



Perfil de vitamina E en semillas de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas y comercializadas en Costa Rica¹

Vitamin E profile in rice (*Oryza sativa* L.) seeds grown and commercialized in Costa Rica

Valery Conejo-López², Luis Barboza-Barquero², Álvaro Azofeifa-Delgado², Ester Vargas-Ramírez²,
Andrea Irías-Mata²

¹ Recepción: 7 de junio, 2022. Aceptación: 29 de julio, 2022. Este trabajo formó parte de la práctica profesional de la primera autora para optar por el título de Bachiller en Laboratorista Químico.

² Universidad de Costa Rica, Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, San Pedro, Montes de Oca, San José, Costa Rica. valery.conejo@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-4459-2928>); luisorlando.barboza@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-4140-6598>); alvaro.azofeifa@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-2716-3005>); ester.vargas15@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-7651-1961>); andrea.iriasmata@ucr.ac.cr (autor para la correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-3789-3247>).

Resumen

Introducción. El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales más consumidos a nivel mundial, las subespecies índicas y japónicas son las más cultivadas. La vitamina E presente en el arroz posee alta actividad antioxidante que contribuye a extender la longevidad de sus semillas. Su cuantificación permite conocer el aporte nutricional respecto a esta vitamina. **Objetivo.** Analizar el perfil de vitamina E en semillas de las subespecies de arroz (*O. sativa* L.) índicas (comerciales registradas, aromáticas, promisorias en desarrollo) y japónicas, consumidas en Costa Rica. **Materiales y métodos.** Se analizaron veintisiete materiales cultivados en las regiones Chorotega y Brunca, Costa Rica, cosechados en 2020. Se cuantificó la vitamina E por cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a detección por masas de cuadrupolo triple con fuente de ionización química a presión atmosférica, en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, en 2021. **Resultados.** En el perfil de vitamina E se obtuvo un agrupamiento característico para las muestras japónicas, opuesto al presentado por las muestras índicas. Los compuestos mayoritarios fueron γ -tocotrienol, α -tocoferol y γ -tocoferol, el rango de concentración total de vitamina E fue de 5,50 a 33,20 $\mu\text{g g}^{-1}$, donde la subespecie japónica fue la que reportó menor cantidad (6,30 – 8,80 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que la muestra Nayuribe, perteneciente a la subespecie índica comercial registrada obtuvo la concentración más alta (33,20 \pm 7,40 $\mu\text{g g}^{-1}$). **Conclusión.** Aunque las subvariedades analizadas son filogenéticamente de la misma especie, las diferencias significativas encontradas en el aporte nutricional de vitamina E pueden deberse a características intrínsecas de cada subespecie. El contenido significativamente alto de vitamina E de la muestra Nayuribe evidenció que es posible encontrar acervos para alto contenido de vitamina E entre las variedades analizadas.

Palabras clave: tocoferoles, tocotrienoles, semilla, cromatografía, validación.



Abstract

Introduction. Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most consumed cereals worldwide, the indica and japonica subspecies are the most cultivated. The vitamin E present in rice has a high antioxidant activity that contributes to extend the longevity of its seeds. Its quantification allows to know the nutritional contribution of this vitamin. **Objective.** To analyze the vitamin E profile in seeds of indica (registered commercial, aromatic, promising in development) and japonica subspecies of rice (*O. sativa* L.), consumed in Costa Rica. **Materials and methods.** Twenty-seven materials grown in the Chorotega and Brunca regions of Costa Rica, harvested in 2020 were analyzed. Vitamin E was quantified by ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass detection with chemical ionization source at atmospheric pressure at the Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, in 2021. **Results.** In the vitamin E profile, a characteristic clustering was obtained for the japonica samples, which was opposite to that presented by the indica samples. The majority compounds were γ -tocotrienol, α -tocopherol, and γ -tocopherol, the range of total vitamin E concentration was 5.50 to 33.20 $\mu\text{g g}^{-1}$, where the japonica subspecies reported the lowest amount (6.30 – 8.80 $\mu\text{g g}^{-1}$), while the Nayuribe sample, belonging to the registered commercial indica subspecies, obtained the highest concentration (33.20 \pm 7.40 $\mu\text{g g}^{-1}$). **Conclusion.** Although the analyzed subvarieties are phylogenetically from the same species, the significant differences found in the nutritional intake of vitamin E may be due to intrinsic characteristics of each subspecies. The significantly high vitamin E content in the Nayuribe sample showed that it is possible to find stocks for a high vitamin E content among the varieties analyzed.

Keywords: tocopherols, tocotrienols, seed, chromatography, validation.

Introducción

En los últimos años, la demanda de cereales a nivel mundial se ha incrementado. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (conocida por sus siglas en inglés como FAO), dentro de los cereales más consumidos se encuentra el arroz, el cual, para el periodo 2021/2022, se espera que su utilización global aumente en un 1,8% (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2022). En Costa Rica, este grano posee gran importancia dentro de la canasta básica, razón por la cual se cultiva en las cinco principales regiones socioeconómicas del país; durante el periodo 2020/2021 su consumo per cápita fue de 46,83 kg (Corporación Arrocería Nacional [CONARROZ], 2021a).

La especie de arroz más utilizada para cubrir los requerimientos mundiales de este insumo corresponde a *Oryza sativa* L., principalmente la subespecie indica, seguido por la subespecie japonesa (Molkenbuhr, 2020). En las subespecies mencionadas, se han desarrollado, a nivel interno, distintos tipos de arroz, entre ellos los denominados especiales, que, para el caso del arroz indica, un grupo de ellos se puede clasificar en arroz tipo aromático, el cual se distingue por presentar cien veces mayor concentración de 2-acetil-1-pirrolina en comparación con especies no aromáticas, lo cual provoca que posean un aroma y sabor característico, a su vez, se caracterizan por su bajo índice glicémico y por su alto valor comercial (García et al., 2019).

El arroz tipo indica es el más cultivado globalmente por las características que este presenta: planta alta, tropical, sensible a bajas temperaturas, tallo débil con hojas largas y grano fino. Por el contrario, el arroz japonesa se distingue por ser una planta de tipo subtropical, resistente a bajas temperaturas, cultivado en países no tropicales, de hojas, grano y tallo cortos y presenta menor contenido de amilosa (Acevedo et al., 2006).

Debido a las características edafoclimáticas de Costa Rica, el tipo de arroz que mejor se adapta y que se cultiva en el país, corresponde a la subespecie indica; no obstante, el arroz japonesa, aunque no se cultiva, se comercializa en territorio costarricense, junto con el arroz aromático, esto gracias a las importaciones realizadas (CONARROZ, 2021a).

