour.

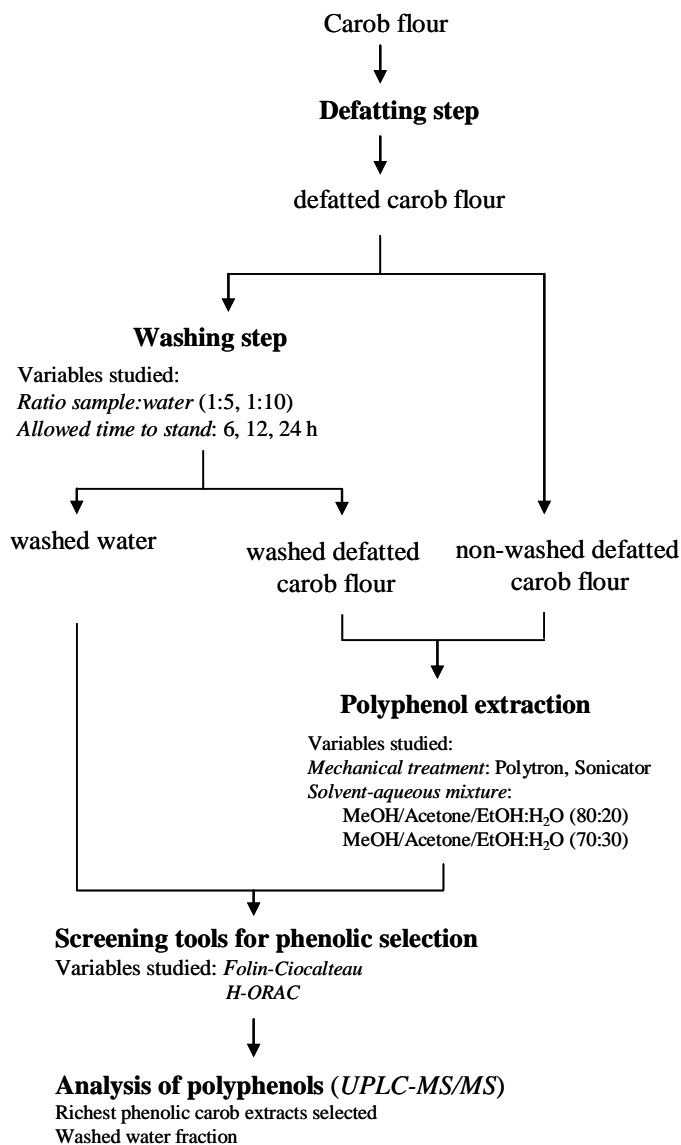
## 2. Materials and methods

### Chemicals and reagents

The fluorescein (FL), Folin-ciocalteu reagent and kaempferol were from Fluka Co (Buchs, Switzerland). 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were from Acros Organics (New Jersey, USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Caffeine, theobromine, syringic acid, naringenin and myricetin were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ferulic acid, *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, cinamic acid, quercetin, apigenin, genistein and luteolin were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Gallic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

## Extraction procedure

A general scheme illustrating the three-step extraction procedures (defatting, washing and phenol extraction) and the variables studied can be seen in **Figure 1**.



**Figure 1.** Scheme for preparing the polyphenol carob extract.

*Defatting step:* in order to maximise yield efficiency during the sample preparation, 15 g of carob flour were firstly defatted with 125 ml of hexane for 20 min in an orbital shaker (Selecta, Barcelona, Spain) at 200 rpm, and subsequently centrifuged for 15 min at 15000*g*.

*Washing step:* Defatted carob flour was washed with water in two different ratios (1:5 and 1:10) and allowed to stand for three different times (6, 12 and 24 hours) at 4° C. The resulting mixture was

centrifuged for 15 min at 15000g and the residue (washed carob flour) was used to continue with the phenol extraction.

*Phenol extraction:* the defatted carob flour (non-washed) and the washed defatted carob flour were then extracted with different solvent-aqueous mixtures (methanol, ethanol and acetone) in two different proportions (80:20, v/v and 70:30, v/v). Polytron and sonicator were tested as two kinds of mechanical treatment during the phenol extraction. For each experiment, after the addition of extraction solvent mixture (in a ratio 1:5 sample:solvent mixture, w/v), the samples were treated by sonicator or polytron for 5 min and then centrifuged for 15 min at 15000g. The extraction procedure was repeated three more times after the addition of the extraction solvent mixture. All the supernatants (four) were then combined from the centrifuged tubes and filtered with glass wool. The organic solvent (methanol, acetone and ethanol) was removed by rotary evaporation (Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) under partial vacuum at 30° C. Finally, the phenolic water extract was freeze-dried (Lyobeta, Telstar, Barcelona, Spain) and stored at -80° C in N<sub>2</sub> atmosphere before the phenol analysis.

### **Total Phenol content**

The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used to measure the total phenol content of the extracts. An aliquot of lyophilized phenolic extract dissolved in the respective solvent extraction mixture was diluted with 5 ml of MilliQ water, and 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent was added. After 3 min, 1 ml of sodium carbonate was added, the content was mixed and MilliQ water was added up to the final volume of 10 ml. After 60 min standing in darkness, the absorbance was measured in the spectrophotometer at 725 nm. The results are expressed as mequivalents of gallic acid per g lyophilized phenolic extract obtained from defatted washed and defatted non-washed carob flour (**Figure 1**).

### **Antioxidant activity**

The antioxidant activity of the different phenol extracts was monitored with the ORAC assay. The method was performed as described by Ou *et al.* (15), slightly modified, in a FLUORstar optima spectrofluorometric (BMG GmbH, Offenburg, Germany). The measurement in this work was focused in the hydrophilic fraction (H-ORAC). The reaction was carried out in phosphate buffer (pH 7.4), which is considered the assay buffer solution. Each carob phenolic extract obtained was dissolved in its respective solvent extraction mixture, and then diluted in the assay buffer solution to obtain a concentration range to use during the analysis. AAPH was used as a peroxy generator, and it was

prepared in an assay buffer at 37° C immediately before each assay. Trolox was used as a standard (concentration range from 12.5 to 100 µM) and assay buffer as a blank. The H-ORAC values were calculated by a linear regression equation between Trolox or the phenolic carob extract concentration and the net area under the FL decay curve. The results are expressed as µmol of Trolox equivalent per g lyophilized phenolic carob extract.

### **Analysis of the phenolic composition of optimized carob flour extracts by UPLC-MS/MS**

The obtained phenolic carob extracts were characterised according to the chromatographic method described in a previous work (16). The chromatographic analyses were performed using a Waters Acquity Ultra-Performance liquid chromatography system (Waters, Milford MA, USA), equipped with a binary pump system (Waters, Milford, MA, USA). The UPLC analyses were performed using an Acquity High Strength Silica (HSS) T3 column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm particle size) also from Waters (Milford MA, USA). The mobile phase was Milli-Q water/acetic acid (0.2%), as solvent A, and acetonitrile, as solvent B. The flow-rate was 0.4 ml/min, and the temperature was set at 30° C. The UPLC was coupled to a PDA detector Acquity UPLC and a TQD mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The wavelengths in the PDA detector were set at 278 nm and 339 nm.

The tandem MS analyses were carried out on a TQD mass spectrometer (Waters, Milford MA, USA) equipped with a Z-spray electrospray interface. The analyses were done in negative mode for all the phenolic compounds, and in positive mode for the alkaloids in a single run, and the data were acquired by selected reaction monitoring (SRM). The dwell time established for each transition was 30 ms. Data acquisition was carried out by MassLynx v 4.1 software.

The lyophilized phenolic carob extract was dissolved in the solvent extraction (acetone:water, 70:30, v/v) at a concentration of 10 mg/ml and filtered through 0.22 µm nylon filters before the chromatographic analysis by UPLC, as described before. The sample volume injected was 2.5 µl. The results of the quantification of the phenolic acids, the aglycon flavonoids and the alkaloids (caffeine and theobromine) were expressed as mg standard per g of carob extract. Methyl gallate was quantified as gallic acid. All the flavonoid glycosides were quantified as mg of the corresponding aglycon. The results of the quantification were expressed as mg per g of phenolic carob extract.

### Statistical analysis

All measurements were done in triplicate (n=3) and the values were averaged and given with the standard deviation ( $\pm$ SD).

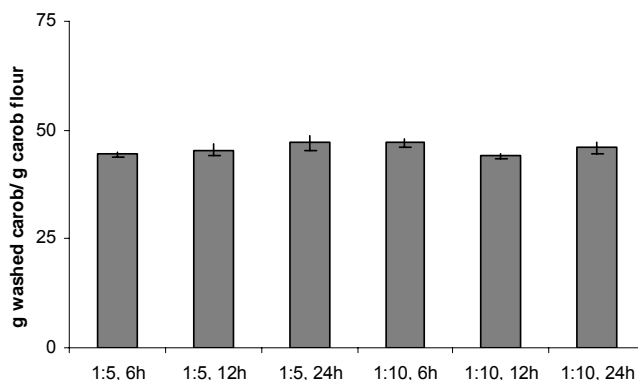
## 3. Results and discussion

### Optimization of extraction procedure

Washing the defatted carob flour with water has been proposed in order to remove the sugar fraction, which is supposed to be about 40-50% of the sample weight (8). According to Kumazawa *et al.* (5), removing the sugar fraction is necessary to achieve maximum yield efficiency for polyphenols in carob derivatives because of the sugar solubility in the solvent mixtures (organic-aqueous) could interfere with the phenol extraction procedure. So, taking this into account in the present study, this step was investigated in order to improve the phenol yield efficiency. Nevertheless, due to the washed step, several phenolic compounds could be solubilised into the washed water fraction. In order to evaluate the possible losses in terms of phenolic compounds, this fraction is also taken into account and analyzed. The results of the previous study by Kumazawa *et al.* (5) proposed the application of a washing step on the carob pod keeping the sample in contact with water for 24 hours. In the present study, it is proposed to optimize this step in terms of sample:water ratio (1:5 and 1:10) and the allowed contact time (6, 12 and 24 hours) at refrigerator temperature (4° C). The results obtained for the evaluation of the sample:water ratio at different times showed no significant differences ( $p < 0.05$ ) in the recovery values with 1:5 and 1:10 ratios being in contact for 6, 12 or 24 hours at 4° C. **Figure 2** shows the efficiency of the removal of the sugar fraction under the conditions proposed for this step. Regarding from an industrially point of view, the economic target is to minimise solvent use, time and energy. Thus, the results show that the 1:5 sample:water relation for 6 hours was enough to remove the sugar fraction from the matrix, the carob flour.

With regard to the most influential experimental variables on the extraction procedure reported in previous studies with carob fruit, the type and percentage of solvent mixtures have been attributed to be the main influence on the extraction selectivity of the different phenolic compounds (6, 8). In general, the recovery efficiency of polyphenols in plant material has been influenced by the solubility of these compounds in the solvent mixtures used during the extraction procedure. Normally, mixtures of alcohols and water have been shown to be more efficient in extracting polyphenols from vegetables and fruit (17, 18). Thus, the evaluation of the optimum solvent extraction in this study

was performed with three different solvent mixtures: methanol:water (MeOH:H<sub>2</sub>O), ethanol:water (EtOH:H<sub>2</sub>O) and acetone:water (acetone:H<sub>2</sub>O), at two ratios, 80:20, v/v and 70:30, v/v (**Figure 1**). The choice of methanol has been taken into account as it is the most usual extraction solvent for polyphenols in plant materials (17, 18). Since its use is not desirable in the food industry, we have proposed the use of ethanol as an alternative because its polarity properties are similar to those of methanol, and are more acceptability for human consumption.



**Figure 2.** Removal efficiency of the sugar fraction by the washed step in relation to the ratio flour:water and washing time (hours). The results are expressed as g washed carob flour/ g carob flour.

Finally, the main reason for choosing acetone is justified in some previous studies focused on carob pods by its high efficiency at the extraction of phenols in simple phenolic acids and flavonoid compounds (6, 8). Besides the sample washing step and the extraction solvent mixture, other factors were considered in the optimization of the phenol extraction, such as the mechanical treatment of the material. The sonicator and polytron were used to optimise the mechanical system due to their high capacity to disrupt plant cell structure and facilitate phenol solubilization. All the steps during the phenol extraction in this study were done at temperature values below 25° C. Firstly, the washing step was carried out in refrigerated conditions (at 4° C) and the phenol extraction at room temperature (25° C); contact with ice being necessary around the extraction tub to avoid an increase in the temperature using the sonicator as mechanical treatment. Finally, in relation to the number of steps in the phenol extraction, four times was chosen to guarantee the rupture of cell membranes and enhance the extraction of endocellular material during the polytron and sonicator extraction processes.

Bearing in mind that the aim of this study is to obtain carob extracts rich in phenolic acids and flavonoids, the study of the variables parameters defined above (solvent mixtures and



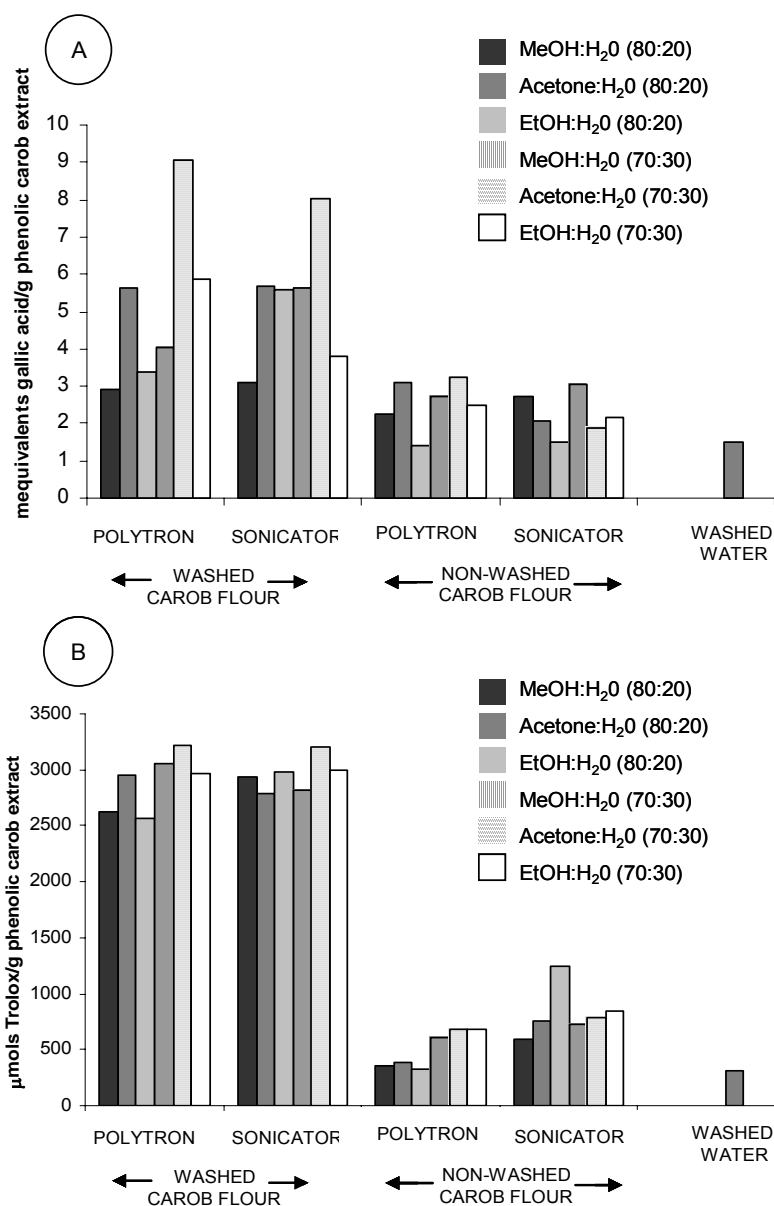
mechanical treatment) from washed and non-washed defatted carob flour matrix was proposed (**Figure 1**). To evaluate the effectiveness of the variables studied, the Folin-Ciocalteu and ORAC assay for the quantification of the total phenol content and characterization the antioxidant activity from the obtained carob extracts were selected, respectively. The results of the total phenol content from the different carob extracts obtained is shown in **Figure 3A**.

A significant difference can be seen between the carob extracts obtained from defatted washed and defatted non-washed carob flour in all the solvent mixtures studied, which values ranged from 2.9 to 9.1 and 1.4 to 3.2 mequivalents of gallic acid/g phenolic carob extract, respectively. These values show how washing carob flour with water allows a concentration of the total phenol content in the carob extracts, independently of the solvent mixture and mechanical treatment used. The total phenol content extracted by the selected solvents mixtures was in the following decreasing order: acetone:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) > EtOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) > acetone:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) > MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) > EtOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) > MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). Taking into account only the carob extracts from defatted washed carob flour, the use of acetone:H<sub>2</sub>O at 70:30 (v/v) seems to be the best solvent mixture for extracting phenols from carob flour. Several studies reported that acetone:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) with or without acid was most efficient the solvent mixture for polyphenol recovery in beach pea (19) and cocoa derivatives (20). These results agree with those reported by Avellone *et al.* (8), in which the best solvent mixture in carob pods was the same proportion of acetone:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v). In contrast, in the study by Makris *et al.* (6), in which methanol, acetonitrile and acetone were compared, acetone:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) showed the most efficient polyphenol extraction from carob pods. There are other factors that could explain these slight differences in acetone:H<sub>2</sub>O ratio such as the origin and variety or treatment of carob pod analyzed.

Regarding the polytron and sonicator mechanical treatments used, slightly lower phenol extraction values were observed in those carob extracts obtained using sonicator equipment. Moreover, as mentioned above, the use of sonicator sometimes needed the use of ice to maintain the extraction temperature at 25° C. For that reason, the use of polytron can be proposed as the best equipment to achieve the same efficiency phenol yields.

As a final point, to evaluate possible losses during the washing step, the washed water fraction was also analyzed (**Figure 1**). The value of the total phenol content ranges from 1.5 mequivalents of gallic acid/g washed water fraction (**Figure 3A**). This response to the Folin-Ciocalteu reagent could be mainly attributed to phenolic acids solubilised in the water during the washing step. However, the total phenol content in this fraction is negligible in relation to the total phenol content of the extracts

obtained from defatted non-washed carob flour. Therefore phenol losses during the washing step are minimal.



**Figure 3.** (A) Total phenol content expressed as mequivalents of gallic acid/g phenol extract obtained from washed and non-washed carob flour. (B) H-ORAC expressed as µmols of Trolox/g phenol extract obtained from washed and non-washed carob flour.

To optimize the extraction variables, as well as the total phenol content, the antioxidant activity of the different carob extracts was also considered by the application of the ORAC assay. The ORAC assay uses a biologically relevant radical source and combines inhibition time and the degree of inhibition into a single quantity. It is based on the capacity of an antioxidant to quench free radicals by hydrogen donation. **Figure 3B** shows the values of the H-ORAC from the different carob

phenol extracts obtained from defatted washed and defatted non-washed carob flour. As can be seen, the carob phenol extracts obtained from defatted washed carob flour showed higher antioxidant activity compared with those obtained from defatted non-washed carob flour. Regarding the carob phenol extracts from defatted washed carob flour, those obtained with acetone:H<sub>2</sub>O mixture at ratio 70:30, v/v showed the highest antioxidant value. On the other hand, no differences were shown with the other solvent mixtures. The comparison of the antioxidant activity of carob phenol extracts obtained in the present study with other literature results is difficult, while no evaluation in carob fruit or derivatives has been done with this test. However, as a similar matrix to cocoa, it can be claimed that the antioxidant activity of carob extracts obtained from defatted washed carob flour based in the ORAC method, was comparable that in with phenolic cocoa extracts (20). Finally, the washed water fraction was also characterized in terms of antioxidant activity. The value of the antioxidant activity of this fraction was lower than all the carob phenol extracts (**Figure 3B**). Thus, the loss of this slightly active phenolic fraction in the washed water could be justified by the removal of the soluble sugar fraction, which supposes an increase in the phenol yield of the carob extracts obtained from the washed carob flour compared with extracts obtained from non-washed carob flour.

Bearing in mind the results obtained, the optimum extraction procedure to obtain the richest phenol carob extracts in terms of phenol content and antioxidant activity comprises: (i) a washing step of the sample (defatted carob flour) at a sample:water ratio of 1:5 during 6 hours at 4° C; (ii) acetone:H<sub>2</sub>O 70:30, v/v as an extraction mixture with polytron as mechanical treatment.

### **Analysis of the phenol profile of optimized carob flour extracts by UPLC-MS/MS**

The aim of the extraction method proposed in this study was not only to quantify the recovery of the carob extract, but also to identify the highest number and classes of phenolic acids and flavonoid compounds. Knowledge of the precise composition of carob extracts may contribute to a better understanding of their influence on the biological properties (14). For this proposal, it has selected the obtained carob flour phenol extract during the first part from defatted washed and defatted non-washed carob flour performed with acetone:H<sub>2</sub>O 70:30, v/v using polytron. Moreover, in order to evaluate the nature of the phenol losses during the washing step, the washed water fraction was also characterized.

The concentration of the phenolic compounds and alkaloids in the selected carob extracts and in the washed water fraction, analyzed by UPLC-MS/MS, are shown in **Table 1**. Three different

phenolic groups were identified and quantified in the extracts: phenolic acids, flavonoids aglycones and some of their glycoside forms.

**Table 1.** Composition of phenolic acids, flavonids and alkaloids of phenolic extracts from washed and non-washed carob flour, and the washed water fraction.

Compound	Extract from	Extract from	washed water fraction*
	washed carob flour*	non-washed carob flour*	
	(mg/g extract)	(mg/g extract)	(mg/g extract)
cinamic acid	0.34 ± 0.11	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01
<i>p</i> -coumaric acid	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
gallic acid	6.76 ± 0.23	4.86 ± 0.26	3.56 ± 1.23
ferulic acid	0.11 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.01
syringic acid	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
<b>Total phenolic acids</b>	<b>7.30 ± 0.35</b>	<b>5.05 ± 0.29</b>	<b>3.68 ± 1.52</b>
genistein	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00
apigenin	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01
naringenin	0.09 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
luteolin	0.59 ± 0.10	0.08 ± 0.02	0.00 ± 0.00
kaempferol	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
quercetin	0.20 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.00 ± 0.00
myricetin	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.00 ± 0.00
<b>Total flavonoids aglycone</b>	<b>1.37 ± 0.23</b>	<b>0.33 ± 0.05</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>
methyl gallate	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.03
apigenin-glucoside	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
kaempferol-rhamnoside	1.88 ± 0.34	0.32 ± 0.08	0.02 ± 0.00
quercetin-arabinoside	1.03 ± 0.13	0.16 ± 0.03	0.01 ± 0.00
quercetin-rhamnoside	3.35 ± 1.88	0.86 ± 0.22	0.05 ± 0.02
quercetin-glucoside	1.49 ± 0.19	0.25 ± 0.05	0.03 ± 0.01
myricetin-rhamnoside	16.14 ± 0.45	3.03 ± 0.46	0.37 ± 0.16
myricetin-glucoside	5.54 ± 0.46	0.96 ± 0.22	0.20 ± 0.07
<b>Total flavonoids glycoside</b>	<b>29.60 ± 3.47</b>	<b>5.68 ± 1.07</b>	<b>0.76 ± 0.31</b>
<b>Total phenolic compounds</b>	<b>38.27 ± 4.06</b>	<b>11.06 ± 1.41</b>	<b>4.44 ± 1.84</b>
caffeine	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00
theobromine	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00
<b>Total alkaloids</b>	<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.12 ± 0.04</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3)

\* Extraction conditions: extraction with acetone:H<sub>2</sub>O (70:30) and polytron

Among all the phenol compounds quantified, myricetin-rhamnoside was the predominant and its concentration was 16.14 and 3.66 mg/g of extract, followed by gallic acid with 6.76 and 4.66 mg/g extract obtained from washed and non-washed carob flour, respectively. It is interesting to note that the average values of the main phenolic compound (myricetin-rhamnoside) in the extract obtained from defatted washed carob flour were five times higher than those obtained from defatted non-

washed carob flour. It is known that flavonoids possess a broad spectrum of biological activities but such properties vary with the flavonoid type. For example, it has been shown that the beneficial effects of Ginkgo biloba extracts on brain neurons in ischemia diseases are partially attributed to myricetin's ability to reduce oxidation by hydrogen peroxide (21). Moreover, Ong *et al.* (22) reviewed the potential role of miryctin as an antioxidant, anticarcinogen, antimutagen, antiviral, antithrombotic and antidiabetic. Recent studies have also demonstrated these cited actions (23-24). The high concentration of myricetin and its glycoside forms, myricetin-rhamnoside and myricetin-glucoside, in the extracts obtained from washed carob flour obtained in this present study can lead to use it as a potential source of nutraceutical ingredient.

It is noteworthy that the quantification of the the gallic acid content did not vary so much between the two types of extracts from washed and non-washed carob flour. As reported, gallic acid is the main phenolic compound in carob pods and derivatives (9, 11). Unlike the flavonoid fraction, the first step of washing the carob flour does not lead to a notable increase in the phenol extraction yield. Analysing the washed water fraction shows that the loss of phenolic compounds is mainly attributed to gallic acid. However, this loss could be justified by the increased concentration in terms of polyphenol content in the extract from defatted washed carob flour.

Finally, minor concentrations of two alkaloids, theobromine and caffeine, were also detected in the carob extracts (**Table 1**). Their concentration is slightly lower for the extract from the washed carob flour compared to the extract from the non-washed carob flour. This could be the last reason for choosing the extracts from defatted washed carob flour for future applications as ingredients in food formulations. Nevertheless, the contents of both alkaloids can be considered low in comparison with other plant extracts, such as those obtained from cocoa derivatives (20).

Our results suggest that the optimal method for obtaining a rich phenol extract from carob flour should include a first washing step with water. This prior treatment of the raw material seems to be the best way to eliminate the sugar fraction and facilitate the subsequent phenolic extraction. Moreover the use of acetone:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) has been shown to be the best solvent mixture combination to maximise phenolic yield. The phenol carob flour extracts obtained showed an antioxidant activity (ORAC value) of interest, as well as a high content of flavonoids, mainly myricetin-rhamnoside and myricetin-glucoside, and phenolic acids. The low content of alkaloids reinforces the interest of the carob flour as a phenol source in the formulation of functional foods.

