



**TREBALL DE RECERCA**

# **DE LA CUINA AL TUB D'ASSAIG**

Propietats antioxidants en bolets de consum habitual

"Que el teu aliment sigui la teva medicina, i que  
la teva medicina sigui el teu aliment".

Hipòcrates (s.V aC – IV aC)



## **AGRAÏMENTS**

Aquest treball no s'hauria dut a terme sense la participació i l'ajuda de moltes persones que han estat al meu costat al llarg de tots els mesos que ha durat la seva realització. Per això vull agrair:

A l'Esther Ros, per acceptar la direcció d'aquesta recerca, pel suport i l'interès que ha pres en la meva tasca. Perquè la seva ajuda en la correcció d'aquest treball ha estat molt important.

Al Dr. José Serrano i a Anna Cassanyé, sense els quals aquest treball hauria estat inviable, per les seves hores de dedicació gratuïta, pel coneixement que m'han transmès i en especial pel seu tracte i la seva amabilitat durant les pràctiques realitzades a la Facultat de Medicina.

A l'Àngel Rodríguez i Elena Gassent, per la seva hospitalitat, per haver-me posat en contacte amb la Facultat de Medicina i per haver-me animat en la tasca.

A aquelles persones que treballen a l'IES Ronda i que m'han facilitat el tràmit de les pràctiques d'empresa.

I finalment, a la meva família, els quals m'han guiat i han pres molta paciència durant la realització d'aquest treball, pel seu suport incondicional i la seva constància.

# **ÍNDEX GENERAL**

|  |    |
|--|----|
| 0. INTRODUCCIÓ.....  | 1  |
| 1. MARC TEÒRIC.....  | 4  |
| 1.1 L'oxidació.....  | 4  |
| 1.1.1 L'oxigen, ERO i l'organisme.....   | 4  |
| 1.1.2 Dany oxidatiu.....   | 5  |
| 1.1.3 Els radicals lliures.....  | 5  |
| 1.1.4 Els radicals creats per l'organisme.....   | 6  |
| 1.1.4.1 Radicals creats en la cadena respiratòria.....                                     | 6  |
| 1.1.4.2 Altres fonts de radicals lliures en l'organisme.....                               | 7  |
| 1.1.5 Formació dels radicals lliures per factors i processos<br>externs a l'organisme..... | 8  |
| 1.1.6 Estrès oxidatiu.....   | 10 |
| 1.1.7 Conseqüències de l'estrès oxidatiu.....  | 11 |
| 1.2 Els antioxidants.....  | 12 |
| 1.2.1 Tipus d'antioxidants.....  | 12 |
| 1.2.1.1 Els polifenols.....  | 13 |
| 1.2.2 Bioaccessibilitat i biodisponibilitat dels antioxidants....                          | 15 |
| 1.2.3 Capacitat antioxidant.....   | 16 |
| 1.2.4 Mètode d'actuació dels antioxidants.....   | 17 |
| 1.2.5 Antioxidants en la dieta.....  | 19 |
| 1.2.6 Principals substàncies antioxidants i les seves fonts....                            | 20 |
| 1.2.7 Els aliments més antioxidants.....   | 27 |
| 1.2.8 Beneficis dels antioxidants.....   | 28 |
| 1.3 El regne dels fongs.....   | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 2. PART EXPERIMENTAL.....                                    | 31 |
| 2.1 Hipòtesis.....   | 32 |
| 2.2 Metodologia.....   | 34 |
| 2.2.1 Procediments de preparació de les mostres.....         | 34 |
| 2.2.1.1 Tractaments culinaris de les diferents mostres...    | 34 |
| 2.2.1.2 Homogenització de les mostres.....                   | 34 |
| 2.2.1.3 Extracció <i>metanol/acetona/aigua</i> .....         | 35 |
| 2.2.1.4 Càlcul de la humitat.....                            | 36 |
| 2.2.1.5 Determinació del contingut de greix.....             | 37 |
| 2.2.1.6 Preparació del <i>trolox</i> .....                   | 39 |
| 2.2.2 Mètodes d'extracció i quantificació de polifenols..... | 39 |
| 2.2.2.1 Quantificació dels polifenols extractables.....      | 40 |
| 2.2.2.2 Extracció dels tanins condensats.....                | 43 |
| 2.2.2.3 Extracció dels polifenols hidrolitzables.....        | 44 |
| 2.2.3 Mètodes de mesura de la capacitat antioxidant.....     | 45 |
| 2.2.3.1 Mètode FRAP.....                                     | 45 |
| 2.2.3.2 Mètode ORAC.....                                     | 47 |
| 2.2.3.3 Mètode ABTS.....                                     | 50 |
| 2.2.4 Altres mètodes utilitzats.....                         | 51 |
| 2.2.4.1 Digestió gàstrica <i>in vitro</i> .....              | 51 |
| 2.2.4.2 Western-blot.....                                    | 54 |
| 2.2.4.3 Mètode Bradford.....                                 | 62 |
| 3. RESULTATS.....  | 64 |
| 3.1.1 Polifenols totals en mostres no digerides.....         | 65 |
| 3.1.2 Polifenols totals en mostres digerides.....            | 65 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1 Polifenols del xampinyó.....  | 66  |
| 3.2.2 Polifenols del shiitake.....  | 69  |
| 3.2.3 Polifenols del rossinyol.....   | 72  |
| 3.3.1 Capacitat antioxidant del xampinyó.....                                 | 75  |
| 3.3.2 Capacitat antioxidant del shiitake.....                                 | 77  |
| 3.3.3 Capacitat antioxidant del rossinyol.....                                | 79  |
| 3.4 Taules globals.....   | 81  |
| 3.5 Resultats del western-blot.....   | 85  |
| 4. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS.....  | 86  |
| 4.1 Taula 9 i 10: Polifenols del xampinyó.....                                | 86  |
| 4.2 Taula 9, 11 i 12: Polifenols del shiitake i el rossinyol.....             | 94  |
| 4.3 Taula 13: Capacitat antioxidant del xampinyó.....                         | 101 |
| 4.4 Taula 14 i 15: Capacitat antioxidant del shiitake i el<br>rossinyol.....  | 108 |
| 4.5 Anàlisi de la correlació entre polifenols i capacitat<br>antioxidant..... | 114 |
| 4.5.1 Correlació 1.....   | 114 |
| 4.5.2 Correlació 2.....   | 115 |
| 4.5.3 Correlació 3.....   | 116 |
| 4.6 Taula 20: Western-blot.....   | 118 |
| 5. CONCLUSIONS.....   | 120 |
| 6. VALORACIÓ PERSONAL.....  | 122 |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....  | 123 |
| 8. ANNEXOS.....   | 131 |

# **INTRODUCCIÓ**

En les últimes dues dècades, la nutrició ha esdevingut una prioritat de la recerca científica i mèdica, a causa de les afectacions que poden causar els aliments en el cos humà. Cada vegada més, la societat s'interessa per la relació entre el consum d'aliments considerats "saludables" i la seva repercussió en l'organisme. Cada cop és més evident el rol que té la dieta en la prevenció de moltes malalties com ara les cardiovasculars de tipus crònic, així com el paper que exerceix en el sistema immunitari, el sistema cognitiu, el nivell de vida i la longevitat de les persones, i en el manteniment de la salut en general. La comunitat científica avança constantment en aquest camp de recerca amb objectius tals com el d'identificar els aliments beneficiosos que poden ajudar a aconseguir el que s'ha designat com *envelliment saludable*.<sup>1</sup>

Dins d'aquestes investigacions, un dels aspectes més estudiats en l'última dècada ha estat el de les substàncies amb propietats antioxidants. Aquests compostos tenen la capacitat de protegir les cèl·lules de l'organisme per mitjà la inhibició dels anomenats *radicals lliures*, formats en processos com el de la degradació dels aliments en l'organisme, la radiació, la contaminació ambiental i el consum de drogues i altres agents tòxics<sup>2</sup>. Els beneficis que això comporta en la salut són principalment la prevenció de malalties degeneratives, cròniques, cardiovasculars i altres afectacions<sup>3</sup> a llarg termini. Els compostos fenòlics (com ara els tanins, polifenols hidrolitzables, flavonoids...) presents en diversos aliments com el vi, el cacau, el te, les fruites, les verdures... estan essent objecte d'investigació, ja que

---

<sup>1</sup> Lutz & Edel León, 2009

<sup>2</sup> Del Castillo, 2000

<sup>3</sup> The Hong Kong polytechnic university, 2011



s'ha demostrat que tenen, en la seva majoria, una alta activitat antioxidant<sup>4</sup>.

La meua recerca s'emmarca en la quantificació de fenols i de capacitat antioxidant de tres espècies de fongs comestibles diferents com són el Xampinyó (*Agaricus bisporus*), el Shiitake (*Lentinus edodes*) i el Rossinyol (*Cantharellus cibarius*)<sup>5</sup>. S'han escollit aquests aliments, amb la finalitat d'obtenir-ne més informació ja que són poc conegudes les seves propietats antioxidants. Els bolets amb els quals s'ha dut a terme la investigació han rebut diferents tractaments culinaris per avaluar si hi ha pèrdua d'agents antioxidants en els diversos processos de cocció quotidians. També s'ha realitzat una aproximació al sistema d'alliberament i d'absorció d'aquests compostos antioxidants, ja que la comunitat científica ha demostrat que en molts casos la ingesta de compostos antioxidants no és directament proporcional als que el cos absorbeix. Finalment s'ha dut a terme un estudi i una quantificació de la proteïna oxidada present en els bolets, per avaluar quins canvis en relació amb els antioxidants s'han produït en el tractament rebut.

La metodologia de recerca utilitzada en l'experiment es basa en els estàndards seguits pels grups de recerca d'aquesta disciplina, tal i com es descriu més endavant en l'apartat 2.2. Les diferents tècniques i mètodes que s'han aplicat en la investigació s'han dut a terme en el laboratori de recerca de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida, juntament amb el grup *Nutren (nutrigenomics)* on s'estan desenvolupant estudis al voltant dels antioxidants i el paper que

---

<sup>4</sup> Barros, Baptista et al., 2007

<sup>5</sup> Durant aquesta recerca es farà referència als diferents bolets anomenant-los pel seu nom popular.

adopten en la nutrició, entre d'altres aspectes. La part experimental del meu treball s'ha dut a terme aplicant tècniques totalment *in vitro*, ja que no s'ha utilitzat cap ésser humà o animal en la investigació.

Les dades s'han obtingut amb l'ajut de diferents tipus d'instrumental i maquinària del qual disposa el laboratori, tant pel que fa als de caràcter més general, com el pHmetre o la balança de precisió; com també els més específics, com és el cas dels aparells d'espectrofotometria (en el cas dels mètodes *FRAP*, *ABTS*, *Folin-Ciocalteu* i *Bradford*), de luminescència (*ORAC*) o també de quimioluminiscència (*Western-blot*)<sup>6</sup>.

A partir d'aquestes dades s'han obtingut unes conclusions, que pretenen fer una aportació molt discreta a un camp de recerca en el qual hi estan treballant múltiples grups de recerca i bioquímica de tot el món. Els meus resultats són el producte del seguiment d'un procés que segueix el mètode científic, que m'han permès conèixer els mètodes dels treballs de recerca científica al costat d'investigadors de la Universitat de Lleida.

La motivació que m'ha portat a escollir els antioxidants i els tractaments culinaris com a temàtica central del treball ha estat l'interès personal per la nutrició i la salut, que són dos camps en els quals m'agradaria dedicar els meus estudis posteriors al batxillerat.

---

<sup>6</sup> Totes les tècniques mencionades es descriuen posteriorment en l'apartat 2.2.

## **1.-MARC TEÒRIC:**

### **1.1-L'oxidació:**

L'oxidació és un procés electroquímic en el qual un àtom, ja sigui en estat fonamental o bé ionitzat, perd un o diversos electrons. És el contrari a la reducció, que consisteix en un procés pel qual un àtom guanya un o més electrons. Aquestes dues reaccions se solen anomenar *redox*<sup>7</sup>, ja que sempre van unides una amb l'altra: Si un electró s'oxida, un altre ha de guanyar l'electró o els electrons que ha perdut el primer i, per tant, es redueix. Quan un compost cedeix electrons augmenta el seu *estat d'oxidació*.

#### **1.1.1-L'oxigen, ERO i l'organisme:**

L'oxigen va aparèixer a l'atmosfera terrestre ara fa aproximadament uns 2.000 milions d'anys<sup>8</sup>. Aquest fet va permetre el desenvolupament d'éssers vius amb un metabolisme aeròbic. Actualment, la major part d'éssers pluricel·lulars depenen de l'oxigen per sobreviure. Tot i això, el metabolisme produeix molts subproductes tòxics (concretament, les espècies reactives de l'oxigen o *ERO*<sup>9</sup>) contra els quals, aquests éssers vius han anat creant sistemes per tal de neutralitzar-los. Quan l'acció d'aquests mecanismes és insuficient, es crea un desequilibri que pot danyar l'organisme i provocar afectacions diverses a la llarga.

---

<sup>7</sup> Reacció d'oxidació-reducció o oxidoreducció. Designa una reacció en la qual es produeix una transferència electrònica entre els reactius.

<sup>8</sup> Riere Codina, 2002

<sup>9</sup> Les espècies reactives de l'oxigen no només engloba els radicals lliures, sinó que també representen aquells compostos oxidants que en són derivats (peròxid d'hidrogen).

### **1.1.2-Dany oxidatiu:**

El dany oxidatiu és el conjunt de lesions que es produeixen en les cèl·lules de l'organisme majoritàriament com a conseqüència de l'acció de les espècies reactives de l'oxigen (*ERO*) quan es dona el cas d'un desequilibri (vegeu el punt 1.1.6) entre aquests compostos i aquells dels quals disposa el cos per neutralitzar-los. El dany cel·lular prové moltes vegades de l'acció conjunta de les *ERO* i algunes espècies reactives del nitrogen (*ERN*).

### **1.1.3-Els radicals lliures:**

El nostre cos està format per molècules, o agrupacions d'àtoms que habitualment presenten els seus electrons emparellats. El fet que estiguin en aquesta disposició dona estabilitat electroquímica a la molècula. Si es donés el cas que un àtom perdés un electró, la seva inestabilitat el portaria a buscar-ne un altre en altres àtoms per aconseguir novament l'estabilitat. Aquest àtom és l'anomenat radical lliure<sup>10</sup>.

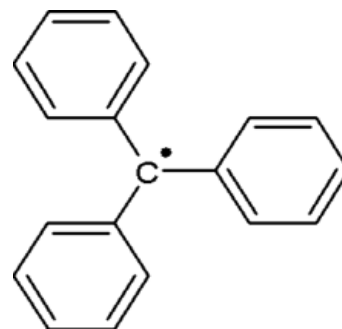


Figura 1: Representació esquemàtica d'un radical lliure.

Font: Rüchard, 1992

Tot i que la vida dels RL és extremadament efímera, aquests constitueixen reaccions en cadena, ja que el seu procés d'actuació consisteix en robar l'electró absent a una molècula o àtom estable, de manera que aquests darrers es converteixen en un nou radical lliure. El petit lapse de temps en el qual té lloc la creació d'un radical lliure és suficient perquè aquest reaccioni amb totes les molècules del seu

---

<sup>10</sup> Lima, 2001

entorn, les quals majoritàriament són constituents de l'estructura cel·lular com ara lípids, carbohidrats, proteïnes, àcids nucleics i derivats. Per tant, si es degraden<sup>11</sup> aquests compostos per l'acció dels radicals lliures, es poden causar danys importants a les cèl·lules i als teixits. Aquests danys poden ser causants o potenciadors de malalties de molts tipus, en general de caràcter degeneratiu, i de processos associats amb l'envelliment.

#### **1.1.4-Radicals creats per l'organisme:**

Una part d'aquests àtoms però, són sintetitzats contínuament pel propi metabolisme del cos, que els genera en quantitats petites per tal de lluitar contra alguns agents patògens, tot i que també es produeixen uns enzims com la catalasa o la dismutasa que inhibeixen els radicals lliures gràcies a la seva capacitat de neutralitzar-los sense desestabilitzar-se.

##### **1.1.4.1-Radicals creats en la cadena respiratòria:**

La principal font de radicals lliures en l'organisme es produeixen en el mitocondri durant la respiració cel·lular o cadena de transport d'electrons<sup>12</sup>. Concretament en el procés de la fosforilació oxidativa, on l'oxigen rep els electrons provinents dels coenzims  $\text{NADH}_2$  i  $\text{FADH}_2$  (4 electrons concretament, en un 95% dels casos) produint així dues molècules d'aigua. El procés de la fosforilació consisteix bàsicament en el fet que aquests dos cofactors orgànics ( $\text{NADH}_2$  i  $\text{FADH}_2$ ) situen 6 o 4 protons respectivament a l'espai intermembrana quan els seus electrons passen a l'oxigen. D'aquesta manera es produeix una acumulació de protons que creen un pH més àcid a l'espai

---

<sup>11</sup> Perden la seva funció principal.

<sup>12</sup> Rodríguez, Menéndez et al., 2001



intermembrana, provocant així un gradient electroquímic entre aquest espai i la matriu mitocondrial. La membrana és molt impermeable, la qual cosa obliga als protons a equilibrar la concentració del mitocondri passant a través de les *ATP sintetases*<sup>13</sup> que utilitzen aquesta energia per fosforilar Adenocinadifosfat (ADP) i formar ATP. La conseqüència directa que té aquest procés sobre la formació de radicals lliures és que entre els nutrients inicialment degradats i la generació d'energia al final del cicle, es formen molècules diverses amb diferents graus d'oxidació. Algunes d'elles poden reduir-se entregant un o dos electrons a l'oxigen i formant radicals lliures (Radical súperòxid, radical hidroperòxid i principalment el radical hidroxil, el qual té un gran potencial oxidatiu).

#### **1.1.4.2-Altres fonts de radicals lliures en l'organisme**

Els radicals lliures formats en l'organisme poden procedir d'altres processos com el que duen a terme les peroxisomes, que són orgànuls presents en el citoplasma o citosol de la cèl·lula. Aquests són molt rics en oxidases i generen peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) substància coneguda per ser altament oxidant i per formar radicals lliures ( $OH\cdot$ ). La catalasa, que és un enzim present en els teixits de molts éssers vius, depuren les peroxisomes, transformant-les en aigua i oxigen.

Els *neutròfils*<sup>14</sup> també representen una font important de radicals lliures formats pel cos humà. Aquests leucòcits tenen la propietat de formar espècies reactives de l'oxigen (radicals lliures oxidants) amb les quals destrueixen l'intrús. Un dels compostos més rellevants en

---

<sup>13</sup> Complexos enzimàtics situats a la membrana interna del mitocondri (en el cas de les cèl·lules animals) que formen ATP a partir d'ADP i un grup fosfat.

<sup>14</sup> També anomenats "leucòcits de nucli lobular". Són un tipus de glòbuls blancs, concretament els leucòcits més abundants en el cos humà, que realitzen la fagocitosi de bacteris i fongs.

aquest leucòcit és l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) format pel coenzim NADPH, present en la seva membrana. A part de l'anió superòxid, el neutròfil també forma altres radicals lliures de l'oxigen i el nitrogen, els quals ataquen i danyen els lípids, les proteïnes i els àcids nucleics dels microbis.

En algunes ocasions, es pot donar el cas que s'alliberin alguns d'aquests compostos a la matriu extracel·lular causant danys *tissulars* (danys dels teixits). Generalment l'actuació de la catalasa degrada el peròxid d'hidrogen impedit que es produeixin danys en les cèl·lules. En algunes circumstàncies (com ara en infeccions com la tuberculosi, les malalties autoimmunes o en reaccions al·lèrgiques) els leucòcits poden constituir una amenaça per a les estructures cel·lulars i malmetre els teixits, amplificant així l'acció de l'agent patògen. Aquests fet té lloc sobretot en processos d'inflamació.

En la majoria de situacions però, la formació dels radicals lliures en l'organisme es dona en situacions controlades pels mecanismes defensius cel·lulars. Això canvia quan estem exposats a diversos factors que poden influir o incrementar la creació d'aquests radicals.

#### **1.1.5-Formació dels radicals lliures per processos i factors externs a l'organisme:**

Els radicals lliures, a part d'estar produïts en reaccions metabòliques i altres processos del propi cos, també es poden formar per factors externs tals com la contaminació, l'alimentació i altres circumstàncies.

Aquests factors es classifiquen en 3 grups principals:

-Factors químics:

- Xenobiòtics<sup>15</sup>.
- Components del fum del tabac, consum d'alcohol i de drogues en general.
- Contaminació ambiental.
- Metalls pesats presents en la nostra vida quotidiana com els aliments envasats en recipients<sup>16</sup> de plàstic o d'alumini, alguns desodorants i cosmètics i alguns fàrmacs.
- Pesticides i altres productes químics que s'apliquen en l'agricultura.

-Factors físics:

- Radiacions d'alta energia (sobretot ultraviolades, en exposicions prolongades al sol).

-Factors orgànics i metabòlics:

- Dieta hipercalòrica, insuficient en antioxidants i/o desequilibrada.
- Ingesta d'aliments en mal estat, cremats, fregits<sup>17</sup>, excessivament processats<sup>18</sup> o a base de productes artificials, així com substituïts del sucre (endolcidors artificials).
- Processos inflamatoris i traumatismes.

---

<sup>15</sup> Els agents xenobiòtics són per definició elements biològics "estrany" creats pel cos humà. En la seva majoria, han estat sintetitzats en els últims 100 anys.

<sup>16</sup> Molts aliments reaccionen amb aquests envasos (sobretot si estan calents) i existeix la possibilitat que algun dels components del recipient s'hi dissolgui.

<sup>17</sup> No tots els fregits són responsables de la formació de radicals lliures, però sí que hi estan relacionats els que es duen a terme amb olis refinats, hidrogenats o reutilitzats i aquells que s'exposen a temperatures molt altes per fregir els aliments.

<sup>18</sup> Tals com la farina, el sucre i l'oli refinats.

- Pràctica d'exercici extenuant, ja que implica un augment de les reaccions oxidatives que, a la vegada, són les que aporten l'energia que es precisa per a la contracció muscular.

Aquests radicals lliures exògens no estan tan controlats per l'organisme, encara que el propi cos també secreti substàncies i enzims per neutralitzar-los. Tot plegat pot provocar una situació anomenada *estrès oxidatiu* (vegeu-ho a la figura 2), que consisteix en un desequilibri que es produeix quan hi ha massa radicals lliures en relació amb els que el cos és capaç de controlar.

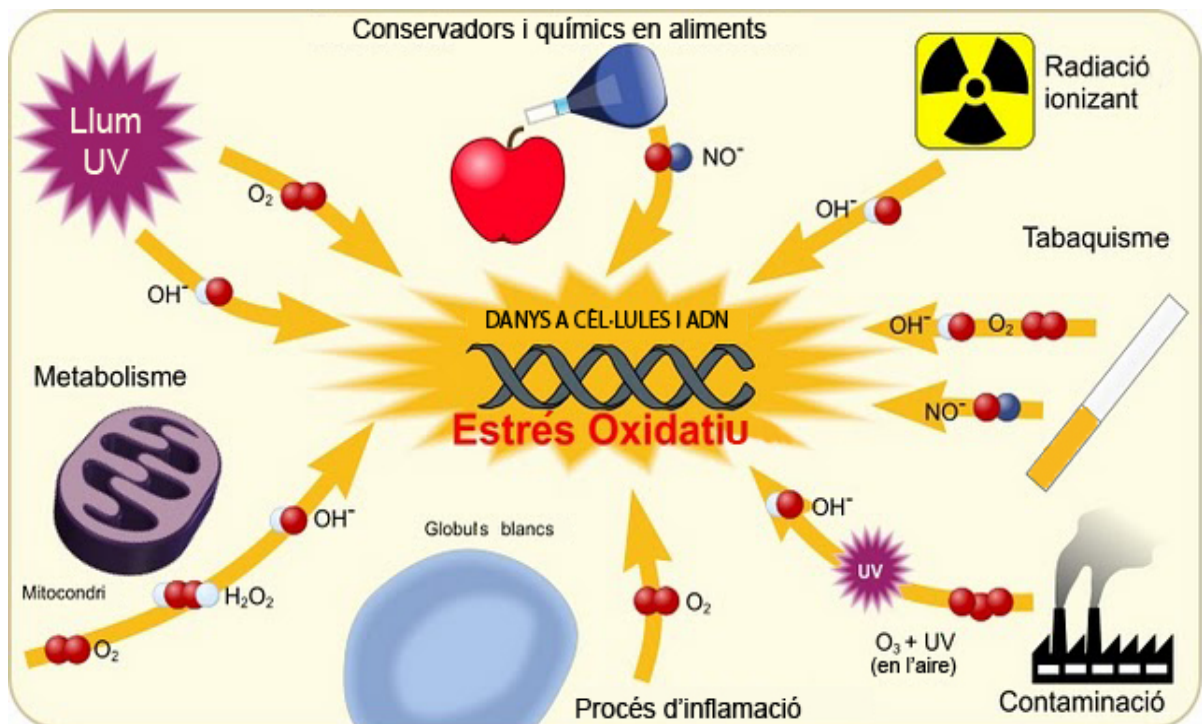


Figura 2: Factors que poden intervenir en la formació d'una situació d'estrès oxidatiu.  
Font: Montoya Díaz, 2011

### **1.1.6-Estrès oxidatiu:**

Fonamentalment, l'estrès oxidatiu és el terme amb què es designa el desequilibri entre els radicals lliures o ERO (Espècies Reactives de l'Oxigen). També constitueix la capacitat d'un sistema biològic per desintoxicar aquests compostos o reparar els danys que han pogut

ocasionar, a partir de les *substàncies antioxidants* (tant les exògenes com les endògenes). Aquest desequilibri pot ser molt negatiu per a les cèl·lules, ja que es produeixen peròxids i radicals lliures que no són neutralitzats pel cos i poden danyar algunes macromolècules (lípid, proteïnes, hidrocarburs i àcids nucleics). Depenent de la magnitud, l'estrès oxidatiu pot provocar danys reversibles a nivell cel·lular, dels quals la cèl·lula es pot recuperar i tornar a l'estat original, o danys irreversibles que poden arribar a provocar la mort cel·lular. Fins i tot, si l'estrès oxidatiu és prou intens, es pot arribar a produir fenòmens com la *necrosi*<sup>19</sup>. A la llarga, les cèl·lules afectades per aquest estat d'estrès oxidatiu poden arribar a provocar afectacions tals com l'acceleració de l'envelliment, el càncer, les malalties cardiovasculars, neurodegeneratives o la diabetis, entre d'altres<sup>20</sup>.

### **1.1.7-Conseqüències de l'estrès oxidatiu:**

L'estat d'estrès oxidatiu pot produir a la llarga un gran nombre d'afeccions al cos humà, sobretot en edats avançades, per l'acumulació de lesions orgàniques, la disminució de la concentració d'antioxidants o la inactivació d'enzims neutralitzadors d'ERO, entre d'altres.

Per totes aquestes raons, s'associa l'acció dels radicals lliures amb l'envelliment i moltes altres alteracions (generalment de caràcter crònic no-transmissible) entre les quals destaquen:

-L'aterosclerosi.

---

<sup>19</sup> Mort patològica d'un teixit o conjunt de cèl·lules de l'organisme.

<sup>20</sup> Romano, Serviddio, de Matthaeis et al., 2010; Balsano & Alisi, 2009



- El càncer.
- Cataractes senils.
- Insuficiència renal aguda o, fins i tot, crònica.
- Diabetis mellitus.
- Hipertensió arterial.
- Cirrosi o insuficiència hepàtica.

## **1.2.-Antioxidants:**

Els antioxidants són qualsevol molècula capaç de prevenir l'oxidació (la pèrdua d'un o més electrons) d'altres molècules o retardar-la. En alguns casos també són considerades antioxidants algunes molècules capaces de revertir el dany oxidatiu.

### **1.2.1-Tipus d'antioxidants:**

Els antioxidants, aplicats en el cos humà, es classifiquen en:

#### **-Sintetitzats pel mateix organisme:**

Són aquelles molècules creades per l'organisme, amb la finalitat de reduir radicals lliures o neutralitzar una substància oxidant (com el cas de la catalasa i el peròxid d'hidrogen) que hagin estat creades en processos biològics del cos.

-Enzimàtics: Com el superòxid dismutasa o la catalasa. Vegeu-ho en el punt 1.1.4.

-No enzimàtics: Com el Coenzim Q, que actua en la cadena respiratòria (vegeu-ho en el punt 1.1.4.1) o el glutatió.

-Procedents de la dieta:

Durant les últimes dues dècades, s'ha fet evident que la ingesta d'antioxidants en la dieta té un potencial molt important a l'hora de prevenir algunes de les malalties principals que afecten als humans a nivell mundial (tumors, cardiovasculars i neurodegeneratives). Per aquest motiu, el consum d'aliments rics en aquestes molècules ha esdevingut sinònim de salut<sup>21</sup>. Els antioxidants presents en els aliments es poden classificar en quatre grups:

-Els polifenols: Objectes d'estudi d'aquesta recerca (es desenvolupen a continuació).

-Les Vitamines: Com l'àcid ascòrbic (vitamina C), present en cítrics i altres vegetals o la vitamina E, molt present en l'oli d'oliva i en els fruits secs.

-Els Carotenoides: Són pigments que es sintetitzen de forma natural en plantes i alguns animals. N'és un exemple el licopè, molt present en la tomata o la vitamina A i que també es troba en aliments com la carn de porc o el bròquil.

-Altres fonts d'antioxidants: En són un exemple aquelles substàncies o elements que sense tenir un valor nutritiu, actuen com a antioxidants (potenciant la seva síntesi) com el seleni, el zinc i el coure presents en carns, peixos, ous i productes vegetals.

**1.2.1.1-Els polifenols:**

Són molècules amb diversos grups fenols (anells aromàtics units a grups hidroxil "OH-") (*vegeu figura 3*), generalment de procedència vegetal.

---

<sup>21</sup> Halliwell., 1996

Aquests compostos tenen la propietat d'exhibir una alta capacitat antioxidant<sup>22</sup>, entre altres beneficis per al cos humà<sup>23</sup>. Els polifenols són la principal causa que moltes fruites i hortalisses tinguin propietats antioxidants, ja que són les molècules amb característiques antioxidants que més abunden en estat natural<sup>24</sup>.

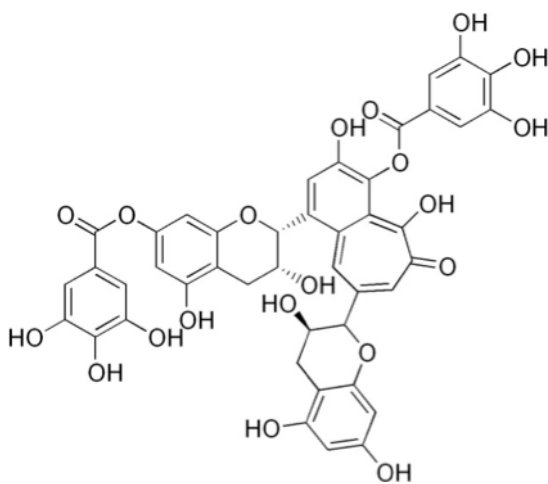


Figura 3: Polifenol present en el te negre, que es caracteritza per la seva capacitat antioxidant.

Font: NCBI, 2011

Aquestes substàncies tenen múltiples classificacions possibles, però els polifenols més rellevants per aquesta recerca són els tanins, els quals s'han avaluat com a més significatius.

Els tanins són polifenols d'alt pes molecular, que es troben principalment en plantes, així com en alguns dels productes d'origen vegetal habituals en la dieta<sup>25</sup>. Un estudi de la Universitat de Creighton (Califòrnia) ha demostrat que els tanins són més biodisponibles<sup>26</sup> i més eficients en la reducció de radicals lliures que altres antioxidants reconeguts com les vitamines C i E<sup>27</sup>. Es poden classificar de la següent manera:

-Els tanins hidrolitzables: Són compostos formats habitualment per àcids fenòlics (com l'àcid gàl·lic<sup>28</sup>) i glucosa. Tenen la propietat de ser

<sup>22</sup> Lozano, Moro, D'Arrigo et al., 2010

<sup>23</sup> Els polifenols també són coneguts per les seves propietats anticancerígenes, antitrombòtiques, antiinflamatòries, antitumorals i antimicrobianes. Soler, 2010

<sup>24</sup> Saura-Calixto, Serrano i Isabel Goñi, 2006

<sup>25</sup> Hartxfeld, Forkner, Hunter & Hagerman, 2002

<sup>26</sup> Vegeu el punt 1.2.2

<sup>27</sup> Bagchi, Bagchi, Stohs et al., 1999

solubles en aigua i de menys pes molecular que els tanins condensats (*vegeu-los a continuació*). El seu nom prové del mètode d'extracció i quantificació d'aquests tanins, ja que són fàcilment hidrolitzables per l'acció d'un àcid diluït.

-Els tanins condensats (Proanthocyanidin): Són substàncies complexes, capaces de reaccionar amb macromolècules que són poc solubles en aigua i no hidrolitzables per àcids o enzims. Estan presents en aliments que es caracteritzen habitualment per la seva coloració vermella, tot i que aquesta no és una garantia de la seva presència (el plàtan, per exemple, és una fruita rica en *proanthocyanidines*). El vi negre, el raïm, el caqui i alguns fruits secs són les principals fonts de tanins condensats.

### **1.2.2-Bioaccessibilitat i biodisponibilitat dels antioxidants:**

La bioaccessibilitat d'una substància és la fracció de l'aliment ingerit que es troba disponible a l'intestí per a la seva posterior absorció, però això no significa que s'absorbeixi amb seguretat.

La biodisponibilitat d'una substància, en canvi, es defineix com la quantitat d'aquesta que passa al sistema circulatori (la sang i el sistema limfàtic) un cop administrada<sup>29</sup>. És necessari saber la biodisponibilitat d'un compost (dels polifenols, en el cas d'aquesta recerca) per tal de conèixer el potencial saludable real que té sobre l'organisme.