Durante el período 2020/2021, el arroz registrado más utilizado para cubrir la demanda nacional fue del tipo índica, específicamente las variedades Lazarroz FI, Senumisa 20, Palmar 18, Nayuribe y Nayudel (CONARROZ, 2021a). También se cultivan en menor proporción variedades acriolladas o regionales de arroz, las cuales son cultivadas por pequeños agricultores de ladera en zonas muy puntuales del país y con la finalidad de autoabastecer el consumo doméstico (Guadamúz-Mayorga, 2019; Barrantes Rojas, 2019).

Los distintos tipos de arroz que se importan y comercializan en Costa Rica, son empleados con el fin de cubrir las demandas nacionales, ya que la producción de arroz en el país durante los últimos años, no ha sido suficiente para cubrir el consumo nacional, por lo que se debe recurrir a la importación del cultivo (CONARROZ, 2021a). Debido a esto, el estudio y la búsqueda de parámetros que puedan contribuir a la creación de nuevas variedades de arroz o mejoramiento de las ya existentes, se ha convertido en un tema de interés, donde características como la viabilidad y vigor de las semillas son considerados importantes, dada su correlación con la germinación (Hay et al., 2019).

Estudios realizados a nivel internacional, han determinado que la vitamina E (conformada por cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles), posee actividad antioxidante que contribuye a extender la longevidad de las semillas de arroz, lo cual constituye un indicativo de la viabilidad y vigor y, por lo tanto, de su capacidad germinativa (Chen et al., 2016; Lee et al., 2017; 2019).

Los tocoferoles y tocotrienoles poseen una estructura muy similar, ambos contienen un anillo complejo cromanol con una cadena lateral de carbonos, pero se diferencian por la saturación de la cadena, los tocoferoles presentan una cadena saturada y los tocotrienoles una cadena insaturada; a su vez, los ocho compuestos (cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles) se diferencian entre sí por medio de la posición del grupo metilo en el anillo (Greibenstein & Frank, 2012; Zhu et al., 2016).

La vitamina E también juega un rol esencial en la nutrición y salud humana, donde su actividad antioxidante corresponde a su función biológica más importante (Olcott & Mattill, 1931). Dada la gran biodisponibilidad del compuesto α -tocoferol, este desempeña funciones vitales dentro del organismo, por lo que su ausencia en la dieta humana puede ocasionar trastornos neuronales significativos, enfermedades cardiovasculares, cataratas e incluso cáncer (Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds et al., 2000).

Aunque los otros compuestos que conforman la vitamina E no se mantienen en el plasma humano, cuando son absorbidos por el organismo desempeñan funciones importantes dentro de él, diversos estudios han determinado que gracias a la actividad antioxidante de los tocotrienoles, estos poseen propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias, a su vez, actúan como neuroprotectores, mejoran la función cognitiva y contribuyen en la disminución de los niveles de colesterol en el cuerpo humano (Fu et al., 2014; Meganathan & Fu, 2016; Sen et al., 2007). Otros estudios han encontrado evidencia de que los tocoferoles y tocotrienoles, pueden contribuir en la prevención de enfermedades comunes, como la diabetes y enfermedades cardiovasculares, a su vez, mejoran la respuesta inmunitaria y, especialmente los tocotrienoles, contribuyen positivamente en la reducción de la obesidad, al reducir la masa de tejido adiposo (Szewczyk et al., 2021).

La cuantificación del perfil de vitamina E en las semillas de arroz, permite conocer su aporte nutricional respecto a esta vitamina, y si a su vez, se determina su calidad fisiológica, la cual se relaciona con la capacidad germinativa y su vigor, esto permite obtener una base para realizar estudios posteriores en mejoramiento genético de las variedades existentes. No obstante, los estudios realizados sobre el contenido nutricional del cereal, donde se incluye el contenido de vitamina E, se han realizado a nivel internacional y con variedades asiáticas (Gunaratne et al., 2013; Ito & Lacerda, 2019; Longvah et al., 2021; Yu et al., 2020; Zubair et al., 2012). En el caso de Costa Rica, se han realizado estudios del contenido de otros nutrientes en arroz, como lo son los ácidos grasos (Monge-Rojas & Nuñez, 2006), pero no se cuenta con un estudio específico del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en las variedades de arroz que consumen los costarricenses.

Los métodos analíticos más utilizados para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles corresponden a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia o a un detector de masas,

ambos detectores son considerados selectivos y eficientes, dado que logran la identificación y cuantificación de los ocho isómeros que conforman la vitamina con una buena sensibilidad, en comparación con otros detectores, como el UV/Vis (Bell et al., 2014; Lauridsen et al., 2001). Se ha determinado que se pueden disminuir los tiempos de análisis, obtener mejor compatibilidad con matrices biológicas y el uso de disolventes menos contaminantes, al emplear la cromatografía líquida en fase reversa y lograr una separación eficiente de los ocho isómeros con el empleo de una columna de pentafluorofenilo (PFP) (Greibenstein & Frank, 2012).

Debido a la necesidad de conocer la calidad fisiológica y el aporte nutricional de vitamina E de las variedades de arroz que se cultivan y comercializan en Costa Rica, resulta indispensable identificar y cuantificar el contenido de tocoferoles y tocotrienoles en las mismas, para de esta manera determinar cuáles son las variedades predominantes y deficientes en estos compuestos. El objetivo de este estudio fue analizar el perfil de vitamina E en semillas de las subespecies de arroz (*O. sativa* L.) índicas (comerciales registradas, aromáticas, promisorias en desarrollo) y japónicas, consumidas en Costa Rica.

Materiales y métodos

Selección y preparación de los materiales de arroz

Se seleccionaron en total veintisiete materiales de arroz (*O. sativa* L.). Dentro de estos se incluyeron cuatro muestras de la subespecie japónica (UCR-205-18, UCR-206-18, UCR-207-18 y UCR-208-18) y el resto (veintitrés) de la subespecie índica de la siguiente manera: índicas comerciales registradas (n=5) (Lazarroz, Nayudel, Nayuribe, Palmar18 y Senumisa 20), índicas aromáticas (n=7) (UCR-170-15, UCR-166-10, UCR-167-10, UCR-167-10, UCR-163-10, UCR-162-10, UCR-165-10, UCR-165-10 y UCR-161-10, e índicas promisorias en desarrollo (n=11) (UCR-03-08, UCR-01-08, UCR-02-08, UCR-77-08, UCR-153-10, UCR-154-10, UCR-200-18, UCR-201-18, UCR-202-18, UCR-203-18 y UCR-204-18). Las características varietales de las muestras índicas comerciales registradas se describen en el registro de variedades comerciales de arroz (Oficina Nacional de Semillas, 2020), estos materiales fueron suministradas por la empresa SENUMISA, ubicada en Barrio La Trinidad, Alajuela, Costa Rica. Las demás variedades fueron proporcionadas por el Laboratorio de Mejoramiento de los Cultivos del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), las cuales forman parte del banco de germoplasma de arroz de dicho centro. Todas las variedades de arroz fueron producidas bajo un sistema comercial de producción de semillas en las regiones Chorotega y Brunca. Su cosecha se realizó en diciembre del 2020.