## Literature Cited

- (1) Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 950-988.
- (2) Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition reviews.* **1998**, *56*, 317-333.
- (3) Miller, N.; Ruiz-Larrea, B. Flavonoids and other plant phenols in the diet: their significance as antioxidants. *J. Nutr. Environ. Med.* **2002**, *12*, 39-51.
- (4) Marakis, S. Carob bean in food and feed: current status and future potentials-a critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.* **1996**, *33*, 365-383.
- (5) Kumazawa, S.; Taniguchi, M.; Suzuki, Y.; Shimura, M.; Kwon, M.S.; Nakayama, T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 373-377.
- (6) Makris, D.; Kefalas, P. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42* (2), 105-108.
- (7) Sun, T.; Ho, C. Antioxidant activity of buckwheat extracts. *Food Chem.* **2005**, *90*, 743-749.
- Avallone, R.; Plessi, M., Baraldi, M.; Monzani, A. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.* **1997**, *10*, 166-172.
- (8) Owen, R.W.; Haubner, R.; Hull, W.E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; Haber, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicology.* **2003**, *41*, 1727-1738.
- (9) Corsi, L.; Avallone, R.; Cosenza, F.; Baraldi, C.; Baraldi, M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia.* **2002**, *73*, 674-684.
- (10) Papagiannopoulos, M.; Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.; Mellenthin, A.; Haber, B; Galensa, R. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3784-3791.
- (11) Botega, D.; Bastida, S.; Marmesat, S.; Pérez, L.; Ruiz, B.; Sánchez, J. Carob fruit polyphenols reduce tocopherol loss, triacylglycerol polymerization and oxidation in heated sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 419-425.
- (12) Bastida, S.; Sánchez, F.; Olivero, R.; Pérez, L.; Ruiz, B.; Jiménez, F. Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meta systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry.* **2009**, *116*, 748-754.

- (13) Klenow, S.; Jahns, F.; Pool-Zobel, B.; Gleis, M. Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 2999-3004.
- (14) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619-4626.
- (15) Ortega, N.; Romero, M.P.; Macià, A.; Trullols, E.; Morelló, J.R.; Anglès, N.; Motilva, M.J. Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flour by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7239-7244.
- (16) Spingo, G.; Tramelli, L.; De Faveri, D. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering.* **2007**, *81*, 200-208.
- (17) Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J. Núñez, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*, 2111-2117.
- (18) Chavan, U.; Shahidi, F.; Naczk, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry.* **2001**, *75*, 509-512.
- (19) Ortega, N.; Romero, M.P.; Macià, A.; Reguant, J.; Anglès, N.; Morelló, J.R.; Motilva, M.J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9621-9627
- (20) Oyama, Y.; Fuchs, P.; Katayama, N.; Noda, K. Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of *Ginkgo biloba* extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca<sup>2+</sup> - loaded brain neurons. *Brain Research.* **1994**, *635*, 125-129.
- (21) Ong, K.; Koo, H. Biological effects of Myricetin. *Gen Pharmac.* **1997**, *29*, 121-126.
- Morcer, B. Efficacy of myricetin as an antioxidant in methyl esters of soybean oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 1167-1174.
- (22) Lian, T.; Wang, L.; Lo, Y.; Huang, I.; Wu, M. Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta.* **2008**, *1781*, 601-609.





## Capítol 5

Effect of fat content on the digestibility and  
bioaccessibility of cocoa polyphenol by an  
in vitro digestion model

Journal Agricultural Food and Chemistry  
2009, 57, 5743-5749



## Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an *In Vitro* Digestion Model

NÀDIA ORTEGA,<sup>†,‡</sup> JORDI REGUANT,<sup>‡</sup> MARIA-PAZ ROMERO,<sup>†</sup> ALBA MACIÀ,<sup>†</sup> AND MARIA-JOSE MOTILVA<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Food Technology Department, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain, and <sup>‡</sup>R + D + i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Spain

This work describes the applicability of an *in vitro* digestion model for the evaluation of the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenols (procyanidins, phenolic acids, and flavones) and for the study of the food matrix effect in relation with the fat content. For this purpose, two cocoa samples, cocoa liquor ( $\approx 50\%$  fat content) and cocoa powder ( $\approx 15\%$  fat content), were used. The results showed an important increase of the concentration of procyanidin (monomers and dimers), probably due to the hydrolysis of procyanidins with a high degree of polymerization (pentamers to nonamers) submitted to the digestion procedure. In relation to flavones, the concentration of aglycone forms remained almost constant after the digestion steps; in contrast, the concentration of the glycoside forms an increase in the digestion mixtures mainly after the duodenal step, probably as a result of the partial digestion of the dietary fiber present in the cocoa. The higher fat content in the cocoa liquor seemed to have a protective effect, probably related with a better micellarization that favors the stability of polyphenols during digestion.

**KEYWORDS:** Cocoa; phenols; procyanidins; *in vitro* digestion model; digestibility; bioaccessibility; food matrix effect

### INTRODUCTION

It is well-known that cocoa contains a wide range of polyphenols, especially procyanidins, with a high degree of polymerization. Procyanidins are a class of polyphenolic polymer composed of flavan-3-ol (catechin and epicatechin as monomers). Moreover, small amounts of flavonoids and phenolic acids have been found in various cocoa-derived products (1). Numerous studies have reported a relation between the consumption of cocoa derivatives, especially dark chocolate, with beneficial health effects on cardiovascular diseases related with the antioxidant activity of procyanidins (2, 3). Related with the health-protective effect of cocoa polyphenols, increasing interest has been devoted to evaluate their modifications, in composition and quantity, during the multiple steps from cocoa bean to chocolate that involve seed fermentation, roasting, nib-grinding, alkalizing, and conching (4).

These health benefits have led many studies to focus on the bioavailability of cocoa polyphenols. Several *in vivo* studies have detected procyanidin monomers and dimers in human plasma (5, 6) and the small intestine of rat (7) after the ingestion of cocoa. The bioavailability of procyanidins oligomers from cocoa samples (3) and the effects of the chiral nature of monomers, catechin and epicatechin, have also been studied (8). Schramm et al. (9) concluded that the food matrix could have an important effect on polyphenol absorption and bioavailability.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 973 702817. Fax: +34 973 702596. E-mail: motilva@tecal.udl.es.

A factor common to all of the *in vivo* studies is the intersubject variability, which influences the interpretation of the obtained data to determine the bioavailability of the cocoa polyphenols. In addition to this individual variability, the composition of the food matrices could also determine the bioavailability of polyphenols.

Several *in vitro* digestion models have been applied to different food matrices to measure the release of polyphenols during digestion (10, 14). These studies have shown different trends in the polyphenol profile after gastrointestinal digestion in the function of which phenolic groups are studied. Besides, some *in vitro* studies have evaluated the stability and the transformation of the cocoa phenols during digestion by using pure synthesized compounds or ones extracted from cocoa food sources (8, 15, 16). However, the digestibility of these compounds might be different considering the whole cocoa samples and their derived products. The food components including proteins, carbohydrates, fiber, and fat and the interaction between these and the polyphenols have rarely been taken into account when determining polyphenol digestion. The presence of protein in the food matrix has been ascribed to a complex form with procyanidins with a high degree of polymerization and could induce low bioaccessibility of these phenolic compounds. However, a negative effect of cocoa polyphenols bioavailability after the intake of the milk-powder cocoa beverage has not been shown (17).

Taking into account that all of the *in vivo* trials, with either animals or human volunteers, are expensive long-term studies and they have also shown high variability between subjects (3), this work proposed an *in vitro* digestion model to be used as a

simple, fast way to measure how the food matrix influences the digestibility and bioaccessibility of polyphenols in new functional food products. So, defining the conditions that influence bioaccessibility of polyphenols can provide potential information for maximizing the use of the polyphenols as healthy nutrients. In this study, the digestibility and bioaccessibility of the phenolic fraction (procyanidins, phenolic acids, and flavones) of cocoa during the gastric and duodenal phases (small intestinal) are studied, and the effect of the fat content of the food matrix is evaluated. For this purpose, two different cocoa sources were used, cocoa liquor with a 50% fat content and cocoa powder with a 15% fat content.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Reagents.** (+)-Catechin, (-)-epicatechin, caffeic acid, syringic acid, protocatechuic acid, epigallocatechin, hydroxybenzoic acid, naringenin, myricetin,  $\alpha$ -amylase, pepsin, pancreatine, and bile salts were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Kaempferol, dimer B<sub>2</sub>, vanillic acid, and quercetin-rhamnoside were acquired from Fluka Co. (Buchs, Switzerland). Ferulic acid, coumaric acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, quercetin, kaempferol-rutinoside, apigenin, apigenin-glycoside, luteolin, kaempferol-glycoside, and luteolin-glycoside were purchased from Extrasynthese (Genay, France).

**Samples.** Two cocoa derivatives (liquor and powder) obtained by standard manufacturing processes were submitted to *in vitro* digestion. The criterion for selecting the test food was mainly based on the high and low fat contents; the cocoa liquor had a fat content of around 50%, while the cocoa powder had a fat content around 15%. Another reason that these cocoa derivatives were selected was based on the minor differences in the phenolic compositions related with the minor physical treatments to transform the cocoa liquor into powder. Cocoa liquor is produced by taking cocoa beans that have been fermented, dried, roasted, and separated from their shells and grinding their center, the cotyledon. The liquor contains both cocoa solids and cocoa butter in roughly equal proportions. The cocoa liquor is pressed, and the remaining cakes of cocoa solids are pulverized into "cocoa powder". Before the digestion, cocoa liquor and cocoa powder were ground in a laboratory mill for 30 s to obtain a homogeneous material.

**Simulated Gastrointestinal Digestion.** The digestion model was a slightly modified version of the technique developed by Gil-Izquierdo et al. (10). The model describes a three-step procedure to mimic the digestive process in the mouth, stomach (gastric digestion), and small intestine (duodenal digestion) (Figure 1A). The digestion starts by adding 10 mg of  $\alpha$ -amylase (100–300  $\mu$ g) in phosphate buffer solution (pH 6.9 with 0.04% NaCl and 0.004% CaCl<sub>2</sub>) to 1 g of the cocoa sample, which is incubated for 5 min. The gastric digestion includes the pH adjusted to 2 by adding HCl concentrate and 15 mg of porcine-pepsin solution (24.750  $\mu$ g/g pepsin) in 1 mL of 0.01 N HCl. This mixture is shaken in an incubator for 2 h at 37 °C. Finally, for the duodenal digestion, the pH is adjusted to 6.5 by adding NaHCO<sub>3</sub>. Then, 5 mL of duodenal juice, including 2.5 mL of bile salts and 2.5 mL of pancreatin (8 g/L), is added and shaken for another 2 h at 37 °C. The bile salt concentration was previously adjusted to the fat content of the two cocoa samples (80 g/L for cocoa liquor and 50 g/L for cocoa powder). All of the digestive mixtures are incubated in the dark in an orbital incubator (Orbital Incubator Cooler, Gallenkamp) at 200 rpm.

At the end of the gastric and duodenal steps, the digestion mixtures are centrifuged for 15 min at 12000g at 4 °C, yielding the chyme (supernatant or soluble fraction) and the pellet (cloud or nonsoluble fraction) (Figure 1A). Both of these chyme and pellet fractions are freeze-dried (Lyobeta, Telstar, Barcelona, Spain) and stored for chromatographic analysis of the phenol contents (procyanidins, phenolic acids, and flavones).

**Design of Dialysis Duodenal Digestion.** For duodenal digestion phase with dialysis, two models were considered, static (DD-SD) and dynamic (continuous-flow) (DD-DD), respectively (Figure 1A). The dialysis tub used for both methods was a cellulose dialysis tub, with a molecular mass cutoff at 12400 Da. The dialysis membrane was previously conditioned by washing the tub in running water for 3–4 h. The tub was then treated with a 0.3% (w/v) solution of sodium sulfide at 80 °C for

1 min followed by acidification with a 0.2% (v/v) sulfuric acid solution. Finally, the tub was rinsed with hot water to remove the acids. All of these pretreatments were designed to remove the glycerol included as a humectant and to ensure the optimum dialysis of all of the compounds.

**Static Dialysis System (DD-SD).** The procedure was based on Gil-Izquierdo's et al. (10) modified procedure. The duodenal mixture was placed inside the conditioned dialysis tub (400 mm long  $\times$  40 mm diameter), and the dialysis tub was completely covered with a phosphate buffer solution (pH 7.4). The system was placed in a beaker and agitated for 2 h at 37 °C in an orbital agitator.

**Continuous-Flow Dialysis System (DD-DD).** The proposed system was designed with an adapted Liebig–West condenser and some end-fitting fluid connectors (Figure 1B). The first chamber contained the dialysis tub, through which the duodenal mixture flowed during the duodenal digestion step by using a peristaltic pump with a flow rate of 1 mL/min and a phosphate buffer solution (pH 7.4), which covered the dialysis tub. A temperate water solution was pumped from a bath through the water jacket to keep the system's temperature constant, under 37 °C.

In both dialysis systems, two fractions were collected at the end of the duodenal digestion step and analyzed separately. These were the outside dialysis solution (OUT), which was considered the dialyzable fraction, and the inside dialysis tub content (IN), referring to the nondialyzable fraction (Figure 1A). The dialyzable fraction (OUT) was considered to be the fraction that could be available for absorption into the systematic circulation by passive diffusion. Meanwhile, the nondialyzable fraction (IN) was attributed to the digested fraction that would reach colon fermentation intact. Both fractions were freeze-dried and stored for chromatographic analysis of the phenol content (procyanidins, flavones, and phenolic acids).

**Chromatographic Analysis of Phenols.** The two tested samples, cocoa liquor and powder, were characterized as in our previous work (1). The digested freeze-dried fractions obtained (chyme, pellet, IN, and OUT) were dissolved in acetone/Milli-Q water/acetic acid (70:29.5:0.5 v/v/v) at a ratio of 1:5, after which the tubes were vortexed for 3 min and centrifuged at 12500 rpm. The supernatant containing the solubilized phenols was filtered through 0.22  $\mu$ m nylon filters prior to chromatographic analysis by ultraperformance liquid chromatography mass spectroscopy (UPLC-MS/MS).

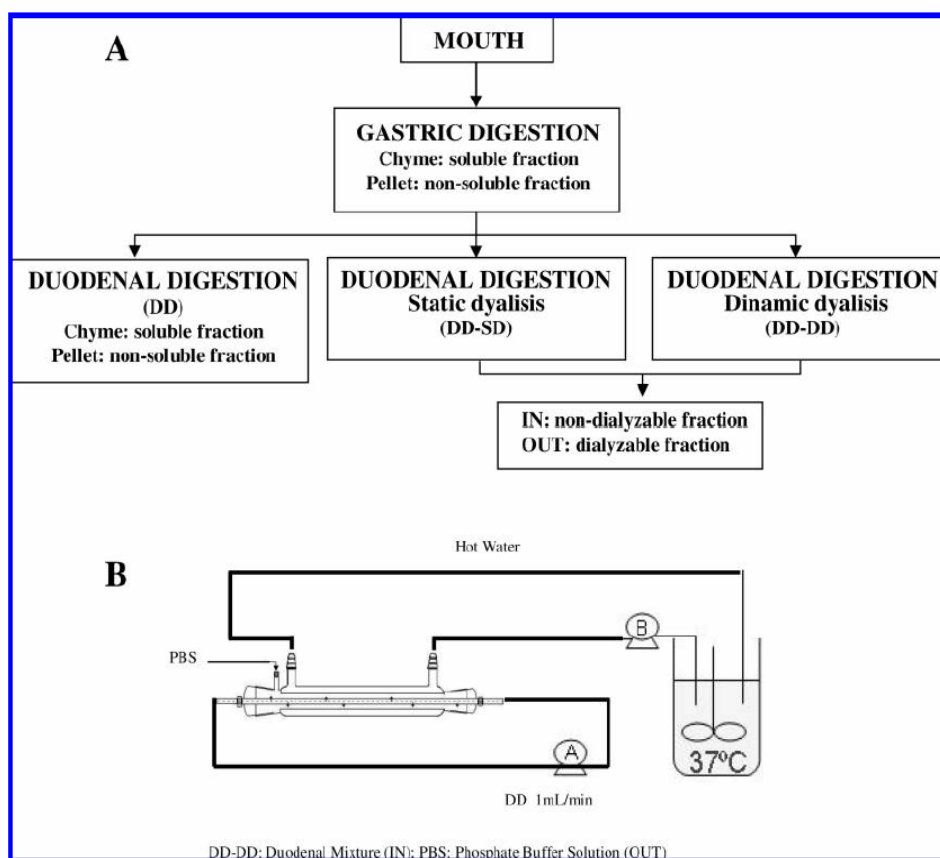
**UPLC-MS/MS.** The chromatographic analyses were performed using a Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography system (Waters, Milford, MA), equipped with a binary pump system (Waters). The UPLC system was coupled to a TQD mass spectrometer (Waters) using an electrospray ionization (ESI) source Z-spray. The MS was operated in negative mode to analyze the phenolic compounds. The data were acquired in selected reaction monitoring (SRM). The dwell time established for each transition was 30 ms. Data acquisition was carried out by MassLynx v 4.1 software.

The UPLC analyses were performed using an Acquity High Strength Silica (HSS) T3 column (100 mm  $\times$  2.1 mm i.d.; 1.8  $\mu$ m particle size) (Waters) with a binary mobile phase; solvent A was water/acetic acid (0.2%), and solvent B was acetonitrile. Two chromatography methods were applied to characterize the phenolic profile in the cocoa samples. The first one was to analyze procyanidins, and a second one was to analyze phenolic acids and flavones. The analysis of procyanidins in cocoa samples and the analysis of phenolic acids and flavones are those reported in a previous work (1). In both analytical methods, the flow rate was 0.4 mL/min, and the sample volume injected was 2.5  $\mu$ L.

The quantification of the procyanidins is expressed as  $\mu$ g of catechin, and the phenolic acids and the aglycon flavones are expressed as  $\mu$ g of the respective standard. All of the flavone glycosides are quantified as  $\mu$ g of the corresponding aglycon.

**Digestibility and Bioaccessibility Indexes.** To evaluate the food matrix effect on the polyphenol digestion, two different indexes were studied for each phenol group: the percentage of digestibility and the percentage of bioaccessibility. The digestibility allows the amount of phenol present in the complete digesta (chyme and pellet) after gastric or duodenal digestion of 1 g of test food (liquor or powder cocoa) to be measured

$$\text{digestibility index (\%)} = (\text{PC}_{\text{DF}}/\text{PC}_{\text{TF}}) \times 100 \quad (1)$$



**Figure 1.** (A) Steps of the proposed in vitro digestion model: gastric digestion, duodenal digestion without dialysis (DD), duodenal digestion with static dialysis (DD-SD), and duodenal digestion with dynamic dialysis (DD-DD). (B) Schema of the duodenal digestion with dynamic dialysis.

where  $PC_{DF}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the digested (chyme + pellet) and  $PC_{TF}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) quantified in 1 g of test food (cocoa liquor or powder).

For each phenol group, the bioaccessibility defines the percentage of phenol that is solubilized in the chyme (supernatant) after each step of digestion. Thus, this index allows the proportion of the phenol group that could become available for absorption into the systematic circulation to be estimated:

$$\text{bioaccessibility index (\%)} = (PC_S/PC_{DF}) \times 100 \quad (2)$$

where  $PC_S$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the chyme fraction and  $PC_{DF}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the digested matrix (chyme + pellet). Both indexes are calculated for each digestion step, gastric and duodenal, and for both foods tested, cocoa liquor and powder.

**Statistical Analysis.** All data are expressed as the average of the five replicates. To simplify the results shown in the tables, the standard deviation is omitted because all of these values are lower than 10%. The data are analyzed by a one-way analysis of variance test to assess differences between cocoa sources with different fat contents. A level of  $p < 0.05$  is considered a significant difference. All of the statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus 5.1.

## RESULTS AND DISCUSSION

**In Vitro Simulated Digestion Method.** This study is designed first of all to assess the digestibility and the stability of the phenolic fraction after the simulation of an in vitro digestion procedure applied to two different cocoa sources. The selection of these two cocoa sources was based on their different fat contents: 50% in the liquor and 15% in the powder. After the gastric and

duodenal digestion steps, the phenol content was measured in the soluble and nonsoluble (undigested) fractions, respectively called chyme and pellet (Figure 1A). Tables 1–3 show the phenolic profile, based on procyanidins, phenolic acids, and flavones, respectively, after the application of the in vitro digestion model to the cocoa samples. For both the gastric and the duodenal steps, the total content ( $\mu\text{g}$ ) of each phenol was quantified in the chyme and pellet fractions. Analyzing the procyanidin profile (Table 1) shows that the oligomers with a high degree of polymerization (pentamers to nonamers) present in the cocoa liquor are completely hydrolyzed during gastric digestion, leading to an important increase in the concentration of monomers and mainly of dimers. This is probably due to the acidic conditions during this step. In comparison with the liquor, the oligomer content of the cocoa powder is lower, and the increase in the concentration of dimers is not as evident after gastric digestion. In addition to their increase, monomer and dimer molecules appeared stable under acidic conditions in both cocoa samples tested. These results partially agree with some previous studies, in which monomers to pentamers from isolated procyanidins were also stable under acidic conditions (15).

The procyanidin content of the digested cocoa liquor after duodenal digestion was 1.8 times higher than after gastric digestion (Table 1). However, the effect of duodenal digestion was not as evident in the digested cocoa powder. The greater stability of procyanidins in digested cocoa liquor could be related to the protective effect of the fat-forming micellar structures within the digested matrix that probably protect the procyanidin molecules

**Table 1.** Procyanidin Contents in the Different Fractions of the Gastric and Duodenal Steps of the Simulated Gastrointestinal Digestion of Cocoa Liquor and Powder<sup>a</sup>

procyanidins ( $\mu\text{g}$ )	gastrointestinal digestion model						
	1 g of food	gastric			duodenal		
		chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total gastric	chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total duodenal
cocoa liquor							
catechin	52.3	137	43.0	180	176	83.7	260
epicatechin	219	331	168	499	760	374	1134
dimer	284	639	306	945	888	650	1538
trimer	118	125	44.4	170	130	102	232
tetramer	25.6	18.2	2.8	21.0	10.0	17.6	27.6
pentamer	3.58	ND	ND		ND	ND	
hexamer	4.21	ND	ND		ND	ND	
heptamer	3.9	ND	ND		ND	ND	
octamer	2.85	ND	ND		ND	ND	
nonamer	2.49	ND	ND		ND	ND	
total	716	1250	564	1814	1964	1226	3191
cocoa powder							
catechin	119	140	120	260	166	58.2	224
epicatechin	106	103	76	179	123	80.8	204
dimer	117	156	140	296	233	182	415
trimer	27.0	5.71	12.4	18.1	5.37	21.3	26.6
tetramer	6.73	0.85	1.65	2.49	ND	ND	
pentamer	ND	ND	ND		ND	ND	
hexamer	ND	ND	ND		ND	ND	
heptamer	ND	ND	ND		ND	ND	
octamer	ND	ND	ND		ND	ND	
nonamer	ND	ND	ND		ND	ND	
total	376	405	350	755	528	342	870

<sup>a</sup>The results are expressed as  $\mu\text{g}$  of phenol in relation to the phenol content of 1 g of tested food, cocoa liquor, and powder, respectively. ND, not detected. <sup>b</sup>Soluble fraction. <sup>c</sup>Nonsoluble fraction.

during enzymatic digestion. The surface-active agents, including the bile salts, present in the duodenal digestion media, form micellar and vesicular structures within the digesta (18), and these colloidal particles could provide further protection to the digested phenols. In fact, changes in the emulsion interface properties (droplet size and surface area) in the duodenal fluid was observed in the presence of green and black tea (19). The results of this study suggest that some epicatechins may be incorporated into the lipid phase of the emulsion. Considering the results of our study, a greater fat content in the digesta seems to favor the formation of the lipid emulsion droplets and the incorporation of the cocoa phenols into the lipid phase, achieving a protective effect during duodenal digestion.

In the case of the phenolic acids fraction (Table 2), it is interesting to note the increased content of several acids in the digesta after the gastric and duodenal steps. The increase in the hydroxybenzoic, vanillic, chlorogenic, and protocatechic acids in the two cocoa samples after both the gastric and the duodenal digestion steps should be noted. In contrast, a total loss of ferulic acid can be observed in both foods tested. Apparently, the fat content of the food tested does not affect the digestibility and stability of the phenolic acids fraction during the gastric and duodenal steps, unlike the protective effect of the fat observed in the procyanidin group.

Finally, observing the content of flavones (Table 3) in the digesta of both cocoa samples after the gastric step, an increase can be seen in the concentration of the aglycone forms. These results show a trend in both cocoa samples toward conversion

from glycosides to aglycone forms under acid conditions. After duodenal digestion of the cocoa liquor, significant increases were observed in the flavone content and the aglycone and the glucoside forms. This fact was not observed after duodenal digestion of the cocoa powder, so the flavone content in the digesta remained almost constant in relation to the gastric step. From the results obtained after the duodenal step, it can be concluded that the higher fat content in cocoa liquor (50% approximately) could protect the flavone glycoside forms during the duodenal digestion, probably also as a consequence of a better micellarization similar to that observed in the procyanidin group.

The increase in the total content of the phenolic acids and flavones observed in the different digested fractions (chyme and pellet) during the gastric and duodenal steps of the two cocoa matrices could be the result of the partial digestion of the dietary fiber in the tested food. Various studies have previously reported the bonding of phenolic compounds to fiber in wine (20) and in cocoa powder (21). Taking this into account and comparing the phenolic content in the tested foods and after the digestion procedure, the solubility of polyphenols seems to be higher after the simulated digestion of the tested food, where the phenols are extracted with the solvent mixture (acetone/Milli-Q water/acetic acid, 70:29.5:0.5 v/v/v) at room temperature. These softer conditions during phenol extraction could mean insufficient cellular disruption in the cocoa samples, which only allows the solubilization of the free phenolic compounds from the cocoa matrices. Subsequently, a part of these phenolic groups, phenolic acids and flavones associated with the fiber fraction in the cocoa samples before digestion, could be digested and released into the digesta, chyme, and pellet, by effect of the temperature (37 °C), time (2 h) under acidic conditions, and the enzymatic treatments during the gastric and duodenal digestion steps.

The stability of phenols under acidic conditions has been previously observed in different food matrices, such as orange juice, frozen strawberries (10, 11, 14), red cabbage (12), and chokeberries (13). Studies have been carried out on the stability of certain procyanidins as pure compounds under the same conditions (8, 16). However, all of these studies report polyphenol losses after duodenal digestion. All of the mentioned food matrices contain lower levels of fat in comparison with cocoa samples or as pure compounds with either low fat or without fat. In this study, by contrast, after the duodenal digestion of the tested food matrices, the phenolic fractions seemed stable; an increase was even observed in the phenol concentration in the chyme and pellet fractions. As mentioned above, this could be related to the interaction of the fat fraction with the polyphenols, which create a stable emulsion that favors the stability of the polyphenols.

**Evaluation of the Food Matrix Effect on the Digestibility and Bioaccessibility of Phenolic Compounds.** There were differences in the initial phenol content concentration in the two cocoa sources subjected to the *in vitro* digestion model (Tables 1–3). These differences make it difficult to compare the two cocoa sources to assess the matrix effect on the polyphenol digestibility and stability under gastric and duodenal conditions. To normalize the results, two different indexes for each phenolic group, digestibility and bioaccessibility, were calculated as described in the Materials and Methods.