---

<sup>28</sup> Àcid 3,4,5-trihidroxibenzoic. És un àcid orgànic que forma part dels tanins presents en l'escorça de molts arbres i en alguns aliments o begudes com el te.

<sup>29</sup> En el cas dels antioxidants normalment per via oral amb la ingesta dels aliments.

No obstant, és complicat conèixer la biodisponibilitat dels compostos fenols, ja que aquests poden procedir de diferents aliments i en quantitats variables i, per tant, no es pot saber la quantitat que s'ingereix amb precisió. A més, un cop s'ha ingerit l'aliment, els polifenols han de passar per diverses etapes (la digestió, l'absorció intestinal, el metabolisme hepàtic i la captació del teixit diana<sup>30</sup>) i això podria provocar canvis en l'estructura química del compost fenol i, com a conseqüència, que no fos absorbit.

#### -El procés de digestió:

La influència del pH, els enzims, les fermentacions intestinals, l'excreció biliar poden afectar alguns polifenols impedit que siguin absorbits posteriorment. Tanmateix, molts d'ells es troben en els aliments en forma d'esters, polímers o glicòsids, i aquests últims no es veuen afectats pel pH i arriben intactes al duodè.

#### -L'absorció intestinal i la metabolització:

Els polifenols es poden veure influenciats per l'absorció intestinal i per la metabolització. No obstant, també depenen d'altres factors com ara el fet de si es tracta de compostos liposolubles o hidrosolubles, de si estan units a monosacàrids o a àcids orgànics i del grau de polimerització<sup>31</sup>.

### **1.2.3-Capacitat antioxidant:**

La capacitat antioxidant o l'activitat antioxidant d'una substància o d'un aliment és la capacitat que tindria el conjunt de compostos

---

<sup>30</sup> El compartiment "diana" és el punt del cos on es requereix, que en el context dels antioxidants vindria a ser algun radical lliure a reduir.

<sup>31</sup> Soler, 2010



antioxidants que hi són presents per actuar simultàniament com una mescla de compostos antioxidants.

La capacitat antioxidant d'una substància no ve donada només per la suma de tots els compostos antioxidants que té, sinó que també depén de la interacció que existeixi entre aquests antioxidants (poden interaccionar i potenciar l'efecte antioxidant o inclús inhibir-se els uns als altres)<sup>32</sup>.

#### **1.2.4-Mètode d'actuació dels antioxidants:**

Els antioxidants, en la seva funció de prevenció i retard de l'acció dels pro-oxidants<sup>33</sup> tenen diferents mètodes d'actuació. Aquests processos es poden classificar en:

-Interacció directa de l'antioxidant amb l'espècie reactiva<sup>34</sup>:

És l'actuació més comuna i més pròpia dels antioxidants. Fa referència a la capacitat de moltes substàncies antioxidants per establir els radicals lliures de l'organisme. Distingim dues formes de dur a terme aquest mètode:

-SET (*Single electron transfer*<sup>35</sup>): Consisteix en la reducció del radical lliure per part de l'antioxidant, de manera que aquest primer s'estabilitza. La conseqüència que té aquest mecanisme és que es forma un radical antioxidant estable<sup>36</sup> i que el que abans era radical

---

<sup>32</sup> Kuskoski, Asuero et al., 2005

<sup>33</sup> Les espècies pro-oxidants ja han estat descrites anteriorment punt . És el concepte per designar els radicals lliures i aquelles altres substàncies que, sense ser radicals lliures, també són capaces d'iniciar o induir l'oxidació (ERO, ERN...).

<sup>34</sup> Prior, Wu & Schaich, 2005; Ou, Huang, Flanagan et al., 2002

<sup>35</sup> Transferència d'un sol electró.

<sup>36</sup> Que trenca la reacció en cadena, ja que al ser estable no reacciona.

lliure, també es transforma en una molècula estable. (Vegeu-ho a la figura 3)

-HAT (*Hydrogen Atom Transfer*<sup>37</sup>): En aquest cas, l'antioxidant transfereix un protó i un electró al radical lliure (un àtom d'hidrogen) de manera que aquest últim forma un catió estable. L'antioxidant forma, per contra, un radical antioxidant anió i queda oxidat. (Vegeu-ho a la figura 4)

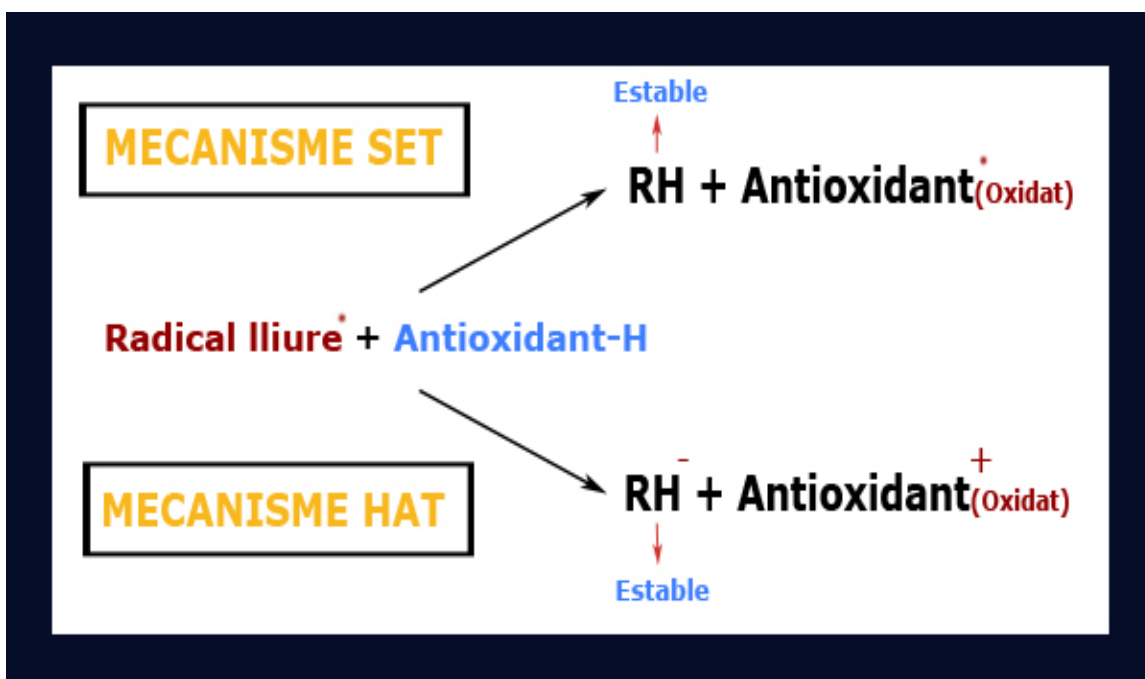


Figura 4: Mecanisme SET i HAT (versió simplificada)

Els antioxidants que actuen pels mètodes *SET* o *HAT* acostumen a ser no-enzimàtics i són aquests els que, en la seva majoria, procedeixen de la dieta. Tot i això, també hi ha alguns antioxidants secretats pel mateix organisme (antioxidants no-fenòlics<sup>38</sup>) que també duen a terme aquests mecanismes, com el glutatió o la melatonina.

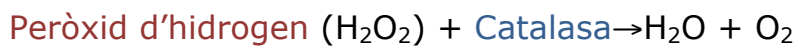
<sup>37</sup> Transferència d'un àtom d'hidrogen.

<sup>38</sup> S'anomenen així perquè són enzimàtics i no tenen grups fenol, com sí que n'hi ha en el cas d'altres antioxidants com els tocoferols o polifenols.

-Activació de l'activitat d'enzims antioxidants:

Són els antioxidants enzimàtics secretats per l'organisme com a mètode de defensa contra les espècies reactives (principalment les ERO). Dins d'aquest grup distingim diversos enzims i cada un té el seu mètode d'actuació.

Exemple:



-Prevenició de la formació de l'espècie reactiva:

Alguns antioxidants, poden actuar inhibint la formació d'ERO i ERN, ja sigui impedit la seva síntesi o l'activitat d'alguns enzims pro-oxidants que poden formar aquestes espècies.

**1.2.5-Antioxidants en la dieta:**

Els antioxidants són cada vegada més importants en els aliments que es consumeixen, no només pel fet que ajuden a mantenir les seves propietats i els conserven, sinó perquè repercuteixen directament en la salut d'aquell qui els ingereix. En l'actualitat, es considera que incloure aliments que continguin polifenols, vitamines o altres compostos antioxidants és una forma efectiva de reduir el risc de patir una malaltia i de propiciar l'envelliment saludable, dos factors que milloren clarament la qualitat de vida.

### **1.2.6-Principals substàncies antioxidants i les seves fonts:**

Generalment, la quantitat de substància antioxidant que es pot trobar en un aliment s'expressa en mg/100g de producte. Així doncs s'ha de tenir en compte no només la quantitat d'antioxidants que porta l'aliment, sinó també la ració que se'n consumeix habitualment. Un altre factor a considerar és la biodisponibilitat perquè en funció de l'antioxidant o de la presència d'altres molècules en el medi, pot variar.

#### -Polifenols<sup>39</sup>:

Encara no existeix una quantitat recomanada acceptada de polifenols al dia. Tot i això, hi ha molta literatura científica que demostra que el consum d'aquests compostos en la dieta pot exercir un alt benefici per a la salut.

La biodisponibilitat dels polifenols varia principalment en funció de la seva procedència, la composició (poden estar units a glúcids), la solubilitat i la flora intestinal. En termes generals, es pot afirmar que la majoria de polifenols són hidrosolubles, factor que dificulta la seva absorció.

La quantitat de polifenols total es mesura en *mg EAG/100g (pes fresc)*<sup>40</sup>. Vegeu-ho en la Taula 1.

---

<sup>39</sup> Prior, Wu, Schaich, 2005

<sup>40</sup> Mil·ligrams equivalents d'àcid gàl·lic per 100g de mostra fresca analitzada. L'àcid gàl·lic és un àcid fenòlic natural molt hidrosoluble, i per això s'utilitza com a estàndard en l'assaig de la quantificació de polifenols totals (PTF).

| ALIMENTS  |   | POLIFENOLS (mg EAG/100g)  |
|-----------|---|---------------------------|
| <b>1</b>  | Nous <sup>41</sup>                                  | 1590                      |
| <b>2</b>  | Festucs   | 752                       |
| <b>3</b>  | Gerds   | 380                       |
| <b>4</b>  | Codony sense pela                                   | 358                       |
| <b>5</b>  | Magrana   | 275                       |
| <b>6</b>  | Raïm ( <i>Red Globe</i> )                           | 240                       |
| <b>7</b>  | Poma amb pela ( <i>Granny Smith</i> ) <sup>42</sup> | 239                       |
| BEGUDA    |   | POLIFENOLS (mg EAG/100mL) |
| <b>8</b>  | Vi negre  | 196                       |
| <b>9</b>  | Te verd   | 116                       |
| <b>10</b> | Suc de taronja                                      | 62,5                      |

Taula 1: Fonts de polifenols en alguns aliments i begudes<sup>43</sup> (mesurada en pes fresc de l'aliment)

En aquesta última taula, no es té en compte la ració que es consumeix habitualment de cada aliment, sinó que s'avalua tots els

<sup>41</sup> Cal destacar que la quantitat de polifenols de les nous i els festucs és molt superior a la de les fruites, perquè quasi no contenen aigua i la proporció consumida habitualment no té res a veure amb els 100 g de producte que s'avaluen en aquesta taula. Tot i així, tenen una proporció molt alta de polifenols.

<sup>42</sup> La quantitat total de polifenols varia en funció de la varietat de poma.

<sup>43</sup> Neveu, Pérez-Jiménez, Vos et al., 2010

aliments per 100 grams de mostra. Per tant, només es veu reflectida la proporció de polifenols de cada aliment. Es pot posar com a exemple, que una tassa de te verd (habitualment 200mL) conté tants o més polifenols (232 mg, equivalents d'Àcid Gal·lic) que algunes de les fruites de la taula superior.

#### -Vitamina E<sup>44</sup>:

La vitamina E inclou dos tipus de molècules molt semblants en estructura: Els tocoferols i els tocotrienols. Els tocoferols estan en major concentració en els aliments que no pas els tocotrienols, i dintre d'aquest grup primer, l'isòmer alfa-tocoferol és 10 vegades més biodisponible que el gamma-tocoferol, gràcies a una proteïna de transferència del fetge, que transporta alfa-tocoferols. A més, els altres isòmers dels tocoferols es degraden amb la digestió en la seva majoria i, per tant, l'alfa-tocoferol és el més biodisponible i el més rellevant per a la salut. Com que la vitamina E és liposoluble, el que fa es protegir els lípids de l'oxidació (els que estan, per exemple, en les membranes cel·lulars), i tenen un paper molt important en la prevenció de malalties cardiovasculars. Es troba principalment en aliments amb greix, especialment els d'origen vegetal (*vegeu-ho a la taula 2*). La quantitat diària recomanada d'aquest antioxidant en persones adultes és de 15 mg<sup>45</sup>.

---

<sup>44</sup> Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996

<sup>45</sup> Oregon, 2000

|          | ALIMENT         | RACIÓ HABITUAL (g) | VITAMINA E (mg) |
|----------|-----------------|--------------------|-----------------|
| <b>1</b> | Oli de gira-sol | 13,6               | 5,6             |
| <b>2</b> | Avellanes       | 28                 | 4,2             |
| <b>3</b> | Margarina       | 14,2               | 2,2             |
| <b>4</b> | Oli d'oliva     | 13                 | 1,9             |
| <b>5</b> | Kiwi            | 76                 | 1,1             |
| <b>6</b> | Civada          | 94                 | 1               |
| <b>7</b> | Pastanaga       | 72                 | 0,8             |
| <b>8</b> | Pinyó           | 8,6                | 0,8             |
| <b>9</b> | Espinacs crus   | 30                 | 0,6             |

*Taula 2: Fonts alimentàries de vitamina E (alfa-tocoferols)<sup>46</sup>*

Està demostrat que els tocoferols poden prevenir l'estrès oxidatiu i les malalties cardiovasculars que hi estan associades. És important, doncs, consumir amb moderació els aliments que en contenen, ja que són majoritàriament molt greixosos i, una ingesta elevada, podria resultar contraproductiu.

<sup>46</sup> United States Department of Agriculture, 2010a

-Carotenoides<sup>47</sup>:

En general, els carotenoides tenen una biodisponibilitat força baixa perquè habitualment estan units a una proteïna. Els processos de cocció i la presència de lípids solen augmentar la biodisponibilitat d'aquests compostos. Per tant, la ingesta dels aliments rics en carotenoides aporta més beneficis, si més no pel que respecta als antioxidants, si s'han fregit o cuinat amb aliments lleugerament greixosos.

Els carotenoides més importants es distingeixen en 5 grups: Alfa-carotens, Beta-carotens, beta criptoxantina, licopè i luteïna.

En la taula 3 es mostren 2 dels aliments més rics en els carotenoides de cada grup.

---

<sup>47</sup> Maniani, Periago, Catasta et al., 2009



|   | ALIMENT           | RACIÓ HABITUAL (g) | Carotenoides (mg) |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|
| <b><math>\alpha</math>-carotens</b>     | Pastanaga         | 72                 | 2.500             |
|   | Carbassa<br>cuita | 100                | 349               |
| <b><math>\beta</math>-carotens</b>      | Pastanaga         | 72                 | 5.970             |
|   | Espinacs crus     | 30                 | 1.690             |
| <b><math>\beta</math>-criptoxantina</b> | Pebrot vermell    | 149                | 730               |
|   | Mandarina         | 84                 | 342               |
| <b>Licopè</b>                           | Síndria           | 286                | 12.960            |
|   | Tomata fresca     | 180                | 4.630             |
| <b>Luteïna</b>                          | Espinacs crus     | 30                 | 3.660             |
|   | Bròquil bullit    | 156                | 1.690             |

Taula 3: Fonts alimentàries de carotenoides.

-Vitamina C (àcid ascòrbic):

La vitamina C és un nutrient essencial per als humans, ja que el propi organisme no és capaç de sintetitzar-lo, i té un potencial antioxidant molt elevat, capaç de protegir les cèl·lules de l'oxidació.

La quantitat recomanada d'àcid ascòrbic per dia (*recommended dietary allowances - RDA*), segons un article de la Universitat d'Oregon<sup>48</sup>, és de 90 mg en els homes adults, i 75 mg en les dones adultes<sup>49</sup>. Cal destacar que l'article també recomana que els homes i

---

<sup>48</sup> Oregon, 2000

<sup>49</sup> Afirmen que consumir una gran quantitat de Vitamina C al dia (2000 mg-*The tolerable upper intake level*) de forma natural podria ajudar a prevenir, encara més, moltes malalties sense necessitat de ser perjudicial per l'organisme. No obstant, conclouen que falten dades que ho confirmin.

dones fumadors augmentin, respectivament, 35 mg aquests valors, ja que el fum del tabac provoca un augment de l'estrès oxidatiu. La vitamina C té una biodisponibilitat del 80%, ja que el 20% aproximadament s'excreta per l'orina.

|          | ALIMENT              | RACIÓ HABITUAL (g) | VITAMINA C (mg) |
|----------|----------------------|--------------------|-----------------|
| <b>1</b> | Pebrot vermell (cru) | 149                | 190,3           |
| <b>2</b> | Maduixes             | 166                | 97,6            |
| <b>3</b> | Taronja              | 180                | 95,8            |
| <b>4</b> | Papaia               | 140                | 85,3            |
| <b>5</b> | Bròquil (cru)        | 88                 | 78,5            |
| <b>6</b> | Pinya                | 155                | 74,1            |
| <b>7</b> | Coliflor (crua)      | 100                | 48,2            |
| <b>8</b> | Tomata               | 180                | 24,7            |
| <b>9</b> | Síndria              | 286                | 23,2            |

Taula 4: Fonts alimentàries de vitamina C<sup>50</sup>

<sup>50</sup> United States Department of Agriculture, 2010b

**1.2.7-Els aliments més antioxidants:**

En la taula 5, es mostren 10 dels aliments habituals a Catalunya amb més capacitat antioxidant (independentment del tipus de compost). La capacitat antioxidant ha estat determinada pel mètode ORAC, el qual s'expressa en unitats  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$  (micromols de l'equivalència de trolox<sup>51</sup> per cada 100 grams de mostra).

| ALIMENT |                                | Capacitat antioxidant( $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ ) |
|---------|--------------------------------|---|
| 1       | Xocolata negra (+70% de cacau) | 13.120  |
| 2       | Fruits secs <sup>52</sup>      | 8.707   |
| 3       | Fruits del bosc <sup>53</sup>  | 7.709   |
| 4       | Llenties (crues)               | 7.282   |
| 5       | Carxofes                       | 6.552   |
| 6       | Prunes                         | 6.100   |
| 7       | All                            | 5.708   |
| 8       | Magrana                        | 4.479   |
| 9       | Maduixes                       | 4.302   |
| 10      | Vi negre <sup>54</sup>         | 4.000   |

*Taula 5: Relació dels aliments amb més propietats antioxidants<sup>55</sup>.*

<sup>51</sup> Anàleg de la vitamina E que, a diferència d'aquesta, té la propietat de ser hidrosoluble i s'utilitza com a mostra patró en molts assajos per mesurar la capacitat antioxidant.

<sup>52</sup> S'ha realitzat la mitjana de la capacitat antioxidant de nous, ametlles, festucs i avellanes (13057, 4454, 7675, 9645  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ , respectivament)

<sup>53</sup> S'ha realitzat la mitjana de la capacitat antioxidant dels nabius, les mores, els gerds i les groselles (4669, 5905, 5065, 16000  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ , respectivament)

<sup>54</sup> Depèn molt de la classe de vi.

### **1.2.8-Beneficis dels antioxidants:**

Com s'ha descrit en el punt 1.2.2, és molt difícil arribar a conèixer amb exactitud els beneficis que tenen la ingesta d'antioxidants en la dieta. La complexitat dels processos *in vivo* fa que, en molts casos, difereixin dels que es simulen *in vitro* en les investigacions que es fan en el camp dels antioxidants. S'ha de mencionar també, que els antioxidants van començar a ser considerats "saludables" fa només dues dècades i, per això, hi ha investigadors i entitats, tals com *WCRFI* o *AHA*<sup>56</sup>, que s'abstenen de dir si un alt consum en antioxidants (com podria ser prenent suplementes) pot prevenir malalties.

A banda d'això, hi ha evidències científiques que demostren que la ingesta de polifenols i substàncies antioxidants en la dieta pot prevenir l'estrès oxidatiu a les cèl·lules i el que això pot comportar. L'exemple més clar és el cas de l'aterosclerosi, ja que l'oxidació dels lípids de baixa densitat (*LDL*) pot ser un fet desencadenant d'aquesta malaltia. Per prevenir que aquestes molècules s'oxidin, hi actuen antioxidants com la vitamina E i alguns carotenoides. Per tant, un dèficit d'aquestes substàncies podria deixar els *LDL* exposats a l'oxidació de les espècies pro-oxidants<sup>57</sup>. També hi ha investigadors que creuen que s'està subestimant el potencial real dels aliments amb característiques antioxidants, ja que els mètodes *in vitro* estandarditzats en l'actualitat no avaluen, en la seva totalitat, tot el potencial d'aquests compostos<sup>58</sup>.

---

<sup>55</sup> United States Department of Agriculture, 2010c

<sup>56</sup> *World Cancer Research Fund International* i *American Heart Association*, respectivament.

<sup>57</sup> Esterbauer, Rotheneder et al., 2006

<sup>58</sup> Serrano, Goñi & Saura-Calixto, 2006

### 1.3- El regne dels fongs<sup>59</sup>:

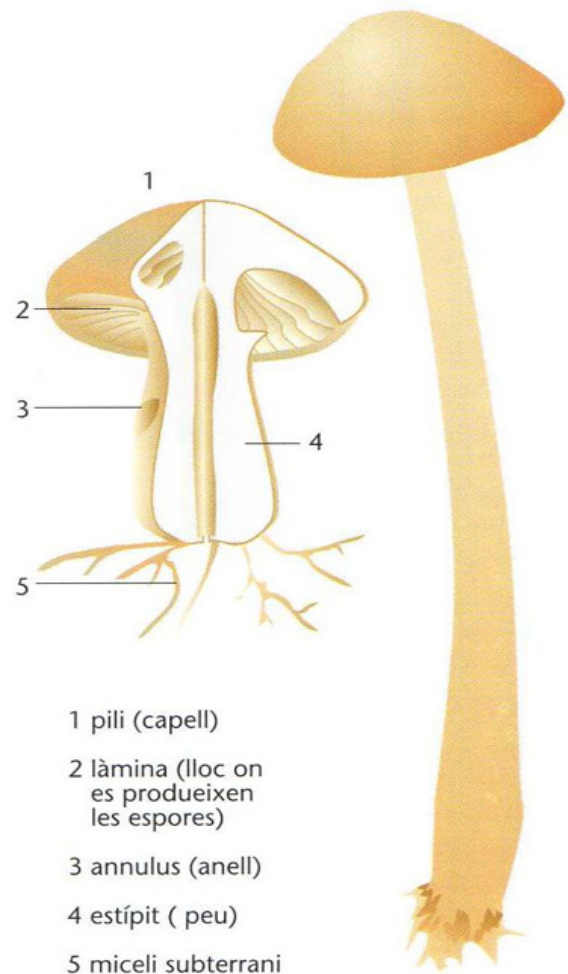
Els fongs són un regne d'organismes, la majoria dels quals són pluricel·lulars i la reproducció es realitza per mitjà d'espores. En el cas dels fongs més desenvolupats i visibles (macromicets), l'aparell esporífer el constitueix el bolet.

Es poden distingir té 3 parts diferenciades i comunes en tots els bolets (capell, làmina i peu) unides al miceli (vegeu-ho en la *Figura 5*).

Depenent del miceli que els formi, hi ha moltes varietats de bolets,. Alguns són comestibles i tenen un alt valor gastronòmic a Catalunya. D'altra banda, també hi ha bolets que poden produir indigestions, al·lucinacions o arribar a ser mortals.

Per dur a terme aquesta recerca, s'han escollit tres bolets diferents: El xampinyó (*Agaricus bisporus*) i el shiitake (*Lentinus edodes*) que són el primer i el segon bolet més consumits del món i un tercer bolet no tan popular com és el rossinyol (*Cantharellus cibarius*).

En termes generals, aquests bolets estan més valorats per les seves propietats gastronòmiques que per les propietats nutritives. No obstant, s'ha demostrat que són beneficiosos per a la salut<sup>60</sup>, a causa



*Figura 5: Estructura de l'aparell reproductor d'un fong (bolet).*

Font: *Enciclopèdia Catalana, 2010*

<sup>59</sup> *Enciclopèdia catalana, 2010*

<sup>60</sup> Barros, Baptista et al., 2007

de la seva riquesa en minerals i les seves propietats antibacterianes i potenciadores del sistema immunitari.

## **2.-PART EXPERIMENTAL**

En l'última dècada, el consum de bolets s'ha popularitzat, principalment perquè s'han tornat molt més accessibles per a la gastronomia i s'han difós les seves àmplies propietats nutricionals i repercussions en la salut. La possibilitat de cultivar aquests aliments fora de temporada i de poder-los conservar ha facilitat que la venda i el consum de bolets es mantingui durant tot l'any. El comerç globalitzat també ha contribuït en aquest fet, ja que ha permès el consum de bolets no-auctòctons provinents, fins i tot, de l'altra punta del planeta<sup>61</sup>.

Pel que fa a les característiques nutricionals de molts d'aquests aliments, s'ha demostrat que posseeixen propietats antibacterianes, antitumorals, antiinflamatories, reguladores de la hipertensió, contenen en gran majoria vitamina B o riboflavina i alguns d'ells tenen força capacitat antioxidant<sup>62</sup>. També hi ha fongs en altres aplicacions mèdiques, com el bolet *shiitake*<sup>63</sup>, que té la capacitat d'estimular el sistema immunològic i per aquest motiu s'inclou en dietes i en diversos compostos fàrmacs administrats a persones amb el síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA)<sup>64</sup>.

Per a dur a terme aquesta recerca s'han escollit tres bolets comestibles com a aliments a analitzar, ja que no hi ha gaires investigacions, fins al moment, pel que fa al seu contingut de polifenols o la seva capacitat antioxidant.

En la part pràctica del present treball, es pretén estudiar la quantitat de polifenols, tanins i capacitat antioxidant dels tres bolets, que es tractaran tant a nivell culinari, com pel que fa a la humitat (mostres

---

<sup>61</sup> Martínez Carrera, Morales et al., 2010

<sup>62</sup> Barros, Baptista et al., 2007

<sup>63</sup> Un dels bolets que s'estudiarà en aquesta recerca.

<sup>64</sup> García-Lafuente, Moro, et al., 2007

fresques, desengreixades/liofilitzades i seques). També es pretén observar el mecanisme d'alliberament d'aquests compostos fenòlics en l'organisme durant el procés de digestió (mitjançant mètodes *in vitro*) tot quantificant els polifenols i la capacitat antioxidant dels bolets un cop estiguin digerits. Finalment, s'aspira a quantificar les proteïnes oxidades dels bolets un cop tractats i digerits, per tal de conèixer l'altra cara de la moneda, l'oxidació dels aliments que es podria produir en els processos químics cocció i digestió.

## **2.1-HIPÒTESIS**

Aquesta investigació es fonamenta en 5 hipòtesis:

- 1- Hi ha compostos antioxidants en els bolets comestibles xampinyó, shiitake i rossinyol.
- 2- El tractament culinari que reben els aliments afecta la quantitat de compostos antioxidants, i per tant, la seva capacitat antioxidant.
- 3- El comportament dels antioxidants en els bolets, és similar a altres aliments que cuits, alliberen més antioxidants que crus.
- 4- La digestió afecta als compostos antioxidants d'un aliment, i per tant, la seva capacitat antioxidant.
- 5- Hi ha una relació directa entre la riquesa entre substàncies antioxidants en cada espècie de bolet i la capacitat antioxidant que se n'obté.

A part dels procediments generals (determinació de la humitat, liofilització, extracció metanol-acetona) que es duran a terme en tots els casos, també es realitzaran uns assajos i una metodologia molt concreta per tal de comprovar i demostrar cada una de les cinc hipòtesis. Vegeu-ho en la Taula 6.



| Hipòtesi | Mètodes   |
|----------|---|
| 1        | <i>Folin-Ciocalteu</i> (extracció dels polifenols de baix pes molecular, tanins condensats i tanins hidrolitzables)   |
| 2        | <i>Folin-Ciocalteu</i> (extracció dels polifenols de baix pes molecular, tanins condensats i tanins hidrolitzables) i mètodes de mesura de capacitat antioxidant (FRAP, ABTS i ORAC).             |
| 3        | Cocció dels bolets i <i>Folin-Ciocalteu</i> (extracció dels polifenols de baix pes molecular, tanins condensats i tanins hidrolitzables)  |
| 4        | Digestió <i>in vitro</i> , <i>Folin-Ciocalteu</i> (extracció dels polifenols de baix pes molecular, tanins condensats i tanins hidrolitzables) i mètode de mesura de capacitat antioxidant (FRAP) |
| 5        | <i>Folin-Ciocalteu</i> i mètodes de mesura de capacitat antioxidant (FRAP, ABTS i ORAC).  |

Taula 6: Mètodes utilitzats per validar cada una de les hipòtesis.

## **2.2-METODOLOGIA**

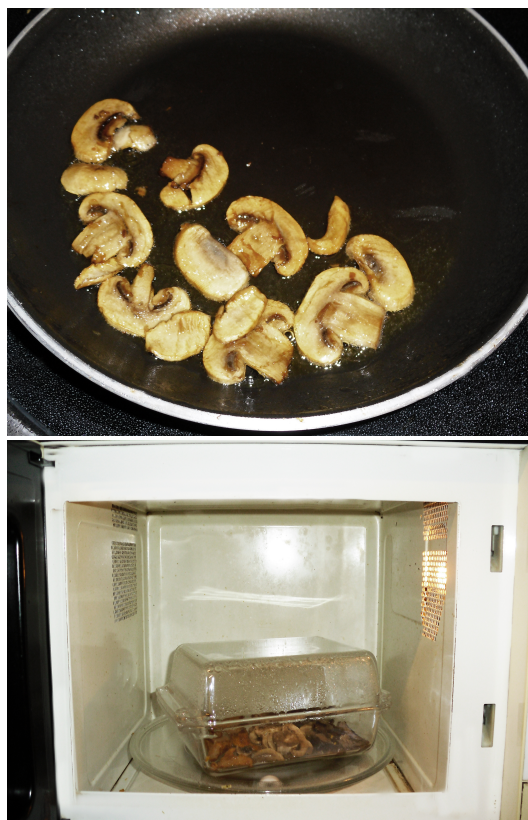
### **2.2.1-PROCEDIMENTS DE PREPARACIÓ DE LES MOSTRES**

#### **2.2.1.1-Tractaments culinaris de les diferents mostres:**

-Fregir: Les mostres es van fregir amb oli d'oliva durant 5 minuts, a una temperatura aproximada de 150°C-160°C.

-Bullir: Les mostres es van bullir amb aigua abundant durant 5 minuts.

-Microones: Les mostres es van coure al forn de microones durant 5 minuts, a una potència de 700W.



*Figura 6: Imatges dels bolets mentre eren processats. A dalt els xampinyons fregits, a sota, els bolets cuits al microones.*

#### **2.2.1.2-Homogenització de les mostres:**

Per tal d'aconseguir mostres homogènies i perquè no es produïssin desajustos en els resultats, es va procedir a liofilitzar les mostres i desengreixar-ne algunes amb el procés que s'explica en la pàgina 37 per triturar-les posteriorment.



Figura 7: Mostres liofilitzades dels tres bolets.

### **2.2.1.3-Extracció Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O:**

Per quantificar els antioxidants o mesurar la capacitat antioxidant d'una substància es necessita obtenir una mostra d'allò que es vol analitzar i triturar-la a trossos petits<sup>65</sup> si es tracta d'un producte sòlid.

Un cop s'aconsegueix la mostra preparada, es procedeix a realitzar una extracció Metanol-H<sub>2</sub>O [50%-50%]<sup>66</sup> / Acetona- H<sub>2</sub>O [70%-30%] com a base de totes les extraccions, mesures o quantificacions.

#### **-Procés:**

1. S'etiqueten els *ependorfs*<sup>67</sup>, usualment de 2ml, només en el cas que es disposi de diverses mostres o que es realitzi la prova per duplicat o triplicat com s'acostuma a fer.

---

<sup>65</sup> En el nostre cas, va haver-hi una gran quantitat de resultats incoherents en el primer assaig, a causa que les mostres eren força heterogènies i es va decidir liofilitzar les mostres i polvoritzar-les per tal d'homogeneïtzar.

<sup>66</sup> Proporcions respectives en les que es troben dos components d'una dissolució.

2. Es pesa una petita mostra de 1 g aproximadament i s'introdueix en els *eppendorfs*.
3. S'introdueix 1 ml de metanol-H<sub>2</sub>O, s'homogeneïtza amb algun instrument com un *ultraturrax* i es posa una gradeta amb els *eppendorfs* a l'agitador, a poques revolucions per minut, durant una hora i a temperatura ambient (uns 20°).
4. Es centrifuguen dels *eppendorfs* durant 10 minuts a 3000rpm per tal de separar el residu del sobrenedant.
5. S'extreu el sobrenedant, que es posa en altres *eppendorfs* prèviament etiquetats com a tal, i s'afegeix 1ml d'acetona-H<sub>2</sub>O a cada residu.
6. Es repeteix el procés d'agitar, centrifugar i separar el sobrenedant del residu, i aquest últim s'afegeix al primer sobrenedant, aconseguit per mitjà de l'extracció metanol-H<sub>2</sub>O.