La nomenclatura empleada para distinguir las muestras ensayadas fue asignada de la siguiente manera: para las variedades índicas comerciales registradas se mantuvo su respectivo nombre comercial. Para las demás variedades se utilizó el mismo código de ingreso de la accesión de arroz utilizado en el banco germoplasma del CIGRAS. Este consiste en las siglas UCR, un guion, un número consecutivo, un guion, y el año de ingreso a la colección de germoplasma.

Para cada grupo de subespecie, se eligió la muestra que obtuvo mayor contenido de vitamina E como material representativo, a su vez, se determinó el rango de cada tocoferol y tocotrienol, donde se consideraron las concentraciones obtenidas por todos los materiales dentro de cada subespecie. A todas las muestras se les cuantificó su humedad previa al almacenamiento, para verificar que se encontrara entre 12-14 % en base seca.

Para cada variedad se tomó una muestra de 50 g de arroz en granza (grano completo con cáscara), las cuales fueron almacenadas de forma inmediata a -80 °C. Con el fin de realizar el procedimiento de extracción de tocoferoles y tocotrienoles a los materiales previamente seleccionados, preparados y almacenados, cada muestra de arroz en granza se molió hasta formar un polvo uniforme, por medio de un molino de laboratorio con discos de molienda que se ajustaron a una molienda fina (ajuste 1 en la distancia entre los discos de molienda).

Análisis de vitamina E por UHPLC-MS

Para poder llevar a cabo la cuantificación de los tocoferoles y tocotrienoles, primero, se realizó la extracción de vitamina E en las muestras evaluadas, luego, se identificaron los respectivos tiempos de retención para cada compuesto, donde estos se compararon con las respectivas masas iónicas obtenidas, la cuantificación se realizó por medio de un método validado de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a detección por masas (UHPLC-MS), el cual se describe a continuación. Todos los ensayos de la presente investigación se desarrollaron en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica), en el año 2021.

Extracción de vitamina E

Para las muestras del grano completo de arroz en granza molido seleccionadas y preparadas, se realizó la extracción de vitamina E por cuadruplicado según lo propuesto por Calvo-Castro et al. (2019) e Irías-Mata et al. (2017). Por cada réplica se pesaron 200 mg de material molido fresco en un tubo de ensayo, se agregaron 2 mL de una disolución de ácido ascórbico al 1 % en etanol (m/v), 900 μ L de agua desionizada y 600 μ L de una disolución saturada de hidróxido de potasio. La disolución obtenida se saponificó a 70 °C en un baño maría durante 30 min, con agitación esporádica cada 15 min, transcurrido este tiempo, la muestra se enfrió en un baño de hielo por 5 min. Luego se agregaron 25 μ L de una disolución de BHT (1 mg mL⁻¹), 1 mL de agua desionizada, 600 μ L de ácido acético glacial y 2 mL de hexano, las muestras se agitaron durante 1 min con una sonda ultrasónica, luego se centrifugaron en la centrífuga a 188xg y 4 °C durante 3 min. Transcurrida la centrifugación, se tomaron 1,5 mL del sobrenadante y se agregaron a un nuevo tubo de ensayo. La extracción con hexano se repitió una segunda vez con 2 mL de hexano y se recolectaron de nuevo 1,5 mL de sobrenadante, la tercera extracción se realizó con 2 mL de hexano y se recolectaron 2 mL de sobrenadante. Todos los sobrenadantes se combinaron y se llevaron a sequedad en una centrífuga con evaporación al vacío. Los extractos obtenidos se resuspendieron en 250 μ L de metanol, se filtraron con un filtro de 0,2 μ m y se transfirieron a viales de HPLC.

Identificación y cuantificación por UHPLC-MS

Se analizaron al menos cuatro réplicas por muestra y cada una se inyectó una vez para el análisis por UHPLC-MS.

Se implementó el protocolo publicado por Grebenstein y Frank (2012) para las condiciones de separación cromatográfica con algunas adaptaciones. Los tocoferoles y tocotrienoles fueron separados con un cromatógrafo líquido de ultra-alta resolución (UHPLC) en fase reversa con una columna PFP (100 * 2,1 mm, 1,7 μ m de tamaño de partícula) y una fase móvil metanol: agua 85:15 v/v con un flujo isocrático de 0,250 mL/min para un tiempo total de medición de 10 min, se utilizó la temperatura de la columna y el automuestreador a 40 y a 6 °C, respectivamente.

La detección de vitamina E se realizó con un detector de masas de cuadrupolo triple con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), la cual operó en polaridad negativa en modo de escaneo de reacciones seleccionadas (SRM), con un tiempo de ciclo de 1 s, los ajustes de masa fueron los siguientes: descarga de corona, 10 V (negativo); flujo de gas envolvente, 25 arb; flujo de gas auxiliar, 5 arb; flujo de gas de barrido, 0 arb; temperatura del tubo de transferencia de iones, 250 °C; temperatura del vaporizador, 325 °C; y gas inducido por colisión, 1,5 mTorr.

Los picos cromatográficos obtenidos del UHPLC-MS se registraron e integraron con el software Xcalibur (versión 3.1).

Biblioteca de iones de estándares de tocoferoles y tocotrienoles

Anterior a la validación del método de análisis, se validaron los parámetros de ionización para cada tocoferol y tocotrienol en el detector de masas. Para identificar las masas iónicas de estándares auténticos de tocoferoles y tocotrienoles (estos últimos fueron donados por la Universidad de Hohenheim, Alemania), se inyectó de manera individual 500 ng mL⁻¹ de cada estándar directo en el detector de masas y se monitoreó sus masas iónicas (m/z) (ion precursor y productos iónicos) en el rango de masas de 200-1000 m/z. Luego, se generó una biblioteca de iones para estos compuestos en el software TSQ Endura del detector de masas.