During gastric digestion, it is interesting to note the digestibility (Figure 2) of the phenolic acids, especially hydroxybenzoic, syringic, and chlorogenic acids, mainly in cocoa liquor (Table 2). The high digestibility index of these phenolic acids could be due to a combination of factors, that is, the ring scission of the other phenolic compounds (procyanidins or flavones) in the food matrix, which leads to a major concentration of these simple phenolic molecules, and/or different rates of solubilization from

## Article

J. Agric. Food Chem., Vol. 57, No. 13, 2009 5747

**Table 2.** Phenolic Acid Contents in the Various Fractions of the Gastric and Duodenal Steps of the Simulated Gastrointestinal Digestion of Cocoa Liquor and Powder<sup>a</sup>

phenolic acids ( $\mu\text{g}$ )	1 g of food	gastrointestinal digestion model					
		gastric			duodenal		
		chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total	chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total
cocoa liquor							
hydroxybenzoic acid	1.53	7.67	3.83	11.5	15.0	5.53	20.5
vanillic acid	0.67	17.0	7.31	24.3	19.3	10.0	29.2
caffeic acid	2.79	3.43	4.24	7.67	4.50	ND	4.50
syringic acid	0.31	5.30	2.60	7.90	5.21	ND	5.21
ferulic acid	0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
vanillin	0.11	1.33	2.27	3.60	2.88	4.88	7.76
coumaric acid	0.70	0.86	ND	0.86	1.14	1.67	2.82
cinnamic acid	0.65	1.55	ND	1.55	3.06	ND	3.06
chlorogenic acid	1.35	54.5	15.9	70.4	53.8	18.4	72.2
protocatechuic acid	18.3	63.8	24.7	88.5	93.5	43.1	137
<b>total</b>	<b>26.5</b>	<b>156</b>	<b>60.9</b>	<b>216</b>	<b>198</b>	<b>83.6</b>	<b>282</b>
cocoa powder							
hydroxybenzoic acid	7.39	28.1	11.7	39.8	41.9	6.33	48.3
vanillic acid	2.16	72.4	11.9	84.3	35.2	7.95	43.2
caffeic acid	10.2	5.48	3.57	9.05	7.23	ND	7.23
syringic acid	1.75	6.05	3.28	9.33	7.43	ND	7.43
ferulic acid	0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
vanillin	0.25	1.49	2.18	3.67	5.56	5.10	10.7
coumaric acid	3.49	1.30	1.20	2.50	1.72	0.37	2.09
cinnamic acid	4.11	2.15	2.49	4.63	7.19	0.68	7.87
chlorogenic acid	2.58	10.8	6.66	17.4	22.3	ND	22.3
protocatechuic acid	150	240	78.9	319	403	36.8	439
<b>total</b>	<b>182</b>	<b>368</b>	<b>122</b>	<b>490</b>	<b>531</b>	<b>57</b>	<b>588</b>

<sup>a</sup> The results are expressed as  $\mu\text{g}$  of phenol in relation to the phenol content of 1 g of tested food, cocoa liquor, and powder, respectively. ND, not detected. <sup>b</sup> Soluble fraction. <sup>c</sup> Nonsoluble fraction.

cocoa fiber. In contrast to the phenolic acids, no differences were observed in the digestibility of glycoside flavones between the cocoa matrices after the gastric digestion step. However, with regard to the flavone group, the aglycone forms did show a significantly higher digestibility in both cocoa samples. This could be due to the greater stability of the aglycone form under acidic conditions and/or to the induction of the hydrolysis of glycosides, resulting in the respective aglycones.

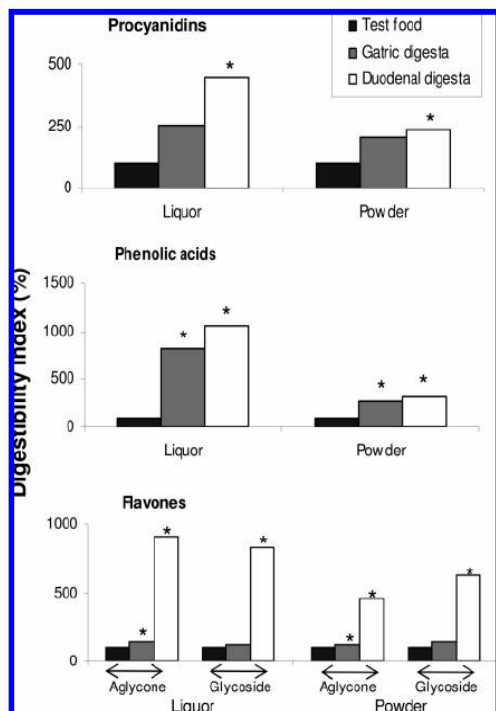
The higher phenol digestibility in cocoa liquor may be due to fat digestion under the acidic conditions and the action of the bile salts during the gastric and duodenal steps, respectively, which may favor disruption of the food matrix. Furthermore, the major fat content of cocoa liquor can mean higher micellization efficiency, leading to a major surface interaction with the solubilized phenols or greater solubility of phenols in micelles, leading to protection during duodenal digestion. This possible protective role of the fat is especially evident in the digestibility percentage of procyanidins (mainly monomers and dimers) and of some phenolic acids (Figure 2). Moreover, it is interesting to note that the percentage of the flavones' digestibility is lower than for the other phenolic groups, mainly after the gastric step; this may be due to the lack of stability in acidic conditions. In contrast, the digestibility of these two groups, aglycones and glycosides, increases after the duodenal step. In brief, the fat content in the digestion media can improve the digestibility of the phenols in a combination of factors, that is, a better solubilization from the food matrix and greater protection during digestion due to the major micellization of the solubilized phenols.

**Table 3.** Flavone Contents in the Various Fractions of the Gastric and Duodenal Steps of the Simulated Gastrointestinal Digestion of Cocoa Liquor and Powder<sup>a</sup>

flavones ( $\mu\text{g}$ )	1 g of food	gastrointestinal digestion model					
		gastric			duodenal		
		chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total	chyme <sup>b</sup>	pellet <sup>c</sup>	total
cocoa liquor							
epigallocatechin	4.21	4.24	2.07	6.31	10.3	5.25	15.6
quercetin	9.14	ND	14.1	14.1	7.32	13.6	20.9
quercetin-glycoside	84.7	16.5	57.9	74.4	79.6	66.4	146
quercetin-rutinoside	0.95	ND	ND	ND	ND	ND	ND
quercetin-arabinoside	103	14.2	76.1	90.3	77.4	89.2	167
dihydroquercetin	4.28	ND	5.10	5.10	7.47	6.70	14.2
dihydroxykaempferol	27.7	0.83	2.34	3.17	26	8.07	34.1
kaempferol-rutinoside	21.1	5.4	13.6	19.0	11.6	9.87	21.5
kaempferol-glycoside	74.2	29.4	100	129	64.0	118	182
naringenin	1.03	0.15	1.25	1.40	0.72	0.99	1.71
naringenin-glycoside	2.47	0.42	0.72	1.14	2.49	1.59	4.08
myricetin-glycoside	5.29	ND	22.5	22.5	ND	ND	ND
luteolin	4.07	0.38	3.30	3.68	1.47	3.08	4.55
luteolin-glycoside	8.66	0.67	2.08	2.75	1.28	3.05	4.33
apigenin	0.15	ND	0.57	0.57	0.35	0.52	0.87
apigenin-glycoside	0.04	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>total aglycone forms</b>	<b>18.6</b>	<b>4.78</b>	<b>21.3</b>	<b>26.0</b>	<b>20.2</b>	<b>23.4</b>	<b>43.6</b>
<b>total glycoside forms</b>	<b>258</b>	<b>67.4</b>	<b>281</b>	<b>321</b>	<b>270</b>	<b>303</b>	<b>559</b>
cocoa powder							
epigallocatechin	7.54	4.24	4.08	8.32	5.57	1.52	7.09
quercetin	7.07	ND	7.57	7.57	4.87	5.82	10.7
quercetin-glycoside	72.7	16.5	40.8	57.3	29.6	32.5	62.1
quercetin-rutinoside	2.85	ND	ND	ND	ND	ND	ND
quercetin-arabinoside	81.9	14.2	55.2	69.4	28.9	43	71.9
dihydroquercetin	7.42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
dihydroxykaempferol	21.1	3.7	11.4	15.1	8.07	11.5	19.6
kaempferol-rutinoside	71.3	5.4	26.9	32.3	4.97	19.9	24.9
kaempferol-glycoside	15.7	29.4	222	251	68.2	195	263
naringenin	0.62	0.15	0.78	0.93	ND	0.71	0.71
naringenin-glycoside	2.49	0.42	0.60	1.02	0.93	0.65	1.58
myricetin-glycoside	19.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
luteolin	3.58	0.38	5.52	5.90	0.99	2.03	3.02
luteolin-glycoside	19.3	0.67	4.63	5.30	1.58	4.42	6.12
apigenin	0.12	ND	0.43	0.43	0.20	0.38	0.58
apigenin-glycoside	0.09	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>total aglycone forms</b>	<b>18.9</b>	<b>4.78</b>	<b>18.4</b>	<b>23.2</b>	<b>11.6</b>	<b>10.1</b>	<b>21.7</b>
<b>total glycoside forms</b>	<b>299</b>	<b>70.3</b>	<b>361</b>	<b>431</b>	<b>142</b>	<b>296</b>	<b>438</b>

<sup>a</sup> The results are expressed as  $\mu\text{g}$  of phenol in relation to the phenol content of 1 g of tested food, cocoa liquor, and powder, respectively. ND, not detected. <sup>b</sup> Soluble fraction. <sup>c</sup> Nonsoluble fraction.

The index of bioaccessibility is aimed at evaluating the quantity of phenols digested (pellet + chyme) that are solubilized into the water phase (chyme) and become available for potential absorption in the systematic circulation in biological systems. Unlike the digestibility index, the bioaccessibility of the phenols was not affected by the fat content in the digestion media. In contrast, the main differences in this index were observed between phenolic groups, probably related to their hydrophilic nature. As Figure 3 shows, the highest solubilization into the water phase corresponds to phenolic acids, followed by procyanidins. Flavones showed the lowest water phase solubilization, and it could be related with the presence of a glycosidic residue in their molecular structure. The bioaccessibility indexes of flavone glycosides showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between cocoa matrices in both digestion steps (Figure 3). As can be seen in the quantification of flavones

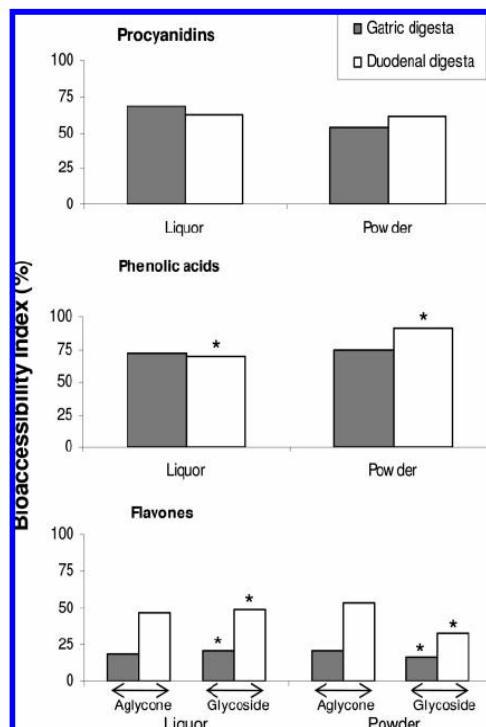


**Figure 2.** Digestibility index of procyanidins, phenolic acids, and flavones (aglycone and glycoside forms) after the gastric and duodenal digestion steps of cocoa liquor and powder. The index has been calculated according to eq 1 of the Materials and Methods. \*Denotes significant differences ( $p < 0.05$ ) between cocoa matrices, liquor, and powder in each digestion step.

after the digestion steps (Table 3), the digestion allowed an increase in the concentration of glycoside forms of flavones in the digesta (chyme) mainly after the duodenal step. However, the major lipophilicity of the aglycone flavones led to a greater retention in the pellet and lower water phase solubilization (chyme), indicating a minor potential bioaccessibility.

**In Vitro Static vs Continuous-Flow Duodenal Digestion.** After the evaluation of the digestibility and bioaccessibility indexes after the gastric and duodenal digestion, a dialysis phase was considered for the duodenal step. The development of a dialyzed digestion method was aimed at estimating the passive diffusion of the digested phenols solubilized in the water phase (dialyzed fraction, OUT) (Figure 1A). For this, two models, static (DD-SD) and dynamic (DD-DD) dialysis, were considered. The static dialyzed model only reproduces the diffusion of a molecule to reach the equilibrium condition. Taking this into consideration, a dynamic continuous-flow duodenal system (Figure 1B) was proposed as an enhanced simulation of the duodenal conditions. In the dialysis dynamic model developed in this study, the digested matrix flows throughout the entire duodenal step.

To compare the efficiency of two dialyzed models to the estimation of the phenol digestibility, the total concentration ( $\mu\text{g}$ ) of each phenolic group (procyanidins, phenolic acids, and flavones) from the complete duodenal mixture (nondialyzable, IN plus dialyzable, and OUT fractions) was quantified. The total concentration ( $\mu\text{g}$ ) of each phenolic group from the duodenal digestion model (DD) (chyme plus pellet) without dialysis shown in Tables 1–3 was considered as the control. The content of the phenolic compounds (procyanidins, phenolic acids, and flavones, respectively) in the mixture after the duodenal digestion (Figure 4) did not show significant differences ( $p < 0.05$ ) between

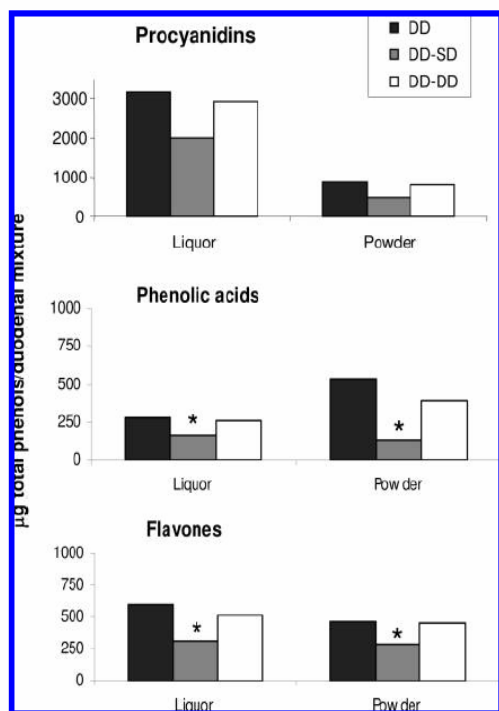


**Figure 3.** Bioaccessibility index of procyanidins, phenolic acids, and flavones (aglycone and glycoside forms) after the duodenal digestion step of cocoa liquor and powder. The index has been calculated according to eq 2 of the Materials and Methods. \*Denotes significant differences ( $p < 0.05$ ) between cocoa matrices, liquor, and powder in each digestion step.

the duodenal digestion model with dynamic continuous-flow (DD-DD) and the nondialyzed digestion model (DD) (Figure 1A). Meanwhile, the static dialyzed method (DD-SD) gave an underestimation of the digestion of phenols as compared with the other models. Thus, the total phenols quantified in the static-dialyzed mixture (IN plus OUT) (DD-SD) were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the total phenols quantified in the mixtures corresponding to the dynamic dialysis (DD-DD) and nondialyzed methods (DD). The losses in the polyphenol content of the static-dialyzed mixture could be attributed to the large molecules (lipids, carbohydrates, or fiber) in the food matrices tested being held on the dialysis membrane, reducing the membrane's surface for diffusion. These results are in line with previous studies by other authors, in which the sugar content of the tested food limited the diffusion of polyphenols during digestion in a dialyzed model (10, 11, 15). Because of the continuous flow of the digested matrix in the dynamic dialyzed digestion, the possibility that phenols could be held on the dialysis membrane is reduced. As a result, the dynamic dialysis could be proposed as a better model for estimating the passive diffusion of the digested phenols during the duodenal step.

In conclusion, the in vitro digestion method coupled with the a continuous-flow dialyzed duodenal step provided a good model for examining the digestibility and bioaccessibility of polyphenols in cocoa food matrices. This could be a rapid and a simple tool evaluating the effect of the food processing on the stability and digestibility of bioactive compounds and estimating their digestibility and potential bioavailability in the formulation phase of new functional food products. Moreover, this tool could also allow the food matrix constituents to be selected to incorporate





**Figure 4.** Total content ( $\mu\text{g}$ ) of procyanidins, phenolic acids, and flavones in the digestion mixture of cocoa liquor and cocoa powder after duodenal step digestion by the different models assayed: duodenal digestion without dialysis (DD), duodenal digestion with static dialysis (DD-SD), and duodenal digestion with dynamic dialysis (DD-DD). \*Denotes significant differences ( $p < 0.05$ ) between duodenal digestion models in each cocoa source, liquor, and powder.

the active compounds, thus ensuring their active and available status after human ingestion. The results obtained let us conclude that the fat content of the cocoa samples tested enhances the digestibility of some phenolic compounds, especially procyanidins, during duodenal digestion. The possible mechanism is probably related with the ability of the fat fraction to interact with the certain polyphenolic compounds following a better micellarization of the digested phenols.

#### LITERATURE CITED

- Ortega, N.; Romero, M. P.; Macia, A.; Reguant, J.; Angles, N.; Morello, J. M.; Motilva, M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *20*, 9621–9627.
- Keen, C.; Holt, R.; Oteiza, P.; Fraga, C.; Schmitz, H. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 298S–303S.
- Cooper, K.; Donovan, J.; Waterhouse, A.; Willisamson, G. Cocoa and health: A decade of research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 1–11.
- Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 423–447.
- Holt, R.; Lazarus, S.; Sullards, M.; Zhu, Q.; Schramm, D.; Hammerstone, J. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4s-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 798–804.
- Tomas-Barberán, F. A.; Cienfuegos-Jovellanos, E.; Marin, A.; Muguera, B.; Gil-Izquierdo, A.; Cerdá, B.; Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Ibarra, A.; Pasamar, M. A.; Ramón, D.; Espín, J. C. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3926–3935.
- Spencer, J.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Kaila, S.; Srai, S.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 588–593.
- Spencer, J.; Chaudry, F.; Pannala, A.; Srai, S.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *47*, 4184–4188.
- Schramm, D.; Karim, M.; Schrader, H.; Roberta, R.; Kirkpatrick, N.; Polagruto, J.; Ensunsa, J.; Schmitz, H.; Keen, C. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sci.* **2003**, *73*, 857–869.
- Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F. A. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 155–159.
- Pérez, A.; Gil-Izquierdo, A.; Garcia, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2308–2312.
- McDougall, G.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1285–1294.
- Bermúdez-Soto, M. J.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* **2007**, *102*, 865–874.
- Fazzari, M.; Fukumoto, L.; Mazza, G.; Livrea, M.; Tesoriere, L.; Di Marco, L. In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3561–3568.
- Rios, L.; Bennett, R.; Lazarus, S.; Révész, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 1106–1110.
- Zhu, Q.; Holt, R.; Lazarus, S.; Ensunsa, J.; Hammerstone, J.; Schmitz, H.; Kenn, C. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1700–1705.
- Keogh, J.; McInerney, J.; Clifton, P. The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 230–233.
- Carey, M.; Cohen, D. Update on physical state of bile. *Ital. J. Gastroenterol.* **1995**, *27*, 92–100.
- Shishikura, Y.; Khokhar, S.; Murray, B. Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1906–1913.
- Saura-Calixto, F.; Diaz-Rubio, M. E. Polyphenols associated with dietary fibre in wine. A wine polyphenols gap? *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 613–619.
- Lecumberri, E.; Mateos, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Rupérez, P.; Goya, L.; Bravo, L. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.* **2007**, *104*, 948–954.

Received February 19, 2009. Revised manuscript received May 4, 2009. Accepted May 14, 2009. This work was supported by the CENIT program from the Spanish Minister of Industry and the consortium of companies led by La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain) with the following companies: Nabisco Iberia, S.L.; BTSa, Biotecnologías Aplicadas, S.L.; Selección Batallé, S.A.; Industrial Técnica Pecuaria, S.A.; Neuron BioPharma, S.A.; Shirota Functional Foods, S.L.; Grupo Leche Pascual, SAU; and Innaves, S.A.



## Capítol 6

**Matrix composition effect on the  
digestibility of carob flour phenols  
by an in-vitro digestion model**

Food and Chemistry  
enviat, desembre 2009



## Matrix Composition Effect on the Digestibility of Carob Flour Phenols by an *in-vitro* Digestion Model

Nàdia Ortega<sup>1,2</sup>, Alba Macià<sup>1</sup>, Maria-Paz Romero<sup>1</sup>, Jordi Reguant<sup>2</sup>, Maria-Jose Motilva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Food Technology Department, XaRTA-UTPV, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria  
Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Spain

\*Corresponding Author. Tel: +34 973 702817; Fax: +34 973 702596.

E-mail address: motilva@tecal.udl.cat (Dra. Maria-José Motilva)

### Abstract

Carob flour (CF) and washed carob flour (WCF) (without the water soluble dietary fraction) were submitted to an *in-vitro* digestion method to evaluate the dietary soluble fiber (DF) and soluble sugars content as a matrix effect on the digestibility and bioaccessibility of polyphenols. In addition, combinations of the raw materials (CF and WCF) with hazelnut oil (HO) were proposed in order to evaluate the protection of a vegetable oil rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the phenolic compounds submitted to *in-vitro* digestion conditions. The results showed that the soluble dietary fraction enhances the stability of the phenolic compounds during the duodenal digestion phase. Similarly the lipid fraction (rich on PUFA) showed a protective effect on the digestibility of the phenolic compounds during duodenal digestion. Disruption of the natural matrix under digestion conditions led to the release of DF and PUFA, which could establish interactions with certain polyphenol compounds enhancing their digestibility and stability during digestion.

Keywords: carob flour, phenols, *in-vitro* digestion model, bioaccessibility, food matrix effect

### List of abbreviations:

CB: cocoa butter; CF: carob flour; CHD: Cardiovascular heart diseases; CSF: chyme soluble fraction; DF: Dietary fiber; EFSA: European Food Safety Agency; HO: hazelnut oil; MUFA: monounsaturated fatty acids; PF: pellet fraction; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SFA: saturated fatty acids; WCF: washed carob flour

## 1. Introduction

Carob flour is being acclaimed as an ingredient with a marked nutritional value due to its high levels of dietary fiber (DF) and phenol compounds (Owen et al., 2003; Papagiannopoulos, Wollseifen, Mellenthin, Haber & Galensa, 2004). Vegetables, which are rich sources of DF, have been shown to be involved in reducing the risk of cardiovascular heart diseases (CHD) (Mann et al., 2007). The soluble fibers in particular are thought to exert a preventative role against heart disease, as they appear to have the ability to lower serum cholesterol levels (Brown, Rosner, Willet & Sacks, 1999). Although the mechanisms behind this protective effect are still not completely known, antioxidant protection might be involved. On the other hand, it has been proved that polyphenols have antioxidant activity, which mainly enhances the prevention or delay of oxidative damage (Ames, Shigena & Hagen, 1993). Consequently, polyphenols are involved in protection against several diseases (cardiovascular, neuronal; among others). As a result, carob flour should be of increasing interest as an ingredient in the food industry in developing such functional and healthy foods formulation as biscuits, bread and cakes (Calixto & Canellas, 1982; Šebečić, Vedrina-Dragojević, Vitali, Hečimović & Dragičević, 2007; Vitali, Vedrina-Dragojević & Šebečić, 2008).

Recently, the adverse effects of excess sugar as a nutrient in the diet have been taken into account. This has led to the European Commission defining the recommended values for the intakes of these nutrients, so called “nutrient profiles” (EC N°1924/2006, on nutrition and health claims made on foods). The concept of “nutrient profiles” also affects the restriction on the saturated fatty acids and the sodium content. These values are defined by EFSA (European Food Safety Agency) in the framework of European regulations depending on the food product (categories). The appropriate establishment of certain restrictions in the “nutrient profile” should be considered bearing in mind the bioaccessibility and bioavailability of the bioactive compounds, such as polyphenols. Palou, Bonet & Picó (2009) reviewed the role of sugars in human nutrition and health, suggesting the necessity for more randomized controlled nutritional intervention trials to establish links between carbohydrates/sugar intake and health.

On the other hand, a link between differences in phenol digestibility and bioaccessibility and the food matrix composition has been suggested. For example, the bioaccessibility of carotenoids showed strong variations due to the food matrix in which the carotenoids were embedded (Reboul, Richelle, Perrot, Desmoulins-Malezet, Pirisi & Borel, 2006). Van het Hof, West, Weststrate, & Hautvast (2000) observed that the use of sucrose polyester, as a nonabsorbable fat replacer, decreased plasma levels of carotenoids. Moreover, the addition of iron and/or protein to red wine,

showed changes in the phenolic composition of red wine during *in-vitro* simulated gastrointestinal digestion (Argyri, Proestos, Komaitis & Kapsokefalou, 2005). Thus, the composition of the food matrix in which polyphenols are located has been shown to be a factor in their stability and digestibility. These observations may be of nutritional significance because their digestibility and consequently, their bioavailability, could be modified when other dietary nutrients, such as proteins, DF, lipid fraction, carbohydrates, minerals and others, are present in the food matrix.

Little is known about the stability and modifications of the bioactive compounds from carob flour during the digestion process, especially their fate in the food matrix under gastric and duodenal conditions. In the present study, an *in-vitro* simulated gastrointestinal digestion model was used to evaluate the stability and the potential bioaccessibility of phenols from carob flour under physiological conditions (stomach and small intestine). Moreover, as a specific objective of this work for the development of future food formulations, it was proposed to determine the effect of common ingredients (soluble sugars, soluble fiber and fat) on the gastrointestinal digestion recovery of phenols from carob.