#### **2.2.1.4-Càlcul de la humitat:**

Mentre es fa l'extracció *metanol/acetona/aigua*, s'acostuma a calcular la humitat de les diferents mostres que es disposen, per tal que el posterior estudi de la quantitat de polifenols i la capacitat antioxidant sigui més acurat i es tingui en comte la quantitat d'aigua present en cada mostra.

##### **-Procés:**

1. Es posen en una gradeta tants tubs d'assaig com mostres diferents es tenen, s'etiqueten segons la mostra que contindran i es posen a assecar en una estufa a més de 100°C durant unes hores. Es prepara un dessecador per tal de transportar-les o manipular-les sense que guanyin humitat.

---

<sup>67</sup> Nom amb que es designa usualment als tubs de microcentrífuga, en referència a la principal empresa que fabrica aquests recipients.

2. S'anota el pes de cada tub un cop assecats i refredats, es fa la tara i es pesa una petita part de la mostra corresponent al tub (no importa el pes que s'hi posi de cada una).
3. Els tubs amb les mostres a dintre es posen dins del dessecador un cop pesats i es tornen a introduir a l'estufa durant unes hores a més de 100°C per aconseguir que les mostres perdin tota l'aigua que contenen.
4. A continuació, es pesen els tubs que contenen la mostra assecada de manera que quan es resta el pes de la mostra seca a la mostra fresca, podem calcular l'aigua que conté la mostra, per al posterior càlcul del grau d'humitat.

#### **2.2.1.5-Determinació del contingut de greix:**

Mitjançant aquest mètode s'aconsegueix conèixer el percentatge i el pes del greix present en una mostra, necessari a l'hora de realitzar experiments de quantificació dels fenols o de capacitat antioxidant.

##### **-Reactius:**

- Èter.

##### **-Procés:**

1. Es pesa una quantitat de mostra i s'anota en cada cas.
2. S'asseca al forn i es pesen els tubs en els quals, posteriorment, es recolliran els sobrenedants.
3. Es posen les mostres en un recipient com pot ser un tub d'assaig o un tub de centrífuga i s'hi afegeix èter<sup>68</sup> en proporció a la mostra que s'hagi pesat.<sup>69</sup> Vegeu-ho en la Figura 8.
4. S'agiten els recipients durant 1 hora.

---

<sup>68</sup> S'utilitza èter ja que aquest dissol els greixos i d'aquesta manera, si s'aïlla el sobrenedant i es deixa evaporar l'èter es pot conèixer el contingut greixós de cada mostra.

<sup>69</sup> En el meu experiment, es van pesar aproximadament 1g de cada mostra i posteriorment es va utilitzar 10 mL d'èter per a cada una.

5. Es realitza un centrifugat durant 10 minuts a 3000 rpm per separar el residu del sobrenedant.
6. S'extreu el sobrenedant i es posen els tubs que s'han pesat i assecat en el pas número '2'.
7. Es repeteix el procés amb 1 mL d'èter per tal de rentar i acabar d'extreure el greix que podria haver quedat en la mostra.
8. Els tubs que contenen els sobrenedants dels dos assajos s'escalfen en una estufa a 37°C per tal que l'èter restant en el sobrenedant s'evapori, i així es pugui conèixer la quantitat de greix de cada mostra.

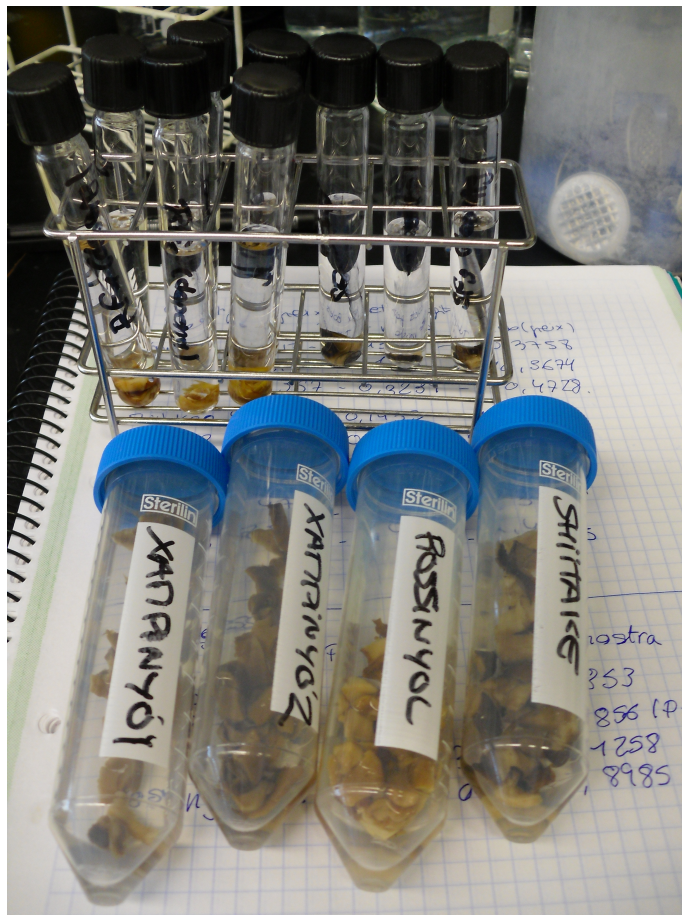


Figura 8:  
Recipients amb èter  
per tal de quantificar el  
greix en les mostres.

### **2.2.1.6-Preparació del Trolox:**

El *trolox* és un anàleg de la vitamina E<sup>70</sup> que, a diferència d'aquesta, té la propietat de ser hidrosoluble. Aquesta substància s'utilitza com a patró de referència en processos de mesura de capacitat antioxidant com són l'ORAC, el FRAP i l'ABTS a causa de la seva alta capacitat per prevenir pèrdues d'electrons, produïdes per agents oxidants (és molt antioxidant). És necessari que sigui hidrosoluble, ja que si no fos soluble o fos únicament liposoluble, no es podrien dur a terme algunes de les pràctiques descrites posteriorment.

Per realitzar les corbes necessàries en aquests processos, primer es fa una dissolució mare 1000µM<sup>71</sup> que s'aconsegueix dissolent 0,00625g de reactiu *trolox* en 25mL d'aigua *milli-Q*. A partir de la dissolució mare s'aconsegueixen les altres solucions (750µM, 500µM, 200µM, 100µM i 50µM)

### **2.2.2-MÈTODES D'EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE POLIFENOLS**

Dintre dels diferents tipus de polifenols que s'acostumen a extreure trobem els polifenols extractables<sup>72</sup>, els polifenols hidrolitzables<sup>73</sup> i els tanins condensats<sup>74</sup>.

---

<sup>70</sup> La vitamina E és un antioxidant liposoluble que es troba en aliments com els fruits secs, hortalitxes de fulla verda, cereals, fruita...

<sup>71</sup> µM – Micro molar.

<sup>72</sup> Molècules que presenten diversos grups fenols, generalment curtes, que no cal trencar per poder quantificar els polifenols, sinó que s'obtenen fàcilment en el sobrenedant d'una extracció *Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O*.

<sup>73</sup> Polímers heterogènis formats per àcids fenols (principalment àcid gàl·lic). Per realitzar l'extracció i la quantificació del contingut fenòlic, s'han de trencar les llargues cadenes que formen.



### 2.2.2.1-Quantificació dels polifenols extractables (*Folin – Ciocalteu*)<sup>75</sup>

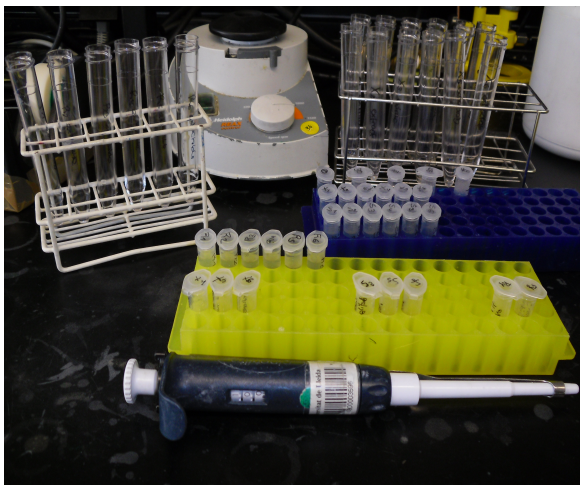


Figura 9: Preparació del material per realitzar l'assaig *Folin – Ciocalteu*.

Aquest mètode s'utilitza per tal de quantificar els polifenols extractables (polifenols de baix pes molecular) presents en una mostra. Aquest assaig es realitza a partir d'una extracció *Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O*, de la qual es recull el sobrenedant (del residu d'aquesta extracció s'extrauran els polifenols no extractables). Posteriorment, la

mostra es barreja durant 3 minuts amb un reactiu anomenat *Folin-Ciocalteu*<sup>76</sup> que provocarà una reacció que donarà color (blau) depenent de la quantitat de polifenols que es trobin presents en la solució. La reacció s'atura amb carbonat de sodi i es llegeix l'absorbància amb espectrofotometria per conèixer el volum fenòlic que es troba en la mostra. La recta patró amb la qual es compara l'absorbància es realitza amb àcid gàl·lic a diferents concentracions.

<sup>74</sup> Són polímers d'un flavonoid anomenat *antocianidina*. Són molt comuns en aliments com la tomata i acostumen a donar una coloració vermella característica com és el cas del vi.

<sup>75</sup> Serrano, Goñi et al., 2006; Saura-Calixto, Serrano et al., 2006

<sup>76</sup> És una mescla de fosfomolibdat i fosfotungstat. S'utilitza per a determinar la presència i la quantitat de fenols, ja que es medeix la quantitat de substància necessària per inhibir l'oxidació del reactiu. El seu nom prové dels científics que van treballar en el seu desenvolupament.



-Reactius:

- 100 µL de cada mostra a la qual se li ha realitzat una extracció *Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O*.
- *Folin-Ciocalteu*.
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (en una concentració de 75g/L)<sup>77</sup>
- Àcid gàl·lic (en una concentració de 400mg/L)
- Aigua *milli-Q*.

-Procés per quantificar els polifenols:

1. Es realitza l'etiquetatge de tants tubs d'assaig com mostres a analitzar i es prepara la corba patró d'àcid gàl·lic, que consisteix en 5 tubs (10 si es fa per duplicat) que contenen una dissolució en escala de concentració d'àcid: 0ppm (blanc), 50ppm, 100ppm, 200ppm i 400ppm.
2. Es posa 100 µL de mostra a cada tub amb una pipeta *P200*<sup>78</sup>.
3. Es programa 3 minuts en un *timer*<sup>79</sup> i a una velocitat més o menys regular, es va introduint 100 µL de *Folin-ciocalteu* a cada tub. És important tenir preparada la dissolució de carbonat de sodi i una pipeta *P5000*<sup>80</sup> llesta per succionar 2mL (2000µL) de manera que el temps de reacció sigui el més precís possible. S'observa que els sobrenedants es tornen d'una coloració blava o verdosa, si tenen polifenols antioxidants. D'altra banda, si la coloració és molt lleu, transparent o la de la mostra analitzada, significa que el *Folin-ciocalteu* s'ha oxidat.
4. Passats els 3 minuts s'introdueix a cada tub 2000µL de la dissolució de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> per tal d'aturar la reacció, intentant que la velocitat amb que es procedeix sigui similar a quan s'ha posat el *Folin-ciocalteu*.

---

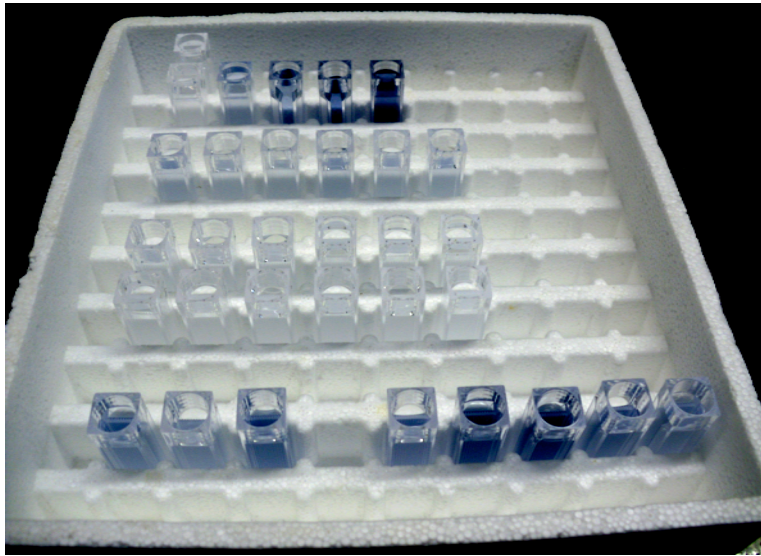
<sup>77</sup> El carbonat de sodi, aporta un pH bàsic, per tal de limitar possibles interferències amb altres compostos antioxidants com la vitamina C i d'aquesta manera només detectar els polifenols.

<sup>78</sup> Pipeta capacitada per succionar des de 50µL fins a 200µL

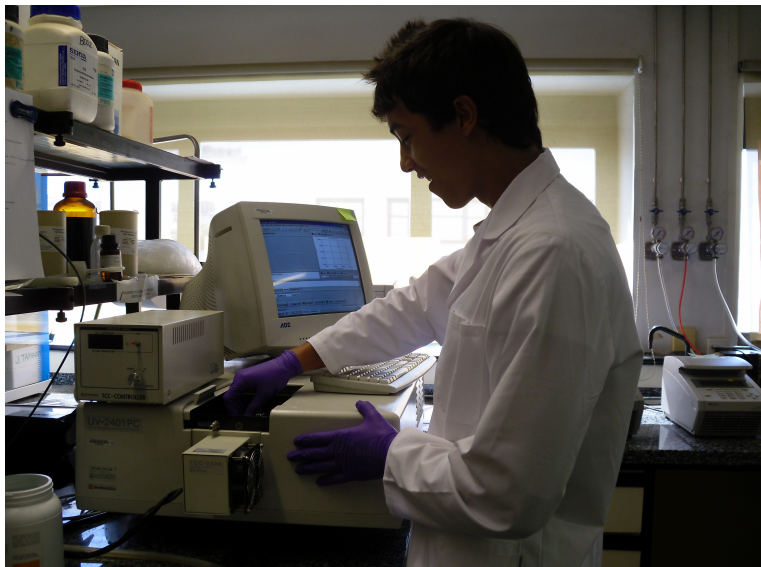
<sup>79</sup> Temporitzador usualment utilitzat en els laboratoris.

<sup>80</sup> Pipeta capacitada per succionar des de 1000µL a 5000µL (1mL-5mL)

5. Posteriorment s'introdueixen 2800 $\mu$ L d'aigua *milli-Q* a cada tub d'assaig, i es deixa reaccionant durant una hora.
6. Es posa el contingut de cada tub en una cubeta d'espectrofotòmetre.
7. Es llegeixen les diferents cubetes a l'espectrofotòmetre amb una absorbància de 750nm i s'anoten els resultats d'absorbància com equivalents d'àcid gàl·lic.



*Figura 10: Cubetes preparades per llegir amb l'espectrofotòmetre. La fila de cubetes superior és l'estàndar d'àcid gàl·lic.*



*Figura 11: Realització de la lectura de l'absorbància amb l'espectrofotòmetre.*

**2.2.2.2-Extracció dels tanins condensats (Folin-Ciocalteu)<sup>81</sup>:**

L'extracció dels tanins, tant dels condensats com dels hidrolitzables, es fa a partir del residu precipitat de la mostra en l'extracció *Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O*. Es fa d'aquesta manera, ja que al ser polímers (i, per tant, macromolècules) no es queden en el sobrenedant, sinó que es precipiten a causa del seu pes molecular. Per això quan s'ha de quantificar la presència de tanins en una mostra, el primer que s'ha de fer és trencar (fer la hidròlisi) aquestes cadenes de molècules tan grans, cosa que s'aconsegueix amb àcid butanol (només en el cas dels tanins condensats).

**-Reactius:**

- Solució Butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub>. Es mesclen 25 mL de HCl (37%) en 0,7 g de FeCl<sub>3</sub>. S'afegeix 0,9 L de 1-butanol, es mescla amb un agitador i s'enrasa a 1L amb n-butanol.

**-Procés:**

1. Es posen els diferents residus en tubs d'assaig anteriorment etiquetats.
2. S'afegeix 10ml de la solució Butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> a cada tub, i es posen a 100°C durant 3 hores.
3. Es deixen refredar i es centrifuguen a 3000rpm per recollir després el sobrenedant, que es posa en *fàlcons*.
4. Es fa un rentat als residus, afegint-los-hi 10 ml de solució butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> i tornant a centrifugar.
5. Es separa el sobrenedant del residu que queda després del rentat i es posa en el *fàlcon*, juntament amb el primer sobrenedant obtingut.
6. S'enrasen els *fàlcons* a 25 mL amb solució butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub>.

---

<sup>81</sup> Porter, Chan et al., 1985; Scalbert, Monties et al. 1989

7. Es posa el contingut dels *fàlcons* en cubetes, i es llegeix l'absorbància a 555nm utilitzant la solució butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> com a "blanc".
8. Les concentracions es calculen en comparació amb la recta patró.

### **2.2.2.3-Extracció dels polifenols hidrolitzables<sup>82</sup>:**

Els polifenols hidrolitzables o tanins hidrolitzables són macromolècules més petites que els no-hidrolitzables, però tot i així, es necessari trencar-los per tal de poder-los quantificar. Aquest trencament és produït en una reacció força violenta, que té lloc entre el metanol i l'àcid sulfúric.

#### **-Reactius:**

- 200mg de mostra
- Metanol
- Àcid sulfúric concentrat (98% aproximadament)
- 200 mg de cada mostra a analitzar

#### **-Procés:**

1. Es posen els 200mg de cada mostra en diferents tubs, prèviament etiquetats.
2. S'afegeix 20ml de metanol a cada tub.
3. Es posen els tubs amb gel ja que quan s'hi afegeix l'àcid sulfúric, succeeix una reacció que canvia la temperatura dràsticament de la dissolució i la fa augmentar molt.
4. S'hi afegeix l'àcid sulfúric molt controladament, preferiblement amb pipetes *Pasteur*.
5. Es tapen els tubs d'assaig i s'incuben a 85°C durant 20 hores. És important tapar correctament, ja que si s'evaporés tot o quasi bé tot el metanol, l'àcid sulfúric cremaria la mostra i l'extracció no seria possible.

---

<sup>82</sup> Hartzfeld, Forkner et al., 2002

6. Es centrifuga a 3000rpm i es separa el sobrenedant del residu.
7. Es fan dos rentats del residu, afegint 10 mL d'aigua *milli-Q*, centrifugant i recollint el sobrenedant en cada rentat.
8. Es mesura la quantitat de polifenols hidrolitzables amb el mètode *Folin-Ciocalteu* utilitzant l'àcid gàl·lic com a patró i es llegeix amb l'espectrofotòmetre a 750 nm.

### **2.2.3-MÈTODES DE MESURA DE LA CAPACITAT ANTIOXIDANT:**

Per dur a terme la mesura de la capacitat antioxidant d'una mostra, existeixen tres principals procediments, entre d'altres, que es determinen amb les sigles FRAP, ABTS i ORAC (Luminòmetre automàtic).

#### **2.2.3.1-Mètode FRAP<sup>83</sup> (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*)<sup>84</sup>:**

L'acrònim *FRAP* serveix per referir-se a un procés que serveix per determinar la capacitat d'una substància per donar un o més electrons al ferro i, per tant, reduir-lo partint d'un pH baix i en presència d'un reductor (que és l'hipotètic antioxidant que conté la mostra). El complex *TPTZ*<sup>85</sup> amb Fe(III) es redueix a la forma fèrrica, i desenvolupa un color blau que es llegeix posteriorment amb un espectròmetre a 595 nm<sup>86</sup> per determinar l'absorbància de la mostra, que posteriorment es compara amb la capacitat d'una substància coneguda, normalment *trolox*. Aquest mètode s'ha realitzat per avaluar la capacitat antioxidant de les diferents mostres en la part pràctica. Com que és el mètode més ràpid per realitzar aquesta

---

<sup>83</sup> Pulido, Bravo et al., 2000

<sup>84</sup> Capacitat antioxidant de reducció fèrrica.

<sup>85</sup> Tripirifiltriàzina.

<sup>86</sup> 595 nanòmetres és el valor de la longitud d'ona que utilitza l'espectrofotòmetre per tal de mesurar la intensitat de llum de la mostra a analitzar.

mesura, en les mostres digerides únicament es va realitzar el FRAP, fet que es deu a una limitació temporal.

-Reactius:

- Sobrenedant d'una mostra a la que prèviament se li ha realitzat una extracció *Metanol/Acetona/H<sub>2</sub>O*.
- Tampó acetat 0,3 Molar de pH 3,6.<sup>87</sup>
- Solució *TPTZ*<sup>88</sup>.
- Solució de  $\text{FeCl}_3$ <sup>89</sup>

-Procés:

1. Es prepara el *reactiu FRAP* mesclant 25 mL de tampó acetat, 2,5 mL de solució *TPTZ* i 2,5 mL de solució de  $\text{FeCl}_3$
2. En una placa de 96 pouets<sup>90</sup>, s'ha d'introduir 7,5  $\mu\text{L}$  de mostra, que es pipeteja individualment i normalment es posa per duplicat i 7,5  $\mu\text{L}$  de patró (amb el qual es realitzarà la *corba* de calibració)
3. S'hi afegeix 22,5  $\mu\text{L}$  d'aigua *milli-Q*<sup>91</sup> que s'acostuma a introduir amb la pipeta multicanal.
4. També amb la pipeta multicanal es posa a tots els pouets 225  $\mu\text{L}$  de reactiu *FRAP*, anteriorment preparat.
5. S'incuba la placa a 37°C durant 30 minuts.
6. Es llegeix l'absorbància en un espectrofotòmetre<sup>92</sup> a 595nm.
7. S'utilitza la *corba* generada per les mostres patró (*Trolox*) per expressar els resultats generats en  $\mu\text{mols}$  equivalents de *Trolox*.

---

<sup>87</sup> 3,1 g de  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  i 16 ml de  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  per litre de dissolució.

<sup>88</sup> Per obtenir el *TPTZ* s'ha de disoldre 0,0312g de *2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina* 10nM (mini molar) en 10mL de HCL 40 mM.

<sup>89</sup> Disoldre 0,054g de  $\text{FeCl}_3$  en 10mL d'aigua *milli-Q*<sup>11</sup>

<sup>90</sup> Placa utilitzada en la fotoespectrometria i la luminometria que està formada per 96 petits recipients anomenats *pouets* amb el fons totalment transparent.

<sup>91</sup> Aigua d'un grau molt elevat de puresa que ha estat filtrada i purificada per osmosi inversa.

<sup>92</sup> En la meua investigació, es va utilitzar l'espectrofotòmetre *Thermo Labsystems – Multiskan ascent* (Vegeu-ho en la Figura 11).



Figura 12:

*Espectofotòmetre  
Thermo Labsystems  
– Multiskan ascent  
amb la placa de 96  
pouets, en  
disposició per llegir  
l'absorbància*

### **2.2.3.2-Mètode ORAC<sup>93</sup> (Oxygen Radical Absorbance Capacity)<sup>94</sup>:**

Aquest mètode es basa en la interacció entre un radical lliure (molt oxidant) i la mostra de la qual es vol conèixer la capacitat antioxidant. La substància que ens indica la capacitat antioxidant de la mostra analitzada és la fluoresceïna, que perd fluorescència en rebre el dany oxidatiu produït pel radical lliure (en cas que la substància que s'analitza no sigui antioxidant). Si per contra, la mostra és antioxidant, reaccionarà amb el radical lliure que formarà hidroperòxid, ROOH i un radical estable antioxidant, fet que provocarà que la fluorescència emesa per la fluoresceïna no es perdi.

Aquest mètode és una mica diferent als altres dos mètodes utilitzats. L'ORAC mesura la capacitat antioxidant, però té en compte les proteïnes o molècules oxidants de la mostra. Aquest fet s'ha de tenir en compte per no cometre l'error de pensar que el resultat de la prova és incoherent, quan en realitat el que passa és que intervé el factor de la oxidació.

---

<sup>93</sup> Cao, Alessio et al., 1993

<sup>94</sup> Capacitat d'absorció dels radicals d'oxigen.

-Reactius:

- Tampó fosfat, pH 7.4, 75mM. Per cada litre de solució es mescla 0,2772 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  amb 1,1356 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Posteriorment s'ajusta el pH a 7.4 mitjançant àcid clorhídric/Hidròxid de sodi.
- El radical lliure *AAPH* en una concentració de 306mM
- Fluoresceïna 48 mM

-Procés:

1. En una placa de 96 de color negre, es posen intentant que no es mesclin<sup>95</sup>:
  - a. 12,5 µL de mostra o patró<sup>96</sup>.
  - b. 15 µL de radical lliure *AAPH*.
2. Amb la pipeta multicanal s'afegeix 120 µL de fluoresceïna a cada pouet i d'aquesta manera es barreja amb els altres dos reactius que comencen a interaccionar entre ells.
3. Es llegeix la fluorescència amb un luminòmetre automàtic<sup>97</sup> a (493 ex/515 em) durant 60 minuts en intervals de 3 minuts.

-Càlculs amb les dades:

1. A tots els valors obtinguts de cada pouet durant 1 hora, se'ls resta el primer valor:

| EXEMPLE <sup>98</sup> (Shiitake microones 1) |       |       |       |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0  | 3     | 6     | 9     | 12    | 15    | 18    |
| 24010  | 23961 | 23708 | 23514 | 23244 | 23145 | 22950 |
| 0  | -49   | -302  | -496  | -766  | -865  | -1060 |

Taula 7: Exemple de la resta que es realitza en el pas 1 del càlcul amb les dades.

<sup>95</sup> Es posa una gota de cada reactiu als costats oposats del pouet, intentant que es mantinguin per tensió superficial sense que s'ajuntin. D'aquesta manera, s'evita que els reactius interaccionin abans d'introduir la fluoresceïna.

<sup>96</sup> En l'ORAC s'utilitza un estàndard de *trolox* de 0 a 50 µM.

<sup>97</sup> En l'experiment realitzat es va utilitzar un *infinite M200* TECAN.

<sup>98</sup> Exemple de la resta del primer valor 24010 a cada un dels valors següents. L'exemple complet arribaria fins al minut 57'.



2. Calcular el pendent, mitjançant els valors de la fluorescència mesurada i el temps en que s'ha mesurat. *Vegeu-ho en la Figura 13.*

|                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| =PENDIENTE(A413:T413;A415:T415) |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
|                                 | M     | N     | O     | P     | Q     | R     | S     | T     | U          |
| 413                             | 36    | 39    | 42    | 45    | 48    | 51    | 54    | 57    | pendent    |
| 414                             | 22196 | 22044 | 22025 | 21832 | 21672 | 21583 | 21450 | 21343 |            |
| 415                             | -1814 | -1966 | -1985 | -2178 | -2338 | -2427 | -2560 | -2667 | =PENDIENT  |
| 416                             | 22306 | 22230 | 22251 | 22058 | 21886 | 21803 | 21600 | 21566 |            |
| 417                             | -2167 | -2243 | -2222 | -2415 | -2587 | -2670 | -2873 | -2907 | -0,0196791 |
| 418                             |       |       |       |       |       |       |       |       |            |

Figura 13: Càlcul del pendent mitjançant els valors obtinguts de la fluorescència que s'ha mesurat.

3. Es comparen cada un dels pendents de les mostres amb l'equació obtinguda de la corba de *trolox* (0 – 50 µM) substituint "x" pel pendent de cada mostra. *Vegeu-ho en les Figures 13 i 14.*

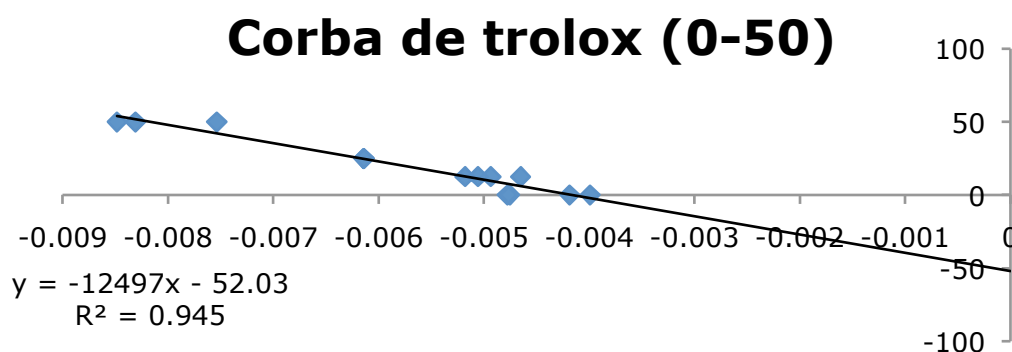


Figura 13: corba de *trolox* i equació (en vermell) realitzada a partir d'una gràfica de dispersió, creada amb el software *Microsoft Excel*.

|     | S     | T     | U          | V                  |
|-----|-------|-------|------------|--------------------|
| 202 | 54    | 57    | pendent    |                    |
| 203 | 20880 | 20719 |            |                    |
| 204 | -2928 | -3089 | -0,0226603 | =-12497*U204-52,03 |
| 205 | 20445 | 20370 |            |                    |
| 206 | -2575 | -2650 | -0,0264373 | 278,35646          |
| 207 |       |       |            |                    |

Figura 14: Substitució de "x" per el pendent de cada mostra.

- Posteriorment també s'introdueix la humitat de cada mostra al full de càlcul.

### **2.2.3.3-Mètode ABTS<sup>99</sup>:**

L'ABTS té un fonament força simple; si s'oxida el reactiu ABTS amb persulfat potàssic, forma un radical catió que es redueix si interacciona amb antioxidants (que poden estar presents en la mostra) i es produeix una decoloració. Posteriorment es llegirà l'absorbància per determinar la capacitat antioxidant de la mostra amb la qual s'ha experimentat.

#### **-Reactius:**

- Tampó fosfat salí 5mM pH 7.4
- 66mg de Persulfat potàssic en 100mL d'aigua *milli-Q*.
- Reactiu ABTS oxidat<sup>100</sup>

<sup>99</sup> Re, Pellegrini et al., 1999

<sup>100</sup> Aquest reactiu s'ha de preparar un dia abans de la mesura posant 38,4 mg d'ABTS en 10mL de solució de persulfat potàssic i dipositant-ho en un recipient opac en agitació lenta durant almenys 8 hores.

-Procés:

1. En una placa de 96 pouets, s'introdueix 1  $\mu\text{L}$  d'aigua la primera fila, per tal de que exerceixi de control.
2. S'introdueix en les dues primeres columnes 1  $\mu\text{L}$  de patró (*trolox*).
3. En la resta de columnes es posa per duplicat 1  $\mu\text{L}$  de cada mostra a analitzar.
4. S'introdueix 250  $\mu\text{L}$  de reactiu ABTS<sup>101</sup> (oxidat) a tots els pouets mitjançant una pipeta multicanal
5. Es llegeix l'absorbància a 405 nm<sup>102</sup> en els minuts 0, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 minuts després d'haver realitzat la barreja amb l'ajuda d'un *timer*.
6. Amb els resultats obtinguts es calcula el percentatge d'inhibició del radical lliure produït pels hipotètics antioxidants i es compara amb el control (l'aigua).

## **2.2.4-ALTRES MÈTODES UTILITZATS:**

### **2.2.4.1-Digestió gàstrica *in vitro*<sup>103</sup>:**

La digestió *in vitro* simula bastant acuradament la digestió humana mitjançant enzims, control del pH i reactius com la pepsina o la pancreatina. Aquest procés ens permet observar i analitzar l'evolució i els canvis que es produeixen en els aliments quan són digerits en el nostre organisme.

---

<sup>101</sup> Aquest procés es convenient de fer al costat d'on es realitzarà la lectura de l'absorbància ja que no ha de transcórrer gaire temps desde que es mesclen els reactius fins que es duu a terme la primera lectura.

<sup>102</sup> En la nostra experiència, aquest pas s'ha dut a terme amb l'espectrofotòmetre *Thermo labsystems Multiskan ascent*.

<sup>103</sup> Serrano, Goñi et al., 2006

-Reactius:

I. TAMPONS:

1. Tampó HCl-KCl 0,2 M pH 1,5.<sup>104</sup>
2. Tampó Tris-Maleat 0,1 M pH 6,9.<sup>105</sup>
3. Tampó acetat de sodi 0,4 M pH 4,75.<sup>106</sup>
4. Tampó fosfat 0,1 M pH 7,5.<sup>107</sup>

II. PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES:<sup>108</sup>

1. Pepsina.

Es prepara una dissolució de 300mg de reactiu *pepsina* en tampó HCl-KCl pH 1,5.

2.  $\alpha$ -Amilasa.

Es prepara una dissolució de 120mg de reactiu  *$\alpha$ -Amilasa* en el tampó tris-maleat pH 6,9.

3. Pancreatina.

Es prepara una dissolució de 5mg del reactiu *pancreatina* en el tampó fosfat pH 7,5.

III. ALTRES REACTIUS (Per la fracció soluble):

1. Amiloglucosidasa

---

<sup>104</sup> Es prepara una dissolució KCl 0,2 molar i es mesclen 250mL amb 150mL de dissolució HCl 0,2 molar. S'hi afegeix 0,5L d'aigua *milli-Q* i s'ajusta el pH a 1,5. Finalment s'enrasa a 1L amb aigua destil·lada.

<sup>105</sup> Es mesclen 23,72g de reactiu *tris-maleat* i 0,4532g de  $\text{CaCl}_2$ . S'hi afegeix 700mL d'aigua *milli-Q* i ajustar pH a 6,9. Finalment s'enrasa a 1L amb aigua destil·lada.

