

Evaluación de la actividad antioxidante y polifenoles totales en *Avena sativa* proveniente de la ciudad de Arequipa

Assessment of antioxidant activity and total polyphenol in *avena sativa* from arequipa city

Cesar Augusto Roque Borda^a, Aline Schneider Teixeira^b, Lorena Deladino^b

^aFacultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María. Arequipa Perú.

^bCentro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de los Alimentos (CIDCA-CONICET), UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

INFORMACIÓN

Historia del Artículo

Recepción: 2016

Revisión: 2016

Aceptación: 15/05/2017

Palabras Clave

Avena sativa, Actividad Antioxidante, FRAP, DPPH, beta-caroteno/ácido linoleico, polifenoles totales, Folin-Ciocalteu.

Key Words

Avena sativa, Antioxidant Activity, FRAP, DPPH, beta-carotene/linoleic acid, total polyphenols, Folin-Ciocalteu.

Doi 10.35286/veritas.v16i1.101

RESUMEN

La *Avena sativa*, un alimento que además de brindar los requerimientos básicos en la dieta provee beneficios adicionales hacia la salud, previniendo enfermedades crónico degenerativas como: obesidad, diabetes, cardiovasculares y cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de polifenoles del extracto etanólico de avena mediante HPLC y evaluar la actividad antioxidante mediante los ensayos beta-caroteno/ácido linoleico, ensayo FRAP, e inhibición del radical DPPH• y los polifenoles totales presentes por el ensayo Folin-Ciocalteu. Los resultados proporcionan una base preliminar para una mayor exploración de esta planta y sus componentes químicos y desarrollo de una aplicación.

ABSTRACT

The *Avena sativa*, a food that besides offering the basic requirements in the diet provides additional benefits towards the health, preparing diseases chronically degenerative as: obesity, diabetes, cardiovascular and cancer. The aim of this work was to determine the profile of polyphenols of the ethanolic extract of oats by means of HPLC and to evaluate the antioxidant activity by means of the tests beta-carotene/linoleic acid, test FRAP, inhibition of the radical DPPH• and the total present polyphenols for the test Folin-Ciocalteu. The results provide a preliminary basis for further exploitation of this plant and its chemical components and application development.

Introducción

Los antioxidantes son importantes en la prevención de diversas enfermedades humanas. Los compuestos con actividad antioxidante pueden funcionar como captadores de radicales libres, formadores de complejos de metales pro-oxidantes, agentes reductores, y desactivadores de la formación de oxígeno singlete (1), protegiendo así al cuerpo de enfermedades degenerativas tales como el cáncer (2). El beneficio de consumir avenas para los humanos y el ganado se debe a sus proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales y antioxidantes (3, 4).

Los compuestos fenólicos con actividad antioxidante, tales como flavonoides y derivados de los ácidos cinámico y benzoico, se han identificado en la avena, pero pocos datos cuantitativos están disponibles (5-10).

Los objetivos de este estudio fueron: medir la actividad antioxidante de extractos de etanol de avena mediante los ensayos de FRAP, DPPH, beta-caroteno/ácido linoleico, los polifenoles totales presentes por el ensayo Folin-Ciocalteu y la concentración de los compuestos antioxidantes por HPLC

Material y Métodos

Obtención de extracto etanólico por soxhlet. Se colocaron 10 g de avena (cosecha invierno 2015, facilitada por la comunidad

local de Polobaya, Perú), en el cartucho poroso con 200 mL de etanol anhidro (Carlo Erba Reagents Spa, plus for HPLC, España) en el extractor soxhlet (FBR Decalab, Argentina), obteniendo avena-etanol. Éstos se hicieron por triplicado. Se llevaron las muestras al Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-124, Suiza) por separado, a una presión 100 ± 20 mmHg y temperatura de 50°C durante 30 minutos. Luego, fue resuspendida con agua destilada y se enrazó a 100 mL. Se determinó la concentración de cada muestra de avena mediante el peso seco por mL.