## **2. Materials and methods**

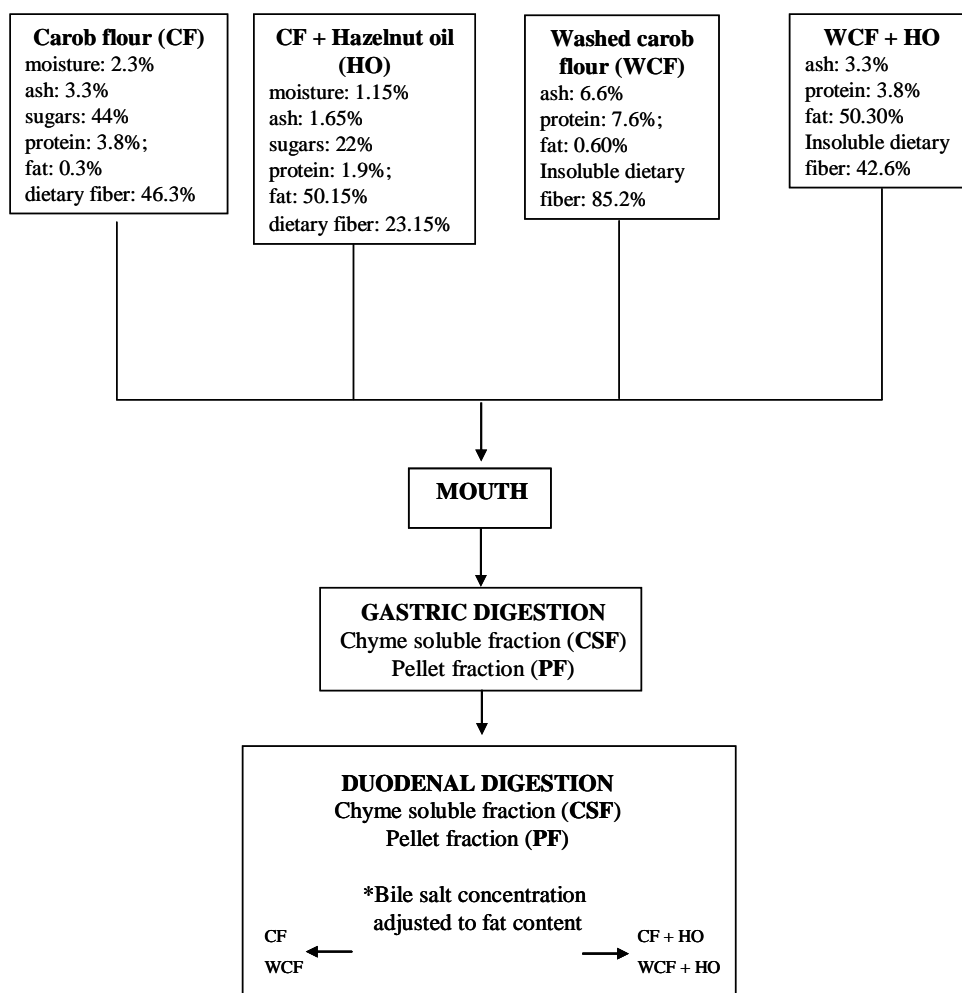
### **Chemicals and reagents**

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). The  $\alpha$ -amylase, pepsin, pancreatine, bile salts, syringic acid, naringenin and myricetin were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ferulic acid, *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, cinamic acid, quercetin, apigenin, genistein and luteolin were purchased from Extrasynthese (Genay, France) and kaempferol from Fluka Co. (Buchs, Switzerland). The gallic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

### **Raw material**

Carob flour (CF) and hazelnut oil (HO) were kindly supplied by La Morella Nuts, S.A. An aliquot of the carob flour sample was submitted to a washing step with water at a 1:5 ratio and allowed to stand for 6 hours at 4° C. The resulting mixture was centrifuged for 15 min at 15000 g and the residue, called washed carob flour (WCF), was used as a raw material to carry out the digestion procedure. During the washing step, the sugars and dietary soluble fiber were removed, so the DF present in WCF was attributed only to insoluble DF.

Two single raw materials, carob flour (CF) and washed carob flour (WCF) were used to evaluate the effect of the presence of soluble sugars and soluble fiber in the food matrix on polyphenol stability and digestibility. Combinations of these raw materials with hazelnut oil (CF+HO and WCF+HO) were arranged to assess the effect of the presence of fat in the food matrix on polyphenol stability and digestibility (**Figure 1**). The food test combinations were prepared by mixing equal amounts of HO and CF or WCF. The mixture (CF+HO or WCF+HO) was placed in the digestion beaker and homogenised for 30 s using a Polytron as homogenising system before starting the *in-vitro* digestion procedure. The average composition of food test combinations (CF, WCF, CF+HO and WCF+HO) is shown in **Figure 1**.



**Figure 1.** Food matrices composition and steps of the in vitro digestion model: gastric digestion and duodenal digestion. \*The bile salt concentration was adjusted to the fat content of the several samples (see description in the Material and Methods).



### Simulated Gastrointestinal Digestion

The method described in our previous work (Ortega, Reguant, Romero, Macià & Motilva, 2009) was used to perform the simulated gastrointestinal digestion. It consisted of a three-step procedure to mimic the digestive process in the mouth, stomach (gastric digestion) and small intestine (duodenal digestion). Briefly, the digestion starts by adding 10 mg of  $\alpha$ -amylase (100-300 ud/g) in phosphate buffer solution (pH 6.9 with 0.04% of NaCl and 0.004% of  $\text{CaCl}_2$ ) to 1 g of the sample (food test), which is incubated for 5 min. The gastric digestion includes the pH adjusted to 2.0 by adding HCl concentrate and 15 mg of porcine-pepsin solution (24.750 ud/g of pepsin) in 1 ml 0.01N HCl. All this mixture is shaken in an incubator for 2 h at 37° C. Finally, for the duodenal digestion, the pH is adjusted to 6.5 by adding  $\text{NaHCO}_3$ . Then 5 ml of duodenal juice, including 2.5 ml of bile salts and 2.5 ml of pancreatin (8 g/l), is added and shaken for another 2 h at 37° C. The bile salt concentration was adjusted to the fat content of the food test: 50 g/l for CF and WC; and 80 g/l for CF+HO and WCF+HO. All the digestion mixtures are incubated in the dark in an orbital incubator (Orbital Incubator Cooler, GALLENKAMP) at 200 rpm.

At the end of the gastric and duodenal steps, the digestion mixtures are centrifuged for 15 min at 12.000 g at 4° C, yielding the chyme soluble fraction (CSF) and the pellet fraction (PF). Both fractions are freeze-dried (Lyobeta, Telstar, Barcelona, Spain) and stored for chromatographic analysis of the phenol composition (phenolic acids, flavonoid aglycones and their glycoside forms).

### Chromatographic analysis of phenols

The digested freeze-dried fractions (CSF and PF) are dissolved in acetone:H<sub>2</sub>O (70:30) at a ratio of 1:5. After which the tubes are homogenised for 5 min and centrifuged at 12,500 rpm. The supernatant, containing the solubilized phenols, is filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filters prior to chromatographic analysis by UPLC tandem MS.

*Ultra performance liquid chromatography mass spectroscopy (UPLC-MS/MS).* The chromatographic analyses were performed according to our previous work (Ortega et al., 2009) using a Waters Acquity Ultra-Performance liquid chromatography system (Waters, Milford MA, USA), equipped with a binary pump system (Waters, Milford, MA, USA). The UPLC system is coupled to a TQD mass spectrometer (Waters, Milford MA, USA) using an electrospray ionization (ESI) source Z-spray. Data acquisition is carried out by MassLynx v 4.1 software.

The quantification of the different phenols was performed by using external calibration. The calibration curves (based on the integrated peak area) were calculated using five points at different concentrations (from 0.0005 to 62.5  $\mu\text{g/ml}$ ), and each standard solution was injected three times.

The phenolic acids and the flavonoid aglycones were quantified using the calibration curve of the respective standard. Methyl gallate was quantified using the calibration curve of the gallic acid. All the flavonoid glycosides were quantified using the calibration curve of the corresponding aglycone. The quantification of each phenol in each digestion fraction (CSF and PF) was expressed as  $\mu\text{g}$  of phenol corresponding to one gram of digested sample (food test).

To evaluate the effect of the food test composition on the digestion of the three phenolic groups (phenolic acids and flavonoids, aglycone and glycoside), two different indexes were studied for each phenol group: the percentage of digestibility and the percentage of bioaccessibility. The digestibility allows the amount of phenol present in the complete digesta (CSF and PF) after gastric and duodenal digestion of 1 g of test food to be measured

$$\text{digestibility index (\%)} = (\text{PC}_{\text{DF}}/\text{PC}_{\text{TF}}) \times 100 \quad [1]$$

where  $\text{PC}_{\text{DF}}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the digested (CSF + PF) and  $\text{PC}_{\text{TF}}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) quantified in 1 g of test food.

For each phenol group, the bioaccessibility defines the percentage of phenol that is solubilised in the chime soluble fraction (CFS) after the duodenal step. Thus, this index defines the proportion of the phenol group that could become available for absorption into the systematic circulation:

$$\text{bioaccessibility index (\%)} = (\text{PC}_{\text{S}}/\text{PC}_{\text{DF}}) \times 100 \quad [2]$$

where  $\text{PC}_{\text{S}}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the CSF after the duodenal step and  $\text{PC}_{\text{DF}}$  = the total phenol content ( $\mu\text{g}$ ) in the digested sample (CSF + PF) after the duodenal step.

### Statistical analysis

All data are expressed as the average of the three replicates. To simplify the results shown in **Table 1**, the standard deviation is omitted because all of these values are lower than 10 %. The data are analyzed by a one-way ANOVA test to assess differences between food tests. A level of  $p < 0.05$  is considered a significant difference. All of the statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus 5.1.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Stability of phenolic compounds of CF and WCF during simulated gastrointestinal *in vitro* digestion.

The first part of the study was focused on the evaluation of the effect of the water soluble components of the food test on the stability of phenols during gastrointestinal digestion. For this

proposal, CF and WCF were submitted to the *in-vitro* digestion model. The main differences between the composition of both samples was the soluble fraction, comprising sugars and soluble DF (**Figure 1**), which was removed by applying a washing step to the CF in order to obtain the WCF (see Material and methods section). After the gastric and duodenal steps, the stability of each individual phenol was checked by measuring the amount of compounds remaining in the CSF and PF fractions respectively (**Table 1**). To do so, attention was paid to the main phenolic groups contained in the CF, namely phenolic acids and flavonoids (aglycone and its glycoside forms) according with a previous study (Ortega et al., 2009).

The results showed that the total phenolic acids in the CF remain practically stable after gastric and duodenal steps, showing recoveries of around 85 and 73% respectively in relation to the initial content in the food test (**Table 1**). It is interesting to note that after the duodenal step, the concentration of most of the phenolic acids increased in comparison to the sample CF tested, except for gallic acid, which showed losses of around 30%. The CF contains a small amount of protein (3.8%), and a high content of DF (46.3%) and sugars (44%) (**Figure 1**), which could have a potential interaction with polyphenols physically trapped in the CF sample matrix. Phenolic acids could be liberated from the soluble esters linked to fiber, mainly yielding free phenolic acids. Additionally, higher solubilisation of these compounds can be observed during the gastric and duodenal steps, where the presence of the phenolic acids in the CSFs is higher than in the PFs (**Table 1**).

The analysis of the phenol stability of WCF during gastrointestinal digestion showed a high stability of the main phenolic acids (gallic and cinamic acids) after the gastric step, in which only syringic acid is completely degraded (**Table 1**). By contrast, after the duodenal digestion step, important losses of phenolic acids were observed; not even ferulic and syringic acids were detected in the digestion mixture. In our previous study (Ortega et al., 2009), after submitting two different cocoa samples (liquor and powder cocoa) to the digestion procedure, the ferulic acid was also completely degraded. Recently, Mateo, van den Berg, Havenaar, Bast & Haenen (2009) showed different bioaccessibility values of ferulic acid depending on the wheat fractions: aleurone, bran and flour under digestion conditions. Therefore, the trend of the phenolic acids after digestion could be highly influenced by the food matrix composition. The free phenolic acids resulting from the digestion of the soluble fiber present in the CF could probably compensate the instability of the phenolic acids in the duodenal conditions observed after the digestion of WCF.

**Table 1.** Phenol contents in the two fractions (CSF and PF) after the simulated gastrointestinal digestion steps (gastric and duodenal) of CF and WCF. The results are expressed as µg of phenol in relation to the phenol content of 1 g of tested food, CF and WCF respectively.

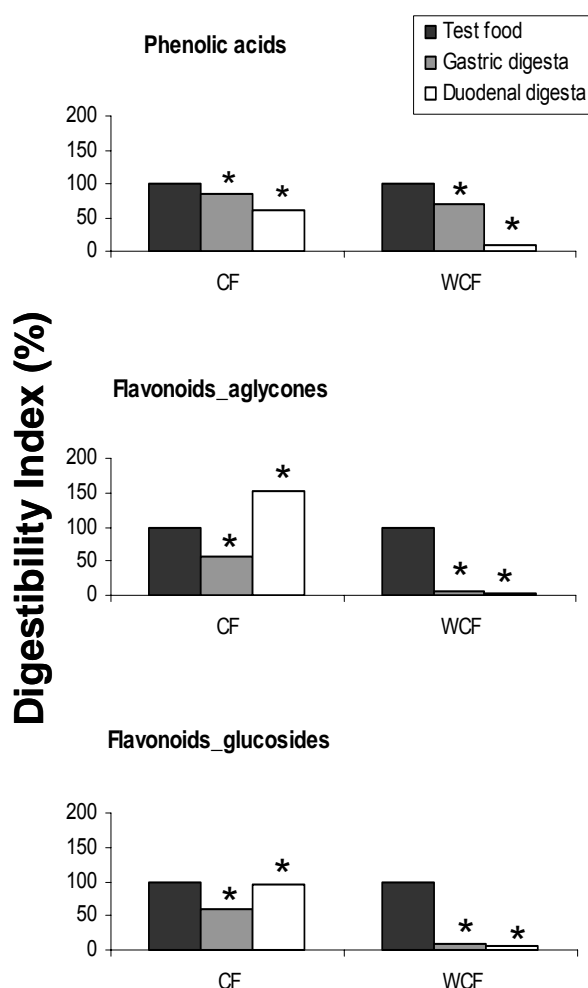
Phenolic compound (µg)	CF (1 g food test)	Gastric step			Duodenal step			WCF (1 g food test)	Gastric step			Duodenal step		
		CSF <sup>A</sup>	PF <sup>B</sup>	TOTAL	CSF <sup>A</sup>	PF <sup>B</sup>	TOTAL		CSF <sup>A</sup>	PF <sup>B</sup>	TOTAL	CSF <sup>A</sup>	PF <sup>B</sup>	TOTAL
Cinamic acid	44.3	41.7	41.5	83.2	94.4	12.0	106.4	46.9	11.3	10.8	22.1	21.4	3.7	25.0
<i>p</i> -Coumaric acid	10.0	9.7	7.0	16.7	23.1	3.2	26.3	15.6	3.3	0.5	3.8	6.3	1.3	7.6
Gallic acid	2692.3	1838.4	400.8	2239.2	1283.5	281.0	1564.5	2107.6	1394.9	132.9	1527.8	59.4	111.4	170.8
Ferulic acid	38.4	4.9	4.2	9.0	11.8	1.9	13.7	14.7	1.8	n.d.	1.8	n.d.	n.d.	n.d.
Syringic acid	11.1	8.6	5.0	13.6	15.3	1.7	17.1	4.6	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Total phenolic acids</b>	<b>2796.2</b>	<b>1903.2</b>	<b>458.5</b>	<b>2361.7</b>	<b>1428.1</b>	<b>299.9</b>	<b>1727.9</b>	<b>2189.4</b>	<b>1411.3</b>	<b>144.2</b>	<b>1555.5</b>	<b>87.1</b>	<b>116.4</b>	<b>203.5</b>
Genistein	4.0	1.9	15.9	17.8	2.8	10.7	13.5	47.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Apigenin	1.5	0.4	8.1	8.5	11.4	7.0	18.4	31.8	0.3	9.7	10.0	0.7	6.8	7.5
Naringenin	9.2	1.3	8.3	9.6	20.5	6.1	26.7	20.1	0.8	8.6	9.4	1.6	4.6	6.2
Luteolin	41.8	1.3	32.7	34.0	72.1	29.8	101.9	94.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaempferol	0.0	n.d.	11.8	12.0	26.5	41.3	67.8	19.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	108.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	74.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myricetin	17.5	4.5	17.6	22.0	38.5	13.8	52.3	110.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Total flavonoid aglycones</b>	<b>182.5</b>	<b>9.3</b>	<b>94.3</b>	<b>103.7</b>	<b>171.9</b>	<b>108.6</b>	<b>280.5</b>	<b>397.9</b>	<b>1.1</b>	<b>18.3</b>	<b>19.4</b>	<b>2.3</b>	<b>11.4</b>	<b>13.7</b>
Kaempferol-rhamnoside	175.4	50.3	167.2	217.5	173.2	95.8	269.1	224.6	23.5	111.2	134.7	43.8	63.9	107.7
Myricetin-rhamnoside	1675.6	305.6	321.2	626.8	574.3	288.4	862.6	2984.3	68.1	108.0	176.1	13.0	62.7	n.d.
Myricetin-glucose	533.6	87.7	96.1	183.8	143.4	93.0	236.4	652.1	20.5	43.7	64.1	13.5	31.7	75.6
Methyl gallate	54.8	6.1	6.6	12.7	16.5	5.0	21.5	1157.3	32.0	n.d.	32.0	n.d.	38.5	45.2
Quercetin-arabinoside	88.8	21.8	56.2	78.0	72.8	33.1	105.9	415.6	0.6	12.9	13.5	1.1	8.0	38.5
Quercetin-rhamnoside	473.1	204.4	393.5	597.9	805.2	333.5	1138.7	2063.6	74.0	257.2	331.2	117.6	138.8	9.2
Quercetin-glucose	140.5	44.2	115.9	160.1	233.5	110.4	343.9	624.9	15.7	58.8	74.5	22.7	38.0	256.4
<b>Total flavonoid glycosides</b>	<b>3141.7</b>	<b>720.1</b>	<b>1156.7</b>	<b>1876.8</b>	<b>2019.0</b>	<b>959.2</b>	<b>2978.1</b>	<b>8122.5</b>	<b>234.2</b>	<b>591.8</b>	<b>826.1</b>	<b>211.7</b>	<b>381.6</b>	<b>532.6</b>

CF: carob flour; WCF: washed carob flour; <sup>A</sup>CSF: Chyme soluble fraction; <sup>B</sup>PF: Pellet fraction; n.d. not detected

Losses of flavonoids, aglycones and glycosides can be observed after the gastric digestion of CF. By contrast, the duodenal digestion yielded a slight increase in flavonoids (**Table 1**). Thus, all the aglycone forms showed higher concentration in relation to the CF sample tested, except the major flavonoid of the carob flour, the quercetin, which was completely degraded. The increased values of kaempferol and myricetin observed in this step could be due to the hydrolysis, under digestion conditions, of the glycoside forms yielding the aglycone forms. The results of the gastrointestinal digestion of WCF showed a very low stability of flavonoids (**Table 1**) besides the high content of flavonoids in this food test. It is important to emphasize the instability of quercetin during the digestion of both samples tested (CF and WCF), which could be related to the hydroxyl substitutions. The complete degradation of this compound was also observed in the study reported by Bermúdez, Tomás & García (2007) after the simulating the *in-vitro* duodenal step for chokeberry. It is known that the stability of phenolic compounds can be affected by differences in cell wall structures, location of glycosides in cells and binding phenols within the food matrix (Hollman, van Trijp, Buysman, Gaag, Mengelers & de Vries, 1997). Sun-Waterhouse, Smith, O'Connor & Melton (2008) observed that cell walls from raw and cooked onions, mainly composed of DF, exerted little protection on quercetin degradation after incubation at 37° C at pH 6.5 for 2 h. Le Bourvellec, Le Quere & Renard (2007) reported interaction of catechin and epicatechin, which present the same ortho-diphenol B-ring structure as quercetin, in isolated apple cell walls. These results could indicate a possible binding of quercetin with insoluble fiber of the food matrix due to high hydroxyl substitutions, which was not measured. By contrast, the sugar substitution in the flavonoid molecules seemed to increase their stability during gastrointestinal digestion. Thus, differences in flavonoid digestibility can be seen according to the location and structure of the sugar moiety.

The results of the present study revealed that the *in-vitro* gastrointestinal digestion model strongly decreased the phenolic content of WCF, probably related to the removal of the water soluble components from the food matrix. We could conclude that the soluble dietary fraction (sugars and dietary soluble fiber) could have a protective role for phenolic compounds against pH changes and enzymatic activities during the digestion process, increasing their stability and potential bioaccessibility, but providing no protection against quercetin. Therefore, the physicochemical transformations, such as oxidation or the interactions with other components, such as polysaccharides or insoluble DF, in the digestion mixture could be more intense in the WFC, being partially responsible for the phenol losses during gastrointestinal digestion.

The recent recommendations by the EFSA have focused on the reduction of the sugar levels in certain food products under the so-called “nutrient profiles”. In the present study, differences in the initial phenol content of the two carob flour sources (CF and WCF) make it difficult to evaluate the effect of the presence of the water soluble fraction (sugars and soluble DF) (**Figure 1**) on the phenol stability and digestibility under gastric and duodenal conditions. To normalise the results, the digestibility index was calculated as described in the Material and Methods. **Figure 2** shows the digestibility indexes of each phenolic group, (phenolic acids, and aglycone and glycoside flavonoids) after the gastric and duodenal digestion steps of the CF and WCF, respectively. Significant differences in the phenol digestibility can be observed between the two food samples tested, CF and WCF (**Figure 2**).

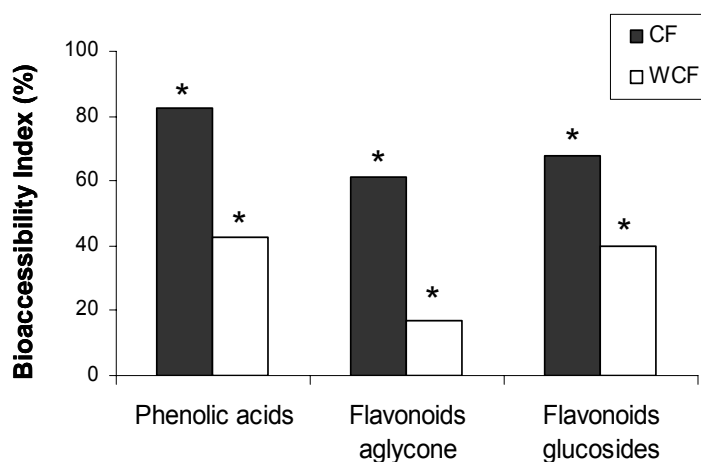


**Figure 2.** Digestibility index of phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides after duodenal digestion step of CF and WCF. The index has been calculated according to eq 1 of the Materials and Methods. \* denotes significantly differences in each phenolic group (phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides) between tested samples (CF and WCF).

The positive effect of the soluble fraction on polyphenol digestibility observed in the CF confirmed the protective effect of this fraction throughout the digestion procedure. This effect can be seen especially in both flavonoids groups, aglycones and glucosides, because of the greater difference in the digestibility values between the WCF and CF. Moreover, the release of flavonoids from the CF matrix after the duodenal step could be bound to sugar residues, giving higher values (**Figure 2**) for the phenolic compounds in the presence of the soluble fraction (CF) than without this fraction (WCF), which could favour their stability during this stage. This could be attributed to the soluble fraction (sugar + soluble fiber) having a protective role in the digestibility and enhancement of the bioaccessibility of the phenolic compounds in the CF. As a consequence, more experiments should be carried out prior to determining the restriction values of sugar in terms of the phenolic compound digestibility. Additionally, attention should be paid to the effect on the stability of polyphenols and other involved and functional bioactive compounds of the recently proposed sugar substitutes, such as the polyalcohols, for use in the new formulation to adequate the products to “nutrient profiles”.

From a functional point of view, several criteria should also be noted when producing foods rich in DF, soluble and insoluble, including the interactions with other molecules, such as iron and bile acids, among others (Dongowski, 2007). This could be also affecting the interaction of the DF with the polyphenols and consequently a decrease in phenol bioaccessibility. Besides the study of the phenol stability, in general in CF, the quantification of phenols (phenolic acids and flavonoids) showed a major content in the chyme soluble fraction (CSF) than in the pellet fraction (PF) at the end of both digestion steps (**Table 1**). This is a good indication that phenol compounds were released from the food matrix (CF) into the digestive juice, thus becoming potentially bioaccessible. In contrast, despite the low stability of the flavonoid glucosides forms of the WFC observed (**Table 1**), these compounds were mainly in the PF in both digestion steps, gastric and duodenal. This trend cannot be observed in the CF, despite its higher soluble dietary fraction, for any phenolic groups, which are mainly in the CSF or equal distributed (**Table 1**). In order to study the effect of the soluble fraction on the solubilization of phenolic compounds, and therefore its potential bioaccessibility, the values obtained were standardised using the bioaccessibility index described in the Materials and Methods. **Figure 3** shows the bioaccessibility values for each phenolic group, (phenolic acids, flavonoids aglycones and glucosides) after the duodenal digestion step of the CF and WCF. For the three phenolic groups, the bioaccessibility was significantly higher for the CF than the WCF. The highest values of flavonoids bioaccessibility for the CF can be seen for the glucoside form (**Figure**

3). This could be influenced by the higher interaction between the glucoside forms and the soluble fraction, which normally has a sugar as a residue.



**Figure 3.** Bioaccessibility index of phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides after duodenal digestion step of CF and WCF. The index has been calculated according to eq 2 of the Materials and Methods. \* denotes significantly differences in each phenolic group (phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides) between tested sample (CF and WCF).

This observation was in agreement with the work carried out by Schramm et al. (2003), in which increased bioavailability values of cocoa flavonols were reported when it was consumed in the presence of carbohydrates. Peters, Green, Janle & Ferruzi (2009) also observed that the presence of sugars in tea samples enhanced the bioavailability of catechin under digestion conditions. Moreover, Neilson et al. (2009) reported that the presence of sucrose in chocolate confectionary products may influence the bioavailability of flavan-3-ols compounds positively. The results in the present study are in agreement with the mentioned *in-vivo* studies. Thus, although the quantitative *in-vitro* results should not be directly translated to the *in-vivo* situation; the proposed *in-vitro* digestion model appears promising as a screening tool to assess the matrix effect on the bioaccessibility of phenolic compounds.

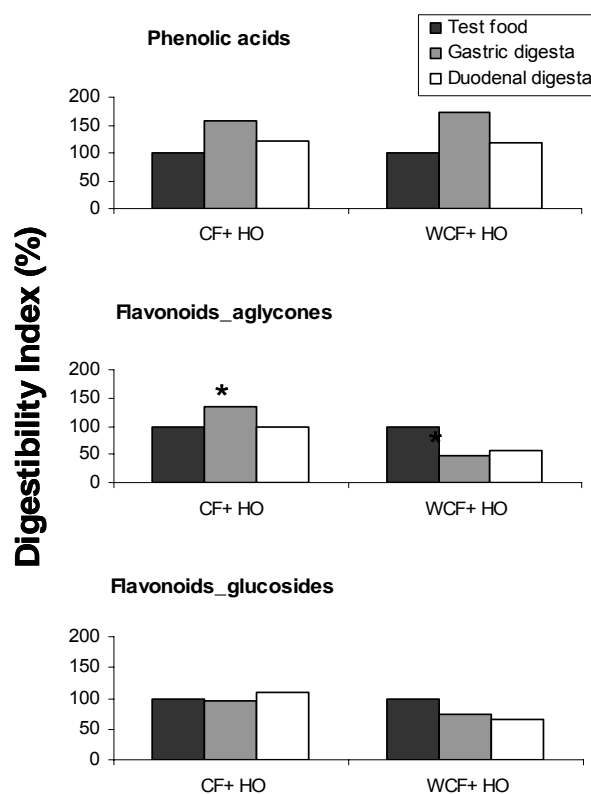
### 3.2. Evaluation the fat fraction as food matrix effect on the digestibility of phenolic compounds.