<sup>106</sup> Dissoldre 33,16g de acetat de sodi (99% de puresa) i 2,34g de  $\text{CaCl}_2$  (95% de puresa) 700mL d'aigua *milli-Q*. Ajustar pH a 4,75.

<sup>107</sup> Es barreja 13,8g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  amb 700mL d'aigua *milli-Q* per produir la solució de fosfat. Es prepara també una dissolució NaOH 1 N (20,41g de NaOH en 0,5L d'aigua *milli-Q*). Es mescla 70mL de solució NaOH 1 N amb tota la dissolució fosfat i posteriorment, s'ajusta el pH a 7,5 i s'enrasa a 1L amb aigua *milli-Q*.

<sup>108</sup> Cal destacar que aquestes preparacions s'han de preparar immediatament abans d'utilitzar.

-Proces:

- I. DIGESTIÓ (en mostra individual)
  1. Determinar la humitat de la mostra.
  2. Pesar 1g de mostra seca en un tub de centrífuga.
  3. Afegir 10 mL de tampó HCl-KCl al tub.
  4. Ajustar el pH a 1,5 mitjançant HCl i NaOH.
  5. Afegir als tubs 0,2 mL de preparació de pepsina.
  6. Incubar a 40°C durant 60 minuts.
  7. Deixar refredar i afegir 4,5 mL de tampó fosfat pH 7,5.
  8. Ajustar el pH total a 7,5.
  9. Afegir 1mL de preparació de pancreatina.
  10. Incubar a 37°C (reproduint la temperatura corporal humana) durant aproximadament 6 hores.
  11. Deixar refredar i afegir posteriorment 9 mL de tampó Tris-Maleat pH 6,9.
  12. Ajustar el pH total a 6,9.
  13. Afegir 1 mL de preparació d'amilasa.
  14. Incubar durant 16 hores a 37°C.
  15. Deixar refredar i centrifugar durant 15 minuts a 3000 rpm per tal de separar la part soluble (sobrenedant) de la fracció insoluble (residu).
  16. Recollir el sobrenedant amb pipetes *pasteur* tenin en compte de no agafar partícules de residu.
  17. Realitzar dos *rentats*<sup>109</sup> amb 5 mL d'aigua destilada i centrifugant amb els mateixos paràmetres que en el pas '15' i recollint el sobrenedant en cada un. Tots els rentats d'una mateixa mostra, es posen en un mateix tub juntament amb el primer sobrenedant.

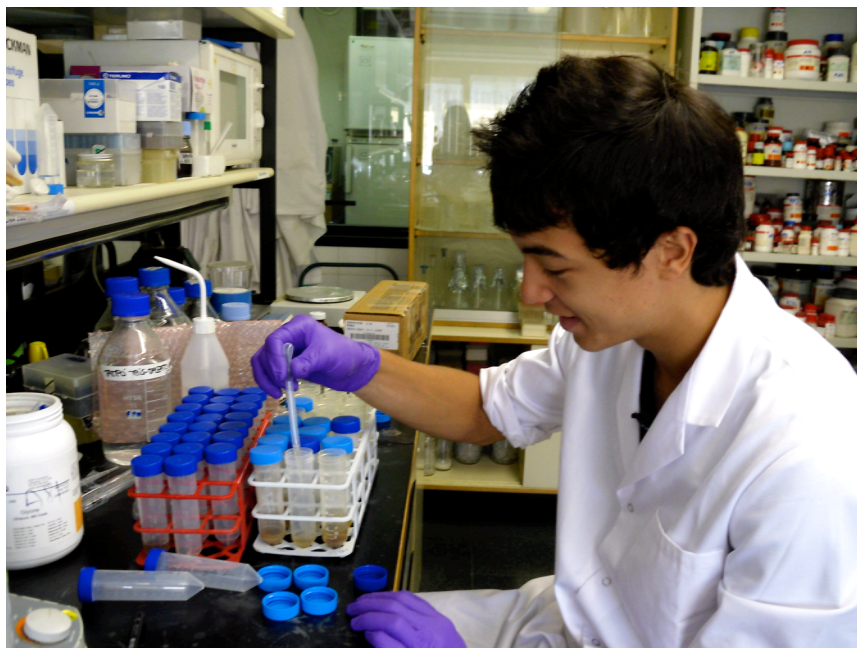
Arribat en aquest punt, s'obté un nombre igual de tubs que contenen sobrenedants (fracció soluble) i de tubs que contenen residus (fracció insoluble). A la fracció soluble se li aplicarà un tractament per tal de finalitzar-la:

---

<sup>109</sup> En aquest cas un *rentat* fa referència a l'acció d'extreure mitjançant aigua, aquelles molècules solubles que hagin pogut quedar precipitades en el residu a causa de l'agitació o perquè no s'han dissolt en el sobrenadant al primer assaig.

II. TRACTAMENT DELS SOBRENEDANTS (fracció soluble):

1. Afegir a cada tub 10 mL de tampó acetat de sodi pH 4,75.
2. Ajustar el pH total de cada mostra a 4,75.
3. Afegir 100 µL d'amiloglucosidasa amb una pipeta P200.
4. Incubar els tubs de centrífuga durant 45 minuts en agitació lenta, a una temperatura de 60°C.



*Figura 15:  
Regulació del pH  
de les mostres.*

**2.2.4.2-Western-blot<sup>110</sup>:**

Aquesta pràctica, permet avaluar les lesions oxidatives de les mostres. Es va realitzar aquest assaig, per tal d'avaluar no només els antioxidants i la capacitat que tenen, sinó també la proporció de compostos pro-oxidants que s'estarien ingerint en el cas que es consumís l'aliment, utilitzant les mostres crues dels bolets com a referència. Per tal d'aconseguir aquesta informació, s'utilitzen

---

<sup>110</sup> Kaur & Bachhawat, 2008. S'utilitza en camps com la bioquímica, biologia molecular i la biotecnologia ja que serveix per detectar proteïnes en una mostra. S'utilitzen tècniques com l'electroforesi per separar les proteïnes desnaturalitzades, i provocar que es quedin en una membrana de nitrocel·lulosa en la que juntament amb un anticòs, poden ser detectades les proteïnes.

diversos anticossos (AGE, CML, MDA-lys i NK, en el meu cas) que juntament amb les proteïnes, permeten dur a terme la lectura de la membrana que conté les proteïnes, utilitzada en l'experiment. Aquest procés és el més llarg i s'ha d'efectuar amb molta cura i presició.

-Reactius:

I. GEL EMPILADOR (5%) 6mL i GEL SEPARADOR (10%) 10mL :

- a. Acrilamida<sup>111</sup>
- b. SDS (10%)<sup>112</sup>
- c. TRIS 0,5M<sup>113</sup>
- d. PA o també anomenat APS (10%)<sup>114</sup>
- e. Aigua *milli-Q*
- f. TEMED<sup>115</sup>

II. ALTRES REACTIUS:

- a. Isopropanol
- b. *Running buffer*<sup>116</sup>
- c. Tampó BLOCK
- d. Buffer TBST<sup>117</sup>
- e. Tampó TBS<sup>118</sup>

---

<sup>111</sup> És un compost químic sòlid, blanc, cristalí, inodor, hidrosoluble i es dissol amb disolvents orgànics. S'utilitza molt en el *western-blot* per preparar els gels ja que juntament amb reactiu com l'APS i el TEMED es polimeritza.

<sup>112</sup> Dodecilsulfat sòdic, és una molècula utilitzada en l'electroforesis, per tal de desnaturalitzar les proteïnes del gel de poliàcrilamida.

<sup>113</sup> Es una amina primària molt utilitzada en camps com la bioquímica i la biologia molecular per tal de preparar tampons (Tris-HCL, Tris-Gly, TAE...)

<sup>114</sup> El persulfat d'amoni és un agent oxidant que es mescla amb el TEMED per preparar els gels d'acrilamida polimeritzats.

<sup>115</sup> És un compost químic que s'utilitza juntament amb persulfat amònic (APS) per catalitzar la polimerització de l'acrilamida quan es realitzen els gels de poliàcrilamida necessaris per dur a terme l'electroforesi en el *western-blot*.

<sup>116</sup> Un *buffer* (Dissolució amortidora) té la propietat de tenir un pH difícilment modificable amb àcids o de bases. Acostumen a estar formades per un àcid/base dèbil i una de les seves sals.

<sup>117</sup> És un *buffer* (veure nota número 44) utilitzat per rentar la membrana de nitrocelulosa utilitzada en el *western-blot*.

<sup>118</sup> És el mateix compost que el tampó TBST tot i que sense el reactiu *tween*.

- f. *Anticossos primaris*<sup>119</sup>
- g. *Anticossos secundaris*<sup>120</sup>
- h. *Luminol*

-Proces:

1. Preparar el gel separador. Vegeu-ho en la Figura 16.
  - a. Posar en un vas de precipitat 3,4mL d'acrilamida.
  - b. Afegir 100  $\mu$ L de *SDS*(10%), 2,5 mL de *TRIS* 0,5M i 3,96 mL d'aigua *milli-Q*.
  - c. Afegir 80 $\mu$ L del reactiu *PA*(10%) i 7,5 $\mu$ L de *TEMED*.
  - d. Agitar suaument perquè es polimeritzi el gel.
  - e. Introduir el gel separador entremig dels vidres<sup>121</sup>.

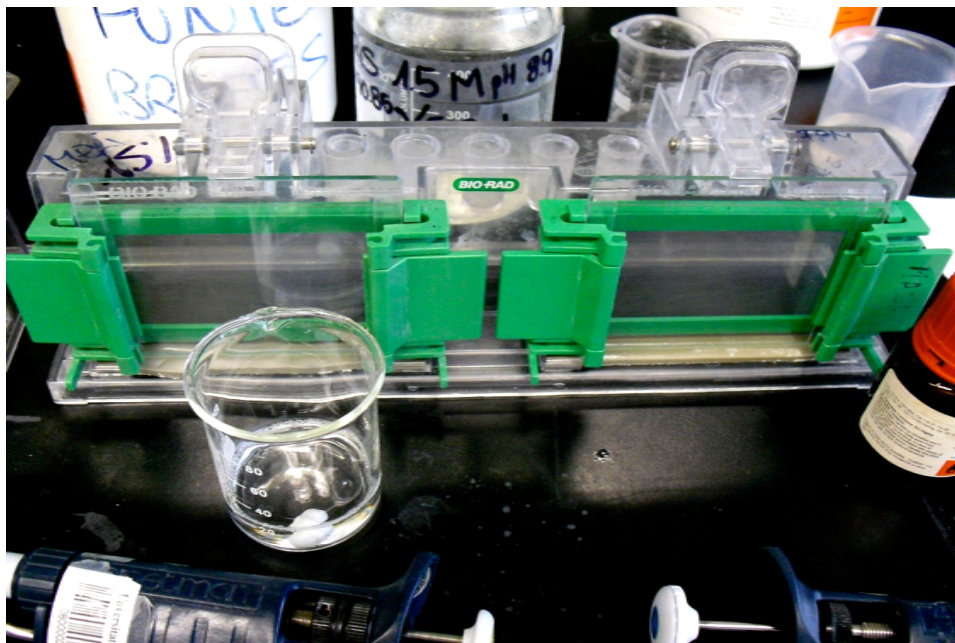


Figura 16: Polimerització del gel separador.

---

<sup>119</sup> Depenent del que es vulgui detectar en el *Western-blot* s'utilitzen anticossos diferents. En el meu experiment, es van utilitzar els anticossos "AGE, NK, MDA-Lys i CML" per tal d'evaluar les lesions oxidatives en els bolets liofilitzats i digerits.

<sup>120</sup> En el meu experiment es van utilitzar els anticossos secundaris *Anti-mouse* i *Anti-goat*.

<sup>121</sup> En el meu experiment es van utilitzar vidres de 1mm de gruix.



Nota: És important seguir l'ordre en afegir els reactius, ja que si s'introduís el *PA* o el *TEMED*, el gel es començaria a polimeritzar i podria dificultar l'adició dels altres reactius.

2. Afegir isopropanol per eliminar les possibles bombolles presents en el gel separador i esperar 20 minuts. Vegeu-ho en la Figura 17.
3. Retirar l' isopropanol mitjançant paper de filtre.
4. Preparar el gel empilador:
  - a. Posar en un vas de precipitat 1mL de reactiu acrilamida.
  - b. Afegir 60  $\mu$ L de *SDS*(10%), 1,5 mL de *TRIS* 0,5M i 3,4 mL d'aigua *milli-Q*.
  - c. Afegir 40 $\mu$ L del reactiu *PA*(10%) i 7,5 $\mu$ L de *TEMED*.
  - d. Remenar suaument perquè es polimeritzi el gel.
5. Introduir el gel empilador entre els vidres, a damunt del gel separador (ja polimeritzat).
6. Posar el *pinte*<sup>122</sup> i deixar que el gel polimeritzi i adopti una textura més sòlida durant 20 minuts. Afegir una petita quantitat d'empilador en el cas que quedin moltes bombolles sobre el gel. Retirar el *pinte* vigilant de no deformar els pouets.

---

<sup>122</sup> Peça de plàstic que realitza la funció de motlle per tal de que es formin *pouets* en el gel empilador, on posteriorment s'hi introduiran les mostres a analitzar.

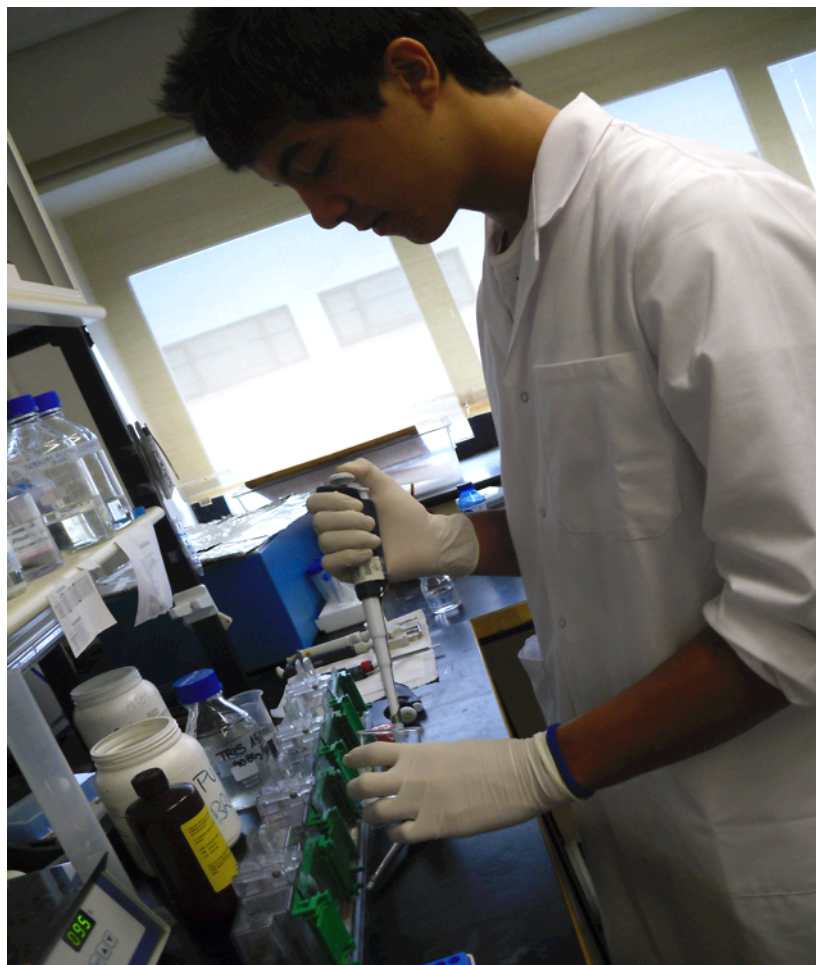


Figura 17: Addició d'isopropanol en el gel separador per tal d'eliminar-ne les bombolles d'aire.

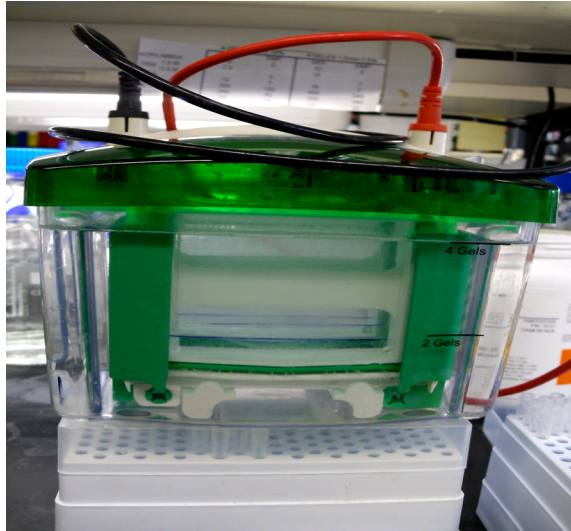
7. Preparació de les mostres<sup>123</sup>:
  - a. Escalfar les mostres en una estufa per a *eppendorfs* a 95°C durant 3 minuts. Posteriorment realitzarem un *spinning*<sup>124</sup> a cada *eppendorfs*.
8. Carregar les mostres:
  - a. Introduir 25 µL de marcador al primer pouet de cada gel.
  - b. Introduir 20 µL de mostra a cada pouet restant.
  - c. Cobrir amb running buffer els gels, després de posar-los en la cubeta de *western-blot*.
9. Iniciarem l'electroforesi connectant la cubeta al corrent elèctric a 30 mA<sup>125</sup> durant 60 minuts, fins que la línia blava

---

<sup>123</sup> En el meu experiment, les mostres eren el resultat d'una digestió *in vitro* realitzada en 3 bolets liofilitzats de diferents varietats, els quals van estar

<sup>124</sup> Terme usual en el laboratori, que fa referència a l'acció de mesclar una substància vortejant el recipient en el que es troba durant pocs segons.

minvi pel gel, fins a la part de baix de tot, de tal manera que les proteïnes es queden en els pouets i més endavant es recolliran en una membrana. Vegeu-ho en la Figura 18.



*Figura 18: Electroforesi en la cubeta de corrent elèctric. Es pot apreciar com la línia blava es troba gairebé a baix de tot.*

10. Separar els vidres i fer una marca al gel (tallar un fragment) de la cantonada contrària on s'ha posat el marcador, per saber quina posició tenen cada una de les proteïnes.
11. Es preparen les membranes:
  - a. Es numeren.
  - b. S'agiten en metanol 3 vegades durant 5 minuts, canviant el metanol en cada ocasió
12. Transferència:
  - a. Es preparen dos cartrons i dues esponges per cada membrana.
  - b. Es situa la peça per realitzar l'anomenat *sandwich* i a cada car s'hi situa una esponja i un cartró.
  - c. Damunt del cartró de la dreta, s'hi posa el gel, previament tallat (s'ha de tallar la part del gel empilador). Vegeu-ho en la Figura 19.

---

<sup>125</sup> S'utilitzen 30 mA en el cas de tenir 2 gels. Es reduirà la intensitat a la meitat en el cas de tenir només un gel.



*Figura 19:  
Preparació del  
sandwich. En la  
imatge s'aprecia  
com es posa el gel  
damunt del  
cartró.*

- d. A damunt del gel s'hi posa la membrana i es passa un rodet per tal que desapareguin les petites bombolles d'aire que podrien interferir en la transferència de proteïnes.
- e. Es completa el *sandwich* afegint el cartró i l'esponja restants de manera successiva, i finalment es tanca la peça de plàstic aplicant pressió en tot moment a la zona de la membrana i el gel, perquè no hi entri aire.
- f. Es situa a l'aparell d'electroforesi i es connecta a 100 volts durant 60 minuts.
13. S'extreuen les membranes dels *sandwich* i les posem en agitació amb uns 25mL de tampó *BLOCK* durant 60 minuts.
14. S'incuben les membranes a 4°C en *fàlcons* amb 3mL de dissolució d'un dels anticossos primaris en cada cas, depenent del que es vulgui detectar en el *western-blot*. Es tapa amb parafilm cada un dels *fàlcons*. En el meu cas es van utilitzar: MDA-lys, NK, AGE i CML.
15. Es realitzen 3 rentats amb tampó TBST (0,05%) de 5 minuts cada un. Vegeu-ho en la Figura 20.

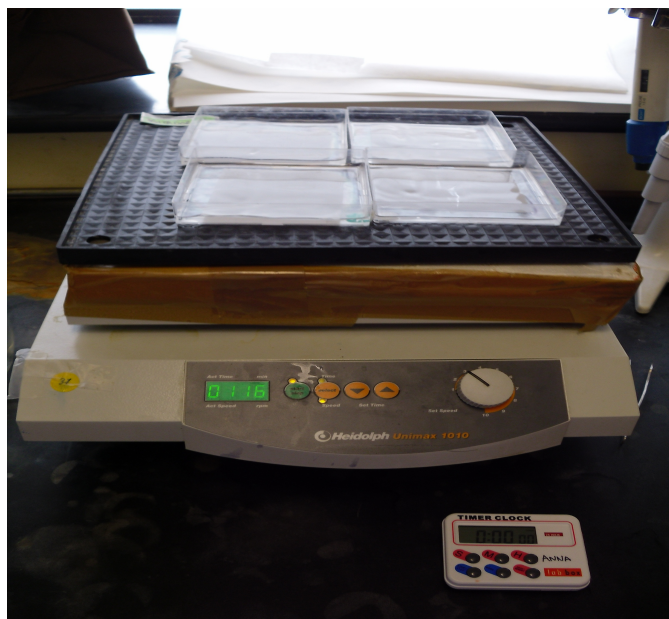


Figura 20: Rentats en agitació, amb tampó TBST (0,05%).

16. S'afegeix un anticòs secundari a 3 de les 4 membranes (en el meu cas). L'anticòs varia segons la membrana. Els anticossos secundaris utilitzats en la meua experiència són:
  - a. Primera membrana: Anticòs *Anti-mouse*.
  - b. Segona membrana: Anticòs *Anti-mouse*.
  - c. Tercera membrana: Sense anticòs.
  - d. Quarta membrana: Anticòs *Anti-goat*.
17. Es realitza una nova sèrie de rentats de 5 minuts, aquest cop però, en comptes de TBST s'utilitzarà TBS, que és el mateix compost però sense el reactiu *tween*.
18. Es posen les membranes en plaques individuals, tot i que especials, ja que tenen un film al fons, per tal que sigui més senzill a l'hora de separar la membrana de la placa.
19. S'afegeix 1,5mL d'un substrat anomenat *luminol* a cada placa. Es deixa reaccionar la mescla en agitació durant 4 minuts.
20. Lectura:
  - a. Es treuen les membranes de les plaques i es situen en un film transparent per a *western*.



- b. Es situa el film dintre d'un aparell com el *QUEMIDOC*<sup>126</sup>



Figura 21: Aparell de quimioluminiscència *QUEMIDOC*.

- c. Amb el *software* "Quantity one 4.6.5" es realitza la lectura.

#### **2.2.4.3-Mètode Bradford<sup>127</sup> (Determinació de la quantitat de proteïnes):**

Aquesta tècnica s'utilitza per conèixer la concentració de proteïnes d'una mostra, per mitjà del reactiu *Bradford*. Aquesta tècnica estava destinada principalment al Western-blot, ja que coneixent la quantitat de proteïna de cada mostra es poden igualar per tal de comparar-les entre elles. Si la proteïna oxidada no s'avalués tenint en compte aquest assaig, els resultats no serien comparables perquè cada mostra contindria una proporció de proteïna oxidada diferent en funció de les proteïnes totals de l'aliment.

---

<sup>126</sup> Aparell de quimioluminiscència *Molecular Imager ChemiDoc* - *Bio-Rad* utilitat en el present experiment per realitzar la lectura del *western-blot*.

<sup>127</sup> Krujer, 2002

-Reactius:

1. BSA.<sup>128</sup>
2. Reactiu Bradford.
3. 160 µL de cada mostra a analitzar.

-Procés:

1. Preparar la corba de BSA partint de la solució mare 0,1 µg/µL. Vegeu-ho en la Taula 8.

| <b><i>BSA (Solució mare)</i></b> | <b><i>Aigua milli-Q</i></b> |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 0 µL                             | 160 µL                      |
| 1 µL                             | 159 µL                      |
| 6 µL                             | 154 µL                      |
| 14 µL                            | 146 µL                      |
| 20 µL                            | 140 µL                      |
| 40 µL                            | 120 µL                      |

Taula 8: Diferents dissolucions de l'albumina de sèrum boví per tal d'obtenir la corba patró.

2. Etiquetar els *ependorfs* amb les mostres i també els que contenen la corba patró.
3. En una placa de 96 pouets, s'introdueix 160 µL de mostra o patró i 40 µL de reactiu Bradford per mitjà de la pipeta multicanal.
4. Amb la mateixa pipeta es mescla el contingut de cada pouet, per l'acció de xuclar i extreure la solució de la pipeta unes quantes vegades.
5. Es deixa reaccionar durant 10 minuts.

---

<sup>128</sup> Sigles angleses per designar l'albumina de suero boví.

6. Es llegeix l'absorbància a 596 nm per mitjà d'un espectrofotòmetre.<sup>129</sup>
7. Es quantifica la quantitat de proteïna de cada mostra amb els resultats obtinguts.

---

<sup>129</sup> En la meva investigació, es va utilitzar l'espectrofotòmetre *Thermo Labsystems – Multiskan ascent*.



### **3.-RESULTATS**

A partir dels assajos realitzats, es van obtenir uns resultats que es presenten, a continuació, organitzats en cinc tipus de taules. El primer tipus (tipus 3.1) és el total de polifenols de cada mostra, resultat de la suma dels polifenols de baix pes molecular i els tanins hidrolitzables. Els dos tipus de taules següents (tipus 3.2 i 3.3) mostren en forma de columnes els diferents factors amb els quals he sistematitzat aquest treball i corresponen, d'esquerra a dreta, als següents conceptes:

- Categoria que s'ha avaluat (polifenols o capacitat antioxidant).
- El bolet analitzat (xampinyó, shiitake i rossinyol).
- Tractaments (cru, fregit, bullit i microones).
- Digestió (digerits/no digerits).
- Tipus de mostra (polifenols, tanins hidrolitzables i tanins condensats) o assaig realitzat (FRAP, ABTS i ORAC).
- Mostra (fresca, liofilitzada/desengreixada i seca).

En el segon tipus de taula, la columna dels resultats mostra la mitjana dels mg equivalents d'àcid gàl·lic per cada gram de mostra analitzada (mg GAE/g) i el valor de la desviació estàndard de cada una. En canvi, en el tercer tipus de taula, es mostra la mitjana dels resultats en  $\mu$ mols equivalents de *trolox* per gram de mostra analitzada ( $\mu$ mol TE/g) i la desviació estàndard respectiva.

Donat que els bolets fregits no es van liofilitzar sinó que es van desengreixar estan reflectits en les taules en **color vermell**.

En el quart tipus de taula (3.4) es mostra una visió general de tots els resultats anteriors. En l'últim tipus (3.5), es mostren els resultats del western-blot i la proporció d'oxidació de cada mostra.

| <b>3.1.1- Polifenols totals mostres NO DIGERIDES</b>        | <b>Fresc</b> | <b>Liofilitzat/<b>Desengreixat</b></b>  | <b>Sec</b> |
|---|--------------|---|------------|
| Xampinyó  | 1,06         | 9,67                                    | 10,49      |
| Xampinyó fregit desengreixat                                | 3            | 4,02                                    | 10,03      |
| Xampinyó bullit   | 0,74         | 9,16                                    | 9,7        |
| Xampinyó microones  | 0,69         | 4,71                                    | 5,16       |
| Shiitake  | 0,41         | 4,76                                    | 5,24       |
| Shiitake fregit desengreixat                                | 3,4          | 7,09                                    | 14,03      |
| Shiitake bullit   | 0,284        | 3,91                                    | 4,23       |
| Shiitake microones  | 0,11         | 1,2                                     | 1,33       |
| Rossinyol   | 0,18         | 2,47                                    | 2,64       |
| Rossinyol fregit desengreixat                               | 3,9          | 4,01                                    | 14,17      |
| Rossinyol bullit  | 0,34         | 4,7                                     | 5,08       |
| Rossinyol microones   | 0,2          | 1,61                                    | 1,75       |
| <b>3.1.2-Polifenols totals mostres DIGERIDES (mg GAE/g)</b> | <b>Fresc</b> | <b>Liofilitzat/ <b>Desengreixat</b></b> | <b>Sec</b> |
| Xampinyó  | 1,52         | 13,93                                   | 15,12      |
| Xampinyó fregit desengreixat                                | 9,14         | 12,28                                   | 30,61      |
| Xampinyó bullit   | 1,34         | 16,55                                   | 17,54      |
| Xampinyó microones  | 2,31         | 15,81                                   | 17,34      |
| Shiitake  | 0,86         | 10,08                                   | 17,34      |
| Shiitake fregit desengreixat                                | 3,25         | 6,78                                    | 13,41      |
| Shiitake bullit   | 0,61         | 8,47                                    | 9,15       |
| Shiitake microones  | 0,98         | 2,22                                    | 11,86      |
| Rossinyol   | 0,68         | 9,6                                     | 11,86      |
| Rossinyol fregit desengreixat                               | 7,32         | 7,52                                    | 35,86      |
| Rossinyol bullit  | 0,77         | 7,65                                    | 8,19       |
| Rossinyol microones   | 1,01         | 1,97                                    | 8,87       |

Taula 9: Contingut total de polifenols en mostres no digerides (part superior) i mostres digerides (part inferior).

| 3.2.1-<br>Categoria | Bolet    | Tractaments | Digerit/No<br>digerit | Tipus de<br>polifenols   | Mostra        | Resultats<br>(mg<br>GAE/g) |
|---------------------|----------|-------------|-----------------------|--------------------------|---------------|----------------------------|
| POLIFENOLS          | Xampinyó | Cru         | No digerit            | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 0.64±0.002                 |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 5.83±0.02                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 6.32±0.02                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 0.42±0.28                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 3.84±2.54                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 4.17±2.76                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>condensats     | Fresca        | n.d.                       |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  |                            |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          |                            |
|                     |          |             | Digerit               | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 1.24±0.33                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 11.4±3.04                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 12.37±3.3                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 0.28±0.04                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 2.53±0.41                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 2.75±0.45                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>condensats     | Fresca        | n.d.                       |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  |                            |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          |                            |
|                     |          | Fregit      | No digerit            | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 0.97±0.53                  |
|                     |          |             |                       |                          | Desengreixada | 1.3±0.71                   |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 3.24±1.76                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 2.03±0.72                  |
|                     |          |             |                       |                          | Desengreixada | 2.72±0.97                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 6.79±2.41                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>condensats     | Fresca        | n.d.                       |
|                     |          |             |                       |                          | Desengreixada |                            |

|  |  |                   |            |                       |               |            |
|--|--|-------------------|------------|-----------------------|---------------|------------|
|  |  |                   |            |                       | Seca          |            |
|  |  |                   | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 9.05±2.12  |
|  |  |                   |            |                       | Desengreixada | 12.16±2.85 |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 30.31±7.12 |
|  |  |                   |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.09±0.02  |
|  |  |                   |            |                       | Desengreixada | 0.12±0.02  |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 0.3±0.06   |
|  |  |                   |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.       |
|  |  |                   |            |                       | Desengreixada |            |
|  |  |                   |            |                       | Seca          |            |
|  |  | Bullit            | No digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.12±0.04  |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  | 1.54±0.46  |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 1.63±0.48  |
|  |  |                   |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.62±0.07  |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  | 7.62±0.83  |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 8.07±0.88  |
|  |  |                   |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.       |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  |            |
|  |  |                   |            |                       | Seca          |            |
|  |  |                   | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 1.14±0.09  |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  | 14.05±1.08 |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 14.89±1.14 |
|  |  |                   |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.2±0.02   |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  | 2.5±0.26   |
|  |  |                   |            |                       | Seca          | 2.65±0.28  |
|  |  |                   |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.       |
|  |  |                   |            |                       | Liofilitzada  |            |
|  |  |                   |            |                       | Seca          |            |
|  |  | Micr<br>oon<br>es | No digerit | P.Baix pes            | Fresca        | 0.26±0.03  |

|  |  |  |         |                       |              |            |
|--|--|--|---------|-----------------------|--------------|------------|
|  |  |  |         | molecular             | Liofilitzada | 1.75±0.22  |
|  |  |  |         |                       | Seca         | 1.92±0.24  |
|  |  |  |         | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.43±0.06  |
|  |  |  |         |                       | Liofilitzada | 2.96±0.43  |
|  |  |  |         |                       | Seca         | 3.24±0.47  |
|  |  |  |         | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.       |
|  |  |  |         |                       | Liofilitzada |            |
|  |  |  |         |                       | Seca         |            |
|  |  |  | Digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca       | 2.06±0.04  |
|  |  |  |         |                       | Liofilitzada | 14.11±0.28 |
|  |  |  |         |                       | Seca         | 15.47±0.31 |
|  |  |  |         | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.25±0.04  |
|  |  |  |         |                       | Liofilitzada | 1.7±0.24   |
|  |  |  |         |                       | Seca         | 1.87±0.27  |
|  |  |  |         | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.       |
|  |  |  |         |                       | Liofilitzada |            |
|  |  |  |         |                       | Seca         |            |

Taula 10: Contingut en polifenols del xampinyó.