Validación del método de análisis

Para la validación del método de análisis se verificaron los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y efecto matriz, según los lineamientos de validación de métodos bioanalíticos de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), donde se adaptó el protocolo de HPLC del procedimiento publicado por Grebenstein y Frank (2012). A las muestras enriquecidas a bajas (0,5 µg mL⁻¹), medianas (5,0 µg mL⁻¹) y altas (25,0 µg mL⁻¹) concentraciones, empleadas en la validación, se les añadió las alícuotas correspondientes de una solución estándar mixta.

Linealidad y sensibilidad

Se prepararon tres curvas de calibración de nueve patrones (rango de concentraciones de 0,0117 - 25 µg mL⁻¹), así como blancos de calibración, que corresponden a patrones sin analitos, luego se midió cada una por triplicado. A partir de las curvas obtenidas, se determinó el rango de concentración lineal de los tocoferoles y tocotrienoles, así como sus respectivos coeficientes de correlación. Se aplicó el método de mínimos cuadrados a las curvas resultantes para obtener los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), estos indican, respectivamente, la cantidad de analito inyectado en el HPLC que puede ser detectada de forma confiable a partir del ruido de fondo del sistema y la cantidad más baja que puede ser cuantificada con la exactitud y precisión requerida.

Precisión

La precisión inter-día fue determinada al medir disoluciones estándar de tocoferoles y tocotrienoles enriquecidas a bajas (0,5 µg mL⁻¹), medianas (5,0 µg mL⁻¹) y altas (25,0 µg mL⁻¹) concentraciones, donde se midió tres veces cada estándar en un mismo día. La precisión intra-día, se determinó de la misma manera, con la diferencia de que las mediciones fueron realizadas en tres días independientes, se midió tres veces cada uno de los estándares en cada día.

Efecto matriz

Se utilizaron muestras enriquecidas a bajas (0,5 µg mL⁻¹), medianas (5,0 µg mL⁻¹) y altas (25,0 µg mL⁻¹) concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles, junto con una muestra sin enriquecer que se utilizó como blanco. Se midió tres veces cada muestra con el fin de obtener curvas de calibración, luego las pendientes de dichas curvas fueron comparadas con las pendientes obtenidas a partir de estándares a las mismas concentraciones, esto permitió evaluar la supresión o engrandecimiento de la señal y el porcentaje de efecto matriz, el cual se obtuvo al emplear la ecuación 1.

$$EM (\%) = [((\text{Pendiente Curva EI}) / (\text{Pendiente curva convencional})) - 1] \times 100 \quad (1)$$

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Rstudio (4.1.0). Todos los valores reportados corresponden a promedios con su desviación estándar. Los análisis de varianza (ANOVA) de un factor junto con la prueba de comparación múltiple de Tukey se realizaron a un 95 % de confianza para determinar si existen diferencias significativas en las medias de las concentraciones obtenidas para cada compuesto entre variedades, así como dentro de una misma variedad ($p < 0,05$). Se realizaron análisis de componentes principales para evaluar agrupamientos entre variedades de arroz y contenidos de tocoferoles y tocotrienoles.

Resultados

Análisis de vitamina E por UHPLC-MS

En lo referente a las condiciones para la separación y detección de los tocoferoles y tocotrienoles, se combinó el uso de los tiempos de retención en la columna cromatográfica y las masas iónicas de los analitos.

Para los compuestos α y δ , la relación masa carga (m/z) del ion precursor y de los productos iónicos resulta diferente, por lo que se pueden diferenciar sin ningún problema con sus masas iónicas. En cambio, estos valores en los compuestos β y γ fueron iguales (Cuadro 1), esto porque son isómeros y difieren en la posición de un grupo metilo en el anillo (Figura 1), por esta razón no es posible diferenciarlos a través de sus fragmentos iónicos y su respectiva diferenciación solo se puede realizar a través de su tiempo de retención. Debido a esto, fue que se utilizó la columna PFP, la cual es capaz de separar estos isómeros y los otros compuestos que conforman la vitamina E en un tiempo de 10 min (Figura 2), con otras columnas no es posible llevar a cabo de forma satisfactoria la separación de los ocho compuestos.

Cuadro 1. Tiempos de retención (min) y masas iónicas (m/z) para la detección por UHPLC-APCI(-)-MS de los tocoferoles y tocotrienoles en arroz (*Oryza sativa* L.). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Table 1. Retention times (min) and ionic mass (m/z) for the detection of tocopherols and tocotrienols by UHPLC-APCI(-)-MS in rice (*Oryza sativa* L.). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	Productos iónicos (m/z)
α -tocoferol (α T)	8,5	429	163; 203
β -tocoferol (β T)	6,5	415	149; 189
γ -tocoferol (γ T)	6,9	415	149; 189
δ -tocoferol (δ T)	5,2	401	135; 175
α -tocotrienol (α T3)	4,6	423	163; 203
β -tocotrienol (β T3)	3,6	409	149; 189
γ -tocotrienol (γ T3)	3,9	409	149; 189
δ -tocotrienol (δ T3)	3,0	395	135; 175

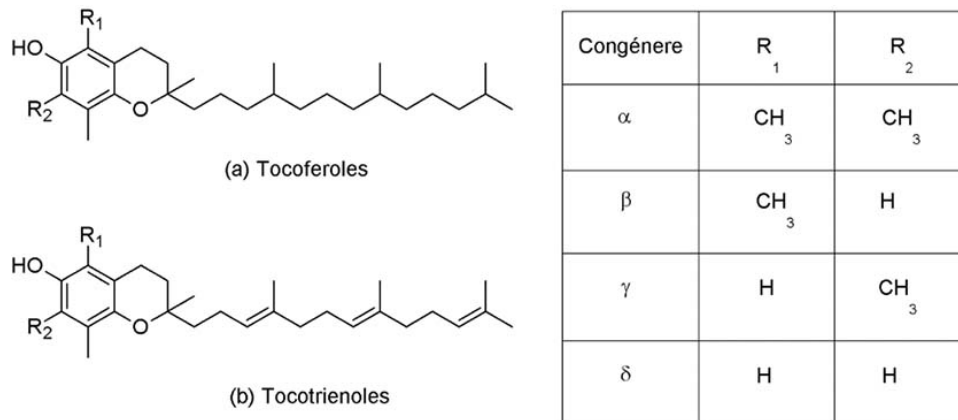


Figura 1. Estructuras químicas y patrones de metilación de los tocoferoles y tocotrienoles que conforman la familia de la vitamina E. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Figure 1. Chemical structures and methylation patterns of the tocopherols and tocotrienols that comprise the vitamin E family. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