Caracterización química del extracto etanólico de *Avena sativa*

Determinación de la composición del extracto por Cromatografía líquida de Alta Performance (HPLC). Se empleó un cromatógrafo líquido (Waters Corp. Modelo 2414), Fase móvil: A = H₂O + 0.1 % ácido fórmico; B = metanol + 0.1 % ácido fórmico; Columna C18 Waters Spherisorb 5um ODS2 4.6X250 mm, Temperatura de columna: 40°C , Caudal: 1,0 mL/min, Volumen de inyección: 50 µl, Detector: Waters 2998 con arreglo de diodos. Longitud de onda = 280 nm, Bomba binaria Waters 1525. El gradiente empleado fue el siguiente: 80-20 % (A-B), desde 0-40 min; 60-40 % (A-B), desde 45-50 min; 80-20% (A-B), a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

Se utilizaron los siguientes compuestos como estándares para la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos: ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico, ácido dihidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido cafeico, rutina (Quercetin-3-Rutinoside), quercetina, vitezina (Apigenin-8-C-Glucoside), y 2-O-rhamnosylvitezina todos de Sigma-Aldrich, USA. Se prepararon soluciones stock de las sustancias patrón de concentración 0,25 mg/mL en mezclas de

Correspondencia:
Cesar Augusto Roque Borda
equipu.abbc@ucsm.edu.pe

acetonitrilo:agua (50:50), ambas fases acidificadas, se conservaron en la heladera. Las curvas de calibración se realizaron con diluciones sucesivas.

Determinación de Polifenoles Totales por Folin-Ciocalteu. Se tomaron 0,2 mL de extracto etanólico de cada muestra y se colocaron en un tubo de ensayo conteniendo 2 mL de Na_2CO_3 2 % (p/v), se dejó reposar durante 2 minutos y a continuación se agregaron 0,2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 en agua destilada) (11). Se agitó mediante vórtex y, luego de un tiempo de reacción de 30 minutos en la oscuridad, se procedió a la medida de absorbancia en un espectrofotómetro (SHIMADZU UVmini-1240, Japón) a una longitud de onda de 725 nm. Para el ácido gálico, se preparó una solución de 0,2 mg de ácido gálico/mL (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

A fin de conocer las concentraciones de las muestras ensayadas a partir de las absorbancias medidas se utilizó la Ley de Lambert y Beer, representada por la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad \text{Ec. 1}$$

donde A es la absorbancia medida, ϵ es el coeficiente de extinción ($\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), b es el camino óptico (1 cm) y C es la concentración de la muestra (g/L). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante o antirradical de los extractos. Se utilizó el protocolo de Brand-Williams, Cuvelier (12) modificado. Se empleó como medio de reacción una solución de etanol debido a que ensayos previos demostraron que no existían mayores diferencias entre ambos solventes. Se preparó una solución del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•) (Sigma-Aldrich, USA) de 25 mg DPPH•/L etanol a la cual se le realizó un espectro de absorción a fin de determinar la longitud de onda a la cual la absorción es máxima.

Se ensayaron diferentes concentraciones del extracto de *Avena sativa*, se adicionaron 100 μl de cada muestra a 3,9 mL de la solución de DPPH•-etanol y se calculó el porcentaje de inhibición (%) del radical con la siguiente ecuación:

$$I\% = \frac{(\text{Abs. Blanco} - \text{Abs. Muestra})}{\text{Abs. Blanco}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Determinación de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). Se preparó un buffer ácido (300 mM, pH=3,6), para ello se disolvieron 0,0061 g de acetato de sodio ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{O}_2$) en 200 mL de agua destilada, ajustando el pH a 3,6 utilizando ácido clorhídrico (HCl) 40 mM, el cual se preparó diluyendo 5,35 mL de ácido clorhídrico al 37 % en 100 de agua destilada. Se completó el buffer con agua destilada para ajustar a un volumen de 250 mL. Por otro lado, se preparó una solución de cloruro férrico (FeCl_3 20 mM) disolviendo 0,0312 g de cloruro férrico trihidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 25 mL de agua destilada; por último se preparó una solución del reactivo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)triazina) 10 mM, se pesaron 0,0312 g del reactivo TPTZ en un matraz de 10 mL el cual se enrasó con ácido clorhídrico 40 mM. Para obtener la solución completa de FRAP se mezclaron las soluciones obtenidas en las siguientes proporciones: 2,5 mL de la solución clo-

ruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 20 mM), 2,5 mL de la solución TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)triazina) y 25 mL del buffer acetato de sodio, el reactivo se mantuvo en baño termostático a 37 °C. Para la reacción, 90 L de muestras, se añadió 270 L de agua destilada y 270 μL de la solución completa de FRAP, se midió la absorbancia de esta reacción a 595 nm, haciendo una primera lectura a los 5 minutos y una última a los 30 minutos (13, 14).

Ensayo β -caroteno/ácido linoleico. Se utilizó cloroformo (CHCl_3), ácido linoleico ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$), tween 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) (Sigma-Aldrich, USA), agua destilada y β -caroteno (Sigma-Aldrich, USA). Se preparó una solución de β -caroteno en cloroformo (5,01 mg/10 mL). Se pesaron 40 mg de ácido linoleico y 40 mg de tween 20 dentro de un balón y se le adicionó 1 mL de β -caroteno, se removió el cloroformo por evaporación a 40 °C, 20 rpm, 200 mmHg durante 60 minutos en rotavapor. Al residuo se le adicionó lentamente 100 mL de agua destilada por las paredes del balón, luego se agitó vigorosamente formando así una emulsión (observar si es necesaria una dilución). Se preparó una emulsión blanco, sin β -caroteno. Se tomaron 200 μL de la muestra y se le adicionó 5 mL de la emulsión de β -caroteno/ácido linoleico, se tomó la lectura de la absorbancia al minuto cero ($\lambda = 470$ nm) y luego cada 15 minutos hasta que la muestra quede en estado estacionario o hasta 2 h. Los tubos se mantuvieron a 40 °C en baño termostático (15).

Resultados

En el presente trabajo se obtuvieron los extractos utilizando etanol como solvente, ya que además de representar una alternativa económica, tiene la ventaja de ser inocua, lo cual es muy importante teniendo en cuenta que la finalidad es aplicar el extracto en un alimento funcional.

Determinación de la composición del extracto por HPLC.

Utilizando las condiciones de resolución de los componentes de los extractos bajo investigación, se determinó de manera individual el tiempo de retención de cada uno de los compuestos utilizados como estándares. Por otro lado, se adicionaron cada uno de los estándares a las muestras a fin de confirmar la identidad de cada pico. En base a los espectros UV-visible de cada compuesto, se seleccionaron las longitudes de onda correspondientes a los máximos de las bandas de absorción. La identificación de los compuestos presentes en la muestra se realizó en base a los tiempos de retención de los compuestos patrón.

El análisis de las muestras generó el cromatograma que a continuación se presenta (Fig. 1) y mediante el cual se identificaron algunos de los estándares buscados en el extracto.

Se detectó el ácido vainílico (13,219 min), el ácido cumárico (23,618 min), el ácido ferúlico (30,857 min) y el vitexin (40,351 min). Para la cuantificación de los compuestos encontrados en el extracto de avena, se obtuvieron las siguientes curvas de calibración (Fig. 2), de las cuales se dedujeron las ecuaciones lineales correspondientes ($y = ax + b$) que permitieron calcular los contenidos de los compuestos. Según los resultados de la tabla 1, se puede observar que los compuestos ácidos (ácido vainílico, ácido cumárico y ácido ferúlico) presentaron una concentración semejante ($\approx 1,30$ mg compuesto/g de avena) en la muestra de *Avena sativa*, mientras que la concentración de vitexin fue cerca de diez veces más pequeña.