Previous studies focused on the digestibility of the phenolic compound from different food matrices had reported that these parameters could be enhanced by the presence of a fat fraction in the food matrix (Ortega et al., 2009; Mateo et al., 2009). In our previous study (Ortega et al., 2009), it was observed that the fatty fraction of the cocoa samples acted as a protection of polyphenol



digestibility. This fat protection role in the cocoa samples is attributed to the presence of cocoa butter (CB), whose fatty acid profile is based on 60% saturated fatty acids (SFA), 31% monounsaturated fatty acids (MUFA) and 3% polyunsaturated fatty acids (PUFA).

In line with the “nutrient profiles”, it is also proposed to reduce the saturated fatty acid levels depending on the food products. Therefore, in this study, we proposed a vegetable oil, whose fatty acid profile is reduced in terms of SFA to be to study the impact of the fat fraction on the phenolic compound digestibility. To do so, we selected hazelnut oil (HO), whose fatty acid profile is based on 7.4% SFA, 78% MUFA and 7.8% PUFA. Two different formulations were prepared for this purpose: HO+CF and HO+WCF (**Figure 1**). As in the evaluation of the effect of the soluble fraction, the digestibility index described in the Material and Methods was also used in this case. **Figure 4** shows the digestibility values for each phenolic group (phenolic acids, flavonoids aglycones and glucosides) after the gastric and duodenal digestion steps of the formulation (HO+CF) and (HO+WCF).



**Figure 4.** Digestibility index of phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides after duodenal digestion step of CF+VO and WCF+VO. The index has been calculated according to eq 1 of the Materials and Methods. \* denotes significantly differences in each phenolic group (phenolic acids, flavonoids aglycones and flavonoids glucosides) between tested samples (CF+VO and WCF+VO).

The digestibility of all the phenolic groups is significantly higher in the presence of the HO fraction for both sample mixtures.

Significant differences were observed in the digestibility of both samples tested, CF and WCF (**Figure 2**) compared with the mixtures with HO (**Figure 4**). It is interesting to note the strongly enhanced digestibility values of the phenolic compounds after the duodenal digestion step of the HO+WCF combination compared with the single WCF sample.

Only the digestibility values of flavonoids aglycones showed significant differences between both combinations HO+CF and HO+WCF (**Figure 4**).

The solubility and chemical stability of phenolic compounds can be seen in the HO+CF and HO+WCF formulation samples, which led to increases in the digestibility values of the phenolic compounds. In this study, the protective role of the fat fraction on the digestibility of the phenolic compounds was observed despite the lower value of the SFA profile of this HO fraction in comparison with its values in CB. The mixture sample formulation is composed of two different polarity ingredients, the CF and WCF as polar and HO as non-polar, which could form an emulsion during their homogenate agitation step, becoming a food matrix able to give protection to the phenolic compounds under the digestion conditions.

Nowadays, new ingredients called “fat replacers” are becoming popular in the market with the aim of facilitating the manufacture of food products adapted to “nutrient profiles”. In this sense, the application of sucrose polyester, a nonabsorbable fat replacer, has shown decreased plasma levels of carotenoids in function of the amount of sucrose polyester and carotenoids proposed (Koonvitsky et al., 1997). This second part of the study could lead to further research with different SFA profiles and the new proposed fat-replacer ingredients in order, firstly, to study the proposed SFA restriction values on polyphenol compounds, among other bioactive compounds, and secondly, the effect of the new proposed nutrient-ingredients (fat-replacers) used in the new formulations. The proposed *in-vitro* digestion model could act as a first directional influence on the reformulation of the new products in order to achieve the required “nutrient profiles”, in terms of sugar content and fatty acid profile, allowing the effect on polyphenol digestibility and bioaccessibility to be evaluated.

### Literature Cited

Ames, B.; Shigena, M. & Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.

- Argyri, K.; Proestos, C.; Komaitis, M & Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 56, 213-222.
- Bermúdez, M; Tomás, F. & García, M. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874.
- Brown, L.; Rosner, B.; Willet, W. & Sacks, F. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 281, 1998-2004.
- Calixto, F. & Canellas, J. (1982). Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Journal Science of Food Agricultural*, 33, 1319-1323.
- Dongowski, G. (2007). Interactions between dietary fiber-rich preparations and glycoconjugated bile acids *in vitro*. *Food Chemistry*, 104, 390-397.
- Hollman, P.; van Trijp, J.; Buysman, M.; Gaag, M.; Mengelers, M. & de Vries, J. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various food in man. *FEBS Letters*, 418, 152-156.
- Koonsvitsky, B.; Berry, D.; Jones, M.; Lin, P. Cooper, D.; Jones, D & Jackson, E. (1997). Olestra effects serum concentrations of  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids but not vitamin D or vitamin K status in free-living subjects. *Journal of Nutrition*, 127, 1636-1645.
- Le Bourvellec, C.; Le Quere, J. & Renard, C. (2007) Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: studies in model suspensions and application. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 7896-7904.
- Mann, J.; Cummings, J., Englyst, H.; Key, T.; Liu, S.; Riccardi, G.; Summarbell, C.; Uauy, R.; van Dam R.; Venn, B.; Vorster, H. & Wiseman, M. (2007). FAO/WHO scientific update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 132-137.
- Mateo, A.; van den Berg, R.; Havenaar, R.; Bast, A. & Haenen, G. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 49, 296–300.
- Neilson, A.; George, J.; Janle, E.; Mattes, R.; Rudolph, R.; Matusheski, N. & Ferruzzi, M. (2009). Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 9418-9426.
- Ortega, N.; Macià, A.; Romero, M.P.; Trullols, E.; Morello, J.R.; Anglès, N. & Motilva, M.J. (2009). Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flours by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 7239-7244.

- Ortega, N.; Reguant, J.; Romero, M.P.; Macià, A. & Motilva, M.J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in-vitro* digestion model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5743-5749.
- Owen, R.W.; Haubner, R.; Hull, W.E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fiber. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1727-1738.
- Palou, A.; Bonet, M. & Picó, C. (2009). On the role and fate of sugars in human nutrition and health. Introduction. *International Association for the Study of Obesity*, 10, 1-8.
- Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.; Mellenthin, A.; Haber, B & Galensa, R. (2004). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3784-3791.
- Peters, C.; Green, R.; Janle, E. & Ferruzi, M. (2009). Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Research International*, in press
- Reboul, E.; Richelle, M.; Perrot, E.; Desmoulins-Malezet, C.; Pirisi, V. & Borel, P. (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8749-8755.
- Schramm, D.; Karim, M.; Schrader, H.; Roberta, R.; Kirkpatrick, N.; Polagruto, J.; Ensunsa, J.; Schmitz, H. & Keen, C. (2003). Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences*, 73, 857-869.
- Šebečić, B.; Vedrına-Dragojević, I.; Vitali, D.; Hečimović, M. & Dragičević, I. (2007). Raw materials in fiber enrich biscuits production as source of total phenols. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72, 265-270.
- Sun-Waterhouse, D.; Smith, B.; O'Connor, C. & Melton, L. (2008). Effect of raw and cooked onion dietary fibre on the antioxidant activity of ascorbic acid and quercetin. *Food Chemistry*, 111, 580-585.
- Van het Hof, K.; West, C.; Weststrate, J. & Hautvast, G. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130, 503-506.
- Vitali, D.; Vedrına-Dragojević, I. & Šebečić, B. (2008). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fiber on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry*, 114 (4), 1462-1469.

**DISCUSSION**



Els darrers estudis realitzats sobre la relació alimentació i salut han posat de manifest que els polifenols presenten un paper molt important en la prevenció de malalties cardiovasculars i neurodegeneratives. Concretament, s'ha mostrat molt interès en els polifenols del cacau per les atractives evidències científiques presentades en l'àmbit de l'estudi de la capacitat antioxidant i, antiinflamatòria, entre d'altres.

Perquè la indústria alimentària pugui fer ús de les alegacions de propietat de salut de polifenols procedents de matèries primes vegetals, com són el cacau i la garrofa, aquesta precisa de metodologies científicament provades que l'ajudin a l'avaluació i caracterització de les matèries primes; a garantir la seva presència després del seu processat, així com a poder oferir dades de la seva activitat biològica un cop ingerides. Per donar resposta a totes aquestes necessitats, el treball d'aquesta tesi doctoral s'ha dividit en tres blocs, cadascun dels quals es centra en el desenvolupament de metodologies que hi donen resposta.

## **1. Metodologies per a la caracterització química i l'activitat antioxidant de la fracció fenòlica del cacau i la garrofa: Capítols 1 i 2.**

En aquest primer apartat del treball s'engloben els treballs centrats en la posta a punt de mètodes cromatogràfics optimitzats i específics per als polifenols del cacau i la farina de garrofa (Capítols 1 i 2, respectivament).

És sabut que el cacau és una font rica en polifenols, concretament en procianidines (Porter i col., 1991). La gran majoria de treballs centrats en l'estudi de procianidines del cacau s'han dut a terme per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Tot i això, aquesta tècnica presenta certes limitacions en la caracterització d'aquests compostos fenòlics, com poden ser principalment els llargs temps d'anàlisi i la coel·lució de determinats pics. Per aquest motiu, inicialment, es van estudiar i comparar dos mètodes cromatogràfics per a la determinació de procianidines en les fonts de cacau: HPLC-MS/MS, per ser el mètode més aplicat en la bibliografia (Hammerstone i col., 1999; Adamson i col., 1999; Wollgast i col., 2001) i el desenvolupament d'un nou mètode per UPLC-MS/MS en el present treball. Donada l'absència de patrons comercials dels diferents oligòmers de procianidines, el mètode desenvolupat per UPLC-MS/MS, es va posar a punt amb patrons dels monòmers, catequina i epicatequina; i el dímer B<sub>2</sub>. Paral·lelament, es van estudiar i validar dos alcaloides presents en la font de cacau, la teobromina i la cafeïna, en ambdós mètodes proposats.

L'anàlisi comparativa de les procianidines per HPLC i UPLC va oferir un seguit de diferències en els paràmetres de qualitat d'aquests mètodes. El principal avantatge que va presentar el mètode per UPLC fou la reducció del temps d'anàlisi (12.5 min), reduint fins a set vegades aquest en relació al mètode per HPLC (80 min). Una de les millores en la tècnica de cromatografia líquida UPLC és la reduïda mida de partícula de la fase estacionària, fet que desencadena cap a una major compactació d'aquesta; i per tant, a un escurçament considerable de les columnes. Aquest canvi és la clau per a la reducció del temps d'anàlisi. A més a més, aquesta millora en les columnes també es veu reflectida en la sensibilitat de detecció i la quantificació dels analits. D'aquesta manera, el mètode per UPLC va permetre la detecció de procianidines en rangs de concentracions compreses entre 0.01-0.09 µg/ml enfront dels valors obtinguts mitjançant HPLC, 0.02-0.2 µg/ml. Per contra, la tècnica UPLC no va oferir cap millora en la detecció dels alcaloides, teobromina i cafeïna, ja que no es van observar diferències significatives entre ambdós mètodes pel que fa a la seva detecció i quantificació.

Seguidament, i com era d'esperar per dades aportades per d'altres autors com Hammerstone i col. (1999) i Adamson i col. (1999) amb l'aplicació del mètode HPLC amb fase normal, es va observar que els monòmers catequina i epicatequina coeluien. Com ja s'ha esmentat, UPLC és una tècnica molt recent; amb la limitació de no disposar en el moment de l'execució del treball de columnes en fase normal per a ser aplicades. Aquest fet va condicionar l'elaboració d'un estudi de diferents columnes disponibles per a la determinació de les procianidines mitjançant aquesta tècnica. Cooper i col. (2007) aplicant la mateixa tècnica, UPLC, per a la determinació ràpida de sis polifenols en mostres derivades del cacau van escollir la columna BEH C<sub>18</sub>. Cooper i col. (2007) van observar la separació d'oligòmers de procianidines fins a quatre unitats. En el present treball es van provar tres columnes diferents: BEH C<sub>18</sub>, BEH HILIC i la HSS T3. Es va escollir la columna HSS T3, caracteritzada per ser una columna 100% de sílica i per presentar una major capacitat de retenció pels compostos polars en relació a les altres columnes esmentades, fet que va afavorir principalment la retenció dels oligòmers amb major grau de polimerització. L'ús d'aquesta columna va permetre resoldre la limitació que presentava fins al moment el mètode per HPLC, amb l'ús de columnes en fase normal, podent separar ambdós monòmers, catequina i epicatequina.

L'aplicació del mètode UPLC-MS/MS va oferir avantatges enfront els mètodes anteriorment desenvolupats per Hammerstone i col. (1999) en fase normal; Wollgast i col. (2001) en fase reversa i Kelm i col. (2006) en fase diol; sent aquests la identificació d'oligòmers de fins a nou unitats i la



caracterització de dos alcaloides, teobromina i cafeïna, en un mateix temps d'anàlisi de 12.5 min. Aquesta aportació afavoreix el rendiment de producció de les anàlisis de procianidines i alcaloides com a eina ràpida de caracterització de fonts del cacau. La identificació dels oligòmers va ser possible per la presència del detector tàndem masses, representant un paper clau, donada l'absència dels patrons comercials d'aquests oligòmers.

Finalment, la comparació entre la quantificació d'ambdós mètodes va evidenciar la major sensibilitat de la tècnica UPLC, aportant dades més precises per a la quantificació de les procianidines en la mostra de nib de cacau aplicada, en comparació al mètode d'HPLC.

Tot i que la fracció fenòlica del cacau s'atribueix principalment a les procianidines, s'ha observat que a nivell fisiològic no s'absorbeixen aquelles procianidines majors de dos o tres unitats, dímers i trímers (Manach i col., 2004). Els oligòmers de major estructura podrien presentar limitacions en la seva absorció com a conseqüència del seu elevat pes molecular i la mida que presenten. Aquestes estructures arriben, doncs, al còlon gairebé intactes, on per acció de la flora microbiana poden ser reduïdes a àcids fenòlics més fàcilment absorbibles. Per tant, l'activitat fisiològica que representa la ingesta de cacau pot atribuir-se a la presència d'altres compostos fenòlics presents en la matriu. Certs autors han identificat d'altres compostos fenòlics que poden aportar capacitat antioxidant al cacau. És el cas de la detecció de flavonoides glucosilats, com la quercetina, o àcids fenòlics, principalment àcids hidroxicinàmics (Jalal i col., 1977). Posteriorment, Sanbongi i col. (1998) i Lamuela i col. (2001) van detectar la presència de quercetines glucòsids en mostres de licor de cacau. Recentment, Sánchez i col. (2003) van identificar un ampli ventall de flavonoides en el licor de cacau. En cap d'aquests treballs s'han presentat quantificacions d'aquests compostos en mostres derivades del cacau. Per aquest motiu, es va proposar el desenvolupament d'un segon mètode mitjançant la tècnica UPLC-MS/MS per a la caracterització d'altres compostos minoritaris com els flavonoides i àcids fenòlics en les mostres derivades del cacau. Aquest nou mètode desenvolupat amplia la caracterització del perfil fenòlic, identificant 25 compostos, principalment flavonoides i àcids fenòlics en un temps d'anàlisi de 20 min. El límit de detecció de la tècnica UPLC és un avantatge enfront d'altres tècniques. En el cas dels flavonoides i àcids fenòlics aquestes concentracions oscil·len entre 0.0003-0.02 µg/mL en funció del compost, i han permès la seva identificació en extractes fenòlics de les fonts del cacau. L'aplicació d'aquest mètode va servir per a confirmar l'alt contingut de flavonoides presents, així com una menor concentració àcids fenòlics en tots els derivats de cacau estudiats.

En relació a la determinació dels polifenols en mostres de garrofa, pocs són els estudis centrats en identificar i quantificar el perfil fenòlic per cromatografia. Per aquest motiu, es va desenvolupar una metodologia per a la determinació de polifenols en farina de garrofa. La demanda actual d'aliments alternatius ha donat lloc a la recomanació de la garrofa com a substitut del cacau, principalment per dues justificacions: d'una banda, pel baix contingut en greix; i d'altra, per l'absència d'alcaloides. Craig i col. (1984) no va identificar alcaloides en mostres de garrofa; tot i això, posteriorment no s'ha identificat cap estudi que ho corroborés. Fruit d'aquest motiu es va tenir en compte també l'estudi d'aquests analits, teobromina i cafeïna, en el nou desenvolupament del mètode proposat per a la caracterització dels polifenols en mostres de la farina de garrofa.

La fracció estudiada en mostres derivades de garrofa, en beines, ha estat principalment la fracció de tanins (Avallone i col., 1997; Corsi i col., 2002; Kumazawa i col., 2002; Makris i col., 2004). Tot i això, arran del treball de Papagiannopoulos i col. (2004), en el qual es va avaluar la fracció fenòlica d'un seguit de derivats de la garrofa: beina, xarop de sucres de garrofa, fibra de garrofa, pols o farina de garrofa, es va observar que en la farina de garrofa s'hi presentaven principalment derivats dels tanins condensats hidrolitzats, essent atribuït a l'efecte processat sotmès sobre la garrofa. Aquest fet ha estat prèviament observat també en la pols de cacau, presentant una hidròlisi dels oligòmers de grau de polimerització com a conseqüència també de l'efecte processat (Lamuela i col., 2008). Per aquest motiu, es va proposar estudiar altres polifenols, com és el cas dels àcids fenòlics i flavonoides, en la metodologia a desenvolupar per a la caracterització de la fracció fenòlica de la farina de garrofa.

Prèviament, Owen i col. (2003) van desenvolupar un mètode per cromatografia líquida en fase inversa (HPLC-FR) amb una columna  $C_{18}$ , que permetia la identificació de compostos fenòlics sobre la fracció de fibra de la garrofa. Aquest mètode presentava un escombrat de tots els possibles polifenols presents en aquesta matriu. Per aquest motiu, es va optar per escollir aquest mètode com a punt de partida pel desenvolupament d'un nou mètode mitjançant la tècnica UPLC. En el present treball es va plantejar l'estudi de la columna  $C_{18}$ , àmpliament utilitzada per a la caracterització d'aquests tipus de polifenols en d'altres matrius de fonts vegetals i la columna HSS T3 emprada en el primer estudi del cacau. Finalment, es va escollir aquesta darrera, HSS T3, ja que millorava la resolució de flavonoides en comparació a la columna  $C_{18}$  per a un mateix temps d'anàlisi.

Els resultats de l'optimització del mètode desenvolupat presenten un temps d'anàlisi de 20 min, reduint-se a la meitat en comparació amb d'altres mètodes (Corsi i col., 2002; Papagiannopoulos i col. 2004) i fins a cinc vegades en comparació al mètode descrit per Owen i col. (2003). Aquest temps d'anàlisi (20 min) permet la identificació de 20 compostos fenòlics. Els paràmetres de qualitat, límits de detecció i de quantificació, també van ser millorats en relació a d'altres mètodes aplicats a mostres de garrofa (Corsi i col., 2002; Owen i col, 2003; Papagiannopoulos i col., 2004) així com els aplicats en d'altres fonts vegetals (Muñoz i col., 2008; Kumar i col., 2008).

L'aplicació d'aquest mètode desenvolupat (UPLC-MS/MS) es va fer servir per a la caracterització d'una farina de garrofa comercial. En aquesta anàlisi es va poder identificar com a fenol principal l'àcid gàl·lic (2675 µg/g farina de garrofa) seguit del flavonoide miricetina ramnòsid (1665 µg/g farina de garrofa). El perfil polifenòlic a nivell qualitatiu va coincidir amb el descrit per Papagiannopoulos i col. (2004); però per contra, va diferir a nivell quantitatiu. Aquest fet pot justificar-se per l'efecte torrat durant el processat de la garrofa o factors intrínsecs del propi fruit (l'origen o la varietat). Paral·lelament, es va detectar la presència dels dos alcaloides estudiats, la teobromina i la cafeïna, presentant concentracions de 24 µg/g farina de garrofa i 38 µg/g farina de garrofa, respectivament.

En resum, en aquest primer apartat (capítols 1 i 2), es presenten tres metodologies d'anàlisi cromatogràfica que permeten ampliar el perfil fenòlic de les mostres de cacau i de farina de garrofa. Principalment, les millores en la tècnica de cromatografia líquida d'ultra resolució (UPLC) i l'acoblament del detector tàndem masses (MS/MS) han estat els factors que han permès la millora dels paràmetres de qualitat. Aquestes millores s'han traduït en la reducció del temps d'anàlisi i en una major sensibilitat en la detecció dels compostos. Com a conseqüència, ha permès, en el cas del cacau, ampliar la caracterització de la fracció fenòlica; així com verificar la presència d'alcaloides en la farina de garrofa.

## 2. Metodologies per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols de les fonts d'estudi seleccionades: Capítols 3 i 4.

En el segon bloc del treball, s'engloben les metodologies per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols del cacau i de la garrofa, així com la caracterització del seu perfil fenòlic i la seva capacitat antioxidant.

El mètode d'extracció de polifenols de cacau ha estat estudiat en treballs previs, emprant per a aquesta finalitat la fava del cacau (Hammerstone i col., 1999; Lazarus i col., 1999; Gu i col., 2002) i el licor de cacau (Counet i col., 2003). Counet i col. (2003) consideren com a condicions òptimes d'extracció l'ús d'una barreja de solvents orgànics amb aigua, acetona:aigua:àcid acètic en proporció 70:28:2 (v:v:v) sobre les mostres de cacau prèviament desengreixades. Tot i això, la barreja més emprada ha estat amb una proporció d'acetona:aigua:àcid acètic 70:29.5:0.5 (v:v:v) (Hammerstone i col., 1999; Lazarus i col., 1999; Adamson i col., 1999; Gu i col., 2002). En qualsevol dels treballs citats anteriorment, es du a terme una eliminació prèvia de la fracció grassa de la matriu de cacau amb l'objectiu d'eliminar analits interferents durant l'extracció pròpiament dels polifenols.

En el present treball, es va escollir la fava de cacau i el nib com a productes intermedi i dos productes finals del processat d'aquests: el licor i la pols de cacau, com a fonts d'estudi del cacau per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols. En estudis preliminars no publicats, es va assajar ambdues metodologies d'extracció proposades per la bibliografia, acetona:aigua:àcid acètic en proporcions 70:29.5:0.5 (v:v:v) (Hammerstone i col., 1999) i 70:28:2 (v:v:v) (Counet i col., 2003). En aquest primer estudi, es va descartar la barreja de solvents proposada per Counet i col. (2003) per motius sensorials dels extractes fenòlics obtinguts amb un 2% d'àcid acètic, ja que es percebia olor d'àcid acètic en els extractes, que hagués pogut dificultar la seva incorporació o el seu ús com a ingredient en algunes formulacions alimentàries. Aquests resultats van determinar la selecció de la barreja de solvents proposada per Hammerstone i col. (1999), acetona:aigua:àcid acètic en proporcions 70:29.5:0.5 (v:v:v), per a utilitzar durant l'extracció dels polifenols.

L'aplicació d'una etapa prèvia de desengreixat seguida d'una extracció pròpiament dels polifenols va permetre l'obtenció d'extractes polifenòlics de cacau, anomenats extractes bruts, de les quatre fonts d'estudi. L'avaluació d'aquests extractes bruts de cacau va permetre observar que

la fracció fenòlica majoritària era la fracció de procianidines, coincidint amb altres treballs descrits en la bibliografia (Hammerstone i col., 1999; Adamson; Lazarus i col., 1999). Cal destacar la concentració de la fracció de flavonoides en les fonts de cacau, principalment en fava, nib i licor, suposant una quarta part de la fracció fenòlica. Caldria parar atenció al perfil fenòlic de l'extracte brut de la pols de cacau, ja que aquest presenta un perfil diferent als altres extractes de les fonts de cacau d'estudi: el perfil de la fracció de procianidines que s'identifica només consta de monòmers fins a tetramers i la seva quantificació presenta una menor concentració; la fracció de flavonoides presenta una concentració menor en relació als extractes de les altres fonts de cacau, mentre que la fracció d'àcids fenòlics és la majoritària en quant a concentració de l'extracte i en relació als altres extractes.

A més a més de les operacions a què la fava i els derivats del cacau poden veure's sotmesos durant el seu processat, cal tenir en compte el procés d'alcalinització, aplicable en qualsevol punt del procés amb l'objectiu de modificar les propietats sensorials. Gu i col. (2006) van observar que aquest procés afectava negativament al contingut de polifenols en mostres de pols de cacau. Recentment, aquesta observació ha estat confirmada en l'estudi per Lacueva i col. (2008), on es van avaluar diferents pols de cacau comercials sotmeses a condicions d'alcalinització diferents. Lacueva i col. (2008) van observar reduccions en el contingut dels monòmers epicatequina i catequina de l'ordre del 67% i 38%, respectivament, amb posterioritat al procés d'àlcali. Aquesta disminució podria ser atribuïda a reaccions d'oxidació sota condicions bàsiques, generant estructures o-quinones, que proporcionarien la coloració marronosa desitjada en aquest procés.

L'avaluació en conjunt dels quatre extractes bruts permet concloure que l'extracte de nib presenta una major riquesa fenòlica en relació als altres extractes de cacau. En aquest cas, l'efecte torrat sobre la fava i la posterior molturació són dos tractaments que podrien afavorir el trencament de les parets cel·lulars, donant lloc a una desestructuració de les cèl·lules vegetals i facilitant una millor solubilització dels fenols durant l'extracció. Les operacions posteriors, com són el premsat i la polvorització, podrien provocar una major extracció de fenols alhora que una major degradació, amb un balanç que es manifesta en una disminució, principalment dels polifenols de la pols de cacau, ja que en l'extracte brut d'aquesta font es va observar una reducció en el contingut de procianidines a nivell qualitatiu, en nombre d'oligòmers de procianidines, així com a nivell quantitatiu, disminuint la concentració dels monòmers i oligòmers presents en comparació als altres

extractes. El balanç en l'extracció, en relació a l'efecte processat de les mostres de cacau, mostra un augment de la concentració d'àcids fenòlics, en particular de l'àcid protocatèquic.

D'altra banda en aquest treball, es va optimitzar una etapa de purificació dels extractes bruts de cacau prèviament obtinguts, mitjançant una extracció en fase sòlida (SPE), amb la finalitat d'estudiar l'obtenció d'extractes més concentrats en polifenols de les quatre fonts d'estudi. Les condicions d'optimització d'aquesta extracció s'observen a la Taula 9, (dades annexades) i es van dur a terme amb la finalitat d'eliminar la presència de sucres en els extractes bruts de cacau. En els extractes obtinguts en aquesta extracció, extractes purificats de cacau, s'identificà un increment de la riquesa fenòlica presentant concentracions similars en la fracció de procianidines i flavonoides, mentre que es va veure disminuïda la concentració dels àcids fenòlics en relació als extractes bruts de cacau. L'etapa de rentat de l'extracció en fase sòlida, realitzada amb aigua per a l'eliminació de la càrrega de sucres, va afavorir la concentració de la fracció fenòlica de tots els extractes de cacau purificats, però donada la solubilitat dels àcids fenòlics en aigua, part d'aquesta fracció es va perdre durant aquesta etapa. La concentració del perfil fenòlic dels extractes purificats presenta una riquesa fenòlica dues vegades més gran en relació als extractes bruts, que justifica la pèrdua d'una de la fracció dels àcids fenòlics.