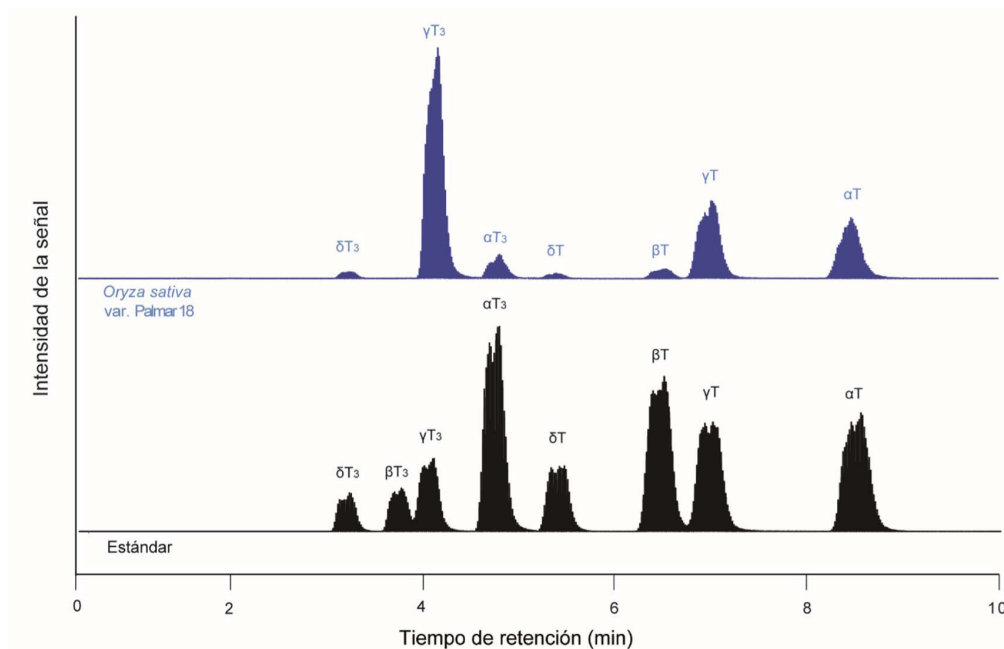


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por UHPLC-APCI(-)-MS de la separación de los tocoferoles y tocotrienoles en una muestra del grano completo de arroz en granza molido (*Oryza sativa* L.), variedad índica comercial registrada Palmar 18 (azul, arriba) y en una muestra de estándares (negro, abajo). Las condiciones de separación e identificación utilizadas para la obtención de los cromatogramas se describen en la sección de metodología de identificación y cuantificación por UHPLC-MS. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Figure 2. Chromatograms obtained by UHPLC-APCI(-)-MS of the separation of tocopherols and tocotrienols in a sample of the complete grain of paddy rice (*Oryza sativa* L.) ground, registered variety indica commercial named Palmar 18 (blue, top) and in a standards mix (black, bottom). The separation and identification conditions used to obtain the chromatograms are described in the UHPLC-MS identification and quantification methodology section. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

Con respecto a la validación del método de análisis, los resultados de validación (Cuadro 2) demuestran que los tocoferoles y tocotrienoles presentaron buena linealidad (coeficientes de correlación superiores a 0,995) en el rango de concentración de 0,000-25,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A su vez, se obtuvieron límites de detección y cuantificación entre 0,045-0,112 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0,150-0,373 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, lo cual denota buena sensibilidad.

Cuadro 2. Parámetros analíticos de verificación del método de análisis por UHPLC-(APCI)-MS de los tocoferoles y tocotrienoles. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Table 2. Analytical parameters of verification of the method of analysis of tocopherols and tocotrienols by UHPLC-(APCI)-MS. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r) ¹	Límite de detección ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisión intra-día (%EER) ²	Precisión inter-día (%EER) ²	Efecto matriz (%) ³
α -tocoferol	0,9993	0,112	0,373	8	27	-1
β -tocoferol	0,9999	0,051	0,169	13	28	-2
γ -tocoferol	0,9998	0,047	0,157	12	27	-8
δ -tocoferol	0,9999	0,055	0,184	13	28	-13
α -tocotrienol	0,9999	0,052	0,173	10	29	29
β -tocotrienol	0,9995	0,050	0,166	13	31	11
γ -tocotrienol	0,9999	0,048	0,159	13	29	17
δ -tocotrienol	0,9998	0,045	0,150	13	34	6

¹ Evaluado en un rango de concentración lineal de 0,000-25,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.² EER= error estándar relativo; criterio de aceptación, ± 15 -20 %.

³ Efecto matriz representa el porcentaje de mejora (+) o supresión (-) de la señal analítica en la ionización de los compuestos en el arroz.

¹ Evaluated in a linear concentration range of 0,000-25,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.² EER= relative standard error; acceptance criterion, ± 15 -20 %.³ Matrix effect represents the percentage of enhancement (+) or suppression (-) of the analytical signal in the ionization of compounds in rice.

La precisión intra-día cumplió con el criterio de aceptación establecido por la FDA (± 15 -20 %) (Cuadro 2), dado que el error estándar relativo (EER) para cada compuesto estuvo entre 8-13 %. Por otro lado, la precisión inter-día no logró cumplir con dicho criterio, pues se obtuvo un EER entre 27-34 %.

Acorde con los resultados del efecto matriz, la ionización de los analitos se vio influenciada de manera distinta por la matriz de arroz. Para los tocotrienoles se obtuvo una mejora de la ionización (valores positivos), con un máximo de 29 %, mientras que para los tocoferoles se obtuvo un máximo 13 % de supresión en la ionización (valores negativos) (Cuadro 2).

Cuantificación de vitamina E en las variedades evaluadas

Las concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles obtenidas para cada una de las variedades representativas se muestran en el Cuadro 3, los análisis de varianza realizados permitieron comparar las medias de las concentraciones de isómeros entre variedades (comparación entre filas), así como las medias de las concentraciones de dichos compuestos por variedad (comparación por columna).