| 3.2.2-<br>Categoria | Bolet    | Tractaments | Digerit/No<br>digerit | Tipus de<br>polifenols   | Mostra        | Resultats<br>(mg<br>GAE/g) |
|---------------------|----------|-------------|-----------------------|--------------------------|---------------|----------------------------|
| POLIFENOLS          | Shiitake | Cru         | No digerit            | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 0.12±0.03                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 1.35±0.3                   |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 1.49±0.33                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 0.29±0.09                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 3.41±1.09                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 3.75±1.2                   |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>condensats     | Fresca        | n.d.                       |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  |                            |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          |                            |
|                     |          |             | Digerit               | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 0.78±0.09                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 9.15±1.11                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 10.06±1.22                 |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 0.08±0.02                  |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  | 0.93±0.18                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 1.03±0.2                   |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>condensats     | Fresca        | n.d.                       |
|                     |          |             |                       |                          | Liofilitzada  |                            |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          |                            |
|                     |          | Fregit      | No digerit            | P.Baix pes<br>molecular  | Fresca        | 0.39±0.11                  |
|                     |          |             |                       |                          | Desengreixada | 0.82±0.22                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 1.62±0.44                  |
|                     |          |             |                       | Tanins<br>hidrolitzables | Fresca        | 3.01±0.15                  |
|                     |          |             |                       |                          | Desengreixada | 6.27±0.31                  |
|                     |          |             |                       |                          | Seca          | 12.41±0.61                 |
|                     |          |             |                       | Tanins                   | Fresca        |                            |

|  |        |  |            |                       |               |             |
|--|--------|--|------------|-----------------------|---------------|-------------|
|  |        |  |            | condensats            | Fresca        | n.d.        |
|  |        |  |            |                       | Desengreixada |             |
|  |        |  |            |                       | Seca          |             |
|  |        |  | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 3.19±0.21   |
|  |        |  |            |                       | Desengreixada | 6.65±0.45   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 13.15±0.89  |
|  |        |  |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.06±0.04   |
|  |        |  |            |                       | Desengreixada | 0.13±0.09   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 0.26±0.18   |
|  |        |  |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.        |
|  |        |  |            |                       | Desengreixada |             |
|  |        |  |            |                       | Seca          |             |
|  | Bullit |  | No digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.004±0.001 |
|  |        |  |            |                       | Liofilitzada  | 0.06±0.02   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 0.06±0.02   |
|  |        |  |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.28±0.1    |
|  |        |  |            |                       | Liofilitzada  | 3.85±1.36   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 4.17±1.48   |
|  |        |  |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.        |
|  |        |  |            |                       | Liofilitzada  |             |
|  |        |  |            |                       | Seca          |             |
|  |        |  | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.52±0.08   |
|  |        |  |            |                       | Liofilitzada  | 7.25±1.17   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 7.83±1.27   |
|  |        |  |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.09±0.01   |
|  |        |  |            |                       | Liofilitzada  | 1.22±0.16   |
|  |        |  |            |                       | Seca          | 1.32±0.18   |
|  |        |  |            | Tanins                | Fresca        | n.d.        |

|  |  |           |            |                       |              |            |
|--|--|-----------|------------|-----------------------|--------------|------------|
|  |  |           |            | condensats            | Liofilitzada |            |
|  |  |           |            |                       | Seca         |            |
|  |  | Microones | No digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca       | 0.01±0.004 |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 0.15±0.04  |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 0.17±0.04  |
|  |  |           |            | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.1±0.04   |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 1.05±0.42  |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 1.16±0.46  |
|  |  |           |            | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.       |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada |            |
|  |  |           |            |                       | Seca         |            |
|  |  |           | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca       | 0.79±0.05  |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 0.15±0.04  |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 9.57±0.66  |
|  |  |           |            | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.19±0.09  |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 2.07±0.97  |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 2.29±1.07  |
|  |  |           |            | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.       |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada |            |
|  |  |           |            |                       | Seca         |            |

Taula 11: Contingut en polifenols del shiitake.



| 3.2.3-Categoria | Bolet     | Tractaments | Digerit/No digerit | Tipus de polifenols   | Mostra        | Resultats (mg GAE/g) |
|-----------------|-----------|-------------|--------------------|-----------------------|---------------|----------------------|
| POLIFENOLS      | Rossinyol | Cru         | No digerit         | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.1±0.05             |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  | 1.39±0.7             |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 1.49±0.75            |
|                 |           |             |                    | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.08±0.003           |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  | 1.08±0.04            |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 1.15±0.04            |
|                 |           |             |                    | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.                 |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  |                      |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          |                      |
|                 |           |             | Digerit            | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.56±0.08            |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  | 7.93±1.21            |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 8.46±1.29            |
|                 |           |             |                    | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.08±0.02            |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  | 0.93±0.18            |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 1.03±0.2             |
|                 |           |             |                    | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.                 |
|                 |           |             |                    |                       | Liofilitzada  |                      |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          |                      |
|                 |           | Fregit      | No digerit         | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 5.6±0.11             |
|                 |           |             |                    |                       | Desengreixada | 5.75±0.12            |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 27.43±0.56           |
|                 |           |             |                    | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 3.57±1.79            |
|                 |           |             |                    |                       | Desengreixada | 3.67±1.85            |
|                 |           |             |                    |                       | Seca          | 12.56±3.08           |
|                 |           |             |                    | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.                 |

|  |  |        |            |                       |               |                   |
|--|--|--------|------------|-----------------------|---------------|-------------------|
|  |  |        |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.              |
|  |  |        |            |                       | Desengreixada |                   |
|  |  |        |            |                       | Seca          |                   |
|  |  |        | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 3.19±0.21         |
|  |  |        |            |                       | Desengreixada | 6.65±0.45         |
|  |  |        |            |                       | Seca          | 13.15±0.89        |
|  |  |        |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 1.72±0.41         |
|  |  |        |            |                       | Desengreixada | 1.77±0.43         |
|  |  |        |            |                       | Seca          | 8.43±2.03         |
|  |  |        |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.              |
|  |  |        |            |                       | Desengreixada |                   |
|  |  |        |            |                       | Seca          |                   |
|  |  | Bullit | No digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca        | n.d. <sup>1</sup> |
|  |  |        |            |                       | Liofilitzada  | n.d. <sup>1</sup> |
|  |  |        |            |                       | Seca          | n.d. <sup>1</sup> |
|  |  |        |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.34±0.04         |
|  |  |        |            |                       | Liofilitzada  | 4.7±0.62          |
|  |  |        |            |                       | Seca          | 5.08±0.67         |
|  |  |        |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.              |
|  |  |        |            |                       | Liofilitzada  |                   |
|  |  |        |            |                       | Seca          |                   |
|  |  |        | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca        | 0.6±0.09          |
|  |  |        |            |                       | Liofilitzada  | 5.94±0.85         |
|  |  |        |            |                       | Seca          | 6.36±0.91         |
|  |  |        |            | Tanins hidrolitzables | Fresca        | 0.17±0.04         |
|  |  |        |            |                       | Liofilitzada  | 1.71±0.37         |
|  |  |        |            |                       | Seca          | 1.83±0.39         |
|  |  |        |            | Tanins condensats     | Fresca        | n.d.              |

|  |  |           |            |                       |              |           |
|--|--|-----------|------------|-----------------------|--------------|-----------|
|  |  |           |            | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.      |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada |           |
|  |  |           |            |                       | Seca         |           |
|  |  | Microones | No digerit | P.Baix pes molecular  | Fresca       | 0.03±0.01 |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 0.26±0.09 |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 0.28±0.1  |
|  |  |           |            | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.17±0.03 |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 1.35±0.24 |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 1.16±0.46 |
|  |  |           |            | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.      |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada |           |
|  |  |           |            |                       | Seca         |           |
|  |  |           | Digerit    | P.Baix pes molecular  | Fresca       | 0.8±0.03  |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 0.26±0.09 |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 7.02±0.27 |
|  |  |           |            | Tanins hidrolitzables | Fresca       | 0.21±0.03 |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada | 1.71±0.23 |
|  |  |           |            |                       | Seca         | 1.85±0.24 |
|  |  |           |            | Tanins condensats     | Fresca       | n.d.      |
|  |  |           |            |                       | Liofilitzada |           |

Taula 12: Contingut en polifenols del rossinyol.

| 3.3.1-Categoria       | Bolet    | Tractaments | Digerit/No digerit | Mètode | Mostra        | Resultats (μmol TE/g) |
|-----------------------|----------|-------------|--------------------|--------|---------------|-----------------------|
| CAPACITAT ANTIOXIDANT | Xampinyó | Cru         | No digerit         | FRAP   | Fresca        | 8.45±0.33             |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 51.7±3.07             |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 84.13±3.33            |
|                       |          |             |                    | ABTS   | Fresca        | 7.45±0.6              |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 68.39±5.55            |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 74.2±6.02             |
|                       |          |             |                    | ORAC   | Fresca        | 3.54±0.33             |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 32.47±3.06            |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 35.22±3.32            |
|                       |          |             | Digerit            | FRAP   | Fresca        | 4.43±0.44             |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 40.61±4               |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 44.06±4.34            |
|                       |          | Fregit      | No digerit         | FRAP   | Fresca        | 10.68±0.77            |
|                       |          |             |                    |        | Desengreixada | 14.34±1.03            |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 35.76±2.57            |
|                       |          |             |                    | ABTS   | Fresca        | 11.95±0.43            |
|                       |          |             |                    |        | Desengreixada | 16.04±0.57            |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 40.01±1.43            |
|                       |          |             |                    | ORAC   | Fresca        | 5.89±0.59             |
|                       |          |             |                    |        | Desengreixada | 7.91±0.8              |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 19.74±1.99            |
|                       |          |             | Digerit            | FRAP   | Fresca        | 8.92±0.56             |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 11.98±0.75            |
|                       |          |             |                    |        | Seca          | 29.87±1.87            |
|                       |          | Bullit      | No digerit         | FRAP   | Fresca        | 3.82±0.19             |
|                       |          |             |                    |        | Liofilitzada  | 31.38±2.35            |

|  |  |           |            |         |              |               |            |
|--|--|-----------|------------|---------|--------------|---------------|------------|
|  |  |           |            |         | Seca         | 49.86±2.49    |            |
|  |  |           |            | ABTS    | Fresca       | 10.74±0.84    |            |
|  |  |           |            |         | Liofilitzada | 132.34±10.29* |            |
|  |  |           |            |         | Seca         | 140.17±10.9*  |            |
|  |  |           |            | ORAC    | Fresca       | 5.05±0.54     |            |
|  |  |           |            |         | Liofilitzada | 62.26±6.68    |            |
|  |  |           |            |         | Seca         | 65.95±7.08    |            |
|  |  |           |            | Digerit | FRAP         | Fresca        | 3.37±0.03  |
|  |  |           |            |         |              | Liofilitzada  | 41.56±0.39 |
|  |  |           |            |         |              | Seca          | 44.03±0.41 |
|  |  | Microones | No digerit | FRAP    | Fresca       | 9.27±0.57     |            |
|  |  |           |            |         | Liofilitzada | 42.36±3.93    |            |
|  |  |           |            |         | Seca         | 69.69±4.31    |            |
|  |  |           |            | ABTS    | Fresca       | 7.25±0.25     |            |
|  |  |           |            |         | Liofilitzada | 49.67±1.69    |            |
|  |  |           |            |         | Seca         | 54.47±1.85    |            |
|  |  |           |            | ORAC    | Fresca       | 7.26±0.92     |            |
|  |  |           |            |         | Liofilitzada | 49.8±6.32     |            |
|  |  |           |            |         | Seca         | 54.61±6.93    |            |
|  |  |           |            | Digerit | FRAP         | Fresca        | 7.5±0.79   |
|  |  |           |            |         |              | Liofilitzada  | 51.44±5.43 |
|  |  |           |            |         |              | Seca          | 56.42±5.95 |

Taula 13: Capacitat antioxidant del xampinyó, mesurada a partir dels mètodes FRAP, ABTS i ORAC.

\*Els valors marcats en **color taronja** indiquen que son incoherents. Hi ha la possibilitat de que algún factor no controlable hagi provocat una interferència en el moment de calcular la capacitat antioxidant.

| 3.3.2-<br>Categoria   | Bolet    | Tractaments | Digerit/No<br>digerit | Mètode | Mostra        | Resultats<br>( $\mu\text{mol TE/g}$ ) |
|-----------------------|----------|-------------|-----------------------|--------|---------------|---------------------------------------|
| CAPACITAT ANTIOXIDANT | Shiitake | Cru         | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 4.5±0.3                               |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 26.31±3.92                            |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 57.86±4.31                            |
|                       |          |             |                       | ABTS   | Fresca        | 1.95±0.2                              |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 22.84±2.31                            |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 25.11±2.54                            |
|                       |          |             |                       | ORAC   | Fresca        | 3.82±0.33                             |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 44.61±3.86                            |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 49.05±4.24                            |
|                       |          |             | Digerit               | FRAP   | Fresca        | 2.65±0.12                             |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 33.64±4.76                            |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 34.03±1.53                            |
|                       |          | Fregit      | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 3.84±0.28                             |
|                       |          |             |                       |        | Desengreixada | 8.02±0.59                             |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 15.86±1.16                            |
|                       |          |             |                       | ABTS   | Fresca        | 2.53±0.36                             |
|                       |          |             |                       |        | Desengreixada | 5.27±0.74                             |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 10.42±1.47                            |
|                       |          |             |                       | ORAC   | Fresca        | 4.13±0.65                             |
|                       |          |             |                       |        | Desengreixada | 8.61±1.36                             |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 17.03±2.69                            |
|                       |          |             | Digerit               | FRAP   | Fresca        | 4.03±0.44                             |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 8.4±0.93                              |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 16.62±1.84                            |
|                       |          | Bullit      | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 1.83±0.09                             |
|                       |          |             |                       |        | Liofilitzada  | 25.64±1.23                            |
|                       |          |             |                       |        | Seca          | 27.71±1.33                            |

|  |  |           |            |      |              |             |
|--|--|-----------|------------|------|--------------|-------------|
|  |  |           |            | ABTS | Fresca       | 0.94±0.25   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 13.07±3.55  |
|  |  |           |            |      | Seca         | 14.13±3.83  |
|  |  |           |            | ORAC | Fresca       | 3.69±0.33   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 51.6±4.64   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 55.77±5.02  |
|  |  |           | Digerit    | FRAP | Fresca       | 1.53±0.25   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 21.39±3.48  |
|  |  |           |            |      | Seca         | 23.12±3.76  |
|  |  | Microones | No digerit | FRAP | Fresca       | 4.55±0.26   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 41.23±2.81  |
|  |  |           |            |      | Seca         | 54.77±3.11  |
|  |  |           |            | ABTS | Fresca       | 4.25±1.12   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 46.22±12.18 |
|  |  |           |            |      | Seca         | 51.17±13.49 |
|  |  |           |            | ORAC | Fresca       | 3.92±0.22   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 42.62±2.41  |
|  |  |           |            |      | Seca         | 47.19±2.67  |
|  |  |           | Digerit    | FRAP | Fresca       | 3.02±0.12   |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 32.82±1.34  |
|  |  |           |            |      | Seca         | 36.33±1.48  |

*Taula 14: Capacitat antioxidant del shiitake, mesurada a partir dels mètodes FRAP, ABTS i ORAC.*

| 3.3.3-<br>Categoria   | Bolet     | Tractaments | Digerit/No<br>digerit | Mètode | Mostra        | Resultats<br>( $\mu\text{mol TE/g}$ ) |
|-----------------------|-----------|-------------|-----------------------|--------|---------------|---------------------------------------|
| CAPACITAT ANTIOXIDANT | Rossinyol | Cru         | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 2.68±0.32                             |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 25.5±4.55                             |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 40.79±4.85                            |
|                       |           |             |                       | ABTS   | Fresca        | 1.05±0.14                             |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 14.97±1.98                            |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 15.96±2.11                            |
|                       |           |             |                       | ORAC   | Fresca        | 4.06±0.4                              |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 57.94±5.65                            |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 61.78±6.02                            |
|                       |           |             | Digerit               | FRAP   | Fresca        | 1.44±0.16                             |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 24.05±6.28                            |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 21.9±2.45                             |
|                       |           | Fregit      | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 3.59±0.46                             |
|                       |           |             |                       |        | Desengreixada | 3.69±0.47                             |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 17.58±2.24                            |
|                       |           |             |                       | ABTS   | Fresca        | 2.61±1.31                             |
|                       |           |             |                       |        | Desengreixada | 2.69±1.35                             |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 12.81±6.41                            |
|                       |           |             |                       | ORAC   | Fresca        | 6.86±0.47                             |
|                       |           |             |                       |        | Desengreixada | 7.06±0.49                             |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 33.63±2.32                            |
|                       |           |             | Digerit               | FRAP   | Fresca        | 5.34±0.52                             |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 5.49±0.53                             |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 26.19±2.52                            |
|                       |           | Bullit      | No digerit            | FRAP   | Fresca        | 1.8±0.26                              |
|                       |           |             |                       |        | Liofilitzada  | 17.82±2.62                            |
|                       |           |             |                       |        | Seca          | 19.09±2.81                            |



|  |  |           |            |      |              |              |
|--|--|-----------|------------|------|--------------|--------------|
|  |  |           |            | ABTS | Fresca       | 1.12±0.44    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 11.07±4.34   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 11.85±4.65   |
|  |  |           |            | ORAC | Fresca       | 4.68±0.86    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 46.4±8.55    |
|  |  |           |            |      | Seca         | 49.69±9.15   |
|  |  |           | Digerit    | FRAP | Fresca       | 2.11±0.12    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 20.86±1.21   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 22.35±1.29   |
|  |  | Microones | No digerit | FRAP | Fresca       | 4.21±0.19    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 28.43±1.54   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 36.98±1.67   |
|  |  |           |            | ABTS | Fresca       | 3.27±0.58    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 26.51±4.69   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 28.74±5.09   |
|  |  |           |            | ORAC | Fresca       | 5.6±0.88     |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 45.32±7.09   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 49.13 ± 7.69 |
|  |  |           | Digerit    | FRAP | Fresca       | 3.45±0.28    |
|  |  |           |            |      | Liofilitzada | 27.98±2.24   |
|  |  |           |            |      | Seca         | 30.33±2.43   |

*Taula 15: Capacitat antioxidant del rossinyol, mesurada a partir dels mètodes FRAP, ABTS i ORAC.*

Totes aquestes dades anteriors que s'han organitzat per factors es presenten a continuació amb una perspectiva més global:

| 3.4.1                         | Polifenols baix pes molecular |                   |                   | Tanins hidrolitzables |               |                | Tanins condensats |                   |                   |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|---------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Xampinyó                      | 0.64<br>±0.002                | 5.83<br>±0.02     | 6.32<br>±0.02     | 0.42<br>±0.28         | 3.84<br>±2.54 | 4.17<br>±2.76  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó fregit desengreixat  | 0.97<br>±0.53                 | 1.3<br>±0.71      | 3.24<br>±1.76     | 2.03<br>±0.72         | 2.72<br>±0.97 | 6.79<br>±2.41  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó bullit               | 0.12<br>±0.04                 | 1.54<br>±0.46     | 1.63<br>±0.48     | 0.62<br>±0.07         | 7.62<br>±0.83 | 8.07<br>±0.88  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó microones            | 0.26<br>±0.03                 | 1.75<br>±0.22     | 1.92<br>±0.24     | 0.43<br>±0.06         | 2.96<br>±0.43 | 3.24<br>±0.47  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake                      | 0.12<br>±0.03                 | 1.35<br>±0.3      | 1.49<br>±0.33     | 0.29<br>±0.09         | 3.41<br>±1.09 | 3.75<br>±1.2   | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake fregit desengreixat  | 0.39<br>±0.11                 | 0.82<br>±0.22     | 1.62<br>±0.44     | 3.01<br>±0.15         | 6.27<br>±0.31 | 12.41<br>±0.61 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake bullit               | 0.004<br>±0.001               | 0.06<br>±0.02     | 0.06<br>±0.02     | 0.28<br>±0.1          | 3.85<br>±1.36 | 4.17<br>±1.48  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake microones            | 0.01<br>±0.004                | 0.15<br>±0.04     | 0.17<br>±0.04     | 0.1<br>±0.04          | 1.05<br>±0.42 | 1.16<br>±0.46  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol                     | 0.1<br>±0.05                  | 1.39<br>±0.7      | 1.49<br>±0.75     | 0.08<br>±0.003        | 1.08<br>±0.04 | 1.15<br>±0.04  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol fregit desengreixat | 0.33<br>±0.03                 | 0.34<br>±0.03     | 1.61<br>±0.13     | 3.57<br>±1.79         | 3.67<br>±1.85 | 12.56<br>±3.08 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol bullit              | n.d. <sup>1</sup>             | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | 0.34<br>±0.04         | 4.7<br>±0.62  | 5.08<br>±0.67  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol microones           | 0.03<br>±0.01                 | 0.26<br>±0.09     | 0.28<br>±0.1      | 0.17<br>±0.03         | 1.35<br>±0.24 | 1.47<br>±0.26  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |

Taula 16: Contingut en polifenols. Els resultats es mostren com mg de polifenols per gram de mostra FRESCA/LIOFILITZADA (**DESENGREIXADA** Fregit)/SEC. En cada quadre hi ha dos valors: el superior expressa els µmols de trolox i l'inferior la desviació estàndard de cada mostra.

| 3.4.2                         | FRAP           |                |                | ABTS           |                  |                 | ORAC          |                |                |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|
| Xampinyó                      | 8.45<br>±0.33  | 51.7<br>±3.07  | 84.13<br>±3.33 | 7.45<br>±0.6   | 68.39<br>±5.55   | 74.2<br>±6.02   | 3.54<br>±0.33 | 32.47<br>±3.06 | 35.22<br>±3.32 |
| Xampinyó fregit desengreixat  | 10.68<br>±0.77 | 14.34<br>±1.03 | 35.76<br>±2.57 | 11.95<br>±0.43 | 16.04<br>±0.57   | 40.01<br>±1.43  | 5.89<br>±0.59 | 7.91<br>±0.8   | 19.74<br>±1.99 |
| Xampinyó bullit               | 3.82<br>±0.19  | 31.38<br>±2.35 | 49.86<br>±2.49 | 10.74<br>±0.84 | 132.34<br>±10.29 | 140.17<br>±10.9 | 5.05<br>±0.54 | 62.26<br>±6.68 | 65.95<br>±7.08 |
| Xampinyó microones            | 9.27<br>±0.57  | 42.36<br>±3.93 | 69.69<br>±4.31 | 7.25<br>±0.25  | 49.67<br>±1.69   | 54.47<br>±1.85  | 7.26<br>±0.92 | 49.8<br>±6.32  | 54.61<br>±6.93 |
| Shiitake                      | 4.5<br>±0.3    | 26.31<br>±3.92 | 57.86<br>±4.31 | 1.95<br>±0.2   | 22.84<br>±2.31   | 25.11<br>±2.54  | 3.82<br>±0.33 | 44.61<br>±3.86 | 49.05<br>±4.24 |
| Shiitake fregit desengreixat  | 3.84<br>±0.28  | 8.02<br>±0.59  | 15.86<br>±1.16 | 2.53<br>±0.36  | 5.27<br>±0.74    | 10.42<br>±1.47  | 4.13<br>±0.65 | 8.61<br>±1.36  | 17.03<br>±2.69 |
| Shiitake bullit               | 1.83<br>±0.09  | 25.64<br>±1.23 | 27.71<br>±1.33 | 0.94<br>±0.25  | 13.07<br>±3.55   | 14.13<br>±3.83  | 3.69<br>±0.33 | 51.6<br>±4.64  | 55.77<br>±5.02 |
| Shiitake microones            | 4.55<br>±0.26  | 41.23<br>±2.81 | 54.77<br>±3.11 | 4.25<br>±1.12  | 46.22<br>±12.18  | 51.17<br>±13.49 | 3.92<br>±0.22 | 42.62<br>±2.41 | 47.19<br>±2.67 |
| Rossinyol                     | 2.68<br>±0.32  | 25.5<br>±4.55  | 40.79<br>±4.85 | 1.05<br>±0.14  | 14.97<br>±1.98   | 15.96<br>±2.11  | 4.06<br>±0.4  | 57.94<br>±5.65 | 61.78<br>±6.02 |
| Rossinyol fregit desengreixat | 3.59<br>±0.46  | 3.69<br>±0.47  | 17.58<br>±2.24 | 2.61<br>±1.31  | 2.69<br>±1.35    | 12.81<br>±6.41  | 6.86<br>±0.47 | 7.06<br>±0.49  | 33.63<br>±2.32 |
| Rossinyol bullit              | 1.8<br>±0.26   | 17.82<br>±2.62 | 19.09<br>±2.81 | 1.12<br>±0.44  | 11.07<br>±4.34   | 11.85<br>±4.65  | 4.68<br>±0.86 | 46.4<br>±8.55  | 49.69<br>±9.15 |
| Rossinyol microones           | 4.21<br>±0.19  | 28.43<br>±1.54 | 36.98<br>±1.67 | 3.27<br>±0.58  | 26.51<br>±4.69   | 28.74<br>±5.09  | 5.6<br>±0.88  | 45.32<br>±7.09 | 49.13<br>7.69  |

Taula 17: Capacitat antioxidant mesurada a partir dels mètodes de FRAP, ABTS i ORAC. Els resultats s'expressen en micromols equivalents de Trolox per gram de mostra FRESCA/LIOFILITZADA (DESENGREIXADA Fregit)/SEC. En cada quadre hi ha dos valors: el superior expressa els μmols de trolox i l'inferior la desviació estàndard de cada mostra.

| 3.4.3                         | Polifenols    |                |                | FRAP          |                |                |
|-------------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| Xampinyó                      | 1.24<br>±0.33 | 11.4<br>±3.04  | 12.37<br>±3.3  | 4.43<br>±0.44 | 40.61<br>±4    | 44.06<br>±4.34 |
| Xampinyó fregit desengreixat  | 9.05<br>±2.12 | 12.16<br>±2.85 | 30.31<br>±7.12 | 8.92<br>±0.56 | 11.98<br>±0.75 | 29.87<br>±1.87 |
| Xampinyó bullit               | 1.14<br>±0.09 | 14.05<br>±1.08 | 14.89<br>±1.14 | 3.37<br>±0.03 | 41.56<br>±0.39 | 44.03<br>±0.41 |
| Xampinyó microones            | 2.06<br>±0.04 | 14.11<br>±0.28 | 15.47<br>±0.31 | 7.5<br>±0.79  | 51.44<br>±5.43 | 56.42<br>±5.95 |
| Shiitake                      | 0.78<br>±0.09 | 9.15<br>±1.11  | 10.06<br>±1.22 | 2.65<br>±0.12 | 33.64<br>±4.76 | 34.03<br>±1.53 |
| Shiitake fregit desengreixat  | 3.19<br>±0.21 | 6.65<br>±0.45  | 13.15<br>±0.89 | 4.03<br>±0.44 | 8.4<br>±0.93   | 16.62<br>±1.84 |
| Shiitake bullit               | 0.52<br>±0.08 | 7.25<br>±1.17  | 7.83<br>±1.27  | 1.53<br>±0.25 | 21.39<br>±3.48 | 23.12<br>±3.76 |
| Shiitake microones            | 0.79<br>±0.05 | 0.15<br>±0.04  | 9.57<br>±0.66  | 3.02<br>±0.12 | 32.82<br>±1.34 | 36.33<br>±1.48 |
| Rossinyol                     | 0.56<br>±0.08 | 7.93<br>±1.21  | 8.46<br>±1.29  | 1.44<br>±0.16 | 24.05<br>±6.28 | 21.9<br>±2.45  |
| Rossinyol fregit desengreixat | 5.6<br>±0.11  | 5.75<br>±0.12  | 27.43<br>±0.56 | 5.34<br>±0.52 | 5.49<br>±0.53  | 26.19<br>±2.52 |
| Rossinyol bullit              | 0.6<br>±0.09  | 5.94<br>±0.85  | 6.36<br>±0.91  | 2.11<br>±0.12 | 20.86<br>±1.21 | 22.35<br>±1.29 |
| Rossinyol microones           | 0.8<br>±0.03  | 0.26<br>±0.09  | 7.02<br>±0.27  | 3.45<br>±0.28 | 27.98<br>±2.24 | 30.33<br>±2.43 |

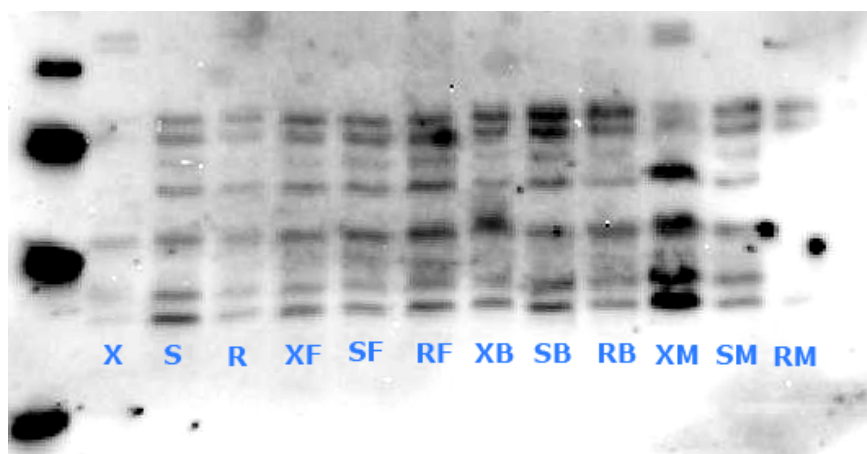
Taula 18: Polifenols (mg/g) i capacitat antioxidant bioaccessible (micromols ET/g). Contingut en polifenols en el sobrenadant després de la digestió in vitro. Mostra FRESCA/LIOFILITZADA (DESENGREIXADA Fregit)/SEC. En cada quadre hi ha dos valors: el superior expressa els µmols de trolox i l'inferior la desviació estàndard de cada mostra

| 3.4.4                         | Tanins hidrolitzats |               |               | Tanins condensats |                   |                   |
|-------------------------------|---------------------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Xampinyó                      | 0.28<br>±0.04       | 2.53<br>±0.41 | 2.75<br>±0.45 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó fregit desengreixat  | 0.09<br>±0.02       | 0.12<br>±0.02 | 0.3<br>±0.06  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó bullit               | 0.2<br>±0.02        | 2.5<br>±0.26  | 2.65<br>±0.28 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Xampinyó microones            | 0.25<br>±0.04       | 1.7<br>±0.24  | 1.87<br>±0.27 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake                      | 0.08<br>±0.02       | 0.93<br>±0.18 | 1.03<br>±0.2  | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake fregit desengreixat  | 0.06<br>±0.04       | 0.13<br>±0.09 | 0.26<br>±0.18 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake bullit               | 0.09<br>±0.01       | 1.22<br>±0.16 | 1.32<br>±0.18 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Shiitake microones            | 0.19<br>±0.09       | 2.07<br>±0.97 | 2.29<br>±1.07 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol                     | 0.12<br>±0.03       | 1.67<br>±0.46 | 1.78<br>±0.49 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol fregit desengreixat | 1.72<br>±0.41       | 1.77<br>±0.43 | 8.43<br>±2.03 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol bullit              | 0.17<br>±0.04       | 1.71<br>±0.37 | 1.83<br>±0.39 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |
| Rossinyol microones           | 0.21<br>±0.03       | 1.71<br>±0.23 | 1.85<br>±0.24 | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> | n.d. <sup>1</sup> |

Taula 19: Contingut en tanins hidrolitzats i tanins condensats del residu de la digestió in vitro. Mostra FRESCA/LIOFILITZADA (DESENGREIXADA Fregit)/SECA. En cada quadre hi ha dos valors: el superior expressa els µmols de trolox i l'inferior la desviació estàndard de cada mostra.

| 3.5- MDA-LYS        | Valor del western blot | Proporció    |
|---------------------|------------------------|--------------|
| Xampinyó cru        | 1,59                   | 100          |
| Shiitake cru        | 9,59                   | 100          |
| Rossinyol cru       | 4,19                   | 100          |
| Xampinyó fregit     | 9,21                   | 579,245283   |
| Shiitake fregit     | 9,18                   | 95,72471324  |
| Rossinyol fregit    | 13,98                  | 333,6515513  |
| Xampinyó bullit     | 11,57                  | 727,672956   |
| Shiitake bullit     | 14,2                   | 148,0709072  |
| Rossinyol bullit    | 9,06                   | 216,2291169  |
| Xampinyó microones  | 20,69                  | 1301,257862  |
| Shiitake microones  | 4,53                   | 47,2367049   |
| Rossinyol microones | -7,78                  | -185,6801909 |

*Taula 20: Valors del western-blot i la proporció que representen respecte a les mostres crues. Els valors que es mostren en **taronja** s'han descartat per donar uns resultats incongruents.*



*Figura 22: Resultat del western-blot (analitzat amb el software Labimage 1D).*

## **4.-DISCUSSIÓ DELS RESULTATS:**

En aquest apartat es comenten les dades més significatives i es contrasten amb resultats ja publicats per altres grups de recerca que treballen en el mateix camp dels antioxidants. Per organitzar aquesta discussió, es distribuirà l'anàlisi dels resultats per les taules que els contenen.

### **4.1-Taula 9 i 10: Polifenols del Xampinyó**

#### **1. Anàlisi i comparació dels resultats:**

En els resultats obtinguts com a fruit d'aquesta recerca, es confirma que els bolets analitzats (xampinyó, shiitake i rossinyol) contenen polifenols. No obstant, no s'ha d'interpretar com que són aliments amb altes propietats antioxidants. En relació amb altres aliments que realment es caracteritzen per tenir un alt grau antioxidant, els bolets tenen una proporció de polifenols més aviat baixa. Per posar un exemple, el xampinyó cru, no digerit i fresc (sense cap tipus de tractament) té una quantitat de polifenols<sup>130</sup> de 1,06 mg GAE/g. En canvi les nous, que són altament antioxidants, en tenen 15,9 mg GAE/g<sup>131</sup>. Vegeu aquesta comparació en la *Figura 23*.

---

<sup>130</sup> Es fa referència als polifenols totals, resultat de la suma dels polifenols de baix pes molecular i dels tanins condensats.

<sup>131</sup> Vegeu-ho en la *Taula 1* de l'apartat 2.5.1.