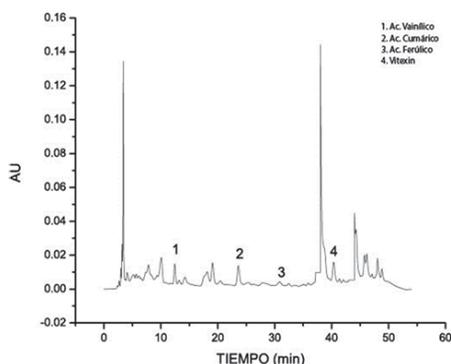


Fig. 1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución realizada en *Avena sativa* proveniente de la ciudad de Arequipa.

Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteau.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de las soluciones, generando la curva patrón y la ecuación ($Y = 5,5055x - 0,0288$, $R^2 = 0,9924$) para los cálculos del ensayo de Folin-Ciocalteu correspondiente al ácido gálico. La expresión como ácido gálico será útil al comparar con extractos antioxidantes provenientes de varias hierbas e incluso *Avena sativa*. A partir de la pendiente de la recta se obtuvo el coeficiente de extinción (ϵ) para determinar la cantidad de mg equivalente de ácido gálico/g de avena. El contenido de polifenoles totales de la muestra de *Avena sativa* (2,04 mg equiv. ác. gálico/g avena) se calculó según la ecuación 1.

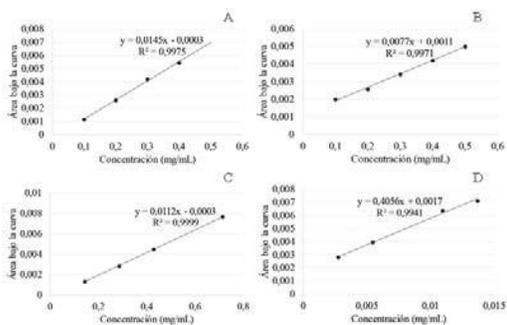


Fig. 2. Curvas de calibración de los patrones analizados por HPLC obtenidas para la cuantificación del ácido vainílico (A), ácido cumárico (B), ácido ferúlico (C) y vitexin (D).

Tabla 1. Concentración de los compuestos identificados por gramo de *Avena sativa*.

Compuesto identificado	Concentración (mg compuesto/g de avena)
ácido vainílico	1,30 ± 0,46
ácido cumárico	1,33 ± 0,36
ácido ferúlico	1,29 ± 0,41

Determinación de la actividad antioxidante por DPPH•, determinación de la capacidad de reducción férrica (FRAP) y Ensayo β -caroteno/ácido linoleico.

En su forma estable el radical DPPH• absorbe a 517 nm, pero luego de ser reducido por un antioxidante (AH) u otra especie radical (R•), la absorción desaparece.

El poder reductor (PR) se expresó en μ moles equivalentes de Fe+2 reducidos por g extracto para lo cual se construyó una curva de calibración de absorbancia a 470 nm versus concentración de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. La curva de calibración se construyó en el rango de 100–1,200 μ mol Fe+2/mL y generó la ecuación ($y = 0,6327x$, $R^2 = 0,9874$) para los cálculos de actividad antioxidante.

El resultado de la actividad antioxidante del extracto de avena determinada por diferentes técnicas está plasmada en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de actividad antioxidante por técnica seleccionada.

Técnica	Actividad Antioxidante
Inhibición del radical libre DPPH (1%)	17,30 ± 1,38
Poder reductor (Ensayo FRAP) (μ Mol Fe+2/g de Avena)	24,46 ± 2,18
Índice antioxidante (IA) Sistema β -Caroteno/Ácido linoleico	58,01 ± 5,60

Discusión

En general, la concentración de los compuestos fenólicos encontrados en la muestra estudiada fue significativamente mayor que lo encontrado en otros trabajos Emmons, Peterson (16). Esta diferencia puede ser por diferencia varietal, condiciones climáticas y locales del origen de la muestra.

La presencia de vitexin, aunque en baja concentración si comparado con los otros compuestos, aporta actividad antioxidante, anticancerígena y anti-mutagénica (17, 18).