En l'extracció en fase sòlida dels extractes bruts de cacau s'ha observat una major concentració en l'extracte de pols de cacau. En termes absoluts la pols de cacau presenta menys fracció grassa que les altres matrius d'estudi (15% enfront del 55% de la fava, nib i licor de cacau). Aquest fet comporta que la càrrega de sucres sigui superior en la pols de cacau. Per tant, l'etapa de purificació proporciona un enriquiment dels fenols en aquesta matriu en relació a les altres, les quals al presentar major fracció lipídica no presenten un contingut tan elevat de sucres.

L'optimització del mètode d'extracció mitjançant SPE sobre els extractes bruts del cacau ha permès l'obtenció d'extractes més rics a nivell del seu perfil fenòlic i com a conseqüència, sobre la seva activitat antioxidant. Tot i això, aquesta etapa no es caracteritza per presentar una viabilitat positiva a l'hora de fer un escalat industrial a causa de la seva complexitat i el baix rendiment que se n'obté (Taula 8, dades annexades). En aquest cas, caldria estudiar una etapa alternativa per a la purificació dels extractes bruts de cacau.

Els extractes fenòlics bruts i purificats obtinguts de les quatre fonts de cacau van ser caracteritzats mitjançant dos mètodes espectrofotomètrics proposats, el mètode Folin-Ciocalteu i l'assaig de Vainillina, per a avaluar aquestes metodologies com a eines ràpides de la valoració del perfil fenòlic. Els resultats de la quantificació dels polifenols totals i els flavan-3-ols van presentar valors superiors en relació a la seva determinació prèviament realitzada amb els mètodes cromatogràfics, tant per als extractes bruts com els purificats. Tot i aquesta sobrequantificació, ambdós mètodes van presentar la mateixa ordenació dels extractes obtinguts en relació a la seva riquesa fenòlica. Amb la mateixa finalitat, tots els extractes van ser sotmesos a l'avaluació de la seva activitat antioxidant amb l'aplicació dels mètodes DPPH i l'H-ORAC. Els resultats obtinguts d'ambdós mètodes van classificar els extractes amb el mateix ordre en relació a la seva activitat antioxidant. Es pot ressaltar com a avantatge del mètode H-ORAC, l'execució de més d'un extracte al mateix temps; i per tant, es va veure reduït el temps destinat a la valoració dels extractes. Quan es van comparar els resultats de la riquesa fenòlica dels extractes, tant per mètodes espectrofotomètrics com cromatogràfics, amb la seva capacitat antioxidant es va observar una correlació alta entre la riquesa fenòlica dels extractes i la seva activitat antioxidant.

En darrer terme, es va avaluar la riquesa fenòlica de les matrius de cacau *per se* (fava, nib, licor i pols) per a conèixer la càrrega fenòlica aportada quan s'utilitzen com a ingredient en les formulacions. Per a fer-ho es van convertir les dades de la caracterització dels extractes fenòlics bruts del cacau obtinguts a la pròpia matriu, mitjançant els rendiments de l'etapa de desengreixat i l'extracció fenòlica (Taula 7 i 8, dades annexades). Comparant la caracterització fenòlica de les quatre fonts (Taula 11, dades annexades), es pot observar que el nib de cacau presenta una concentració major de procianidines i flavones; mentre que el licor de cacau presenta una major concentració d'àcids fenòlics i alcaloides. La fava de cacau presenta valors lleugerament inferiors en relació al nib i al licor en totes les fraccions fenòliques analitzades. Per contra, els valors de les fraccions de procianidines i flavones són sis vegades inferiors en la pols de cacau en relació a les altres fonts; mentre que el seu contingut d'àcids fenòlics i alcaloides no mostra diferències en relació a la resta de fonts de cacau. Les diferències que es presenten, tan a nivell qualitatiu com quantitatiu, en les diferents fonts de cacau poden atribuir-se a l'efecte processat. És a dir, a mesura que el cacau està sotmès a més operacions, el contingut de procianidines d'alt grau de polimerització o flavonoides disminueix a favor de l'augment de les formes monomèriques i dels àcids fenòlics, que es poden generar mitjançant reaccions d'hidròlisi dels compostos fenòlics que desapareixen o de les estructures a les que estaven lligats.

En les darreres dècades, pocs estudis s'han centrat en ampliar el coneixement del perfil fenòlic de la garrofa. Per aquest motiu, es va proposar optimitzar els paràmetres de l'extracció polifenòlica de la farina de garrofa. El resultat de la caracterització d'una farina de garrofa comercial, va permetre observar que el perfil fenòlic dels extractes fenòlics de la farina de garrofa són àcids fenòlics i flavonoides, fet que condicionaria la selecció dels solvents a utilitzar en l'extracció. Al mateix temps, per similitud de matriu de la farina de garrofa amb la pols de cacau en relació a la càrrega de sucres totals, i per ser el darrer subproducte obtingut durant el processat, es va tenir en consideració la presència dels sucres (50% de la composició) com a principal interferent en l'obtenció dels fenols. En aquest sentit, Kumazawa i col. (2002) van concloure que l'eliminació de la càrrega de sucres era necessària per afavorir l'extracció de fenols en mostres de garrofa. Per aquest motiu, es va proposar una etapa alternativa a l'extracció en fase sòlida, utilitzada per a l'eliminació de sucres en els extractes de cacau, que presentés una viabilitat econòmica si s'hagués de fer a escala industrial.

Atenent a aquestes premisses, es va proposar de realitzar un rentat previ amb aigua per a eliminar els sucres de la farina de garrofa, i posteriorment dur a terme l'extracció fenòlica. Es va optimitzar l'etapa de rentat proposada en l'estudi de Kumazawa i col. (2002) en termes de temps i la relació mostra:aigua. Els resultats de l'optimització d'aquesta etapa van desencadenar una reducció del temps, passant de 24 h a 6 h. Al mateix temps, no es van detectar diferències significatives entre les dues proporcions emprades, 1:10 i 1:5 de mostra:aigua (p:v). Per aquest motiu, es va proposar l'etapa de rentat amb una duració de 6 h i una relació de mostra:aigua 1:5 (p:v).

En el cas pròpiament de l'extracció fenòlica de la garrofa, s'identifiquen treballs on s'ha emprat aigua, a T<sup>a</sup> ambient i/o al seu punt d'ebullició (Corsi i col., 2002; Kumazawa i col., 2002) i barreja de solvents orgànics amb aigua (acetona, metanol, acetonitril) en diferents proporcions (Avallone i col., 1997; Papagiannopoulos i col., 2004; Makris i col., 2004). Per aquest motiu, es va estudiar la possibilitat d'utilitzar diferents barreges de solvents orgànics amb aigua, com ara el metanol, l'etanol i l'acetona en proporcions de 80:20 i 70:30 (v:v). Encara que recentment s'ha aprovat l'ús en el camp alimentari l'ús del metanol (Directiva 2009/32/CE, 23 abril 2009), és necessari un control exhaustiu de la presència de traces d'aquest un cop realitzades les extraccions. Com a conseqüència, tot i que l'etanol no s'havia emprat anteriorment en cap treball sobre garrofa, es va prendre la decisió d'incorporar-lo a l'estudi per les propietats anàlogues a les del metanol per a fer l'extracció de polifenols. Per a l'estudi de l'optimització de l'obtenció dels extractes fenòlics de la farina de garrofa, també es va considerar com a variable del procés l'esforç mecànic sobre



l'extracció dels polifenols mitjançant la selecció dels equips *polytron* i sonicador. Aquests equips van ser plantejats per afavorir l'alliberament dels polifenols de les cèl·lules vegetals de la matriu i obtenir un major rendiment d'extracció.

La barreja de solvents i proporcions seleccionades es van aplicar sobre la farina de garrofa i la farina de garrofa prèviament rentada. Els resultats de la quantificació total de polifenols per Folin-Ciocalteu i de l'activitat antioxidant per H-ORAC d'aquests extractes van aportar diferències significatives en la riquesa dels extractes obtinguts havent rentat prèviament la farina de garrofa. Per contra, entre els extractes obtinguts a partir de la farina de garrofa rentada, les diferències entre les combinacions de barreges de solvents emprades van ser mínimes, destacant-ne els extractes obtinguts a partir d'acetona:aigua en ambdues proporcions 80:20 i 70:30, per presentar major contingut total de polifenols i d'activitat antioxidant. Els resultats obtinguts van mostrar que no hi havia diferències entre l'aplicació dels dos equips emprats, *polytron* i sonicador. En aquest cas, durant el propi processat de la farina de garrofa, aquesta ja ha sofert un important esforç mecànic i per tant les diferències esperades amb l'aplicació d'ambdós equips no s'aprecien.

Tenint en compte la possibilitat de fer un primer escalat industrial de l'obtenció d'extractes fenòlics de farina de garrofa i en l'interès industrial de minimitzar els recursos, es va acceptar la proporció 70:30, ja que comportava un consum inferior de solvent orgànic. Per tant, es va escollir l'extracte obtingut amb acetona:aigua en una proporció 70:30 amb *polytron* sobre farina de garrofa rentada i sense rentar per a caracteritzar el perfil fenòlic mitjançant l'aplicació del mètode cromatogràfic prèviament desenvolupat. En la caracterització d'aquests extractes, es va observar que l'extracte fenòlic obtingut a partir de la farina de garrofa rentada presentava major riquesa fenòlica en relació a l'extracte obtingut sense rentar prèviament la garrofa. En l'extracte de polifenols a partir de farina de garrofa rentada es va observar la presència de compostos majoritaris com la miricetina-ramnòsid o de l'àcid gàl·lic, amb un contingut de 16 i 6 mg per g d'extracte en comparació als valors 3 i 4.8 mg per g d'extracte respectivament, en l'extracte de farina de garrofa obtingut sense rentar.

Finalment, es van analitzar les aigües de rentat de la farina de garrofa per a fer un balanç de les possibles pèrdues en detriment a l'enriquiment dels extractes fenòlics de la farina de garrofa que es poguessin obtenir. D'aquesta anàlisi es va observar una pèrdua principalment d'àcid gàl·lic en decrement de l'enriquiment de flavonoides i àcids fenòlics dels extractes obtinguts a partir de la

farina de garrofa rentada. Considerant els recursos limitats actuals i l'aprofitament industrial dels subproductes de la indústria, es podria valorar aquest residu com a un concentrat de sucres (xarop) amb una càrrega important d'àcid gàl·lic com a ingredient en l'elaboració d'aliments. Al mateix temps, l'aplicació d'una etapa de purificació sobre les aigües de rentat podrien permetre l'obtenció d'extractes més concentrats de l'àcid gàl·lic.

En resum, s'ha observat la necessitat d'una etapa prèvia per a l'eliminació dels interferents en les matrius d'estudi, el greix i els sucres per al cacau i els sucres per a la farina de garrofa, per tal d'obtenir extractes més rics en polifenols. Es va observar que l'ús de la barreja de solvents orgànics amb aigua, acetona:aigua:acètic en una proporció 70:29.5:0.5 (v:v:v) i acetona:aigua en una proporció 70:30 (v:v), permet l'obtenció d'extractes rics en polifenols, principalment en flavonoides en les fonts de cacau (procianidines) i en la farina de garrofa (ressaltant també la presència de l'àcid gàl·lic), respectivament. També s'ha observat que l'efecte processat disminueix el contingut de polifenols. Aquest fet desencadena que a partir del nib s'obtinguin extractes rics en polifenols de capacitat antioxidant similars a extractes del vi o de l'oliva (Lee i col., 2003); i que la farina de garrofa presenti un perfil fenòlic ben diferenciat en relació al que presenta la beina de garrofa. L'optimització dels extractes de garrofa ha permès obtenir extractes de la mateixa capacitat antioxidant que els extractes bruts de nib de cacau. D'aquesta manera, es proposa donar un nou enfocament a la farina de garrofa com a ingredient en l'elaboració d'aliments funcionals, aportant una càrrega important de polifenols.

Finalment, els resultats d'aquest apartat justifiquen la proposta dels mètodes Folin-Ciocalteu i l'H-ORAC com a metodologies o criteris d'avaluació de selecció ràpida d'extractes fenòlics. La justificació del Folin-Ciocalteu recau en la generalització del mètode per a la quantificació dels polifenols totals, enfront de l'especificitat de l'assaig de Vainillina només sobre la fracció de flavan-3-ols. Pel que fa als mètodes d'avaluació antioxidant, es proposa el mètode H-ORAC per ser un mètode reproduïble i que per estar adaptat a l'ús de fluorímetres amb microplaques permet l'execució de més d'una mostra al mateix temps.

### 3. Metodologies d'avaluació de la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols en matrius derivades del cacau i la garrofa: Capítols 5 i 6.

Segons la reglamentació vigent, per a què un aliment pugui presentar al·legacions de propietat de salut ha de complir prèviament uns perfils nutricionals ((CE) nº 1924/2006). L'EFSA està pendent de definir els valors dels perfils nutricionals de les diferents categories d'aliments; concretament la definició dels valors sobre els greixos saturats, del sucre i del sodi. Alguns d'aquests paràmetres estan relacionats amb les fonts d'estudi d'aquest treball: els àcids grassos saturats i els sucres són components característics de les fonts del cacau i la garrofa, respectivament. La definició d'aquests nutrients no està relacionada amb la biodisponibilitat i funcionalitat dels diferents principis actius presents en les matrius d'estudi. Per aquest motiu, en aquest darrer bloc del treball es va desenvolupar un model de digestió *in-vitro* per a l'avaluació dels polifenols del cacau i la garrofa (Capítols 5 i 6, respectivament). A més a més, en cada un dels treballs es va proposar l'estudi de l'efecte matriu alimentària característic de cada font; és a dir, la influència de la fracció grassa i els sucres en la biodisponibilitat dels polifenols.

En la bibliografia és fàcil d'identificar treballs que descriuen la biodisponibilitat dels polifenols mitjançant models de digestió *in-vitro* utilitzant patrons comercials o extractes fenòlics obtinguts experimentalment. D'aquesta manera Spencer i col. (2000) van avaluar l'estabilitat de procianidines aïllades del cacau sota condicions de la digestió gàstrica. En aquest treball, Spencer i col. (2000) van observar que durant la simulació de les condicions gàstriques sota condicions químiques sense la presència d'enzims els oligòmers es degradaven i augmentava el contingut de monòmers; especialment l'epicatequina, fruit d'una epimerització sota condicions àcides. Per contra, Rios i col. (2002), en un treball amb sis voluntaris, que havien ingerit 500 mL d'una beguda de cacau (amb 733 mg de procianidines i 351 mg de monomèriques), no van observar cap alteració en el perfil de procianidines després de les condicions gàstriques. Paral·lelament, Zhu i col. (2002) van sotmetre patrons de dímers i monòmers del cacau purificats sota condicions reproduïbles de la digestió, on van observar que els dímers no eren estables, mentre que si ho eren les formes monomèriques. Per contra, tant els monòmers com els dímers no van ser estables un cop sotmesos a les condicions químiques del duodè. Les condicions dels experiments són tan diferents que dificulten l'obtenció de conclusions sobre els polifenols procedents d'una mateixa font. En aquests estudis, tot i que s'aporta informació rellevant sobre l'estabilitat i la bioaccessibilitat dels polifenols, no es contempla la influència d'altres estructures presents de la matriu alimentària.

Els treballs que s'han centrat en l'estudi de la influència de la pròpia matriu alimentària aporten dades molt més valuoses per a l'extrapolació de la funcionalitat dels polifenols a l'hora de desenvolupar un nou ingredient funcional. Ha estat el cas de l'estudi de l'estabilitat de polifenols en suc de taronja i maduixes (Izquierdo i col., 2002); en fulles de *Ginkgo biloba* (Goh i col., 2004); en bròquil i col (Vallejo i col., 2004; McDougall i col., 2007); en fruites roges (Bérmudez i col., 2007; Fazzari i col., 2008) o fins i tot sobre l'efecte cuinat dels vegetals en l'estabilitat dels carotenoides (Hédren i col., 2002; Hornero i col., 2007; Ryan i col., 2008). És per aquest motiu que es va decidir avaluar directament l'estabilitat dels polifenols en la seva matriu.

En el primer treball d'aquest apartat (capítol 5) es va desenvolupar un model de digestió *in-vitro* adaptant-se al model descrit per Izquierdo i col. (2001). Per a la posta a punt, es van escollir dos derivats del cacau, el licor i la pols de cacau. Aquestes dues fonts de cacau permetrien a la vegada l'avaluació de l'efecte de la fracció lipídica sobre l'estabilitat dels polifenols (55% i 15% de fracció grassa en les matrius, respectivament). En l'avaluació dels polifenols en ambdues matrius durant les etapes del model de digestió, es va poder observar un augment de tots els grups fenòlics en ambdues matrius. Aquests resultats indicaven que durant la simulació de la digestió *in-vitro* s'havien alliberat molts més fenols de les matrius d'estudi; fet que no s'havia assolit mitjançant les extraccions. El mètode proposat d'extracció de polifenols del cacau amb barreja de solvents orgànics amb aigua aportaria informació només de la fracció soluble polifenòlica de les matrius; mentre que l'aplicació del model de digestió aportaria informació sobre la fracció insoluble polifenòlica que queda atrapada en la matriu alimentària. L'any 1995, Bartolomé i col., van proposar un procediment similar a les condicions del model de digestió *in-vitro* per estudiar els tanins condensats que quedaven atrapats en la fracció fibra de diverses matrius, entre ells els del cacau, considerant-ne la fracció insoluble dels polifenols. És a dir, que el mètode desenvolupat presenta una dualitat: la simulació de la digestió *in-vitro* dels polifenols i l'avaluació de la fracció fenòlica insoluble de les matrius.

El mètode de digestió *in-vitro* desenvolupat va ser aplicat per a la matriu de garrofa, avaluant en aquest cas l'efecte de la presència de la fracció de sucres sobre els polifenols. Per a fer-ho, es va partir de la mateixa quantitat de farina de garrofa i de farina de garrofa prèviament rentada. En relació a aquesta matriu, independentment de la presència o absència de la fracció de sucres, no es va observar un increment del contingut fenòlic en cap de les etapes, a diferència del que s'havia observat en les matrius de cacau. En certa manera ja era presumible fruit de la caracterització del

perfil fenòlic de farina de garrofa prèviament, en la qual no es van identificar procianidines; a partir de les quals es pogués alliberar estructures fenòliques més simples. Només es va poder apreciar un augment en els flavonoides aglicones en l'etapa duodenal de la farina de garrofa; fet que podria estar justificat per una hidròlisi de les formes flavonoides glicosídiques.

Donat que cada gram de matriu de cacau i garrofa presenta un contingut de polifenols diferents, a partir de la caracterització polifenòlica de les fonts de cacau i garrofa prèviament realitzada i amb la finalitat de poder comparar els resultats de la digestió *in-vitro* de les diferents matrius en termes polifenòlics, aquests valors es van normalitzar mitjançant l'índex de digestibilitat, que expressa la fracció de fenols (g) en el digerit, després de cada etapa de la digestió, en relació a la caracterització fenòlica que presenta un g de mostra inicial a digerir. La digestibilitat dels fenols ha estat major en totes les fraccions fenòliques en presència de la fracció grassa o sucres, respectivament. En el cas de les fonts de cacau, la digestibilitat dels flavonoides va assolir un major valor en l'etapa duodenal a raó de la major presència de la fracció grassa. Aquest fet podria venir donat per la interacció dels lípids amb els flavonoides, formant estructures micel·lars durant la digestió dels greixos; és a dir, en l'etapa duodenal. Resultats similars van ser observats per Shishikura i col. (2006) en l'avaluació de l'estabilitat dels polifenols del te en estat emulsionat amb l'oli d'oliva.

Contràriament, la digestibilitat dels polifenols en la farina de garrofa es troba íntimament relacionada amb la presència de la fracció de sucres en ambdues etapes de la digestió, gàstrica i duodenal. En aquest cas, es va poder observar la degradació pràcticament total dels flavonoides (90-93%) en absència de sucres en la farina de garrofa rentada sotmesa a la digestió. És a dir, que la presència d'ambdues fraccions exerceixen un efecte protector enfront de l'estabilitat dels polifenols sota les condicions de la digestió.

A partir dels resultats obtinguts es posa de manifest la protecció dels polifenols durant el procés de digestió en presència de la fracció lipídica. Cal esmentar que la fracció lipídica de les mostres de cacau es caracteritza per presentar un 59% d'àcids grassos saturats; un 32% d'àcids grassos monoinsaturats i un 3% d'àcids grassos poliinsaturats (perfil d'àcids grassos de la mantega de cacau, ([www.na.usda.gov/fnic/foodcomp](http://www.na.usda.gov/fnic/foodcomp), agost 2009)). Tenint en compte que des de l'EFSA es volen rebaixar els valors dels àcids grassos saturats en els aliments, en el darrer treball es va avaluar l'efecte de la protecció de la fracció grassa emprant una fracció grassa més noble; és a dir;

amb un percentatge més elevat de poliinsaturats enfront dels saturats. Per a aquesta valoració es va escollir un oli de fruit sec; la fracció grassa del qual presenta aproximadament un perfil d'àcids grassos amb un 7.4% de saturats; 78% de monoinsaturats i 7.8% de poliinsaturats ([www.na.usda.gov/fnic/foodcomp](http://www.na.usda.gov/fnic/foodcomp), agost 2009). Es va sotmetre tant la farina de garrofa com la farina de garrofa rentada amb oli de fruit sec al model de digestió *in-vitro* desenvolupat. Els resultats d'aquestes digestions van mostrar que la presència de la fracció grassa, en aquest cas rica en poliinsaturats, també protegia l'estabilitat dels polifenols d'ambdues matrius durant l'etapa duodenal. Especialment aquest efecte es va veure pel grup dels flavonoides en la farina de garrofa rentada en relació a la matriu sola digerida. En aquest cas, la presència de la fracció grassa va garantir valors de digestibilitat oscil·lant entre 48-75% dels flavonoides mentre que quan es va sotmetre la farina de garrofa rentada al model de digestió *in-vitro* només es presentaven valors entre un 7-10% dels flavonoides (en funció de l'etapa i tipologia de flavonoide).

Un cop avaluada la digestibilitat dels polifenols del cacau i de la farina de garrofa, es va optimitzar la darrera etapa del model de digestió amb la finalitat d'avaluar la bioaccessibilitat dels polifenols del cacau i de la garrofa. Estudis centrats en la biodisponibilitat d'altres nutrients com l'àcid fòlic o minerals (calci) duts a terme per Verwei i col. (2003) i Shiowatana i col. (2006) respectivament, entre altres; han emprat models dinàmics en l'etapa duodenal ja que garanteixen una reproducció més fidel de les condicions fisiològiques. En aquest treball es van proposar dos models per a la reproducció de l'etapa duodenal: l'estàtic i el dinàmic. La diferència d'ambdós models recau en el fet que la barreja d'aliment a digerir es manté estàtica dins un tub de diàlisis en el model estàtic; mentre que aquesta es troba en continu moviment, en el cas del model dinàmic. L'optimització d'aquesta etapa es va dur a terme amb les mostres derivades del cacau, el licor i la pols. El model estàtic no va reproduir els valors de digestibilitat de l'etapa duodenal, presentant valors significativament inferiors al mètode sense dialitzar. Per contra, el model dinàmic no va presentar diferències en el contingut digerible en relació al model sense dialitzar. En aquest apartat, a l'igual que succeïa en l'avaluació de l'estabilitat dels fenols, es va proposar un segon índex de bioaccessibilitat, definit com la quantitat de fracció fenòlica (g) que després de la digestió duodenal pot ser potencialment absorbida pel sistema circulatori de l'aparell intestinal en relació a tota la fracció fenòlica digerida (g) en aquesta etapa. L'aplicació de l'etapa duodenal segons el model dinàmic va permetre estimar la bioaccessibilitat dels polifenols en les matrius d'estudi: el licor, la pols de cacau i la farina de garrofa. Es va poder observar una similitud en la bioaccessibilitat quant a la tipologia de fenols, presumiblement assumible al seu baix pes molecular i per tant, a la seva

mida, que els facilita la seva bioaccessibilitat. D'aquesta manera, els àcids fenòlics exhibien una elevada bioaccessibilitat en totes les matrius, tant del cacau com de la garrofa. En el cas dels flavonoides, tant les formes aglicones com les glicosídiques, van presentar la mateixa bioaccessibilitat independentment de la matriu d'estudi; tot i que aquests valors suposen aproximadament la meitat en relació a la bioaccessibilitat dels àcids fenòlics. Finalment, en relació a la bioaccessibilitat de les procianidines en mostres de cacau, no es va observar diferències entre les dues matrius (licor i pols), assolint en ambdós cassos un 75% de bioaccessibilitat, procedents principalment dels monòmers, catequina i epicatequina, i dels dímers i trímers. A partir de les dades obtingudes es pot concloure que la bioaccessibilitat dels polifenols no està vinculada a la presència de certs nutrients com la fracció grassa o el sucre; a diferència de la influència quan s'avaluava la seva digestibilitat sinó a la mida del polifenol.

En resum, en aquest darrer apartat s'ha desenvolupat una metodologia de simulació del procés de la digestió *in-vitro* que ha permès l'avaluació de l'estabilitat dels polifenols presents en les mostres de cacau i garrofa. Aquesta eina ha servit a la vegada per a la caracterització de la fracció fenòlica insoluble de les matrius; proposant-la com a metodologia per a caracteritzar els polifenols de matrius complexes.

Paral·lelament, s'ha avaluat l'efecte matriu de la fracció grassa i els sucres sobre l'estabilitat i bioaccessibilitat dels polifenols. S'ha demostrat que ambdues fraccions actuen com a efectes protectors dels polifenols. Així doncs, els valors d'aquestes fraccions en els aliments caldrien ésser valorats en la nova proposta de perfils nutricionals. En el cas de la fracció grassa, s'ha demostrat que tant una fracció rica en saturats (mantega de cacau) com una fracció on predominen els insaturats (oli de fruit sec) presenten protecció dels polifenols a les condicions químiques de la digestió *in-vitro*.





**CONCLUSIONS**



Aquest treball ha permès el desenvolupament de metodologies ràpides i precises que comprenen la caracterització polifenòlica de les fonts d'estudi, cacau i garrofa. Aquestes metodologies es presenten com a eines de gran utilitat en la indústria alimentària per a l'avaluació i la formulació d'aliments funcionals rics en polifenols.