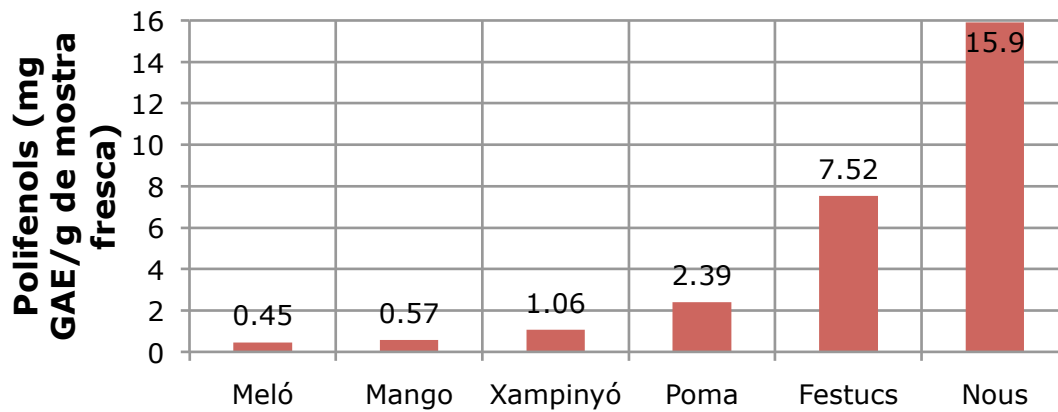


Figura 23: Situació del xampinyó pel contingut de polifenols en relació amb altres aliments.

No obstant, en altres estudis s'ha demostrat que hi ha bolets com els xampinyons de portabello o els xampinyons *crimini* (*Agaricus bisporus*), de la mateixa família que el xampinyó comú, que tenen fins i tot més propietats antioxidants que moltes fruites i verdures<sup>132</sup>.

Un altre aspecte que cal comentar és que no s'han detectat tanins condensats en cap dels tres bolets, ni en les mostres tractades ni en les no tractades. Per tant, en l'anàlisi de les dades es posarà especial atenció en els polifenols de baix pes molecular, els tanins hidrolitzables i al total de polifenols (PTF), que és el resultat de la suma dels altres dos.

## 2. Anàlisi del tractament:

La hipòtesi 2 d'aquesta recerca afirma que el tractament que reben els aliments pot afectar la quantitat de compostos antioxidants (i per tant, la seva capacitat antioxidant). Aquest fet es pot veure reflectit en la Taula 10, si tenim en compte únicament els xampinyons no digerits. És fàcilment apreciable, que la quantitat de polifenols de baix pes molecular en els xampinyons crus (0,64 mg GAE/g en la

<sup>132</sup> Dubost, Ou & Beelman, 2009



mostra fresca) és significativament superior als valors de la mateixa mostra en xampinyons bullits (0,12 mg GAE/g) i en els cuits al microones (0,26 mg GAE/g). No es pot dir el mateix, però, dels xampinyons fregits, ja que els valors de la mostra fresca (0,97 mg GAE/g) augmenten lleugerament amb el processat. Tot i això, les mostres fregides que han estat desengreixades i assecades segueixen la tendència dels altres xampinyons tractats, tot disminuint el seu valor amb el processament. El fet que la mostra fresca fregida augmenti respecte a la mateixa mostra no processada es pot atribuir a l'oli d'oliva. És indiscutible que aquest últim té una alta capacitat antioxidant com a conseqüència, entre d'altres, pel seu alt contingut en polifenols<sup>133</sup>. Aquest factor podria estar constituint una variant pertorbadora en l'assaig, ja que en la mostra fresca fregida hi ha restes de l'oli amb el qual es va processar l'aliment. Les mostres desengreixades i seques, en canvi, podria ser que continguessin traces d'oli en el moment de l'assaig però, si n'hi havia, van resultar insignificants.

No obstant, la tendència s'inverteix una vegada s'analitzen els tanins hidrolitzables. La presència d'aquests compostos en els xampinyons no processats sembla ser més escassa (4,17 mg GAE/g en mostra seca) que la mateixa mostra dels xampinyons que s'han fregit o bullit (6,79 mg GAE/g) i (8,07 mg GAE/g). Per tant, es pot pensar que aplicant temperatura als xampinyons, s'alliberen més tanins hidrolitzables. Alguns estudis<sup>134</sup> han demostrat que la temperatura a la qual es cou un aliment i el temps que passa en aquesta temperatura poden influir en els polifenols que s'hi troben presents. L'augment dels tanins hidrolitzables es produiria pel trencament de la paret cel·lular en les cèl·lules eucariotes del fong, de manera que els polifenols es poden alliberar amb més facilitat. Tot plegat podria ser

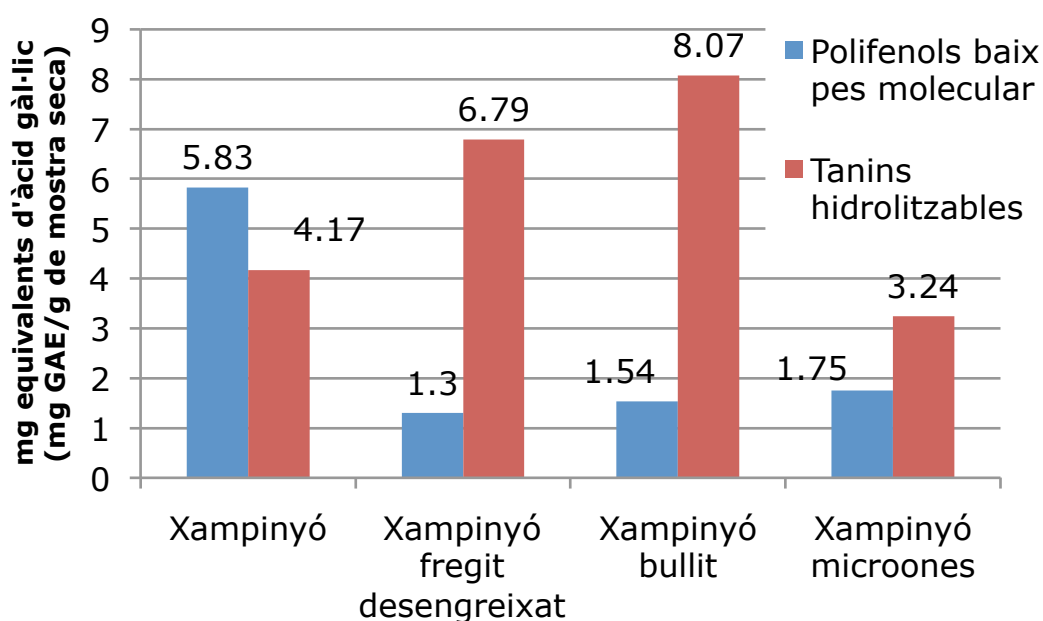
---

<sup>133</sup> Soler Cantero, 2009

<sup>134</sup> Choi, Lee, et al., 2005

conseqüència de les altes temperatures aplicades en la cocció. D'altra banda, alguns dels polifenols de baixa densitat podrien degradar-se, la qual cosa explicaria la disminució dels mg de polifenols amb la cocció.

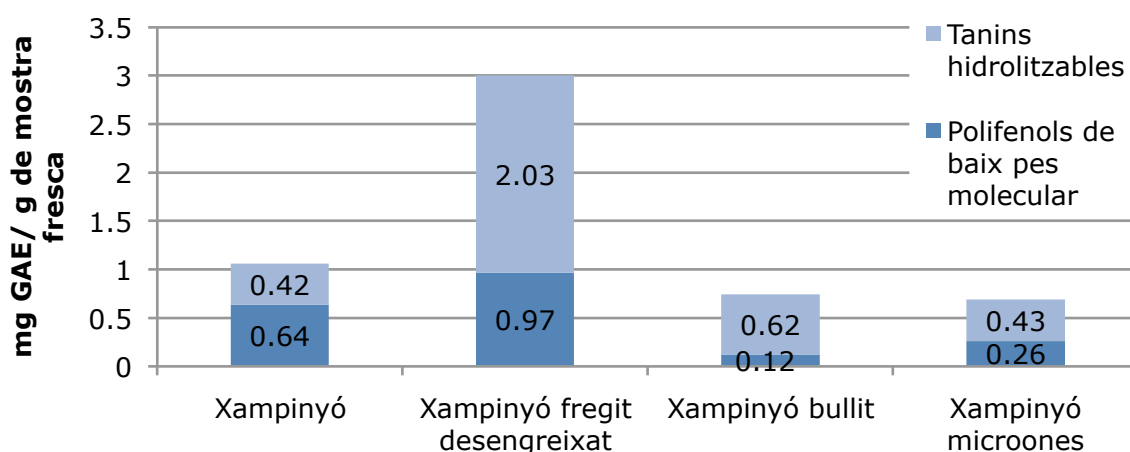
Per a aquests autors s'estableix una relació directa entre l'alliberament dels polifenols amb la interacció dels factors temperatura i temps de cocció. Això explicaria els alts valors dels tanins hidrolitzables que he obtingut en el meu estudi en tractar el xampinyó fregit i el bullit (6,79 mg GAE/g i 8,07 mg GAE/g en mostra seca respectivament), ja que han estat cuits a altes temperatures (100°C i uns 130°C). En canvi, els que es van coure al microones no sobrepassen el valor dels tanins hidrolitzables crus, sinó que més o menys es mantenen. Vegeu-ho en la *Figura 24*.



*Figura 24: Quantitat de polifenols i tanins obtinguts amb els diferents tractaments en mostra seca.*

Els xampinyons crus tenen 0,42 mg GAE de tanins hidrolitzables per gram de mostra fresca i els cuits al microones en tenen 0,43 mg GAE/g. Això podria estar causat pel fet que els xampinyons fregits i bullits van estar cuits a altes temperatures durant 5 minuts i des del primer moment. El pas de la temperatura ambient a la temperatura de cocció va ser immediata, ja que es van posar a coure quan l'aigua ja bullia i l'oli es trobava a alta temperatura. No obstant, els bolets cuits al microones van estar una estona fins que l'aigua que contenen va començar a bullir, i aquests van arribar a 100°C. Amb aquesta suposició, es confirmaria el que diuen els autors Choi, Lee i altres<sup>135</sup>, que a més temps de cocció més s'alliberen alguns polifenols, però també se'n perden altres en menys proporció, com més altes són les temperatures.

En la mostra crua el balanç total situa el xampinyó fregit molt per damunt de la resta de xampinyons tractats, deixant al xampinyó cru en segon lloc (la mostra fresca fregida no ha estat desengreixada i pot rebre la influència de l'oli d'oliva). En canvi, el balanç total de polifenols de les mostres liofilitzades/desengreixades i seques situen la mostra crua per damunt de la resta i, aquest cop, és el xampinyó fregit el que té menys valor de polifenols. Vegeu-ho en la Figura 25.



<sup>135</sup> Choi, Lee, et al., 2005

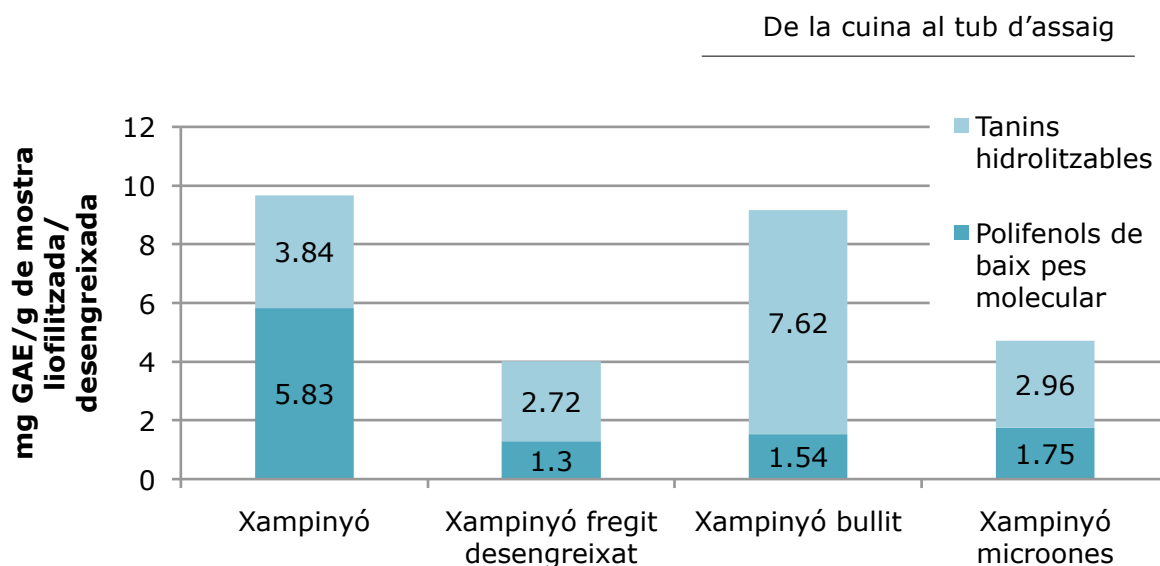


Figura 25: Balanç de polifenols totals (suma de polifenols de baix pes molecular i tanins hidrolitzables) en mostres fresques (gràfica superior) i en liofilitzades/desengreixades (gràfica inferior).

### 3. Anàlisi de la digestió:

En la *Figura 8* es poden apreciar variacions rellevants en els valors de la quantitat de polifenols i de tanins hidrolitzables en les diferents mostres un cop es van digerir. Per començar, els polifenols de baix pes molecular dupliquen el seu valor en totes les mostres dels xampinyons crus sense digerir respecte dels que han estat digerits. Vegeu-ho en la *Figura 26*.

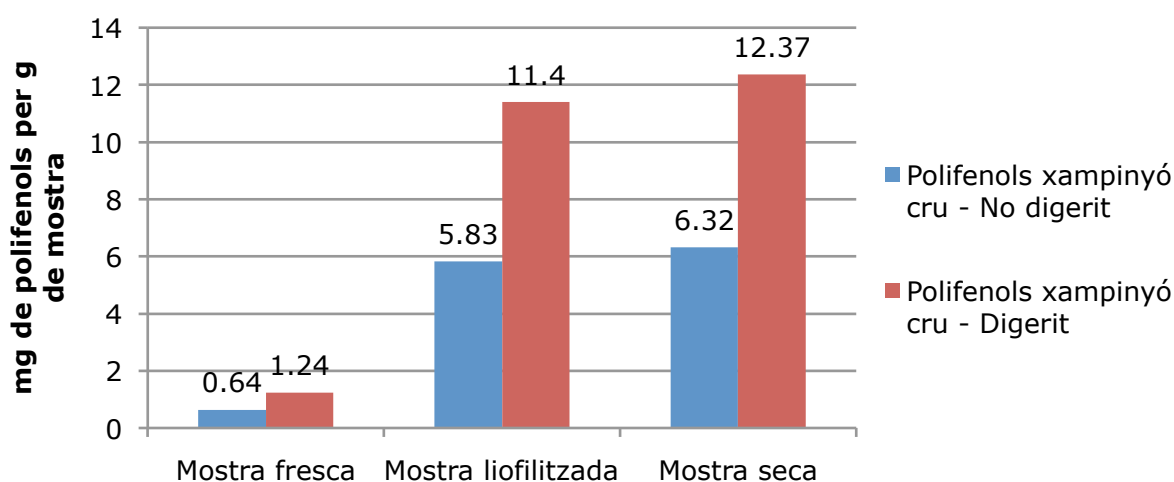


Figura 26: Comparació dels polifenols en les mostres digerides respecte de les no digerides.

En els bolets tractats, aquesta diferència encara s'accentua més. El fort augment es podria deure a un fenomen semblant al que experimentaven els tanins hidrolitzables amb el tractament: Hi ha una sèrie de polifenols de baix pes molecular no-extractables que no es poden avaluar en l'assaig *Folin-ciocalteu* ja que no es troben disponibles. En canvi, el que es podria produir és que en algun dels processos de la digestió *in vitro* aquests polifenols abans no detectables fossin alliberats i es tornessin accessibles. Aquesta possibilitat es confirmaria si s'observés un augment de la capacitat antioxidant en les mostres digerides (un alliberament de polifenols produït per la digestió significaria, a la vegada, un augment de la capacitat antioxidant<sup>136</sup>). Com que aquest fet no es dona i la capacitat antioxidant no augmenta en les mostres digerides respecte les que no ho són, s'ha de descartar la possibilitat. Una altra hipòtesi que explicaria la pujada del valor dels polifenols de baix pes molecular en les mostres digerides seria que es produís una interferència en la metodologia entre el reactiu *Folin* que s'utilitza i alguns aminoàcids presents en el sobrenadant de la digestió. S'han observat altres interferències produïdes per glúcids o proteïnes presents en l'aliment analitzat, en la realització de l'assaig amb el reactiu *Folin*<sup>137</sup>.

En referència als tanins hidrolitzables, els valors disminueixen en tots els tractaments, tot marcant una tendència que indica que durant el procés de la digestió, podrien haver estat degradats en algun dels processos. Com a conseqüència d'aquest descens del valor dels tanins, la bioaccessibilitat<sup>138</sup> d'aquests és molt baixa o pràcticament

---

<sup>136</sup> Es pot comprovar que aquest fenomen no es produeix en la *Figura 44* de l'apartat 4.5.3

<sup>137</sup> Rodríguez Luna, 2009

<sup>138</sup> Quan es fa referència a la bioaccessibilitat, es parla majoritàriament dels tanins o polifenols d'una mostra fresca, ja que és la que consumeixen les persones habitualment.

nul·la i, per tant, és improbable que s'arribin a absorbir algun d'aquests compostos, un cop ingerit l'aliment.

En termes generals, es pot afirmar que una vegada es digereixen els bolets, la quantitat de polifenols augmenta considerablement. En el cas que aquest fet estigués produït per la interferència d'un aminoàcid en l'assaig, seria probable que el contingut total de polifenols disminuís o es mantingués amb la digestió. El xampinyó fregit és el que assoleix més polifenols, sigui per un augment real per alliberament de fenols o per l'efecte de l'oli que té associada la mostra fresca. El balanç total de la digestió en les mostres fresques es pot veure reflectit en la Figura 27.

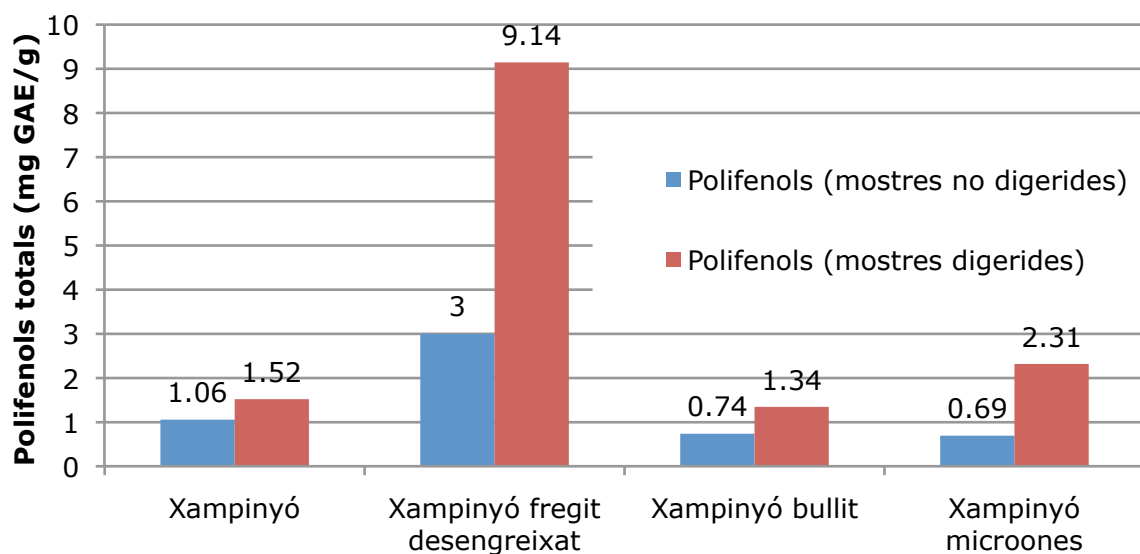


Figura 27: Comparació entre les quantitats de polifenols de les motres fresques no digerides i de les digerides.

#### 4.2-Taula 9, 11 i 12: Polifenols del shiitake i del rossinyol:

##### 1. Anàlisi i comparació de resultats:

En les Taules 11 i 12 es pot apreciar com el shiitake i el rossinyol tenen una quantitat de polifenols inferior a la del xampinyó. Vegeu-ho en la Figura 28.

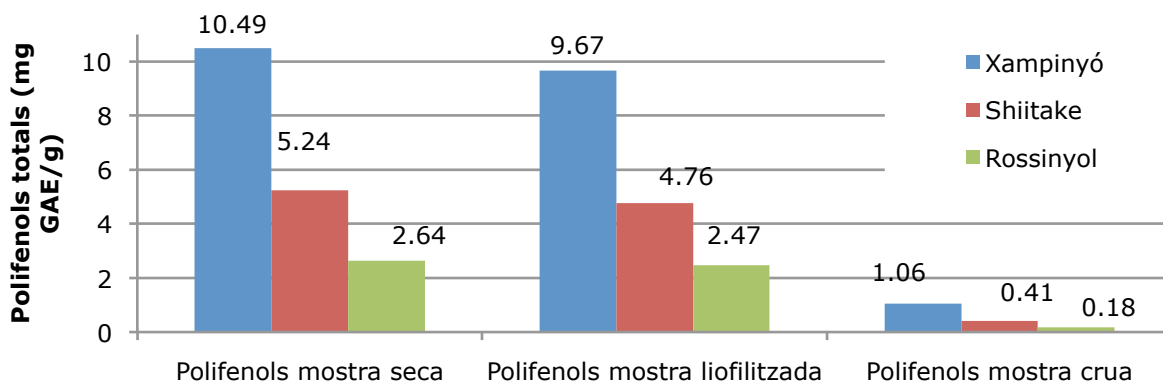


Figura 28: Comparació entre els valors totals de polifenols de les diferents mostres dels tres bolets.

| Bolet     | Tractament | Digerit /no digerit | Tipus de polifenols              | Mostra | Polifenols (mg GAE/g) |
|-----------|------------|---------------------|----------------------------------|--------|-----------------------|
| Xampinyó  | Cru        | No digerit          | Polifenols de baix pes molecular | Seca   | 6.32±0.02             |
| Shiitake  |            |                     |                                  |        | 1.49±0.33             |
| Rossinyol |            |                     |                                  |        | 1.49±0.75             |

Taula 21: Comparació entre els valors de polifenols en les diferents mostres seques dels tres bolets.

Per altra banda, tal com es pot observar en la Taula 21, la mostra seca del xampinyó cru, no digerit, conté aproximadament 6,32 mg GAE/g de polifenols, mentre que la mateixa mostra del shiitake i el rossinyol només en contenen 1,49 mg GAE/g. Aquest mateix resultat

s'observa en l'estudi de Joy Dubost<sup>139</sup>, en el qual es fa l'anàlisi de polifenols de diferents bolets, com els del shiitake i el xampinyó. Els resultats obtinguts en l'article de Dubost difereixen poc dels que s'han aconseguit en la present recerca. Aquestes diferències poc significatives entre els dos estudis es podrien explicar per variables no controlades de la metodologia que s'ha utilitzat en els dos casos, com per exemple el lloc de procedència de les mostres.

A més, en l'anàlisi que han fet aquests investigadors es fa evident que els resultats apunten cap a la mateixa tendència que els que s'han obtingut en la meua recerca. En l'estudi citat, es va trobar que el xampinyó<sup>140</sup> contenia  $8.00 \pm 0.48$  mg GAE/g de polifenols davant dels  $4.32 \pm 0.27$  mg GAE/g del shiitake. Les tendències es comparen en la Figura 29.

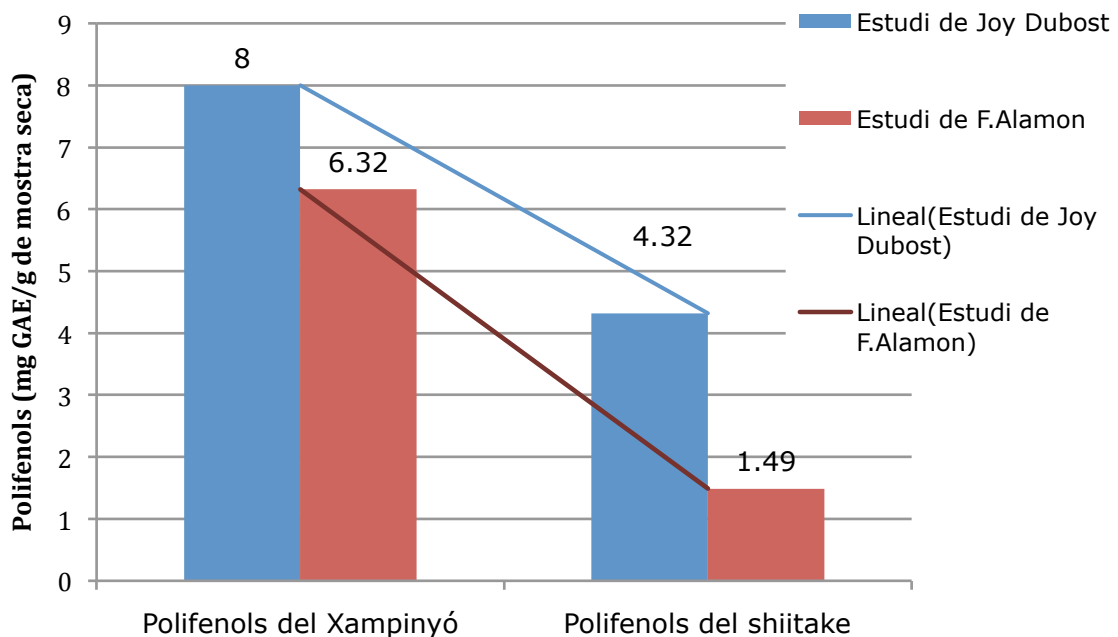


Figura 29: Tendència comparativa entre els polifenols del xampinyó i el shiitake del present estudi i de l'estudi de Joy Dubost<sup>139</sup>.

<sup>139</sup> Dubost, Ou & Beelman, 2009

<sup>140</sup> En l'estudi es fa referència a aquest bolet com a *white button*.



## 2. Anàlisi del Tractament:

En el shiitake i en el rossinyol, així com en el xampinyó, també s'observen diferències rellevants entre els diferents mètodes de cocció que han rebut els bolets. Es podria dir, que el comportament dels polifenols dels dos bolets comparats amb els del xampinyó actuen d'una forma força similar. Si bé el shiitake i el rossinyol tenen menys polifenols que el xampinyó, el valor d'aquests primers també augmenta lleugerament quan els hi afegim oli d'oliva i els fregim. Els valors passen de 0,12 mg GAE/g a 0,39 mg GAE/g en la mostra fresca del shiitake i de 0,1 mg GAE/g a 0,33 mg GAE/g en la mateixa del rossinyol. Com s'ha dit abans, es podria atribuir aquest augment a la gran concentració de polifenols que conté l'oli d'oliva, ja que en els altres mètodes de cocció, els polifenols tendeixen a degradar-se o a perdre's. El shiitake bullit disminueix especialment la quantitat de polifenols respecte del cru, passant de 0,12 mg GAE/g en el cru a 0,004 en el bullit. Aquesta disminució encara s'observa més clarament en el rossinyol bullit, que passa de 0,1 mg GAE/g, en la mostra crua, a tenir un valor negligible en totes les mostres (expressat com a "no detectable"). El shiitake i el rossinyol cuits al microones també actuen de forma similar als bullits. En el cas del shiitake cuit al microones el seu valor disminueix des de 1,35 mg GAE/g en mostra crua liofilitzada fins a 0,15 mg GAE de polifenols per gram. El rossinyol en canvi, si bé en els bullits passava a ser negligible en totes les mostres, en les que es van coure al microones adopta uns valors molt baixos, però com a mínim detectables. L'augment dels polifenols en el rossinyol i el shiitake fregits i la disminució dels seus valors en els altres dos tractaments és equiparable al comportament dels polifenols del xampinyó. Aquest fet es demostra en la gràfica (Figura 30), en la qual es pot apreciar que el dibuix format per les columnes es repeteix tant en el xampinyó com en el shiitake i el rossinyol.

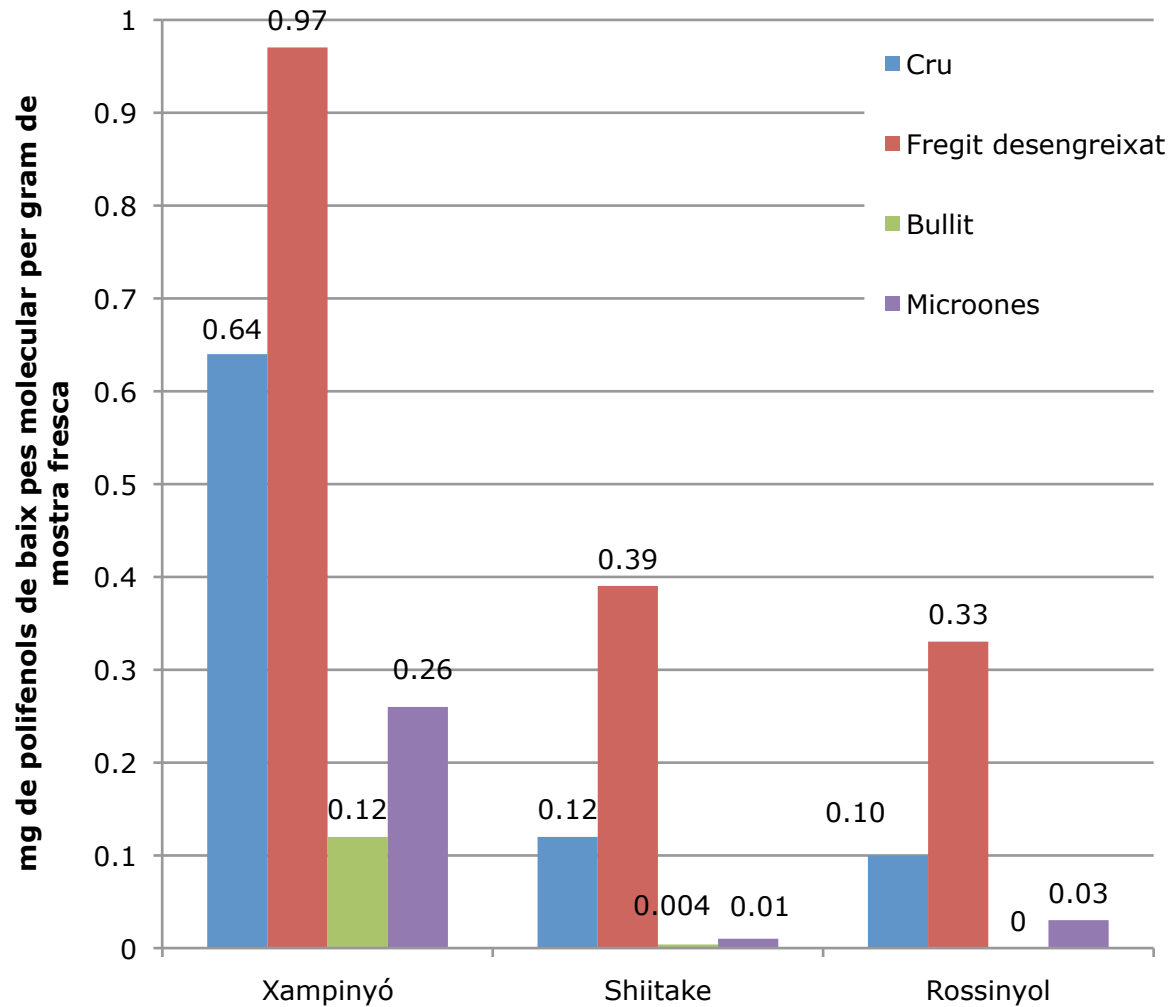


Figura 30: Comparació entre la quantitat de polifenols i el seu comportament en el xampinyó, el shiitake i el rossinyol quan reben diferents tractaments culinaris.

També s'observa que es repeteix el fenomen dels tanins hidrolitzables del xampinyó en el shiitake i el rossinyol. El valor d'aquests compostos augmenten dràsticament amb la cocció i arriben al seu màxim exponent en els fregits. Aquest comportament s'explicaria pel fet que, en aquest darrer tractament, no solament s'hi troba la quantitat de polifenols que s'alliberen en augmentar la

temperatura de la mostra<sup>141</sup>, sinó que a més, es podrien veure reflectits els tanins presents en l'oli i els que s'alliberarien adicionalment en aquesta substància en aplicar temperatura.

### 3. Anàlisi de la digestió:

En la digestió del shiitake i el rossinyol també s'observa que la tendència és semblant a la del xampinyó. No obstant, com que hi ha menys polifenols i tanins en el shiitake i en el rossinyol, l'augment de polifenols i la disminució de tanins hidrolitzables es torna més evident en aquests dos bolets. Si en el xampinyó, els polifenols de la mostra crua i seca digerida (12,37 mg GAE/g) duplicaven el valor de la no digerida (6,32 mg GAE/g), en el rossinyol augmenta unes 5 vegades aproximadament (des de 1,49 fins a 8,46mg GAE/g) i en el shiitake és on es fa més evident l'augment de tanins, ja que el seu valor és sis vegades major respecte del valor inicial (des de 1,49 mg GAE/g fins a 10,06 mg GAE/g). En els tanins hidrolitzables, també s'observa una forta disminució que, com s'ha comentat anteriorment, podria ser conseqüència d'algun dels processos químics aplicats en la digestió *in vitro*. Com a conseqüència, els tanins de les mostres fresques que es consumeixen habitualment gairebé no són bioaccessibles i, per tant, no es troben en l'intestí quan s'ingereix l'aliment. A causa d'aquest fet, és impossible que siguin biodisponibles i que s'absorbeixin.