Por otro lado, la actividad antioxidante de los extractos de *Avena sativa* se debe al contenido de polifenoles. El estudio de la actividad antioxidante de la *Avena sativa* por tres diferentes métodos (DPPH•, FRAP y Ensayo β -caroteno/ácido linoléico) permite la recomendación de su uso como fuente de antioxidantes naturales.

Según Sánchez-Moreno, Larrauri (19), Brand-Williams, Cuvelier (12) y Schlesier, Harwat (11), la solución de DPPH•-metanol tiene su máximo de absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. En este trabajo, como el solvente empleado fue etanol se determinó el espectro visible para identificar el máximo de

absorción. Se observa que la máxima longitud de onda se registró a 517 nm. Bracesco, Dell (20) también emplearon etanol para la disolución del radical y hallaron la máxima longitud de onda a vitexin 0,13 ± 0,07

517 nm.

Chandra and Mejía (21) en un estudio comparativo de Capulín agarroso (*Ardisia*

compressa), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y té verde (*Camellia sinensis*) sugieren que la heterogeneidad en los compuestos fenólicos y la presencia de sustancias

fácilmente oxidables pueden interferir con el resultado cuando se emplea la técnica de Folin-Ciocalteu. Así, el contenido de polifenoles totales basado en determinados estándares puede subestimar o sobrestimar el valor de polifenoles totales. Sin embargo, para comparar los valores relativos de contenido de polifenoles de yerba mate con las demás hierbas en estudio, estos autores informaron los resultados como equivalentes de galato de epigallocatequina (EGCG), ácido gálico, o catequina, aunque estos compuestos no estén presentes en el extracto de yerba mate.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias al proyecto "Evaluación del Efecto Hepatoprotector Anticancerígeno y Anticancerígeno de la *Avena sativa*" del financiamiento de los Fondos para la Investigación de la Universidad Católica de Santa María 2014 y al Equipo ABBC del Vicerrectorado de Investigación por su apoyo y capacitación continua. También quisiéramos expresar nuestro agradecimiento al Sr. Claudio Reyes en la operación del equipo de HPLC y a Piero Silva por su colaboración constante durante la realización del presente trabajo.

Referencias Bibliográficas

- Andlauer W, Furst P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereal foods world* (USA). 1998.
- Bailey G, Williams D. Potential mechanisms for food-related carcinogens and anticarcinogens. *Food technology* (USA). 1993.
- Peterson DM, Hahn MJ, Emmons CL. Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chemistry*. 2002;79(4):473-8.
- Sardar BR, Singhal RS. Characterization of co-crystallized sucrose entrapped with cardamom oleoresin. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):521-9.
- Durkee A, Thivierge P. Ferulic acid and other phenolics in oat seeds (*Avena sativa* L. var Hinoat). *Journal of Food Science*. 1977;42(2):551-2.
- Collins F, Webster F. Oat phenolics: structure, occurrence, and function. *Oats: Chemistry and technology*. 1986:227-95.
- Collins FW. Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1989;37(1):60-6.
- Duve KJ, White PJ. Extraction and identification of antioxidants in oats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1991;68(6):365-70.
- Dimberg LH, Theander O, Lingnert H. Avenanthramides-a group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chemistry*. 1993;70:637-.
- Xing Y, White PJ. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1997;74(3):303-7.
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*. 2002;36(2):177-87.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(8):3396-402.
- Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
- Valerga J, Shorthose R, Lanari MC. Antioxidant activity of yerba mate extracts: Interactions between the individual polyphenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013;115(5):513-25.
- Emmons CL, Peterson DM, Paul GL. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(12):4894-8.
- Salvador M, Dias D. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart) St. Hill. (Amaranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2004;32:107-10.
- Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Anthocyanins and betalains. Natural colorants for food and nutraceutical uses. 2003:167-219.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;76(2):270-6.
- Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of alternative and complementary medicine* (New York, NY). 2003;9(3):379-87. Epub 2003/06/21.
- Chandra S, Mejia EGD. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004;52:3583-9.