Concretament, per a cada capítol que conforma aquest treball de tesi doctoral, es poden concretar les següents conclusions:

(1) Metodologies per a la caracterització química i l'activitat antioxidant de la fracció fenòlica del cacau i la garrofa:

S'ha desenvolupat un mètode sensible, eficaç, ràpid i reproduïble aplicable a mostres de cacau que caracteritza simultàniament procianidines i els alcaloides, teobromina i cafeïna. Els paràmetres de qualitat d'aquest mètode, en relació a la precisió i alta sensibilitat, que permeten la identificació i quantificació d'oligòmers de fins a nou graus de polimerització en mostres de cacau.

S'ha desenvolupat un mètode sensible i reproduïble que permet ampliar la caracterització del perfil fenòlic de mostres de cacau, identificant i quantificant 16 flavonoides i 10 àcids fenòlics en un temps d'anàlisi de 20 min.

S'ha desenvolupat un mètode cromatogràfic sensible, eficaç, ràpid i reproduïble que permet la caracterització del perfil fenòlic de la farina de garrofa reduint-ne el seu temps d'anàlisi a 20 min. Amb aquest mètode s'ha identificat per primera vegada la presència d'alcaloides com la teobromina i la cafeïna a nivells de  $\mu\text{g}$  per g d'aquesta font vegetal.

Els mètodes espectrofotomètrics Folin-Ciocalteu i la prova de Vainillina es proposen com a eines ràpides per a una primera valoració d'extractes de cacau i de garrofa d'origen i processat desconeguts, ja que ordenen els extractes fenòlics en funció de la seva riquesa fenòlica correlacionats amb les determinacions per cromatografia, encara que aporten una determinació sobrequantificada en relació a aquesta.

Es proposa el mètode ORAC com a eina de selecció d'extractes de cacau i de garrofa en base a la seva capacitat antioxidant per la reducció en el temps d'anàlisi, la compatibilitat de realitzar més d'un extracte de naturalesa polar diferent (hidrofílic i lipofílic) i l'alta correlació dels resultats amb la caracterització de polifenols dels extractes estudiats.

### (2) Obtenció d'extractes rics en fenols de les fonts d'estudi seleccionades:

S'ha desenvolupat una metodologia per a l'extracció de compostos fenòlics de faves de cacau i dels productes del seu processat, nibs, licor i pols de cacau.

El nib presenta un contingut més gran en compostos fenòlics que la seva matèria primera, la fava. Aquest fet indica que tant la mòlta com el torrat poden desencadenar un trencament dels teixits cel·lulars que afavoreix la solubilització dels fenols de la matriu durant l'extracció fenòlica. D'aquesta manera, el nib s'ha mostrat com la font més interessant dels diferents derivats de cacau estudiats per a l'obtenció d'extractes rics en polifenols i que presenten una elevada activitat antioxidant.

L'extracte brut de pols de cacau, en canvi, presenta una reducció en el contingut de procianidines a nivell qualitatiu, en nombre d'oligòmers de procianidines, així com a nivell quantitatiu, en la baixa concentració dels monòmers i oligòmers presents en comparació als altres extractes.

Els productes del processat de la fava de cacau, licor i pols de cacau, contenen quantitats superiors d'àcids fenòlics, fet atribuïble a la presència en la matèria primera de fraccions insolubles d'àcids fenòlics lligats amb d'altres estructures que s'alliberen durant el processat.

S'ha establert un protocol per a l'obtenció d'un extracte de farina de garrofa ric en compostos fenòlics basat en un desengreixat, un rentat i una extracció amb solvents. El rentat de la farina amb aigua a 4 °C durant 6 hores en una proporció 1:5 (p/v) previ a l'extracció proporciona extractes amb una riquesa molt superior en àcids fenòlics i flavonoides i amb menys contingut d'alcaloides. S'ha comparat l'eficàcia de l'extracció de barreges d'aigua amb metanol, etanol i acetona per tal d'extreure els fenols de la farina de garrofa, essent la més eficaç acetona:aigua en una proporció 70:30 (v:v).

S'han obtingut extractes de farina de garrofa, destacant el seu contingut en miricetina glicosilada, flavonoide d'alt interès biològic, i l'àcid gàl·lic.

(3) Metodologies d'avaluació de la digestibilitat i bioaccessibilitat dels polifenols en matrius derivades del cacau i la garrofa:

S'ha desenvolupat un model de digestió *in-vitro*, compostat per tres etapes: bucal, gàstrica i duodenal, eficient i reproduïble per a l'avaluació de l'estabilitat química dels polifenols de les matrius d'estudi. L'aplicació d'aquest model sobre les fonts de licor i pols de cacau permet la caracterització de la fracció fenòlica insoluble d'aquestes matrius. Per tant, es proposa el model de digestió *in-vitro* com a metodologia de caracterització de la fracció fenòlica insoluble de mostres alimentàries complexes.

La presència de la fracció de greixos, rica en àcids grassos saturats o insaturats, mostra en les matrius d'estudi un efecte protector dels polifenols durant la digestió. La reducció dels àcids grassos saturats en els perfils nutricionals de certs aliments no es veu repercutida en l'estabilitat dels polifenols.

La presència de la fracció de sucres en la farina de garrofa sotmesa a digestió presenta un efecte protector de l'estabilitat dels polifenols. Per tant, la reducció de la fracció sucres en els perfils nutricionals de certs aliments pot condicionar i disminuir l'estabilitat i bioaccessibilitat dels polifenols.

S'ha desenvolupat un model de digestió *in-vitro* amb etapa duodenal dialitzada que presenta una bona correlació amb els resultats del model de digestió *in-vitro* sense diàlisi. Aquesta eina permet una estimació de la fracció polifenòlica bioaccessible de la matriu que es digereix.

No s'observa cap relació de l'efecte matriu alimentària, per la presència de greixos o de sucres, en la bioaccessibilitat de les fraccions fenòliques estudiades en les matrius del cacau i de la farina de garrofa.



**BIBLIOGRAFIA**





## A

- Adamson, G.; Lazarus, S.; Mitchell, A.; Prior, R.; Cao, G.; Jacobs, P.; Kremers, B.; Hammerstone, J.; Rucker, R.; Ritter, K.; Schmitz, H. HPLC method for the quantification of procyanidins in cacao and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4184-4188.
- Aherne, S.; O'Brien, N. Dietary Flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition.* **2002**, *18*, 75-81.
- Andersen, Ø.M.; Jordheim, M. The Anthocyanins in Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and Applications. *CRC Press. Boca Raton. FL.* **2006**, 471-551.
- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 16th edition (980.14). **1995**.
- Arlorio, M.; Coisson, J.; Travaglia, F.; Varsaldi, F.; Miglio, G.; Lombardi, G.; Martelli, A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Res. Internat.* **2005**, *38*, 1009–1014.
- Avallone, R.; Plessi, M.; Baraldi, M.; Monzani, A. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.* **1997**, *10*, 166-172.
- Azizah, A.; Ruslawati, N.; Tee, S. Extraction and characterization of antioxidant from cacao by-products. *Food Chem.* **1999**, *64*, 199-202.
- Azzi, A.; Stocker, R. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 231-255.

## B

- Balaban, M. Identification of the main phenolic compounds in wood of *Ceratonia siliqua* by GC-MS. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 385-388.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **2006**, *99*, 191-203.
- Bartley, B. The genetic diversity of cocoa and its utilisation. *CABI Pub. Cambridge, MA.* **2005**.
- Battle, I.; Tous, J. Carob tree: *ceratonia siliqua* L. *International Plant genetic Resources Institute.* Roma. **1997**.
- Bazzano, L.; Serdula, M.; Bazzano, S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Report.* **2003**, *5*, 492-499.
- Bermudez-Soto, M.; Tomás-Barberán, F.; García-Conesa, M. Stability of polyphenols in chocoberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* **2007**, *102*, 865-874.
- Bernard, J.; Trumpower, L. Superoxide generation by the cytochrome *bc1* complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 198-206.
- Bischoff, S. Quercetin: Potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* **2008**, *11*, 733-740.

- Bispo, M.; Veloso, M.; Pinheiro, H.; De Oliveira, R.; Reis, J.; De Andrade, J. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *Journal Chrom. Sci.* **2002**, 40, 45-48.
- Blauch, J.; Tarka, S.; HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cacao mixes. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 745-750.
- Bohm, B. A. Introduction to flavonoids. *Harwood Academic Publishers*. Amsterdam. **1998**.
- Boots, A.; Haenen, G.; Bast, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharm.* **2008**, 585, 325-337.
- Borchers, A.; Keen, C.; Hannum, S.; Gershwin, M. Cocoa and chocolate: composition, bioavailability and health implications. *J. Med. Food.* **2000**, 3, 77-105.
- Boveris A.; Oshino N.; Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **1972**, 128, 617-630.
- Boveris, A.; Cadenas, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **1975**, 54, 311-314.
- Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, A. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **1976**, 156, 435-444.
- Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **1973**, 134, 707-716.
- Brand, E. *Carob. Nutr. Food Sci.* **1984**, 91, 22-24.
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition reviews.* **1998**, 56, 217-333.
- Brennecke, J. New applications of supercritical fluids. *Chem Ind.* **1996**, 21, 831-834.
- Brunetto, M.; Gutiérrez, L.; Delgado, Y.; Galignani, M.; Zambrano, A.; Gómez, A.; Ramos, G.; Romero, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cacao samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chem.* **2007**, 100, 459-467.
- Butler, R.; Price, M.; Brotherton, J. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 50, 1087-1089.

## C

- Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Ravanat, J. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews Phys. Biochem. Pharm.* **1997**, 131, 1-87.
- Caja, G. La garrofa: composición, procesado y sus usos agroalimentarios. *Jornadas sobre la garrofa*. Liria (Valencia), **1985**.
- Calabrese, V.; Cornelius, C.; Mancuso, C.; Pennisi, G.; Calafato, S.; Bellia, F.; Bates, T.E.; Giuffrida Stella, A .M.; Schapira, T.; Dinkova Kostova A.T.; Rizzarelli, E. Cellular Stress Response: A novel target

- for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity . *Neurochemical research*. **2008**, 33, 2444-2471.
- Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 14, 303-311.
- Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates- nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1033-1043.
- Cooper, K. A., Giménez, E. C., Alvarez, D. J., Nagy, K., Donovan, J. L., Williamson, G. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cacao polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 2841-2847.
- Corsi, L.; Avallone, R.; Cosenza, F.; Farina, F. Baraldi, C.; Baraldi, M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. On mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fisioterapia*. **2002**, 73, 674-684.
- Cos, P.; Ling, Y.; Calomme, M.; Hu, J.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.; Vanden Berghe, D. Structur-Activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 71-76.
- Counet, C.; Collin, S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6816-6822.

## D

- D.O.C.E. Directiva 2009/32/CE del Parlamento europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes, del 6/6/2009 L141, 3-11.
- Das, N.; Pereira, T. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 67, 255-258.
- Davis, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I general aspects. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 9895-9901.
- Day, A.; Gee, J.; Dupont, M.; Johnson, I.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4-O-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharm.* **2006**, 65, 1199-1206.
- Dewick, P. The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 181-222.
- Dillinger, T.; Barriga, P.; Escarcega, S.; Jimenez, M.; Lowe, D.; Grivetti, L. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2057-2072.
- Dziedzic, S.; Hudson, B. Hydroxyisoflavones as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* **1983**, 11, 161-166.

## E

- Esbenshade, H.; Wilson, G. Growing carobs in Australia. *Ed. Goddard and Dobson*. Victoria, Australia. **1986**.
- Espin, J.; García-Conesa, M. ; Tomás-Barberán, F. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochem.* **2007**, 68, 2986-3008.
- Esterbauer, H.; Schaur, R.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Bio. Med.* **1991**, 11, 81-128.
- Eteng, M.; Ettarh, R. Comparative effects of theobromine and cacao extracts on lipid profile in rats. *Nut. Res.* **2000**, 10, 1513-1517.

## F

- Fori, M.; Piattelli, M.; Baratta, M.; Ruberto, G. Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 497-501.
- Forschy, W. Cacao polyphenolic substances. III Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochem. J.* **1955**, 60, 108-111.
- Forsyth, W.; Quesnel, V. The mechanism of cacao during curing. *Adv. Enzymol.* **1963**, 25, 457-492.
- Frankel, E.; Meyer, A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1925-1941.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 97-112.

## G

- Garrett, D. ; Failla, M.; Sarama, R. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4301- 4309.
- Gerritsma, K.; Koers, J. Determination of theobromine in cacao residues. *Analyst.* **1953**, 78, 201-205.
- Gershman, R.; Gilbert, D.; Nye, S.; Dwyer, P.; Fenn, W. Oxygen poisoning and X-irradiation- a mechanism in common. *Science.* **1954**, 119, 623-626.
- Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 1, 29-36.
- Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food. Res. Technol.* **2002**, 214, 266-159.
- Gille, J.; Van Berkel, C.; Joenje, H. Effect of iron chelators on the cytotoxic and genotoxic action of hyperoxia in Chinese hamster ovary cells. *Mut. Res. DNAging Gen. Inst. Ag.* **1992**, 275, 31-39.
- Glazer, A. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Meth. Enzym.* **1990**, 180, 161-168.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with

an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 50, 4852-4860.

Gu, L.; House S.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cacao and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4057-4061.

## H

Halliwell, B.; Chirico, S.; Crawford, M.; Bjerve, K.; Gey, K. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, 57, 715-725

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology.* **2006**, 141, 312-322.

Halliwell, B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health. *Cardiovasc. Res.* **2007**, 73, 341-347.

.Hammerstone, J.; Lazarus, S.; Mitchell, A.; Rucker, R.; Schmitz, H. Identification of procyanidins in cacao and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 490-496.

Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, 8, 950-988.

Handelman, G.; Cao, G.; Walter, M.; Nightingale, Z.; Paul, G.; Prior, R.; Blumberg, J. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, 47, 4888-4893.

Harborne, J.; Dey, P. *Methods in Plant Biochemistry.* London: Academic Press. **1989**.

Heinonen, S.; Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S. And Adlercreutz, H. In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3178-3186.

Henry, C.; Vitrac, X.; Decendit, A.; Ennamany, R.; Krisa, S.; Mérillon, J. Cellular uptake and efflux of *trans*-piceid and its aglycone *trans*-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 798-803.

Henry-Vitrac, C.; Desmoulière, A.; Girard, D.; Mérillon, J.; Krisa, S. Transport, deglycosylation, and metabolism of *trans*-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, 376–382.

Hermann, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, 28, 315-347.

Hirano, R.; Osakabe, N.; Iwamoto, A.; Matsumo, A.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Igarashi, O.; Itakura, H.; Kondo, K. Antioxidant effects of polyphenols in chocolate on low-density lipoprotein both in vitro and ex vivo. *J. Nutr. Sci. Vit.* **2000**, 46, 199-204.

Holst, B.; Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficiency beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology.* **2008**, 19, 73-82.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. The chemistry behind the antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.

## J

Jalal, W.; Collin, H. Estimation of caffeine, theophylline and theobromine in plant material. *New Phytol.* **1975**, *76*, 277.

Jang, M.; Pezzuto, JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1997**, *25*, 65-77.

Johannsen, M.; Brunner, G. Measurements of solubilities of xanthines in supercritical carbon dioxide plus methanol. *J. Chem. Eng. Data.* **1995**, *40*, 431-434.

## K

Kealey, K.; Snyder, R.; Romanczyk, L.; Geyer, H.; Myers, M.; Withcare, E.; Hammerstone, J.; Schmitz, H. Cacao components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. *Patent Cooperation Treaty WO 98/09533*, Mars Incorporated, USA, **1998**.

Kelly, C. Effects of theobromine should be considered in futur estudies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 483-489.

Keogh, J.; McInerney, J.; Clifton, P. The effect of milk protein on the bioavailability of cacao polyphenols. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 230-233.

Kim, H. Keeney, P. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cacao beans. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1090-1092.

Klenow, S.; Jahns, F.; Pool-Zobel, B.; Gleis, M. Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2999-3004.

Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620-650.

Kreiser, W.; Martin, R. Cacao products: HPLC determination of theobromine and caffeine in cacao and cacao products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1978**, *61*, 1424-1427.

Krinsky, N. Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **1993**, *13*, 561-587.

Kroon, P.; Clifford, M.; Crozier, A.; Day, A.; Donovan, J.; Manach, C. Williamson, G. How we should assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 15-21.

Kumazawa, S.; Taniguchi, M.; Suzuki, Y.; Shimura, M.; Kwon, M.; Nakayama, T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 373-377.

## L

- Lamuela, R.; Romero, A.; Permanyer, J.; Izquierdo, M. More antioxidants in cacao. *J. Nutr.* **2001**, 131, 834.
- Lazarus, S.A., Adamson, G.E., Hammerstone, J. F. Schmitz, H.H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of procyanidins in food and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3693-3701.
- Lee, K. W; Kim, Y. J.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7292-7295.
- Lee, S.; Hudson, R.; Kilpatrick, K.; Graham, T., Ross, R. Caffeine ingestion is associated with reductions in glucose uptake independent of obesity and Type 2 Diabetes before and after exercise training. *Diabetes Care.* **2005**, 28, 566-572.
- Lewis, CE; Walker, JRL, Lancaster JE; Sutton KH. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 77, 45-47.
- Li, S.; Hartland, S.; Influence of cosolvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cacao butter from cacao beans with supercritical carbon CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids.* **1992**, 5, 7-12.

## M

- Makris, D.; Kefalas, P. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, 42, 105-108.
- Makris, D.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J. Food Anal. Comp.* **2007**, 20, 125-132.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols-food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727-747.
- Martens, S.; Mithöfer, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochem.* **2005**, 99, 2399-2407.
- McCord, J.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6049-6055.
- Merwin, M. The culture of carob (*Ceratonia siliqua* L.) for food, fodder and fuel in semi-arid environments. *Int. Tree Croops Inst.* California, USA. **1981**.
- Miller, D.; Schrickler, B.; Rasmussen, R.; Van Campen, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, 34, 2248-2256.
- Minekus, M.; Marteau, P.; Havenaar, R.; Huis in't Veld, J. A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA.* **1995**, 23, 197-209.

## N

Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cacao and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bio. Biotech. Biochem.* **2000**, 64, 2581-2587.

Nehlig, A.; Daval, J. Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanism for action, biochemical, metabolic, and psychostimulant effects. *Brain Res. Rev.* **1992**, 17, 139-170.

Nieto, S.; Garrido, A.; Sanhueza, J.; Loyola, L.; Morales, G.; Leighton, F.; Valenzuela, A. Flavonoids as stabilizers of fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, 70, 773-778.

## O

O'Brien N.; Woods J.; Aherne S.; O'Callaghan Y. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 22-26.

Owen, R.; Haubner, R.; Hull, W.; Erben, G.; Spigelhalter, B.; Bartsch, H.; Haber, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41, 1727-1738.

## P

Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.; Mellenthin, A.; Haber, B.; Galensa, R. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3784-3791.

Parada, J.; Aguilera, J. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* **2007**, 72, 21-32.

Paronetto, L. Polifenoli e tecnica enologica. Ed. Selepress. Milan (Italia). **1977**.

Peñalvo, J. Adlercreutz, H.; Uehara, M.; Ristimaki, A.; Watanabe, S. Lignan content of selected foods from Japan. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 401-409.

Porter, J.; Chan, B. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochem.* **1991**, 5, 1657-1663.

Price, L.; Butler, L. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 1268-1273.

Prior, R.; Hoang, H.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3273-3279.

Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290-4302.

Pura, N. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cacao and cacao products. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3579-3583.



## R

- Rice, C. Miller, N; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Scien.* **1997**, 2, 152-159.
- Rabameda, F. S.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Lacueva, C. A.; Pulido, M. I.; Raventós, R. L. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cacao (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 35-42.
- Rice, C.; Miller, N.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20, 933-956.
- Rice, C.; Miller, N; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Scien.* **1997**, 2, 152-159.
- Rice, C.; Bagchi, D. Nutritional proanthocyanidins, flavonoids, and related phenols. *Antiox. Redox Sign.* **2001**, 3, 939-940.
- Rigaud, J.; Escribano. M.; Prieur, C.; Souquet, J.; Cheynier, V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins of cacao beans and grape seeds. *J. Chrom. A* **1993**, 19, 255-260.
- Rios, L.; Bennet R.; Lazarus, S.; Révész, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. Cacao procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 76, 1106-1110.
- Robards, K.; Prenzler, P.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436.
- Ross, J.; Kasum, C. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, 22, 19-34.

## S

- Salas, E.; Fulcrand, H., Meudec, E., Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, 51, 7951-7961.
- Saldana, M.; Zetzi, C.; Mohamed, R.; Brunner, G. Extraction of methylxanthines from guarana seeds, mate leaves, and cacao beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4820-4826.
- Sambarato, D. Esperienze di estrazione della teobromina de cacao con anidride carbonica supercritical, Dissertation, University of Milan, Milan, Italy, **1984**.
- Sanbongi, C.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Takizawa, T., Shuichi, G.; Osawa, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 454-457.
- Sanchez, F.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Andrés, C.; Izquierdo, M.; Lamuela, R. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometry study of the phenolic composition of cacao (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* **2003**, 8, 35-42.

- Saura-Calixto, F.; Cañellas, J. Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* **1982**, 33, 1319-1323.
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2733-2738.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, 45, 287-306.
- Senanayake, U.M., Wijesekera, R.O.B., Theobromine and caffeine content of the cacao bean during growth. *J. Sci. Food Agric.* **1971**, 22, 262-263.
- Serafini, M.; Ghiselli, A.; Ferro-Luzzi, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **1996**, 50, 28-32.
- Serrano, J.; Puupponen, R.; Dauer, A.; Aura, M.; Saura-Calixto, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53, 310-329.
- Senanayake, U.; Wijesekera, R. Theobromine and caffeine content of the cacao bean during growth. *J. Sci. Food Agric.* **1971**, 22, 262-263.
- Shahidi, F.; Naczk, M. Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Technomic, Publishing CO. INC eds. Lancaster, Pennsylvania. **1995**.
- Shahkhalili, Y.; Finot, P.; Hurrell, R.; Fern E. Effects of food rich in polyphenols on nitrogen excretion in rats. *J. Nutr.* **1990**, 120, 346-352.
- Sies, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* **1991**, 69, 965-968.
- Simonetti, P.; Gardana, C.; Riso, P.; Mauri P.; Pietta, P.; Porrini, M. Glycosylated flavonoids from tomato puree are bioavailable in humans. *Nutrit. Res.* **2005**, 25, 717-726.
- Singh, M.; Arseneault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V.; Ramassamy, C. Challenges for research on polyphenols from food in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4855-4873.
- Singleton, V.; Rossi, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vit.* **1965**, 16, 144-158.
- Sinha, K.; Chaudhary, G. Gupta, Y. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* **2002**, 71, 655-665.
- Sotelo, A.; Alvarez, R. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their composition to the cacao bean. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1940-1943.
- Spencer, J.; Chaudry, F.; Pannala, A.; Srail, S.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Decomposition of cacao procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 47, 4184-4188.
- Spencer, J.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Kaila, S; Srail, S.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B<sub>2</sub> and B<sub>5</sub> after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 285, 588-593.

Springob, K.; Nakajima, J.; Yamazaki, M.; Saito, K. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 288–303.

Stadman, E.; Levine, R. Free radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* **2003**, *25*, 207-218.

Stewart, A.; Bozonnet, S.; Mullen, W.; Jenkins, G.; Lean, M.; Crozier, A. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2663-2669.

Sun, T.; Ho, C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem.* **2005**, *90*, 743-749.

## T

Tereda, H.; Sakabe, Y. High-performance liquid chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products. *J. Chromat.* **1984**, *291*, 453-459.

Toledano, H.; Kraut, J.; Sines, T.; Granot, S.; Shohat, G.; Gil, H.; Yung, Y.; Elson A. Protein tyrosine phosphatase  $\xi$  inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cancer Res.* **2003**, *1*, 541-550.

Tomas-Barberan, F.; Clifford M. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci Food Agric.* **2000**, *80*, 1024-1032.

Torronen, R.; Hakkinen, S.; Karenlampi, S.; Mykkanen, H. Flavonoids and phenolic acids in selected berries. *Cancer Lett.* **1997**, *114*, 191-192.

Tous J.; Batlle, I. El algarrobo. *Ed. Mundi-Prensa.* Madrid. **1990**.

Tous, J.; Batlle, I.; Rallo, J.; Romero, A. Prospección de variedades de algarrobo en las islas Baleares. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* **2001**, *16*, 187-203.

Tsang, C.; Auger, C.; Mullen, W.; Bornet, A. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *B. J. Nutr.* **2005**, *94*, 170-181.

Turhan, I.; Tetik, N.; Aksu, M.; Karhan, M.; Certel, M. Liquid-solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob bean. *J. Food Process Eng.* **2006**, *29*, 498-507.

## U

Ultee, A.; van Dorsen, J. Bijdrage tot de kennis der op Java gecultiveerde cacaosooten. *Java Agric. Station Rep.* **1909**, *33*.

Upson, J.; Terentis, A.; Stocker, R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *The FASEB Journal.* **1999**, *13*, 997-994.

Urquiaga, I.; Leighton, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* **2000**, *33*, 55-64.

## V

Vinson, J.; Proch, J. Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cacao, dark chocolate, and milk chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4821-4824.

## W

- Wadsworth, R.; Tritametric method for determination of theobromine in cacao. *Analyst*. **1921**, 46, 32.
- Waterhouse, A.; Shirly, J.; Donovan, J. Antioxidants in chocolate. *The Lancet*. **1996**, 348, 834.
- Wheldale, M. The anthocyanin pigments of plants. *Cambridge University Press*. **1916**.
- Wiseman, H. Isoflavonoid and human health in Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and Applications. *CRC Press. Boca Raton. FL*. **2006**, 377-396.
- Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* **2000**, 33, 423-447.
- Wollgast J.; Pallaroni, L.; Agazzi, M. E.; Anklam, E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometry and tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatography A*. **2001**, 926, 211- 220.
- [www.ainia.es/html/sites/09/noticias/Presentacion\\_virtual\\_digestor.swf](http://www.ainia.es/html/sites/09/noticias/Presentacion_virtual_digestor.swf), setembre 2009.
- [www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov), octubre 2009.
- [www.barry-callebaut.com](http://www.barry-callebaut.com), History of chocolates, agost 2009.
- [www.modelgut.com](http://www.modelgut.com), setembre 2009.
- [www.na.usda.gov/fnic/foodcomp](http://www.na.usda.gov/fnic/foodcomp), agost 2009.
- [www.niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html](http://www.niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html), octubre 2009.

## X

- Xie, D.; Dixon, R. Proanthocyanidin biosynthesis- still more questions than answers? *Phytochem*. **2005**, 66, 2127-2144.

## Y

- Yousif, A.; Alghzawi, H. Processing and characterization of carob powder. *Food Chem*. **2000**, 69, 283-287.