### 4. Balanç

En termes generals, els totals de polifenols del shiitake i el rossinyol es mantenen en la mateixa tendència que el xampinyó. S'ha

---

<sup>141</sup> Choi, Lee, et al., 2005

d'exceptuar però, el gran augment de polifenols en les mostres fregides perquè destaquen molt més que el xampinyó. Aquest fet podria estar causat perquè la proporció de polifenols en els dos últims bolets és més baixa, i per tant, la influència de l'oli es fa més evident. Vegeu-ho en la Figura 31.

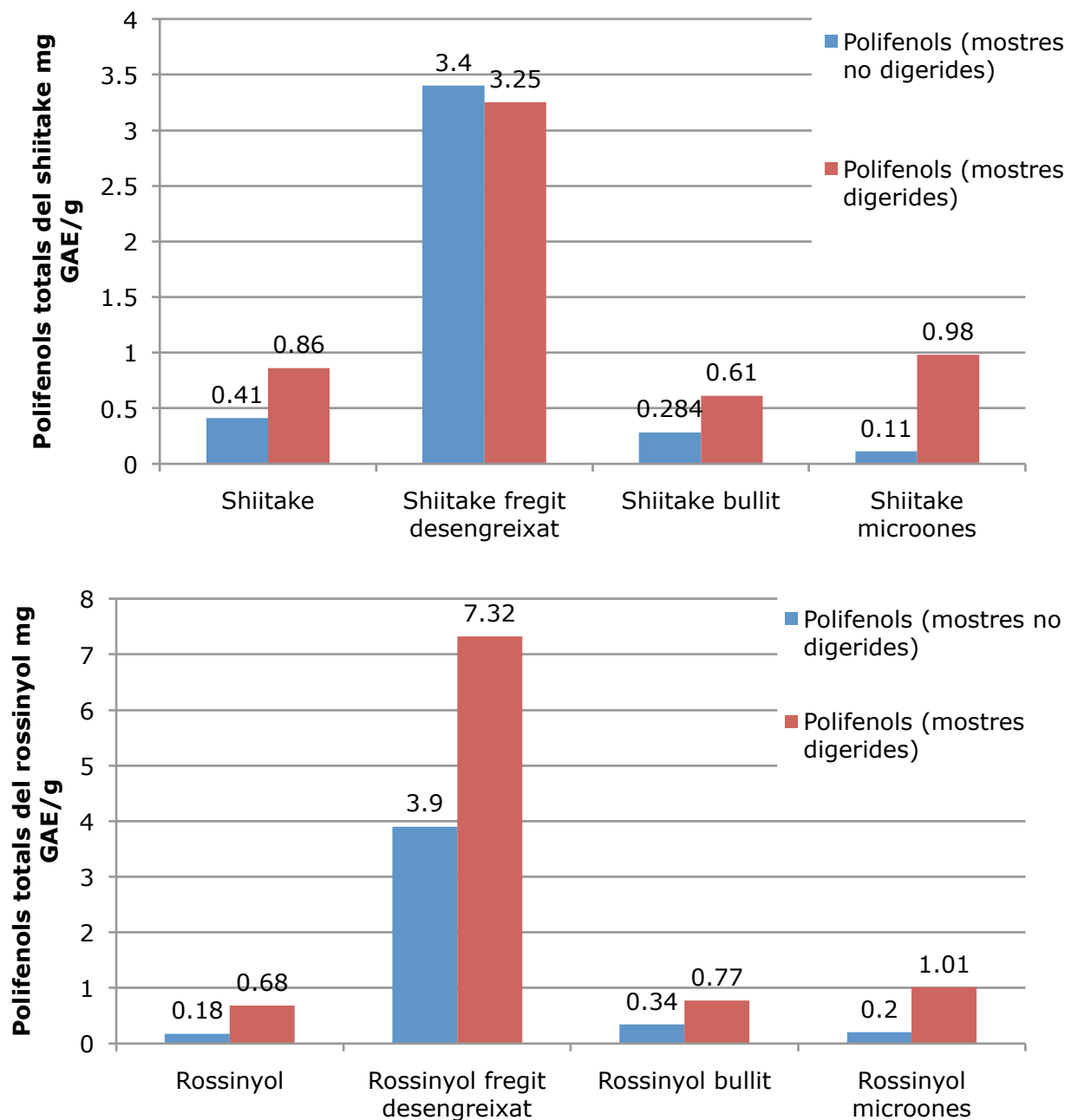


Figura 31: Comparació de la quantitat total de polifenols en les mostres crues del shiitake i del rossinyol digerits i no digerits.

En aquests gràfics, també es pot observar que l'augment més gran de polifenols s'ha produït en la digestió dels bolets fregits, en el cas del rossinyol, i de bolets processats al microones, en el cas del shiitake.

### **4.3-Taula 13: Capacitat antioxidant del xampinyó:**

#### 1. Anàlisi i comparació dels resultats:

En aquesta segona fase de discussió de resultats, es comparar l'activitat antioxidant dels diferents bolets de l'experiment. L'activitat antioxidant, com ja s'ha explicat en el marc teòric, és un pas més en l'anàlisi dels antioxidants. El que s'avalua a continuació, ja no tracta de compostos amb potencial per ser antioxidants com els polifenols, sinó la quantificació de totes les molècules antioxidants del compost, i la manera com aquestes interaccionen per produir, virtualment, un veritable efecte antioxidant. Vegeu-ho en el punt 1.2.3.

Els mètodes per avaluar la capacitat antioxidant es classifiquen de dues maneres: Per una part, el FRAP, que mesura el potencial de reducció dels antioxidants d'una mostra i, per l'altra, hi ha l'ABTS i l'ORAC, els quals es basen en la capacitat dels antioxidants per reaccionar amb un radical lliure.

Existeix bastant consens que, per caracteritzar l'activitat antioxidant d'un aliment, l'assaig ORAC és el mètode més utilitzat<sup>142</sup>. Això es deu al fet que, a diferència d'altres assajos com el FRAP o l'ABTS, l'ORAC avalua l'activitat antioxidant mitjançant radicals i espècies oxidants que es troben presents en el nostre organisme i que es formen de manera biològica. En canvi, tant el FRAP com l'ABTS s'avaluen amb molècules que difereixen de les que es podrien crear pel propi organisme.

Els tres mètodes utilitzats per tal d'avaluar la capacitat antioxidant dels bolets del present estudi (FRAP, ABTS i ORAC) han donat valors força diferents per a cada mostra analitzada. Això s'explica pel fet que cada un d'ells té un enfocament diferent. Aquestes diferències entre els tres mètodes es poden observar en la Figura 32.

---

<sup>142</sup> Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos, 2011

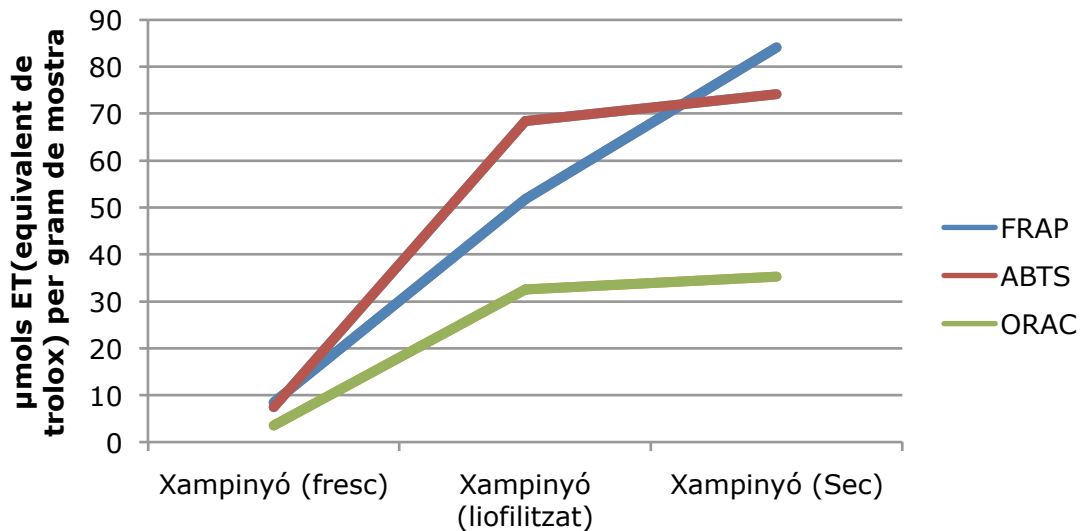


Figura 32: Comparació entre els diferents mètodes d'avaluació de la capacitat antioxidant en una mostra de xampinyó cru.

No obstant, es pot comprovar que, encara que els valors obtinguts dels tres mètodes difereixen els uns dels altres, tots segueixen tendències similars. Els que presenten una tendència més pròxima en els seus valors són l'ORAC i l'ABTS, ja que com s'ha esmentat en la pàgina anterior, tenen mètodes similars d'avaluació.

Quan es compara la capacitat antioxidant del xampinyó obtinguda en el present estudi amb altres aliments reconeguts per les seves propietats antioxidants, es fa evident, com en el cas dels polifenols, que el xampinyó no és un aliment especialment destacable per la seva capacitat antioxidant. En les següents gràfiques (Figura 33) es situen els valors obtinguts en el present estudi de l'activitat antioxidant del xampinyó (en els assajos ORAC i FRAP) en relació amb altres aliments indicats en les bases de dades d'altres estudis similars<sup>143</sup>.

<sup>143</sup> United States Department of Agriculture, 2010c; Charlsen, Harvolson, et al., 2010.

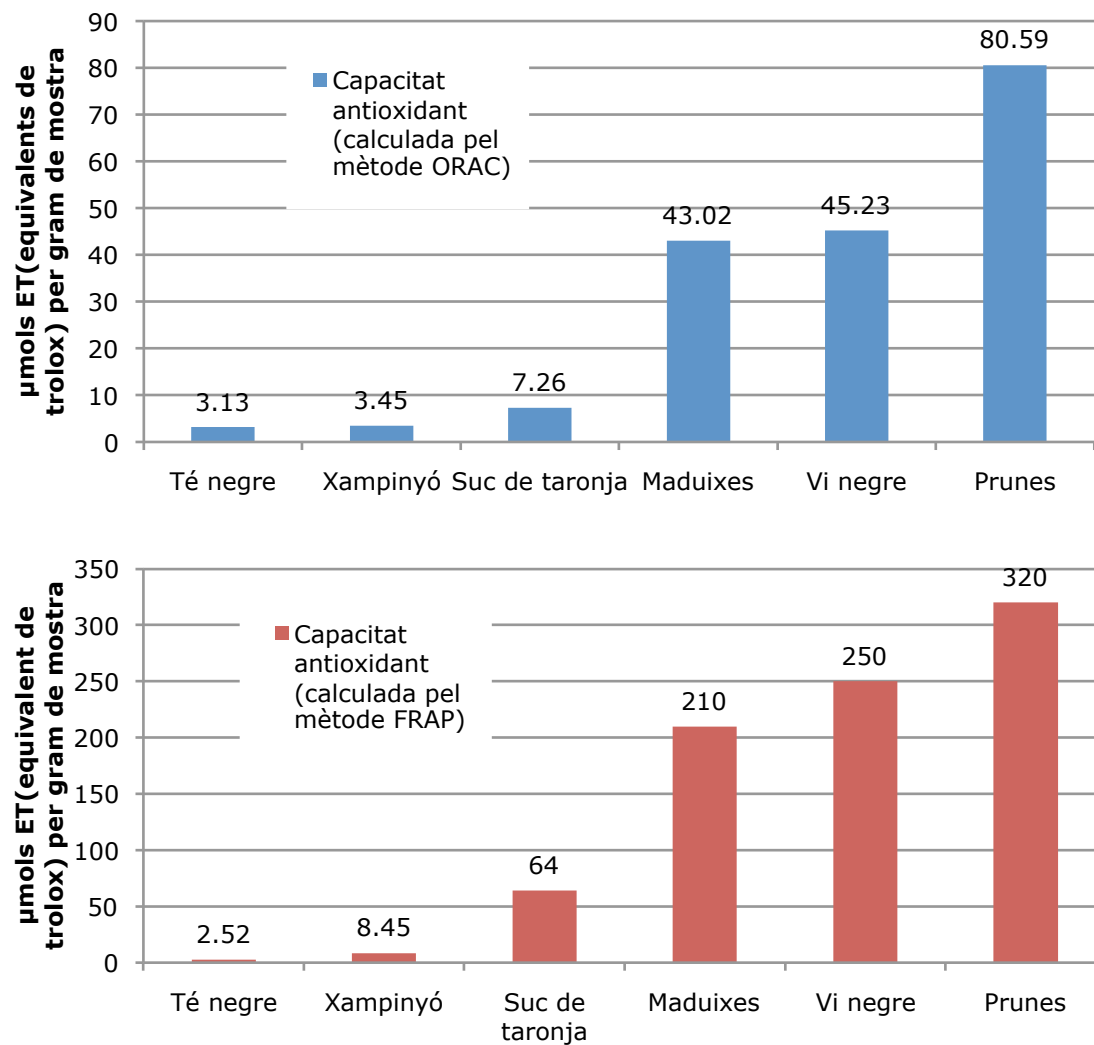


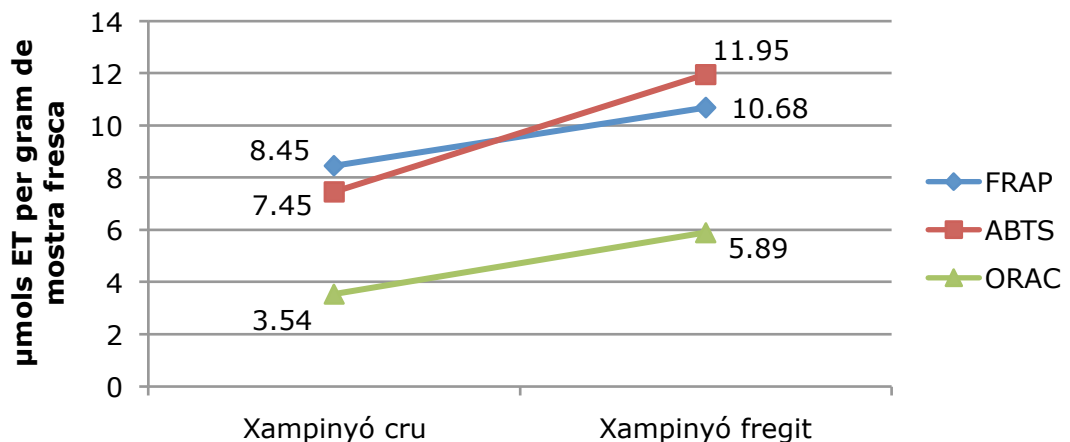
Figura 33: Situació del xampinyó en relació a la capacitat antioxidant d'altres aliments avaluada pel mètode ORAC i FRAP, respectivament.

En les dues taules anteriors, s'observa que tot i que el FRAP i l'ORAC no donen resultats similars pel que fa als valors, sí que segueixen una mateixa tendència pel que fa a la capacitat antioxidant dels diferents aliments.



## 2. Anàlisi del tractaments:

Pel que fa als tractaments, s'observa que el valor de la capacitat antioxidant del xampinyó fregit disminueix respecte del cru en totes les mostres en les quals no hi ha massa presència d'oli d'oliva (mostres desengreixades i seques). En canvi, en la mostra fresca, que conté més quantitat d'oli respecte de les altres dues, la capacitat antioxidant augmenta el seu valor en tots els assajos, encara que les diferències no són massa significatives. El valor del FRAP augmenta des de 8,45  $\mu\text{mols ET/g}$ , en el xampinyó cru i fresc, fins a 10,68  $\mu\text{mols ET/g}$ , en el xampinyó fregit. En aquesta comparació entre el xampinyó cru i el fregit es torna a observar que, tot i la diferència de valors que s'obtenen en els diferents mètodes, tots augmenten aproximadament en la mateixa proporció. Vegeu-ho en la Figura 34.



*Figura 34: Comparació de l'augment del valor de la capacitat antioxidant de les mostres fresques del xampinyó cru i del xampinyó fregit, a partir dels diferents mètodes amb els quals s'ha calculat (FRAP, ABTS i ORAC).*

En el xampinyó bullit i el xampinyó cuit al microones, al contrari que els fregits, els resultats difereixen més els uns dels altres. Per començar, els valors obtinguts per mitjà de l'assaig FRAP del

xampinyó bullit decreixen respecte del xampinyó cru. No obstant, l'ABTS i l'ORAC augmenten els seus valors, creant així una incoherència, tal com es pot veure en la Figura 35.

En el cas de l'ABTS es podria pensar que es deu a alguna interferència, ja que la mostra liofilitzada i la mostra seca superen amb escreix totes les altres capacitats antioxidants avaluades en l'estudi i, per tant, han quedat descartades. Els valors de l'ORAC en canvi, semblen tendir cap a valors més raonables que no pas els de l'ABTS, ja que augmenten en totes les mostres. Tot i així, els resultats de l'ORAC són contraris als que determina el FRAP, ja que en aquest últim assaig, els valors decreixen en tots els casos.

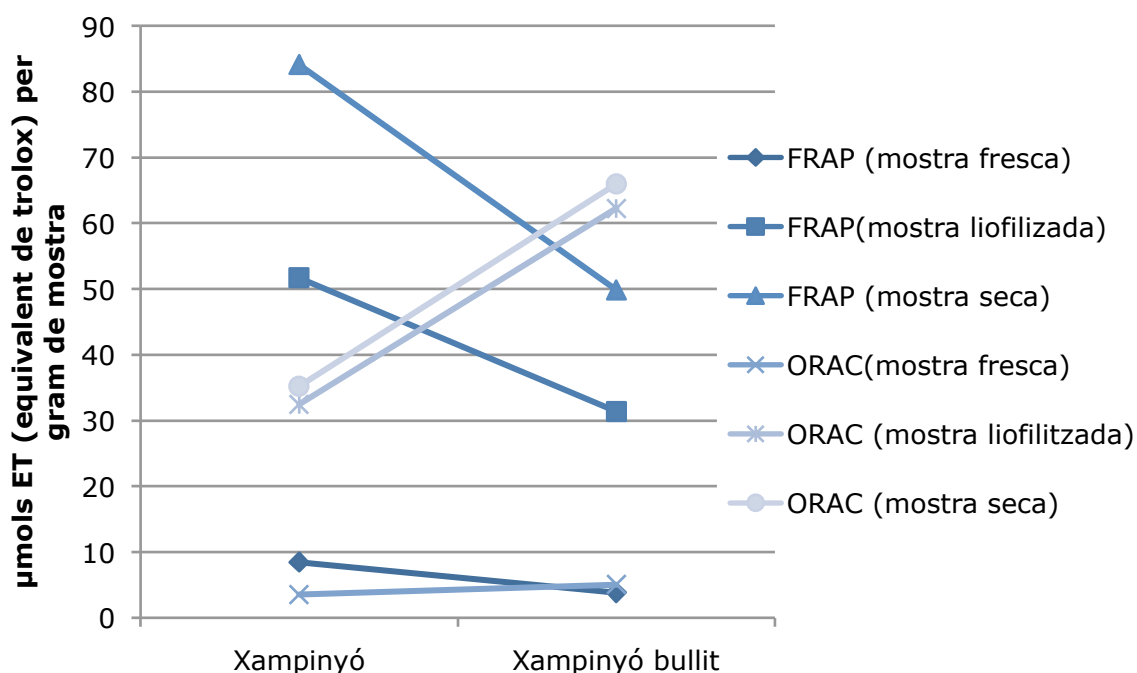


Figura 35: Incoherència creada pels resultats contraris en els mètodes FRAP i ORAC en els bolets bullits.

Es repeteix la incoherència en el xampinyó cuit al microones, ja que el FRAP disminueix, mentre que l'ORAC augmenta considerablement respecte del xampinyó cru. En aquest cas però, els valors de l'ABTS

són raonables, tot i que es mantenen bastant constants, en la línia de l'ABTS del xampinyó no processat.

Com a conseqüència d'aquestes incoherències no es poden treure conclusions de com varia la capacitat antioxidant del xampinyó quan es bull o es cou al microones.

En línies generals, es podria dir que optar per no processar els aliments pot ser una bona idea si es vol evitar la situació d'estrès oxidatiu, ja que en el cas del xampinyó, és el cru el que dóna valors més alts d'activitat antioxidant (considerant l'ABTS del xampinyó bullit com una incoherència), seguit per la mostra que ha estat bullida.

### 3. Anàlisi de la digestió:

Tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.2.3.1 de la metodologia, per limitacions en el temps de realització dels experiments, únicament es va poder realitzar l'assaig FRAP en les mostres digerides. Per tant, en aquest apartat tan sols es compararà el FRAP realitzat en les mostres no digerides amb les digerides.

A primera instància, si s'observa el valor del FRAP de la mostra crua digerida i fresca (4,43  $\mu\text{mols ET/g}$ ) es fa evident que la capacitat antioxidant s'ha reduït a la meitat respecte de la mostra no digerida (8,45  $\mu\text{mols ET/g}$ ). En la resta de mostres del xampinyó cru (liofilitzat i sec) passa el mateix. Aquesta tendència es repeteix en totes les mostres del xampinyó fregit, tot i que canvia en les mostres bullides i cuites al microones. En aquests dos últims casos, la mostra fresca digerida (3,37  $\mu\text{mols ET/g}$  xampinyó bullit i 7,5  $\mu\text{mols ET/g}$  xampinyó cuit al microones) disminueix el seu valor respecte la mateixa mostra no digerida (3,82  $\mu\text{mols ET/g}$  i 9,27  $\mu\text{mols ET/g}$ , respectivament). No obstant, les mostres digerides liofilitzades i seques d'aquests dos

tractaments augmenten d'una forma discreta per damunt de les mostres no digerides. Tal i com s'ha esmentat, totes les mostres fresques, i per tant les que s'ingeririen de forma habitual, disminueixen la seva capacitat antioxidant en la digestió. No és tan rellevant en canvi, el resultat del xampinyó liofilitzat o el sec, ja que el consum en aquest tipus de mostra és més pròpia d'altres bolets que no són tan accessibles. Vegeu-ho en la Figura 36.

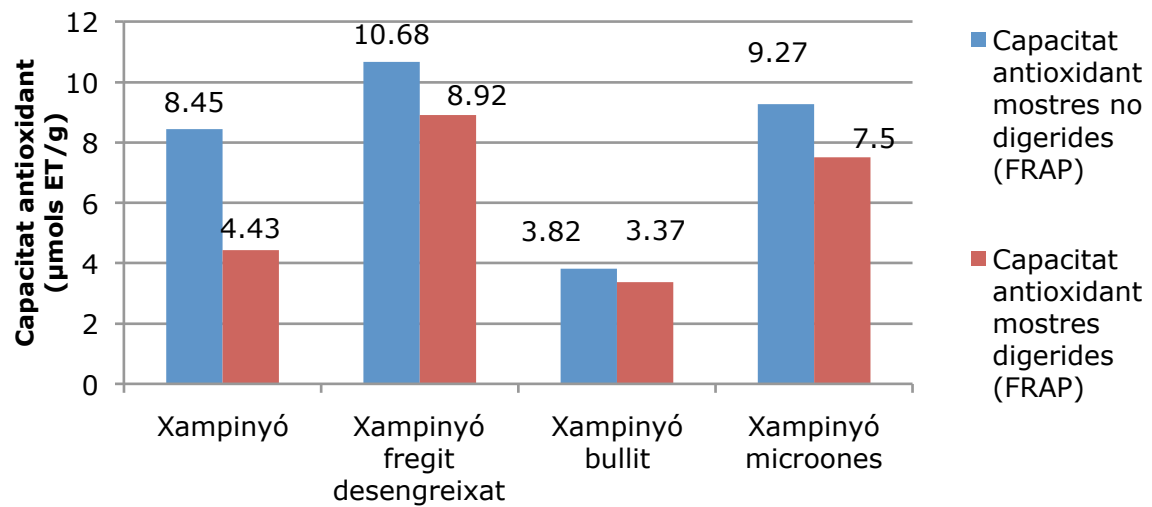
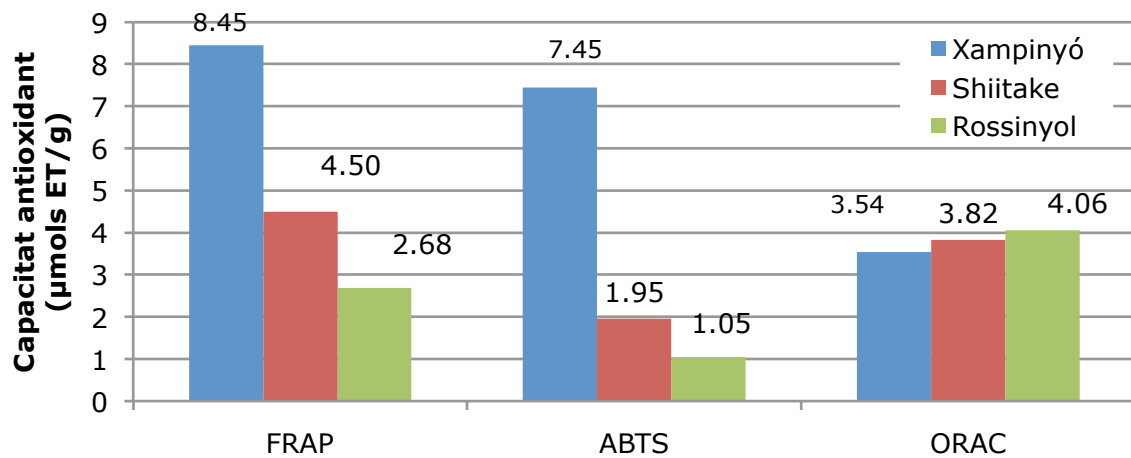


Figura 36: Comparació entre la capacitat antioxidant dels diferents tractaments del xampinyó digerit i no digerit, en mostra fresca.

**4.4-Taula 14 i 15: Capacitat antioxidant del shiitake i el rossinyol:****1. Anàlisi i comparació dels resultats:**

En els resultats obtinguts amb els polifenols, els valors del shiitake i el rossinyol disminueixen respecte del xampinyó. Així mateix, la capacitat antioxidant també redueix el seu valor en aquests dos bolets, tal com es pot veure en la Figura 37. Aquest resultat podria indicar que hi ha una relació entre els polifenols i la capacitat antioxidant, exposada a continuació en el punt 4.5.

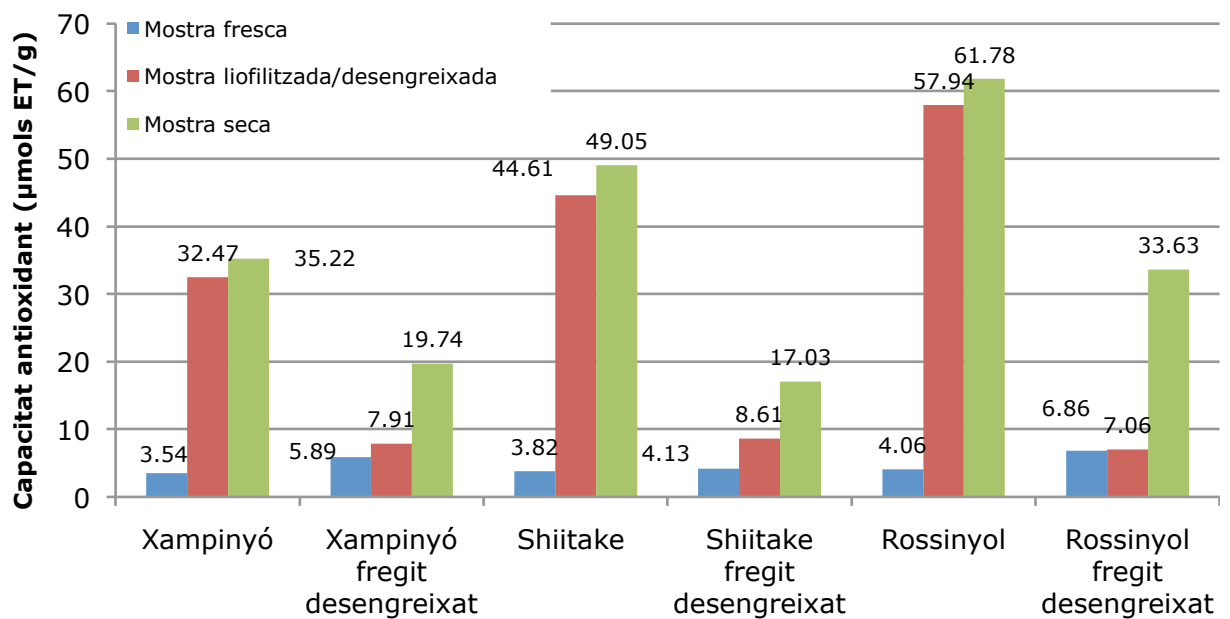


*Figura 37: Comparació entre els diferents mètodes de capacitat antioxidant, aplicats a les mostres fresques de diferents bolets.*

En la figura anterior, es pot comprovar com en els assajos FRAP i ABTS, la capacitat antioxidant és relativament alta en el xampinyó (8,45 i 7,45  $\mu\text{mols ET/g}$ , respectivament) i el valor disminueix progressivament en el shiitake i el rossinyol. En l'assaig ORAC, en canvi, es pot observar com els tres valors obtinguts són molt similars.

## 2. Anàlisi dels tractaments:

En referència als tractaments, ja s'ha observat que en el xampinyó es produeix una disminució del valor de la capacitat antioxidant en el bolet fregit respecte del cru. En el cas del shiitake es fa evident el mateix fenomen. En canvi, no es pot dir el mateix del rossinyol, ja que la majoria dels seus valors augmenten quan es fregeix. En la Figura 38 es veu reflectida la comparació entre els diferents bolets crus i les corresponents mostres fregides (assaig ORAC).



*Figura 38: Comparació de les capacitats antioxidants obtingudes en l'assaig ORAC de les diferents mostres crues de bolets en relació amb les seves respectives mostres fregides.*

Com es demostra en aquesta gràfica, el bolet que denota una capacitat antioxidant més alta és la mostra crua del rossinyol, seguit per la del shiitake i finalment la del xampinyó. Al contrari del que s'esperava, és el rossinyol, el qual presenta menys contingut en polifenols dels tres bolets, el que té una activitat antioxidant més elevada, si més no, en el mètode ORAC.

En els assajos FRAP i ABTS, en canvi, sí que es compleix que el xampinyó és el bolet amb més capacitat antioxidant, seguit del shiitake i el rossinyol. La comparació de la mostra fresca dels tres bolets, en tots els assajos, es troba en la Figura 37.

Pel que fa al shiitake i al rossinyol bullits, no és d'extranyar que els valors de la capacitat antioxidant en les mostres fresques siguin inferiors a les del shiitake i el rossinyol fregits. Tal i com s'ha anat esmentant durant tota la recerca, la influència de l'oli d'oliva present en la mostra fregida fresca podria influir en els resultats, tot augmentant l'activitat antioxidant. En canvi, les mostres desengreixades i seques del shiitake i el rossinyol fregits estan molt per sota de les mostres liofilitzades i seques dels que s'han bullit, ja que, en aquestes darreres, sí que s'ha retirat l'oli de forma parcial o total. Cal esmentar que les mostres crues dels dos bolets disminueixen la seva capacitat antioxidant quan reben el processament del bullit.

Per altra banda, en el processat amb microones, el shiitake i el rossinyol van obtenir uns valors en tots els assajos que superen o es mantenen davant de les seves respectives mostres fregides, bullides i crues. D'aquesta manera, són el shiitake i el rossinyol cuits al microones els que obtindrien més capacitat antioxidant en línies generals, encara que el rossinyol fregit mostri un pic en l'assaig ORAC per la possible influència de l'oli. La comparació entre els diferents tractaments del shiitake i el rossinyol es poden veure en la Figura 39.

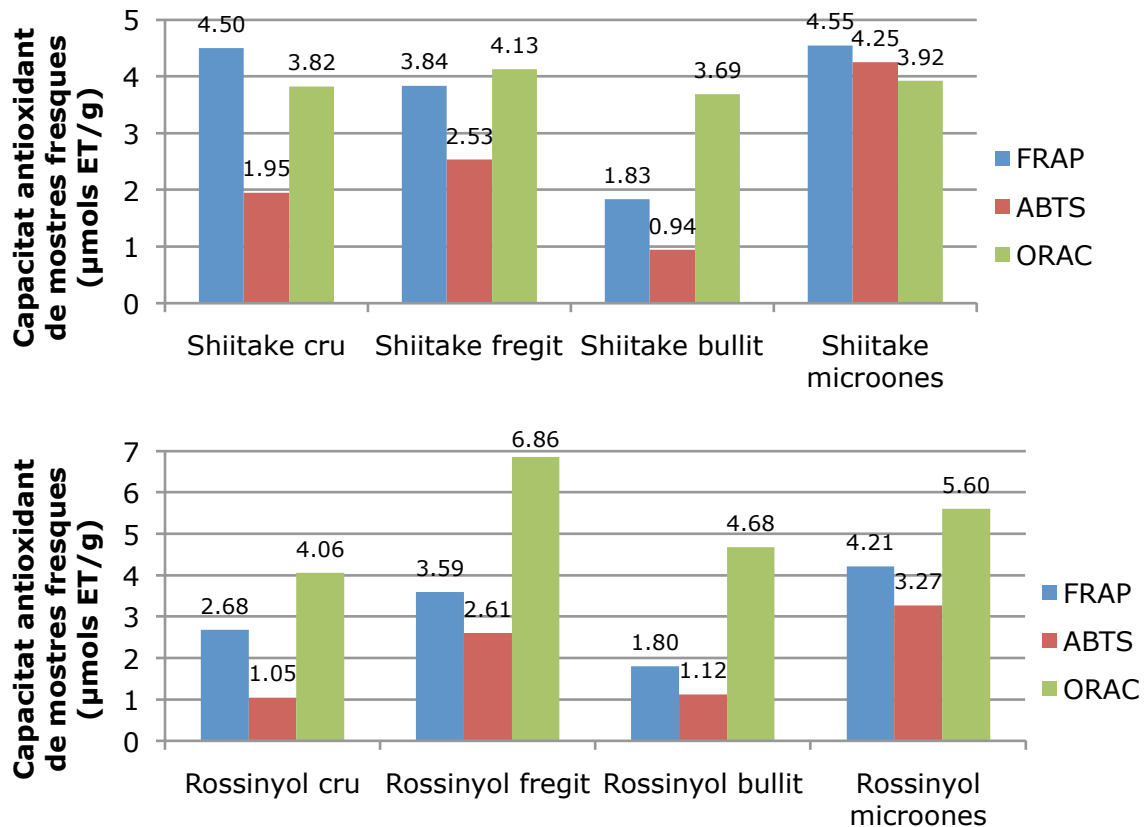


Figura 39: Comparació de la capacitat antioxidant resultant dels tractaments aplicats en el shiitake i el rossinyol.