Al realizar la comparación de medias de concentración por filas (Cuadro 3), los resultados estadísticos indicaron que para el compuesto α -tocoferol, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas entre las muestras evaluadas ($p > 0,05$), no obstante, la muestra Nayuribe perteneciente a la variedad índica comercial

Cuadro 3. Contenido de tocotrienoles y tocoferoles (promedio \pm desviación estándar) en semillas de muestras representativas de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) de Costa Rica. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Table 3. Tocotrienols and tocopherols content (mean \pm standard deviation) in seeds of representative rice (*Oryza sativa* L.) varieties samples from Costa Rica. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

Compuesto	Concentración en semillas molidas de arroz [$\mu\text{g/g}$] ¹							
	Índica comercial registrada		Índica aromática		Índica promisoría en desarrollo		Japónica	
	Nayuribe		UCR-162-10		UCR-03-08		UCR-207-18	
	Promedio	Rango (n= 5) ²	Promedio	Rango (n=7) ²	Promedio	Rango (n=11) ²	Promedio	Rango (n=4) ²
α -tocoferol	3,80 \pm 0,90 ^{Aa}	1,20 - 3,80	2,00 \pm 1,00 ^{Aa}	0,90 – 2,20	2,00 \pm 1,00 ^{Aa}	0,60 – 2,00	2,80 \pm 0,70 ^{Ba}	2,20 – 3,00
β -tocoferol	0,17 \pm 0,03 ^{Aa}	0,11 - 0,17	0,15 \pm 0,04 ^{Aa}	0,11 – 0,15	0,14 \pm 0,02 ^{Aa}	0,08 – 0,14	0,17 \pm 0,03 ^{Aa}	0,17 – 0,20
γ -tocoferol	0,80 \pm 0,20 ^{Aa}	0,80 - 1,90	1,90 \pm 0,80 ^{Ab}	0,20 – 2,10	2,90 \pm 0,70 ^{Ab}	0,41 – 2,09	0,50 \pm 0,10 ^{Aa}	0,50 – 0,60
δ -tocoferol	0,12 \pm 0,01 ^{Aa}	0,12 - 0,15	0,19 \pm 0,06 ^{Ab}	0,09 – 0,21	0,21 \pm 0,02 ^{Aab}	0,08 – 0,21	0,10 \pm 0,01 ^{Aa}	0,10 – 0,16
α -tocotrienol	0,70 \pm 0,20 ^{Ab}	0,30 - 0,70	0,30 \pm 0,10 ^{Aa}	0,30 – 0,25	0,30 \pm 0,10 ^{Aa}	0,16 – 0,57	0,52 \pm 0,07 ^{Aab}	0,39 – 0,52
β -tocotrienol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
γ -tocotrienol	27,00 \pm 6,00 ^{Bb}	9,00 – 27,00	20,00 \pm 8,00 ^{Bb}	6,00 – 20,00	17,00 \pm 2,00 ^{Bb}	4,30 – 17,00	4,30 \pm 0,60 ^{Ca}	2,70 – 4,00
δ -tocotrienol	0,60 \pm 0,10 ^{Ab}	0,21 - 0,60	0,70 \pm 0,20 ^{Aa}	0,29 – 0,70	0,26 \pm 0,03 ^{Ab}	0,14 – 0,40	0,38 \pm 0,05 ^{Aab}	0,24 – 0,40
Total								
vitamina E	33,20 \pm 7,40 ^{Bb}	13,20 - 33,20	25,20 \pm 10,20 ^{Bb}	13,70 – 25,20	22,80 \pm 3,80 ^{Cb}	5,50 – 22,80	8,80 \pm 1,60 ^{Ba}	6,30 – 8,80

¹Comparación de medias con la prueba de Tukey; valores dentro de una fila que no comparten una letra minúscula en común y valores dentro de una columna que no comparten una letra mayúscula en común son significativamente diferentes con un $p < 0,05$. ²Rangos mostrados incluyen a todos los materiales de cada grupo. n.d; no detectable / ¹Comparison of means with Tukey's test; values within a row that do not share a common lowercase letter and values within a column that do not share a common uppercase letter are significantly different at $p < 0,05$. ²Ranges shown include all materials of each group. n.d; not detectable.

registrada resultó ser la predominante (3,80 \pm 0,90 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que las muestras UCR-162-10 y UCR-03-08 pertenecientes a las variedades índica aromática e índica promisoría, respectivamente, resultaron ser deficientes en este compuesto, y se obtuvo para ambas una concentración de 2,00 \pm 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$.

El contenido de β -tocoferol resultó ser, en general, bajo para todas las muestras, sin diferencias significativas entre las concentraciones ($p > 0,05$). La muestra Nayuribe (índica comercial registrada) junto con la muestra UCR-207-18 (japónica), obtuvieron el valor más alto de concentración (0,17 \pm 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$); por otra parte, la muestra UCR-03-08, perteneciente a la subvariedad índica promisoría, obtuvo el contenido más bajo (0,14 \pm 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Las concentraciones obtenidas del compuesto γ -tocoferol en las muestras UCR-162-10 (índica aromática) y UCR-03-08 (índica promisoría), resultaron ser significativamente altas ($p < 0,05$) (1,90 \pm 0,80 y 2,90 \pm 0,70 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), en comparación con las concentraciones de las muestras Nayuribe (índica comercial) (0,80 \pm 0,20 $\mu\text{g g}^{-1}$) y UCR-207-18 (japónica) (0,50 \pm 0,10 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Se observó que el contenido de δ -tocoferol fue alto (0,19 \pm 0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$) en la variedad índica aromática (UCR-162-10) y significativamente diferente al encontrado en las variedades índica comercial registrada (Nayuribe) y japónica (UCR-207-18) ($p < 0,05$). Por su parte, el contenido de este isómero en la variedad índica promisoría en desarrollo (UCR-03-08), no presentó diferencias significativas con ninguna media de concentración obtenida en las otras variedades ($p > 0,05$).

Para el isómero α -tocotrienol, no se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras UCR-162-10 (índica comercial registrada) y UCR-03-08 (índica promisoría) ($p > 0,05$), dado que ambas presentaron la misma concentración (0,30 \pm 0,10 $\mu\text{g g}^{-1}$); no obstante, la muestra Nayuribe (índica comercial registrada), sí difirió significativamente de estas muestras, dado que su contenido fue significativamente más alto (0,70 \pm 0,20 $\mu\text{g g}^{-1}$).

($p < 0,05$). La media de concentración de este compuesto en la muestra UCR-207-18 (japónica), no fue diferente significativamente de las demás muestras ($p > 0,05$).

Para el compuesto γ -tocotrienol, las medias de concentraciones obtenidas para cada variedad resultaron ser altas, no obstante, la muestra Nayuribe, perteneciente a la variedad índica comercial registrada fue la que obtuvo un contenido predominante de este compuesto ($27,00 \pm 6,00 \mu\text{g g}^{-1}$); aunque las muestras UCR-162-10 (índica aromática) y UCR-03-08 (índica promisoría) también reportaron un contenido alto de este isómero ($20,00 \pm 8,00$ y $17,00 \pm 2,00 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), sin diferencias significativas entre estas muestras y la muestra Nayuribe ($p > 0,05$). La muestra UCR-207-18 (japónica) obtuvo una media de concentración de este compuesto significativamente menor ($4,30 \pm 0,60 \mu\text{g g}^{-1}$), lo que resultó en una diferencia significativa al ser comparada con las otras variedades ($p < 0,05$) (Cuadro 3).