## Z

- Zou, C.; Agar, N.; Jones, G. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences*. **2001**, 69, 75-86.
- Zulak, K.; Liscome, D.; Ashihara, H.; Facchini, P.; Alkaloids. In: Crozier, A., Clifford, M.N. Ashihara, H. Plant secondary metabolites: occurrence structure and role in the human diet. *Blackwell, Oxford*. **2006**, 102-136.





## 1. Informació addicional a l'obtenció dels extractes fenòlics

A continuació es presenta una relació de dades no contemplades en cap dels capítols publicats i que s'han emprat durant la discussió general de la tesis.

### 1.1. Rendiments del desengreixat de les fonts de cacau

Els resultats del rendiment de l'etapa de desengreixat de les mostres de cacau es mostren en la següent taula:

**Taula 7.** Rendiments de l'etapa de desengreixat de les mostres de cacau, expressat per g d'extracte desengreixat per 100 g de mostra inicial

Font	Extracció S-L (g mostra desengreixada/100g mostra)
Fava	48.63 ± 0.57
Nib	49.22 ± 1.45
Licor	54.67 ± 1.02
Pols	15.40 ± 0.87

Mitjana ± desviació standard (valor promig de 5 repeticions)

### 1.2. Rendiments d'extracció de la fracció fenòlica de les fonts de cacau

A continuació es presenten els resultats dels rendiments de les extraccions aplicades sobre les matrius de cacau: extracció S-L, per a l'obtenció dels extractes bruts de cacau i l'extracció en fase sòlida (SPE) per a l'obtenció dels extractes purificats.

**Taula 8.** Rendiments de l'etapa d'extracció fenòlica S-L i SPE sobre extractes bruts de cacau, expressat per g d'extracte fenòlic brut i purificat per 100g de mostra inicial

Font	Extracció S-L (g extracte/100g mostra)	Extracció SPE (g extracte/100g mostra)
Fava	8.2 ± 1.84	3.3 ± 0.73
Nib	8.11 ± 0.91	3.4 ± 0.48
Licor	8.5 ± 1.26	3.6 ± 0.54
Pols	16.4 ± 0.98	4.1 ± 0.37

Mitjana ± desviació standard (valor promig de 3 repeticions)

El cartutx que es va utilitzar per a realitzar la SPE es prepara manualment al laboratori amb 1g de C<sub>18</sub> com a fase estacionària, col·locant llana de vidre en la base per a evitar la pèrdua de la fase estacionària. L'optimització d'aquesta etapa va donar lloc als següents paràmetres per a cadascuna de les etapes que componen aquesta extracció:

**Taula 9.** Condicions optimitzades de l'etapa fenòlica SPE per l'obtenció dels extractes purificats del cacau

<b>Etapa</b>	<b>Solvent - Mostra</b>	<b>Volum- Concentració</b>
(1) Condicionament del cartutx	Metanol:Aigua*	10mL:10mL
(2) Addició de la mostra	Extracte brut de cacau	100mg extracte/1mL aigua*
(3) Eliminació d'interferències	Aigua*	20 mL
(4) Elució de l'extracte	Acetona:Aigua*:Àcid acètic (70:229.5:0.5) (v:v:v)	20 mL

\*Aigua MilliQ

Els resultats de les recuperacions de l'extracció en fase sòlida (SPE) per a l'obtenció dels extractes purificats de cacau amb l'ús de la catequina com a patró estàndard es mostren seguidament:

**Taula 10.** Recuperacions de la catequina en l'etapa d'extracció SPE per l'obtenció d'extractes purificats de cacau

<b>Font</b>	<b>% Recup-1</b>	<b>% Recup-2</b>	<b>Promig</b>
Fava	87.18	94.20	90.69
Nib	107.14	94.63	100.88
Licor	93.42	86.05	89.73
Pols	100.29	94.87	97.58

### 1.3. Caracterització fenòlica de les fonts de cacau

Per a l'obtenció de la caracterització fenòlica de les matrius de cacau d'estudi s'ha partit de les dades de la caracterització fenòlica dels extractes bruts així com dels rendiments de l'extracció fenòlica i de l'etapa de desengreixat.

**Taula 11.** Quantificació de procianidines, àcids fenòlics i flavonoides en les diferents matrius d'estudi del cacau: fava, nib, licor i pols de cacau.

<b>Fenol</b>	<b>Fava</b>	<b>Nib</b>	<b>Licor</b>	<b>Pols</b>
<b>Procianidines (mg catequina/g cacau)</b>				
Catequina	0.01	0.11	0.06	0.04
Epicatequina	0.12	0.25	0.18	0.02
Dímer	0.34	0.60	0.39	0.07
Trímer	0.18	0.28	0.18	0.01
Tetràmer	0.07	0.07	0.06	0.00
Pentàmer	0.00	0.01	0.00	n.d.
Hexàmer	0.01	0.00	0.01	n.d.
Heptàmer	0.00	0.00	0.00	n.d.
Octàmer	0.00	0.00	0.00	n.d.
Nonàmer	0.00	0.00	0.00	n.d.
Epigal-locatequina	3.69	7.54	5.14	1.51
<b>TOTAL</b>	<b>4.43</b>	<b>8.86</b>	<b>6.01</b>	<b>1.66</b>



<b>Alcaloides (mg alcaloide/g cacau)</b>				
Teobromina	1.78	1.76	2.01	1.75
Cafeïna	0.18	0.13	0.16	0.15
<b>TOTAL</b>	<b>1.97</b>	<b>1.90</b>	<b>2.18</b>	<b>1.90</b>
<b>Àcids fenòlics (µg estàndard/g cacau)</b>				
àcid hidroxibenzoic	1.65	1.41	1.87	1.28
àcid vainillic	1.08	0.85	0.82	0.37
àcid cafeic	3.05	3.35	3.41	1.76
àcid siringic	0.33	0.43	0.38	0.30
àcid ferúlic	0.14	0.11	0.07	0.02
vanillina	0.20	0.14	0.13	0.04
àcid cumàric	1.06	1.09	0.86	0.60
àcid cinàmic	0.55	0.29	0.80	0.71
àcid clorogènic	0.97	1.07	1.64	0.45
àcid protocatèquic	19.61	17.17	22.35	25.97
<b>TOTAL</b>	<b>28.63</b>	<b>25.90</b>	<b>32.32</b>	<b>31.50</b>
<b>Flavones (µg estàndard/g cacau)</b>				
Quercetina	4.19	9.09	11.17	1.41
Quercetina-glucoside	120.55	139.57	103.55	14.53
Quercetina-rutinoside	0.89	1.12	1.16	0.57
Quercetina-arabinoside	129.95	154.66	126.52	16.36
Dihidroquercetina	3.92	5.96	5.23	1.48
Dihidrokaempferol	29.22	45.64	33.92	4.22
Kaempferol-rutinoside	20.59	29.26	25.79	14.24
Naringenina	0.98	1.18	1.26	0.12
Naringenina-glucoside	2.91	4.17	3.02	0.50
Miricetina-glucoside	4.86	6.46	6.46	3.97
Luteolina	3.69	3.74	4.98	0.71
Luteolina-glucoside	7.38	11.35	10.59	3.87
Apigenina	0.11	0.11	0.18	0.02
Apigenin-glucoside	0.04	0.06	0.05	0.02
<b>TOTAL</b>	<b>329.29</b>	<b>412.36</b>	<b>333.87</b>	<b>62.02</b>

#### 1.4. Rendiments de l'etapa de desengreixat i rentat de la farina de garrofa

A continuació es mostren els rendiments de l'etapa de desengreixat i del rentat de la farina de garrofa, així com els sòlids solubles de les aigües de rentat, expressat en °Brix.

**Taula 12.** Rendiments de l'etapa del desengreixat i rentat de la farina de garrofa, expressat en g de farina de garrofa desengreixada i rentada per 100g de mostra, respectivament. Caracterització de les aigües de l'etapa de rentat de la farina de garrofa (500 mL), expressat en °Brix.

Font	Extracció S-L (g farina garrofa desengreixada/100g mostra)	Rendiment del rentat (g farina garrofa rentada/100g mostra)	Aigües de rentat °Brix
Farina de garrofa	6.52 ± 0.57	48.42 ± 2.34	2.9 ± 0.1

Mitjana ± desviació standard (valor promig de 5 repeticions)

## 1.5. Rendiments d'extracció de la fracció fenòlica de la farina de garrofa i farina de garrofa rentada

Taula 13. Rendiments d'extracció fenòlica de la farina de garrofa i farina de garrofa rentada

Mostra	Dissolvent	Rendiment (pes)	Mitjana	Desvest
GARROFA SONICADOR RENTADA	1A	63	57.4308	8.1879
	2A	52		
	1B	53	53.0985	0.7852
	2B	54		
	1C	72	71.2004	0.7456
	2C	71		
	1D	57	55.7737	1.1590
	2D	55		
	1E	57	58.1137	1.9218
	2E	59		
	1F	51	61.7392	14.5492
	2F	72		
GARROFA SONICADOR NO RENTADA	1A	11	11.2272	0.6816
	2A	12		
	1B	13	12.6747	0.1078
	2B	13		
	1C	14	18.4064	6.3266
	2C	23		
	1D	14	14.5462	0.1631
	2D	15		
	1E	13	13.6549	0.2440
	2E	14		
	1F	12	12.9627	1.9604
	2F	14		
GARROFA POLYTRON RENTADA	1A	55	55.5122	0.5802
	2A	56		
	1B	57	56.1724	0.5689
	2B	56		
	1C	62	65.8922	5.1827
	2C	70		
	1D	57	56.5799	0.0799
	2D	57		
	1E	59	58.4607	0.5900
	2E	58		
	1F	74	74.5812	0.5436
	2F	75		
GARROFA POLYTRON NO RENTADA	1A	12	11.9540	0.0870
	2A	12		
	1B	11	11.4345	0.2118
	2B	12		
	1C	10	10.7204	0.5041
	2C	11		
	1D	12	11.9451	0.4165
	2D	12		
	1E	13	13.4203	1.1026
	2E	14		
	1F	11	10.8121	0.1967
	2F	11		

A: Metanol:H<sub>2</sub>O (80:20)  
 B: Acetona:H<sub>2</sub>O (80:20)  
 C: Etanol:H<sub>2</sub>O (80:20)  
 D: Metanol:H<sub>2</sub>O (70:30)  
 E: Acetona:H<sub>2</sub>O (70:30)  
 F: Etanol:H<sub>2</sub>O (70:30)

## 2. Informació complementària a l'anàlisi cromatogràfic de polifenols de *Ceratonia siliqua* L.

A continuació es presenta una relació de dades vinculades durant el desenvolupament del mètode cromatogràfic per UPLC-MS/MS per a la caracterització dels polifenols en farina de garrofa (Capítol 2).

Taula 14. Condicions SRM per a l'anàlisi de polifenols i alcaloides per UPLC-MS/MS.

Compound	ESI	SRM <sub>1</sub> (quantification)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)	SRM <sub>2</sub> (confirmation)	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)
Cinamic acid	[M-H]	147 > 103	20	10	-	-	-
Coumaric acid	[M-H]	163 > 119	25	10	163 > 117	25	25
Gallic acid	[M-H]	169 > 125	35	10	169 > 97	35	15
Ferulic acid	[M-H]	193 > 134	30	15	193 > 178	30	10
Syringic acid	[M-H]	197 > 182	30	10	197 > 153	30	10
Genistein	[M-H]	269 > 133	30	27	269 > 180	30	30
Apigenin	[M-H]	269 > 117	60	25	269 > 151	60	25
Naringenin	[M-H]	271 > 151	40	15	271 > 119	40	20
Luteolin	[M-H]	285 > 133	55	25	285 > 151	55	25
Kaempferol	[M-H]	285 > 151	35	15	285 > 257	35	15
Quercetin	[M-H]	301 > 151	40	15	301 > 179	40	15
Myricetin	[M-H]	317 > 179	40	15	317 > 151	40	20
Caffeine	[M-H] <sup>+</sup>	195 > 136	45	15	195 > 110	45	20
Theobromine	[M-H] <sup>+</sup>	181 > 163	45	15	181 > 140	45	10

### 3. Documentació científica presentada en el congrés internacional de polifenols (ICP)

A continuació es presenten els dos pòsters presentats en el ICP que va tenir lloc a Salamanca (Juliol 2008).



#### Comparative study of the composition and the antioxidant activity of the phenolic extracts obtained from different cocoa sources

Nàdia Ortega<sup>1,2\*</sup>, Maria P. Romero<sup>1</sup>, Jordi Reguant<sup>2</sup>, Neus Anglès<sup>2</sup>, Maria J. Motilva<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Food Technology Department, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Ample s/n, 43392 Castellvell del Camp, Tarragona, Spain

\*Corresponding author: nolive@tecal.udl.cat



#### INTRODUCTION

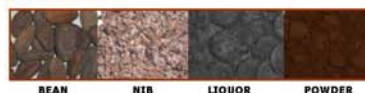
Cocoa beans and by-products are an important food source rich in polyphenolic compounds. The most abundant polyphenol group in cocoa samples is procyanidins. However, there is little information about other phenolic groups, such as flavonoids and phenolic acids, which could also contribute to the health benefits of cocoa.

**The aim of this work** was to characterize the composition of different phenolic cocoa extracts obtained from several cocoa samples (bean, nib, liquor and powder), and also to determine the antioxidant activity of the cocoa phenolic extracts to establish which phenolic compound would best describe the antioxidant activity from the cocoa sources.

#### EXPERIMENTAL CONDITIONS

The cocoa phenolic extracts (CE) from the different cocoa sources and their characterization by UPLC-MS/MS were carried out following the methods described by Ortega et al. (1). The ORAC assay was performed as described by Ou et al. (2).

#### COCOA SOURCES



#### RESULTS AND DISCUSSION

As it can be seen in Table 1, the phenolic profile in all the phenolic extracts was mainly characterized by two phenolic groups: the major fraction was procyanidins followed by flavones, independently of the cocoa source.

The total phenolic content varied significantly for all the cocoa products. The results indicated that nib cocoa extract contains the highest procyanidins and flavone content. This is not surprising since nibs are ground and roasted during the cocoa process, which could explain the increase on the phenol extraction in comparison with cocoa beans. On the other hand, the lower values observed in cocoa liquor and powder extracts could be due to the pressing and milled process, respectively.

Table 1. Quantification by UPLC-MS/MS of phenolic compounds in different cocoa sources

Phenol	Bean	Nib	Liquor	Powder
Procyanidins (µg catechin/g lyophilized CE)				
Catechin	335 ± 83.4 <sup>a</sup>	2374 ± 90.3 <sup>b</sup>	1223 ± 127 <sup>c</sup>	1803 ± 321 <sup>d</sup>
Epicatechin	3011 ± 53.2 <sup>a</sup>	5638 ± 51.4 <sup>b</sup>	3873 ± 217 <sup>c</sup>	922 ± 74.2 <sup>d</sup>
Dimer	8214 ± 52.1 <sup>a</sup>	1320 ± 157 <sup>b</sup>	8341 ± 481 <sup>c</sup>	2914 ± 174 <sup>d</sup>
Trimer	4410 ± 28.7 <sup>a</sup>	6216 ± 410 <sup>b</sup>	3776 ± 182 <sup>c</sup>	398 ± 22.5 <sup>d</sup>
Tetramer	1770 ± 28.7 <sup>a</sup>	1571 ± 80.4 <sup>b</sup>	1191 ± 111 <sup>c</sup>	28.2 ± 21.1 <sup>d</sup>
Pentamer	46.1 ± 17.4 <sup>a</sup>	157 ± 15.7 <sup>b</sup>	21.2 ± 10.3 <sup>c</sup>	n.d.
Hexamer	156 ± 64.5 <sup>a</sup>	100 ± 40.6 <sup>b</sup>	115 ± 82.4 <sup>c</sup>	n.d.
Heptamer	27.1 ± 10.4 <sup>a</sup>	18.4 ± 3.12 <sup>b</sup>	21.4 ± 13.2 <sup>c</sup>	n.d.
Octamer	23.5 ± 10.7 <sup>a</sup>	17.6 ± 1.14 <sup>b</sup>	12.8 ± 11.2 <sup>c</sup>	n.d.
Nonamer	20.4 ± 9.14 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.12 <sup>b</sup>	9.22 ± 1.12 <sup>c</sup>	n.d.
Epigallocatechin	90.2 ± 11.4 <sup>a,b</sup>	167 ± 42.6 <sup>b</sup>	109 ± 26.3 <sup>c</sup>	61.8 ± 30.2 <sup>d</sup>
Flavonoids (µg standard/g lyophilized CE)				
Quercetin	102 ± 26.8 <sup>a</sup>	202 ± 56.9 <sup>b</sup>	238 ± 35.3 <sup>c</sup>	7.4 ± 3.51 <sup>d</sup>
Quercetin-glucoside	2940 ± 193 <sup>a</sup>	3094 ± 230 <sup>b</sup>	2215 ± 262 <sup>c</sup>	590 ± 58.6 <sup>d</sup>
Quercetin-rutinoside	21.8 ± 1.53 <sup>a</sup>	24.8 ± 1.23 <sup>b</sup>	24.7 ± 2.21 <sup>c</sup>	23.2 ± 1.17 <sup>d</sup>
Quercetin-arabinoside	3169 ± 51.1 <sup>a</sup>	3429 ± 103 <sup>b</sup>	2706 ± 87.6 <sup>c</sup>	665 ± 15.6 <sup>d</sup>
Dihydroquercetin	95.6 ± 6.25 <sup>a</sup>	132 ± 16.4 <sup>b</sup>	112 ± 2.38 <sup>c</sup>	60.3 ± 4.67 <sup>d</sup>
Dihydroxykaempferol	713 ± 51.8 <sup>a</sup>	1012 ± 85.1 <sup>b</sup>	725 ± 31.2 <sup>c</sup>	171 ± 4.52 <sup>d</sup>
Kaempferol-rutinoside	502 ± 19.1 <sup>a</sup>	649 ± 56.3 <sup>b</sup>	552 ± 39.4 <sup>c</sup>	579 ± 100 <sup>d</sup>
Naringenin	23.9 ± 0.34 <sup>a</sup>	26.2 ± 0.69 <sup>b</sup>	27.0 ± 3.36 <sup>c</sup>	5.08 ± 0.77 <sup>d</sup>
Naringenin-glucoside	70.9 ± 4.70 <sup>a</sup>	92.4 ± 10.6 <sup>b</sup>	64.6 ± 8.23 <sup>c</sup>	20.2 ± 1.58 <sup>d</sup>
Myricetin-glucoside	118 ± 17.9 <sup>a</sup>	143 ± 8.53 <sup>b</sup>	138 ± 11.0 <sup>c</sup>	161 ± 125 <sup>d</sup>
Luteolin	90.1 ± 20.8 <sup>a</sup>	82.9 ± 14.0 <sup>b</sup>	106 ± 18.5 <sup>c</sup>	29.1 ± 1.71 <sup>d</sup>
Luteolin-glucoside	180 ± 52.0 <sup>a</sup>	252 ± 76.5 <sup>b</sup>	226 ± 72.3 <sup>c</sup>	157 ± 53.3 <sup>d</sup>
Apigenin	2.72 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.21 <sup>b</sup>	3.83 ± 1.19 <sup>c</sup>	0.97 ± 0.13 <sup>d</sup>
Apigenin-glucoside	0.89 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.18 <sup>c</sup>	0.73 ± 0.15 <sup>d</sup>

n.d.: not detected

Values in the same row followed by different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

From the obtained results, it could seem that procyanidins group contribute as the major group to the antioxidant activity.

#### Total Procyanidins and Flavonoids

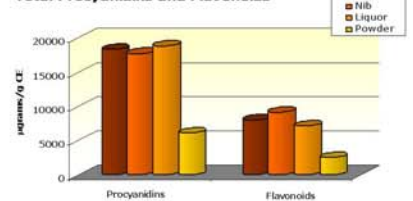


Figure 1. Determination by UPLC-MS/MS of the total procyanidins and flavonoids in the different cocoa sources

#### Antioxidant activity (ORAC)

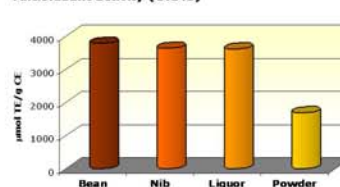


Figure 2. Determination of the total antioxidant activity in the different cocoa sources expressed as micromols of Trolox equivalents per g of CE

#### REFERENCES

- [1] Ortega, N. et al. (2008) Food Chem. (submitted)
- [2] Ou, B. et al. (2002) J. Agric. Food Chem. 49:4619-4626

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CENIT program from the Spanish Minister of Industry and by the consortium of companies led by La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain) with the following companies: Habisco Iberia, S.L.; B.T.S.A. Biotecnologías Aplicadas, S.L.; Selección Batallé, S.A.; Industrial Técnica Pecuaría, S.A.; Neuron BioPharma, S.A.; Shirotta Functional Foods, S.L.; Grupo Leche Pascual, S.A.U.; Innaves, S.A.



## Comparison of an optimized UPLC-MS/MS method with HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples

Nàdia Ortega<sup>1,2</sup>, Maria P. Romero<sup>1</sup>, **Alba Macià<sup>1\*</sup>**, Jordi Reguant<sup>2</sup>, Neus Anglès<sup>2</sup>, Jose R. Morello<sup>2</sup>, Maria J. Motilva<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Food Technology Department, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain  
\*Corresponding author: albamacia@tecal.udl.cat

<sup>2</sup>R+D+i Department, La Morella Nuts, S.A., Camí Amples/n, 43392 Castellvell del Camp, Tarragona, Spain



### INTRODUCTION

Cocoa is a food rich in polyphenols, mainly procyanidins. The analytical methodologies reported in the literature for the analysis of procyanidins in cocoa samples are based on HPLC in normal phase. Unfortunately, all these methods require a lengthy analysis time [1]. Recently, the technique LC has been improved by the use of UPLC, which is able to shorten the analysis time because of the reduction in size particle and the use of shorter columns.

The aim of this study was to develop and compare two different analytical methods, based on HPLC-MS/MS (in the normal phase) and the new UPLC-MS/MS (in the reverse phase) for the analysis of procyanidins and caffeine and theobromine. Next, the two developed methodologies were applied and compared for the analysis of different cocoa samples [2].

### EXPERIMENTAL CONDITIONS

#### LC-MS/MS

	HPLC	UPLC
Instrument:	Waters Acquity coupled to TQD mass spectrometer	Waters Acquity coupled to TQD mass spectrometer
Column:	Phenomenex Luna Silica (5 µm, 4.6 mm, 5 µm)	High Strength Silica (1.8 µm, 2.1 mm, 1.8 µm)
Mobile phase:	A: Dichloro methane/Methanol/Water Acetic acid (80/10/10/2)	A: Water/Acetic acid (100/0.2)
	B: Methanol/Water/Acetic acid (50/50/2)	B: Acetonitrile
Flow rate:	1 ml/min	0.4 ml/min
Injected volume:	10 µl	2.5 µl
Analytic time:	60 min	12.5 min
MS/MS mode:	Selected reaction monitoring (SRM)	

### RESULTS AND DISCUSSION

#### COCOA SOURCES

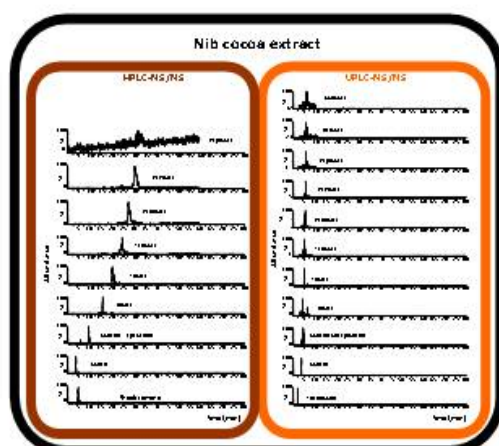


Figure 1. Extracted ion chromatograms for the analysis of the nib cocoa extract by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS

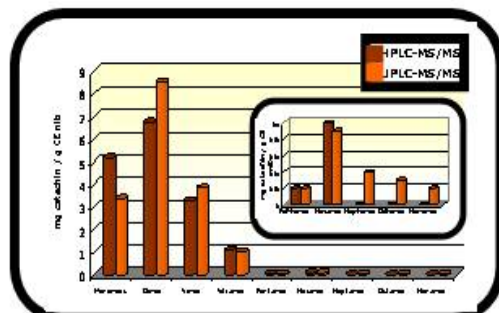


Figure 2. Comparative quantification by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS of procyanidins, expressed as mg catechin/g anetholic cocoa extract (CE) of nib

Table 1. Optimized SRM conditions for the analysis of procyanidins, caffeine and theobromine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS

Compound	[M+] <sup>+</sup>	SRM <sub>1</sub> (Q)	Collision energy (eV)	SRM <sub>2</sub> (Q)	Collision energy (eV)
Catechin	[161] <sup>+</sup>	291 + 212	45	10	291 + 205
Epigallocatechin gallate	[161] <sup>+</sup>	277 + 269	45	20	277 + 425
Theaflavin	[161] <sup>+</sup>	365 + 277	60	20	365 + 315
Theobromine	[161] <sup>+</sup>	1153 + 825	70	20	1153 + 575
Epigallocatechin gallate	[161] <sup>+</sup>	1441 + 1026	60	25	1441 + 1151
Theobromine	[161] <sup>+</sup>	1724 + 1153	60	30	1724 + 825
Caffeine	[161] <sup>+</sup>	1086 + 825	60	30	1086 + 575
Theobromine	[161] <sup>+</sup>	1152 + 825	65	25	1152 + 583
Theobromine	[161] <sup>+</sup>	1296 + 577	50	30	1296 + 1152
Caffeine	[161] <sup>+</sup>	115 + 138	45	15	115 + 110
Theobromine	[161] <sup>+</sup>	161 + 163	45	15	161 + 140

SRM<sub>1</sub> (Q): Transition for quantification

SRM<sub>2</sub> (Q): Transition for confirmation

Table 2. Retention time (RT), detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) for the analysis of catechin, caffeine and theobromine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS in standard solutions

Compound	HPLC			UPLC		
	RT (min)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	RT (min)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Catechin	10.94	20	60	3.68	10	40
Caffeine	3.77	1	3	3.63	1	3
Theobromine	4.55	30	100	2.13	30	100

**As conclusion**, the developed methodologies allowed determining the studied compounds at ng/ml concentration levels. When the 1.8 µm column was used, the method showed faster, more cost-effective, higher peak efficiency and more sensitive than the HPLC system

### REFERENCES

- Hammerstone et al. (1999) J. Agric. Food Chem. 47:490-496
- Ortega, N. et al. (2008) Food Chem. (submitted)

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CENIT program from the Spanish Ministry of Industry and by the extramural consortium led by La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain) made up of the following companies: Nalisco Iberia, S.L.; BISA, Biotecnologies Alimentàries, S.L.; Selsco Km Becanik, S.A.; Industrial Tècnica Peculiar, S.A.; Neuron Bioprogram, S.A.; Siroca Funcional Foods, S.L.; Grupo Leche Pascual, S.A.U.; Innoves, S.A.