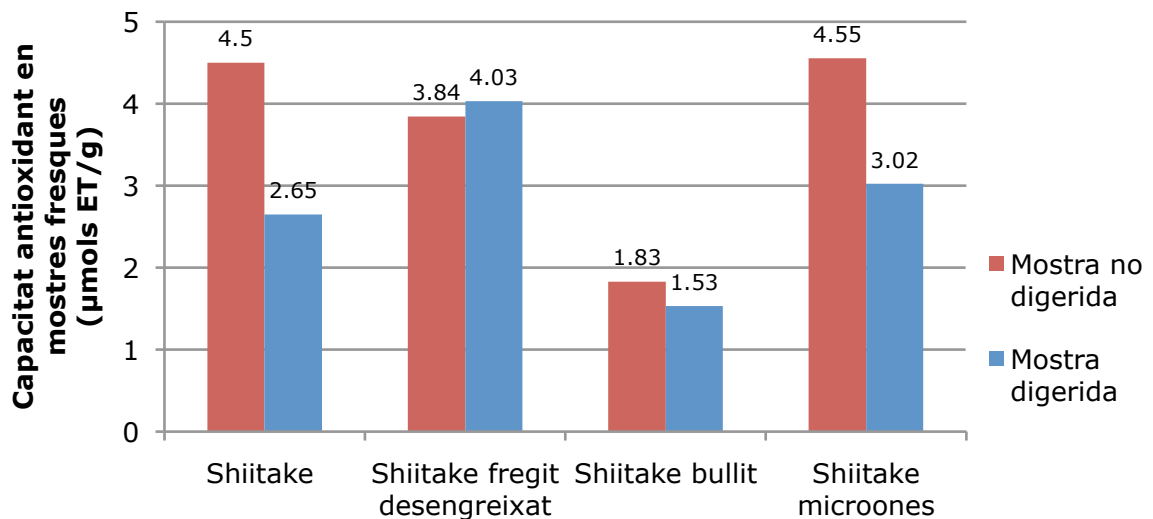
### 3. Anàlisi de la digestió:

Com ja s'ha comentat en l'apartat de capacitat antioxidant de la digestió del xampinyó, en aquesta secció només s'analitzaran els resultats de l'assaig FRAP. Com que en la digestió, els resultats obtinguts en el bolet shiitake difereixen significativament dels resultats del rossinyol, aquests es comentaran per separat.

Si es compara la mostra crua del shiitake (no digerida) amb la mateixa mostra però digerida, s'observa que la capacitat antioxidant disminueix en aquest segon cas (2,68 μmols ET/g en la mostra no digerida i 1,44 μmols ET/g en la digerida). Aquests resultats es repeteixen també en el shiitake bullit i en el shiitake cuit al



microones, en els quals el valor de l'activitat antioxidant de la mostra digerida és inferior a la no digerida. No obstant, la tendència s'inverteix en el cas del shiitake fregit, ja que el valor de la capacitat antioxidant augmenta lleugerament amb la digestió. Les tendències similars del shiitake cru, bullit i cuit al microones i la del shiitake fregit es representen gràficament en la Figura 40.



*Figura 40: Comparació de la capacitat antioxidant dels diferents tractaments aplicats en el shiitake en mostres digerides i no digerides.*

En els resultats de la capacitat antioxidant obtinguts en el rossinyol s'observa que, a diferència del shiitake, en tots els tractaments en mostra fresca, el valor de la capacitat antioxidant es redueix a la meitat quan es digereix. Aquest fet es veu clarament en la Figura 41. En aquest sentit, el rossinyol s'assembla més al xampinyó, ja que la capacitat antioxidant disminueix en totes les mostres d'una manera dràstica quan es digereix. De fet, en el xampinyó el descens del valor en les mostres digerides no era tan notori, tot i que també disminueix en tots els casos de digestió.

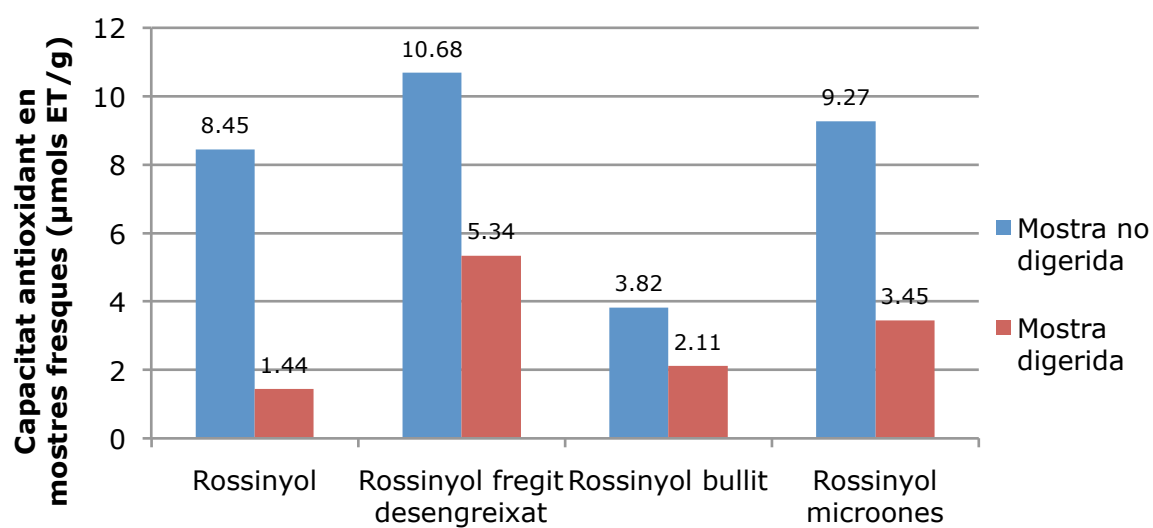


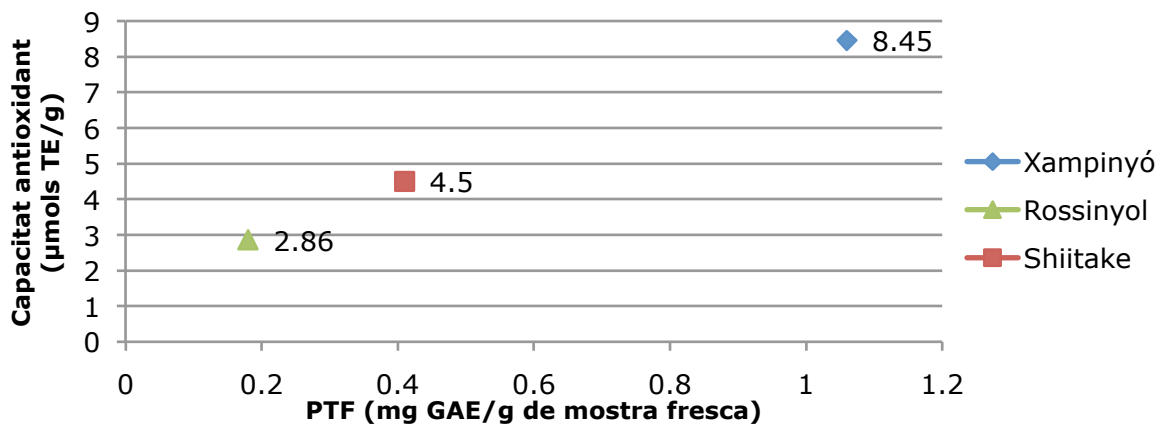
Figura 41: Comparació de les capacitats antioxidants dels diferents tractaments aplicats en el rossinyol en mostres digerides i no digerides.

#### **4.5-Anàlisi de la correlació entre polifenols i capacitat antioxidant:**

Davant de les múltiples variables que intervenen en l'experiment, aquest apartat es centra en la correlació d'aquelles que corresponen a la validació de les hipòtesis que s'han plantejat. Les relacions s'estableixen entre la capacitat antioxidant i el polifenols de les diferents mostres obtingudes en l'experiment. Les variables que es tenen en compte són la quantitat total de polifenols (PTF) de les mostres fresques<sup>144</sup> tractades (digerides i no digerides) en els tres tipus de bolets, considerant el mètode FRAP com a referent de la capacitat antioxidant que s'ha calculat.<sup>145</sup>

##### **4.5.1- Correlació 1:**

La primera correlació que s'ha analitzat, confirma la hipòtesi 5 d'aquesta recerca (Vegeu-ho en el punt 2.1), la qual afirma que existeix una relació directa entre la PTF i la capacitat antioxidant en una mostra. Aquesta relació es veu reflectida en les mostres fresques dels bolets no processats i no digerit, tal com es veu en la Figura 42.



*Figura 42: Correlació entre la quantitat total de polifenols (PTF) i la capacitat antioxidant de les mostres fresques, no processades i no digerides del xampinyó, shiitake i rossinyol.*

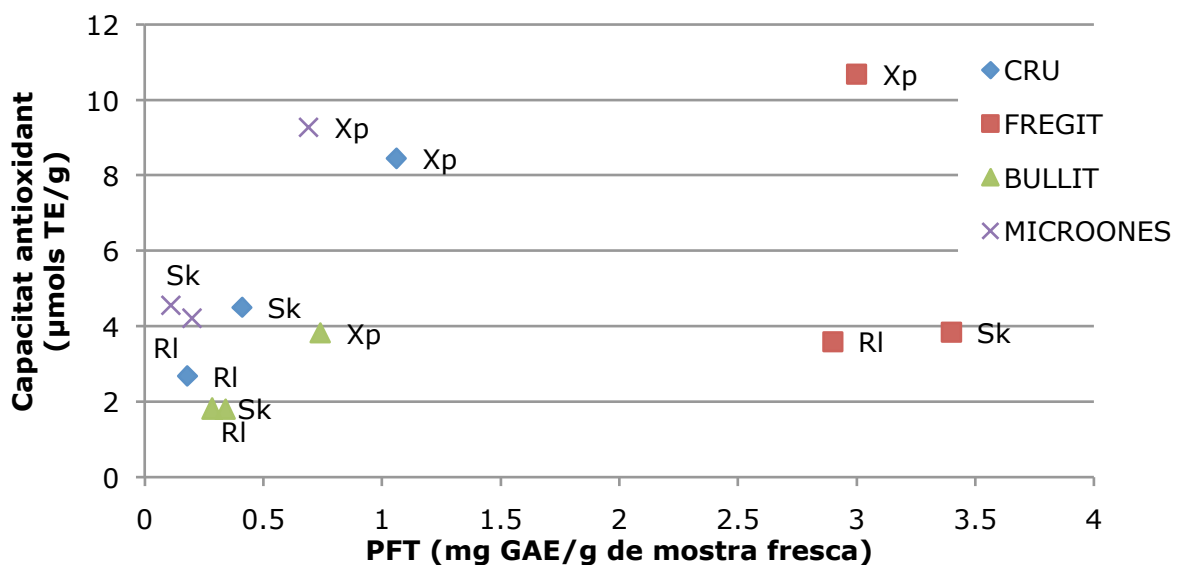
<sup>144</sup> Com en la resta de l'estudi, s'utilitzen principalment les mostres fresques com a referència perquè són els aliments tal i com es troben quan es consumeixen habitualment.

<sup>145</sup> S'utilitza el mètode FRAP, ja que va ser el que es va realitzar més vegades en tots els nivells d'aquest estudi, per la seva senzillesa i facilitat per a l'obtenció dels valors de la capacitat antioxidant.

Partint dels resultats obtinguts amb el rossinyol, que és el bolet amb menys polifenols dels tres, es pot observar que la capacitat antioxidant també és la menor de la que s'ha obtingut en els altres dos bolets. Aquesta capacitat antioxidant es repeteix en el shiitake i el xampinyó en una proporció similar. La correlació és clara i determina una línia de tendència molt estable. La relació ordenada de menys a més capacitat antioxidant, s'estableix en la sèrie rossinyol, shiitake i xampinyó.

#### 4.5.2- Correlació 2:

En la segona correlació que s'ha analitzat, s'ha tornat a comparar els polifenols en relació amb la capacitat antioxidant de cada mostra, però aquesta vegada comparant els diferents tractaments que han rebut els tres bolets. El resultat que s'ha obtingut es mostra a continuació en la Figura 43, on es pot comprovar que, exceptuant el cas del xampinyó (Xp) fregit, els altres valors segueixen tendències similars a la dels bolets crus (correlació 1) expressada també en la Figura 43 en rombes blaus.



El que s'observa en aquesta gràfica també és que, en general, els tractaments no afecten a la relació que existeix entre els PTF i la capacitat antioxidant. Això es comprova observant, per exemple, els bolets bullits, en els quals els valors dels polifenols disminueixen respecte dels valors crus i, alhora, ho fa la seva capacitat antioxidant. El cas del xampinyó fregit és una mica incoherent amb tots els altres valors, ja que tot i tenir un valor de polifenols inferior al shiitake, té una capacitat antioxidant que supera amb escreix la que hauria de tenir si es confirma la hipòtesi.

#### **4.5.3- Correlació 3:**

En la tercera correlació que s'ha analitzat, s'ha comparat els PTF amb la capacitat antioxidant de les mostres crues i fresques, digerides i no digerides dels tres bolets. Els resultats obtinguts es mostren a continuació en la Figura 44, on es pot comprovar un fenomen que aparentment aporta uns resultats incongruents: les mostres digerides tenen menys capacitat antioxidant que les no digerides, tot i presenten una PTF més alta.

En una anàlisi més detallada d'aquest valors obtinguts (expressats en les taules de l'apartat 3), es comprova que els tanins hidrolitzables disminueixen el seu valor amb la digestió, mentre que els polifenols de baix pes molecular augmenten. El total de polifenols es calcula tot sumant els tanins i els polifenols de baix pes molecular.

Així, doncs, si la capacitat antioxidant disminueix en la mostra digerida, tot apunta al fet que són els tanins hidrolitzables els antioxidants que estan aportant la capacitat antioxidant més alta a les mostres, mentre que els polifenols, tot i el seu valor elevat, no aconsegueix que es correlacioni clarament amb un augment de la capacitat antioxidant.

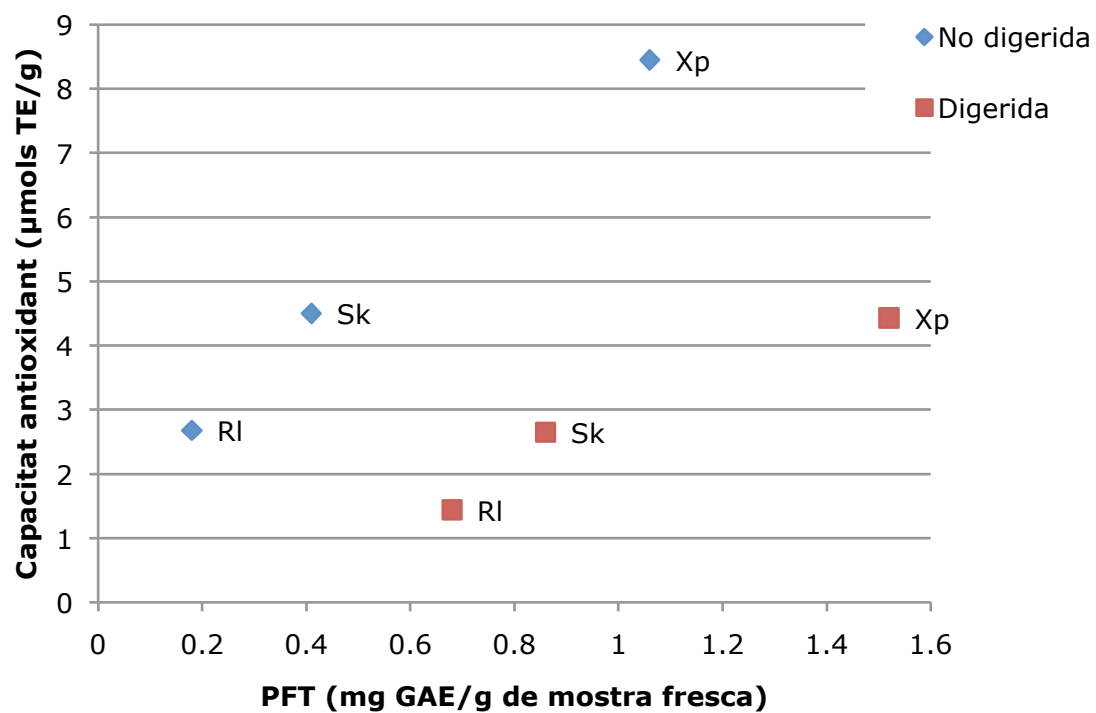


Figura 44: Relació entre la capacitat antioxidant i els PTF en cada un dels bolets digerits i no digerits.

#### 4.6-Taula 20: Western-blot

A part d'estudiar els antioxidants dels bolets i la capacitat que tenen, també es va fer una aproximació a la quantificació de substàncies oxidades que es podrien formar a partir dels diferents tractaments aplicats a les mostres. El mètode que es va utilitzar va ser el Western-blot per tal de quantificar principalment l'oxidació proteïca, però també les formacions entre proteïnes, carbohidrats i greixos que s'haguessin pogut oxidar. Com s'ha descrit en l'apartat 2.2.4.2 de la part experimental, es van utilitzar diferents anticossos (cada un per determinar unes macromolècules concretes) dels quals únicament l'MDA-lys va donar un resultat més o menys coherent. Aquest anticòs s'utilitza principalment per determinar l'oxidació lipídica.

Dels resultats obtinguts es van haver d'excloure la mostra de xampinyó i rossinyol processats al microones, ja que els valors eren totalment incoherents. La resta de resultats es representen en la Figura 45 en forma de % d'oxidació, considerant que la mostra crua representa la referència 100%.

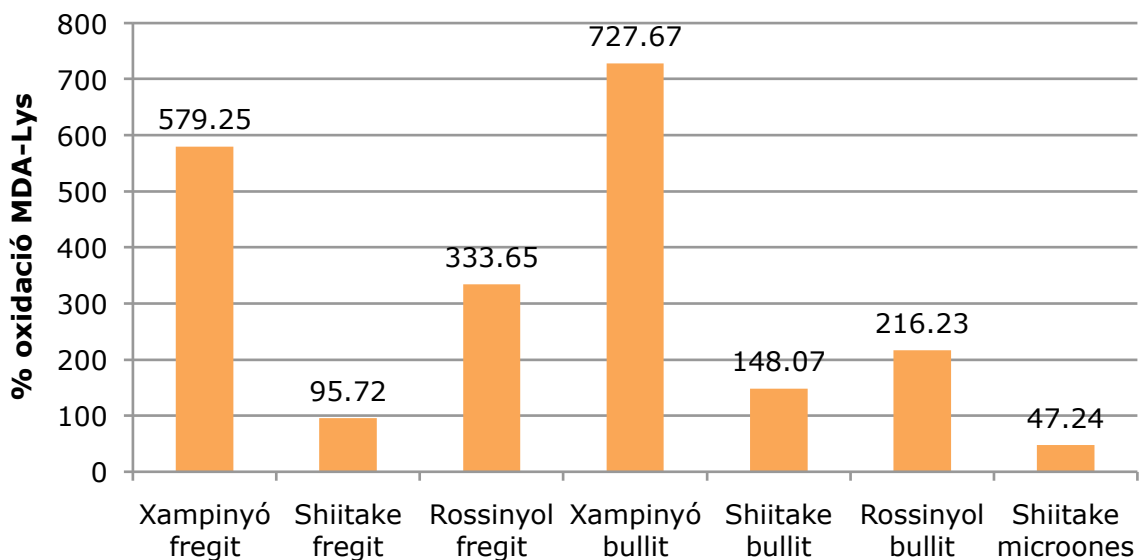


Figura 45: Resultats obtinguts en el western-blot realitzat amb l'anticòs MDA-Lys per determinar l'oxidació lipídica de les mostres.

En la Figura 45 s'observa que les mostres del xampinyó són les que tenen més facilitat per oxidar-se (la mostra de xampinyó microones es va desestimar per superar el 1000%), especialment la mostra bullida. El rossinyol és el bolet amb més oxidació després del xampinyó i, finalment, el shiitake és el que menys s'oxida que fins hi tot té valors que es mantenen per sota del 100%, en el cas del shiitake fregit i processat al microones. Aquest assaig indica que el xampinyó és el que s'oxida més quan es tracta, ja que és el bolet més ric en substàncies i capacitat antioxidant.



## **5.-CONCLUSIONS**

Després d'analitzar els resultats que s'han obtingut, es destaquen les següents conclusions, amb les quals es validen algunes de les cinc hipòtesis que s'han plantejat en l'apartat 2.1:

1. Els bolets estudiats (xampinyó, shiitake i rossinyol) contenen elements antioxidants (bàsicament polifenols de baix pes molecular i tanins hidrolitzables) pròpis del regne vegetal, tot i ser aliments que pertanyen al regne dels fongs.
2. No s'han detectat tanins condensats en cap dels tres bolets analitzats.
3. El bolet que té una major concentració de polifenols és el xampinyó, seguit pel shiitake i, finalment, el rossinyol.
4. Els polifenols de baix pes molecular i els tanins detectats en les tres mostres de bolets tenen activitat antioxidant.
5. L'activitat antioxidant varia en funció de l'espècie de bolet analitzada.
6. El bolet que demostra una activitat antioxidant més alta és el xampinyó, seguit del shiitake i el rossinyol. Existeix una correlació entre la concentració d'elements antioxidants en cada un dels bolets i l'activitat antioxidant que aquests demostren. De fet, el xampinyó presenta una capacitat antioxidant similar a la categoria d'altres aliments referenciats en les bases de dades específiques com ara el te negre o el meló.

7. Els tractaments culinaris que s'han practicat en aquest estudi han provocat una disminució de la capacitat antioxidant en tots els casos, per tant, la millor manera d'obtenir activitat antioxidant a partir d'aquests productes és mitjançant la ingesta en la seva forma crua.
8. El procés d'alliberament dels antioxidants en els bolets, responen de manera diferent a diversos mecanismes:
  - a. En els diferents tractaments culinaris aplicats en els tres bolets, es registra una pujada de la quantitat de tanins hidrolitzables, mentre que els polifenols decreixen relativament.
  - b. En el procés de la digestió es registra un augment del valor de polifenols de baix pes molecular, mentre que la quantitat dels tanins hidrolitzables decreix molt significativament.
9. El xampinyó és el bolet que tindria més productes oxidats en coure'l, seguit pel rossinyol i el shiitake. En aquest últim, els valors d'oxidació serien generalment molt baixos, inferiors fins i tot a la mostra crua.
10. Caldria realitzar un estudi més detallat dels resultats, per analitzar la interacció entre les múltiples variables que es presenten en aquesta recerca. La limitació temporal per a dur a terme aquesta recerca, no ha permés validar amb més fiabilitat els diferents resultats que s'hi ha obtingut. Per tant, els resultats aconseguits permeten fer comparacions a nivell qualitatiu, però no a nivell quantitatiu (exacte).

## **6.-VALORACIÓ PERSONAL**

L'elaboració d'aquest treball ha representat un recorregut de diversos mesos de feina, en els quals he pogut observar un procés de maduració pel que fa als meus coneixements i mètode de treball. Durant aquest temps, he tingut la possibilitat d'accedir a un camp totalment nou i desconegut, que m'ha permès conèixer a fons el mètode científic, la manera com es treballa i com es realitzen els assajos en aquest tipus d'investigació i un camp tant immens com és el dels antioxidants i tot el que s'hi relaciona.

Tot i això, també he sapigut des del primer moment que el treball no seria fàcil, i efectivament la seva realització no ha estat exempta de dubtes davant de situacions incoherents o de moments de bloqueig. Una de les aportacions que he descobert en el meu treball, però, ha estat saber que la recerca és així, i que realment val la pena no abandonar i continuar treballant, ja que el resultat que se n'obté, és més que gratificant.

## **7.-BIBLIOGRAFIA**

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S.J.; DAS, D.K.; RAY, S.D.; KUSZYNSKI, C.A.; JOSHI, S.S.; PRUESS, H.G. (1999). "Free radicals and grape proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention". *Toxicology*. Núm 148. Pàg: 187-197.

BALSANO C.; ALISI, A. (2009). "Antioxidant effects of natural bioactive compounds". *Current Pharmaceutical Design*. Núm 15.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L.M.; FERREIRA, I.C.F.R. (2007). Effect of Fruiting Body Maturity Stage on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Lactarius* sp. Mushrooms. *J. Agric. Food Chem*. Núm 55. Vol. 21. Pàg 8766-88771.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. (1993). "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants". *Free radical biology and medicine*. Vol 14. Núm 3. Pàg 303-311.

CHOI, Y.; LEE, S.M.; CHUN, J.; LEE, H.B.; LEE, J. (2005). "Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom". *Food Chemistry*, núm. 99: p. 381-387.

CHARLSEN, M.H.; HALVORSEN, B.L.; HOLTE, K.; BØHN, S.K.; DRAGLAND, S.; SAMPSON, L.; WILLEY, C.; SENOO, H.; UMEZONO, Y.; SANADA, C.; BARIKMO, I.; BERHE N.; WILLET, W.C.; PHILLIPS, K.M.; JACOBS JR, D.R.; BLOMHOFF, R.; (2010). "The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide". *Nutrition Journal*, núm

DEL CASTILLO, V.C. (2000). "Radicales libres. Su formación en respiración normal y durante el ejercicio". *efdeportes.com* [en línea]. Núm 23. [Consultat: 5 de novembre de 2011]. Disponible a internet: <http://www.efdeportes.com/efd23/radic.htm>

DENNERY, P.A. (2010). "Oxidative stress in development: nature or nurture?". *Free radical biology & medicine*. Núm 49. [Consultat: 22 Novembre 2011].

DUBOST, J.; OU, B.; BEELMAN, R. (2007). "Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity". *Food Chemistry*, núm. 105: p. 727-735.

ESTERBAUER, H.; ROTHENEDER, G.; STRIEGL, G.; WAEG, G.; ASHY, A.; SATTLER, W.; JÜRGENS, G. (1989). "Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation". *European Journal of Lipidd Science and tecnology*. Vol 91. Núm 8. Pàg 316-324.

FUNDACIÓ ENCICLOPEDIA CATALANA, ENCICLOPÈDIA CATALANA (2010). *enciclopèdia.cat* [en línia]. [Consultat el 4 de desembre de 2011]. Disponible a internet: [www.enciclopediacatalana.cat](http://www.enciclopediacatalana.cat)

GARCÍA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.A.; D'ARRIGO, M.; MARTÍNEZ, J.A. (2010). [Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents](#). *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. Núm 9. Pàg 125-141.

HALLIWELL, B. (1996). "Antioxidants in human and disease". *Annual review of nutrition*. Vol. 16. Pàg 33-50. [Consultat: 13 Novembre 2011]

HARTZFELD, P.W.; FORKNER, R.; HUNTER, M.D.; HAGERMAN A.E. (2002). "Determination of hydrolyzable tannins (Gallotanins and Ellagitannins) after reaction with potassium iodate". *J. Agric. Food Chemistry*. Núm 50. Pàg: 1785-1790.

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGIA DE CHILE. (2011). *Portal antioxidantes* [En línia]. Corfo-Chile. [Consultat: 6 de desembre de 2011]. Disponible a internet: [www.portalantioxidantes.com](http://www.portalantioxidantes.com)

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L. (1996). "The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols". *Lipids*. Núm 31. Pàg 671-701.

KAUR, J.; BACHHAWAT A.K. (2008). "A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein". *Analytical Biochemistry*. Vol 384. Núm 2. Pàg 348-349.

KRUGER, N.J. (2002). "The Bradford Method for Protein Quantitation". A: *THE PROTEIN PROTOCOLS HANDBOOK*. Pàg 15-21. ISBN:1-59259-169-8

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. (2005). "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [en línia]. 2005, vol.25, n.4 [citat 10/12/2011], pàg. 726-732 . Disponible a internet:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=en&nrm=iso).

LIMA, L.B. (2001). "Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos". Universidad de la Habana, Cuba.

LUTZ, M.; EDEL LEÓN, A. (eds). (2009). *Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación*. 1 ed. Valparaíso: Universidad de Valparaíso-Editorial. ISBN 978-956-214-094-2.

MAIANI, G.; PERIAGO, M. J.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I. G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. (2009). "Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans". *Molecular Nutrition & Food Research*, Núm 53. Pàg 194-218.

MARTÍNEZ CARRERA, D.; MORALES, P.; SOBAL, M.; BONILLA, M, MARTÍNEZ, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el

sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítol 6.1. Pàg 20. En: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp.* En México. SÁNCHEZ, J. E.; SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ CARRERA, G.; MATA.; LEAL, M. ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.

MONTOYA DÍAZ, M. (2011). *Centro integral de ozonoterapia médica* [en línia]: *Ozono, un paso para la salud*. [Consultat: 1 desembre 2001]. Disponible a internet: <http://www.ozonomontoya.com.mx/>

NCBI (8 desembre 2011). *Pubchem compounds* [En línia]. Pubchem. Disponible a internet: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

NEVEU, V.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; VOS, F.; CRESPI, V.; DU CHAFFAUT, L.; MENNEN, L.; KNOX, C.; ISNER, R.; CRUZ, J.; WISHART, D.; SCALBERT, A. (2010). "Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods". *Database*.

OREGON STATE UNIVERSITY. THE LINUS PAULING INSTITUTE (2000, maig). The new recommendations for dietary antioxidants [en línia]. Spring/summer 2000 newsletter. Disponible a internet: <http://lpi.oregonstate.edu/s-s00/recommend.html>

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. (2002). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study". *J. Agric. Food Chem.* Núm 50. Pàg 3122-3128.

PORTER, L.; HRSTICH, L.; CHAN, B. (1985). "The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin". *Phytochemistry*. Núm 25. Pàg 223-230.

PRIOR, R.L.; WU X.; SCHAICH, K. (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Núm 53. Vol 10. Pàg 4290-4302

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. (2000). "Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing, antioxidant power assay". *Journal of Clinical Nutrition*. Núm 48. Pàg 3396-3402.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology & Medicine*. Núm 26. Pàg 1231-1237.

RIERE CODINA, M. (2002). "El oxígeno y la evolución". *Mundo científico*, 238:66-71.

RODRÍGUEZ, J.M.; MENÉNDEZ, J.R.; TRUJILLO, Y. (2001). "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo". *Rev Cubana Med Milit*. Núm 30. Vol 1. Pàg 15-20

RODRÍGUEZ, M. (2009). Determinación de la actividad antioxidante de pétalos comestibles. Master tesis. Universitat politècnica de Catalunya. Departament d'enginyeria química.

ROMANO, A.D.; SERVIDDIO, G.; DE MATTHAEIS, A.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. (2010). "Oxidative stress and aging". *Nephrol* [en línia]. Núm. 23 (suppl 15). Pàg 29-36. [Consultat: 20 Novembre 2011]

RÜCHARDT, C. (1992) "Eine chemische Theorie in historischer Sicht". Dins: Sitzungsberichte der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, 1992, pàgines. 319-345

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. (2006). "Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet". *ScienceDirect*. Núm 101. Pàg: 492-501



SCALBERT, A.; MONTIES B.; JANIN, G. (1989). "Tannins in wood: comparison of different estimation methods". *J.Agric. Food Chem.* Núm 37. Pàg 1324-1329.

SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. (2006). "Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity". *ScienceDirect*. Núm 40. Pàg: 15-21

SOLER CANTERO, A. (2009). "Estudio de la capacidad antioxidante i la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva: Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional". Motilva Casado i Romero Fabregat (tut.). Tesi doctoral. Universitat de Lleida. Escola tècnica superior d'enginyeria agrària. Departament de tecnologia d'aliments.

SUÁREZ HERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, E.M.; DÍAZ ROMERO, C. (2004). "Cambios en el valor nutritivo de patatas durante distintos tratamientos culinarios.". *Ciencia y tecnología alimentaria*, vol. 4, núm. 3: pàg 258-259.

THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY (2011). "Dietary antioxidants, Redox Tone and Health Promotion: an Orthomolecular study of interactions". *ClinicalTrials* [en línia]. [Consultat: 5 de novembre de 2011]. Disponible a internet: [http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01315977?recr=Open&int\\_r=antioxidants&rank=8&view=record](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01315977?recr=Open&int_r=antioxidants&rank=8&view=record)

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NATIONAL NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE (2010a) Vitamin C, total ascorbic acid Content of Selected Foods per Common Measure [en línia]. Release 23. Disponible a internet: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR23/nutrlist/sr23a401.pdf>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NATIONAL NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE (2010b) Vitamin E (alpha-tocopherol) ( mg ) Content of Selected Foods per Common

Measure [en línia]. Release 23. Disponible a internet:  
<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR23/nutrlist/sr23a323.pdf>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NATIONAL NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE (2010c) Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected Foods [en línia]. Release 2. Disponible a internet:  
[http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/ORAC/ORAC\\_R2.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/ORAC/ORAC_R2.pdf)

## **8.-ANNEXOS**

### CD-ROM ADJUNT:

- Resultats de les diferents anàlisis.
- Galeria d'imatges.
- Articles utilitzats per a la discussió de resultats.