Se observó, en las medias de concentración reportadas para el isómero δ -tocotrienol, que la muestra UCR-162-10 (índica aromática) resultó ser la que tuvo una media mayor de concentración ($0,70 \pm 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$), lo cual la hizo diferir significativamente a la media reportada por las muestras Nayuribe (índica comercial registrada) y a la muestra UCR-03-08 (índica promisoría) ($p < 0,05$); por su parte, la media de la muestra UCR-207-18 (japónica) obtenida para este isómero, no difirió significativamente de las medias reportadas en las otras muestras ($p > 0,05$).

Respecto al contenido total de vitamina E, la muestra Nayuribe (índica comercial registrada), fue la que mostró la media de concentración más alta de tocoferoles y tocotrienoles ($33,20 \pm 7,40 \mu\text{g g}^{-1}$), seguida de las muestras UCR-162-10 (índica aromática) y UCR-03-08 (índica promisoría) ($25,20 \pm 10,20$ y $22,80 \pm 3,80 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente); mientras que la muestra UCR-207-18 (japónica) fue la que obtuvo una media menor de estos isómeros ($8,80 \pm 1,60 \mu\text{g g}^{-1}$), por lo que existen diferencias significativas entre las medias del contenido total de vitamina E de estas muestras índicas respecto a la japónica, más no diferencias significativas entre las índicas ($p < 0,05$).

Al realizar la comparación de las medias de concentración por columna, es decir, concentraciones obtenidas en cada variedad, se pudo observar que el compuesto mayoritario en todas las muestras, correspondió a γ -tocotrienol, donde en todos los casos, la media de concentración de dicho isómero fue significativamente diferente a las medias reportadas para los otros isómeros dentro de cada variedad ($p < 0,05$).

Las muestras Nayuribe (índica comercial registrada), UCR-162-10 (índica aromática) y UCR-03-08 (índica promisoría en desarrollo) no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la concentración del compuesto α -tocoferol y las concentraciones de los otros isómeros (se excluye el compuesto γ -tocotrienol), aunque el primero resultó ser el segundo compuesto con la concentración más alta dentro de cada una de las variedades mencionadas.

En el caso de la muestra UCR-207-18 (japónica), la concentración del α -tocoferol fue la segunda media de concentración más alta, y significativamente diferente a las medias de concentración obtenida para los otros isómeros de la vitamina E ($p < 0,05$).

Al observar las concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles dentro de cada variedad evaluada, es evidente que los compuestos presentes en menor concentración correspondieron a los compuestos β y δ -tocoferol, sin embargo, las medias de concentración obtenidas para dichos isómeros dentro de las muestras Nayuribe (índica comercial registrada), UCR-162-10 (índica aromática) y UCR-03-08 (índica promisoría en desarrollo), no difirieron significativamente a la media de concentración reportada para los isómeros α , γ -tocoferol y α y δ -tocotrienol. En el caso de la muestra UCR-207-18 (japónica), la cantidad obtenida de estos compuestos resultó ser significativamente diferente a la media de los compuestos α -tocoferol y γ -tocotrienol ($p < 0,05$), pero no así al ser comparado con los compuestos γ -tocoferol y α -tocotrienol ($p > 0,05$).

El análisis de componentes principales de los distintos isómeros de la vitamina E, indicó que los componentes 1 y 2 juntos explican un 76,9 % de la variación en los datos (Figura 3). Se observó un claro agrupamiento de las muestras japónicas separadas y opuestas a las índicas comerciales registradas, promisorias en desarrollo y aromáticas, que no presentan una clara separación entre sí. Además, la variable concentración de γ -tocotrienol

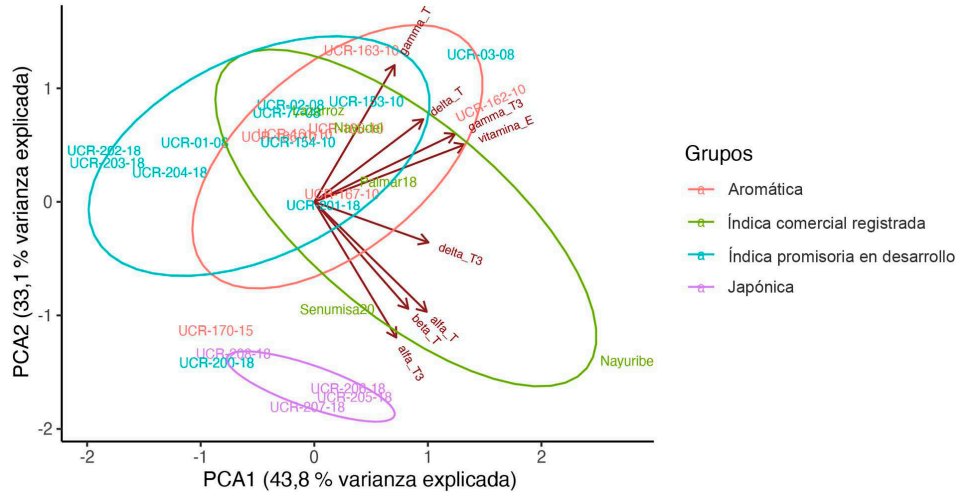


Figura 3. Análisis de componentes principales del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en las variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) de Costa Rica. Los porcentajes representan la proporción de variación explicada por cada eje. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2021.

Figure 3. Principal component analysis of tocopherols and tocotrienols contents in rice (*Oryza sativa* L.) varieties from Costa Rica. The percentages represent the proportion of variation explained by each axis. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2021.

correlacionó con la concentración total de vitamina E, el cual fue el componente que aportó el mayor peso al contenido total de vitamina E. Por último, Nayuribe, ubicado en el extremo máximo de la escala, fue el material con mayor contenido de vitamina E ($33,20 \pm 7,40 \mu\text{g g}^{-1}$), que la diferencia de las demás muestras analizadas, sin importar el tipo o subtipo de arroz.

Discusión

La fragmentación iónica de los tocoferoles y tocotrienoles en el detector de masas se explica a través de su estructura química (Figura 1). Cuando cada uno de estos isómeros se fragmenta, se obtiene como primer ion (ion precursor) el anión del anillo cromanol (M-H), las masas obtenidas para el ion precursor en cada compuesto difieren, debido a que el anillo cromanol en cada isómero está compuesto por distintos sustituyentes, en algunos casos, está sustituido con dos grupos metilo, en otros con un grupo metilo y un hidrógeno, tal como se muestra en la Figura 1. El anillo cromanol es el ion precursor, dado que es el grupo funcional común en los isómeros que conforman la vitamina E, las otras fragmentaciones obtenidas corresponden a fragmentaciones secundarias de este ion (Zhu et al., 2016).

Los parámetros de verificación del método de análisis empleado en el UHPLC-MS, cumplieron con los criterios de aceptación, con la excepción de la precisión inter-día. Esto se debió a que los tocoferoles y tocotrienoles son muy sensibles a la luz y a la temperatura, por lo que su estabilidad disminuye con el transcurso de los días (Delgado-Zamarreño et al., 2009). Los resultados de efecto matriz presentaron porcentajes de afectación entre $\pm 1-29\%$, según del isómero de vitamina E, donde con los tocoferoles hay supresión y con los tocotrienoles engrandecimiento de la señal analítica (Cuadro 2), valores coincidentes con reportes previos, donde se obtuvo que no generan un efecto considerable en su ionización, ya que la variación está dentro de la incertidumbre del método (Ansolin et al., 2017).

Los contenidos de tocoferoles y tocotrienoles observados concuerdan con valores reportados en la literatura, donde se coincide en que el compuesto γ -tocotrienol seguido por el α -tocoferol, resultan ser los isómeros de la vitamina E que se encuentran en mayor cantidad en el arroz, mientras que los compuestos β y δ -tocoferol y δ -tocotrienol se presentan en muy baja cantidad (Huang & Ng, 2011; Shammugasamy et al., 2015; Zhang et al., 2012). El β -tocotrienol (β T3) se encuentra a niveles no detectables por el método de análisis utilizado, por lo que no se logró cuantificar en ninguna de las muestras evaluadas, algo coincidente con reportes previos donde tampoco fue cuantificable en el arroz (Lee et al., 2019). La similitud en los resultados se debe a que los estudios también fueron realizados en la especie de arroz *O. sativa* L.

La cantidad predominante de α -tocoferol y γ -tocotrienol que contiene el arroz consumido en Costa Rica es muy importante en términos de nutrición y salud, principalmente por la importancia de estos compuestos en la dieta humana. El α -tocoferol es el compuesto que presenta mayor actividad vitamínica, dado que es el que se mantiene en grandes cantidades en el plasma humano y tejidos, esto gracias a su afinidad con la proteína de transferencia hepática α -tocoferol; los otros isómeros son biológicamente activos, pero no presentan afinidad con esta proteína, lo cual provoca su poca acumulación en el cuerpo humano (Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds et al., 2000; Szewczyk et al., 2021).

Aunque el compuesto α -tocoferol resultó ser el segundo con la concentración más alta en todas las subvariedades evaluadas, las cantidades obtenidas no alcanzan los requerimientos nutricionales diarios, dado que la dosis recomendada para personas es de 15 mg/día (Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds et al., 2000). Sin embargo, las muestras de arroz evaluadas podrían aportar en estos requerimientos, porque el arroz es consumido en los tres tiempos de comida de un costarricense, en un promedio de 140 g por tiempo de alimentación. (CONARROZ, 2021b). Acorde con este valor, los costarricenses al consumir el arroz Nayuribe, obtendrían 0,532 mg del compuesto en cada tiempo de comida, por lo que el aporte diario sería de 1,60 mg de α -tocoferol; lo equivalente al 11 % del requerimiento diario de vitamina E.

Una persona promedio no puede adquirir todos sus requerimientos de vitamina E del arroz, ya que implicaría el consumo de kilos de arroz al día; además, el arroz no es la única fuente en la dieta que aporte vitamina E. Además, es importante rescatar que el arroz analizado en este estudio se encontraba en forma de semilla en granza y el arroz antes de ser comercializado como grano para consumo es sometido a varios procesos, como el descascarado, almacenamiento y fraccionamiento, que pueden afectar sus características físicas y nutricionales (Salazar et al., 2019). En Costa Rica, existe el Reglamento para el Enriquecimiento del Arroz, en el cual se detalla que el arroz pilado destinado para consumo humano debe ser enriquecido con ciertos nutrientes, incluida la vitamina E, y el nivel mínimo de esta, expresado como α -tocoferol debe ser 15,0 UI (9,99 mg) (Presidencia de la República & Ministerio de Salud, 2002). Con base en lo anterior, los datos brindados sobre el aporte de vitamina E en las semillas de arroz no consideran factores propios de su procesamiento para consumo, por lo que no se pueden utilizar con certeza para medir su aporte de vitamina E en la dieta de los costarricenses.

Las diferencias significativas encontradas en las muestras evaluadas respecto al contenido de los isómeros de la vitamina E, fue mayor entre las subespecies japónica e índica (índica comercial registrada, índica aromática e índica promisorio en desarrollo), lo que puede deberse a características genéticas intrínsecas de cada subespecie y/o variedad, aunque ambas sean de la misma especie *O. sativa* L., sus características morfológicas y ecológicas son muy diferentes, por lo que su contenido nutricional va a diferir también (Zhang et al., 2012). Se evidenció que el contenido de vitamina E en la subespecie japónica es significativamente menor, en comparación con las muestras pertenecientes a la subespecie índica, esto concuerda con comparaciones previas reportadas (Zhang et al., 2012). Futuros estudios de mejoramiento genético en variedades de arroz, deberían centrarse en aumentar el contenido de tocoferoles y tocotrienoles en la subvariedad japónica.

Las diferencias observadas respecto al contenido de vitamina E dentro de las muestras pertenecientes a la subespecie índica (índica comercial registrada, índica aromática e índica promisorio en desarrollo), pueden deberse a

las diferencias varietales dentro del subgrupo y a patrones de expresión propios de la interacción genotipo-ambiente dadas por las condiciones agroambientales del lugar donde fueron cultivadas y cosechadas. Además, aunque las variedades índica comercial registrada e índica promisoría en desarrollo pertenecen a la misma subespecie, estas han sido mejoradas en procesos distintos con el fin de atender objetivos propios de rendimiento en campo y no para caracteres relativos a la calidad nutricional del grano, en este caso, contenido de vitamina E. Por lo anterior, se puede intuir un efecto de deriva génica para aquellos genes involucrados y sus respectivas frecuencias alélicas, entre una generación filial y la siguiente dentro del programa de mejora genética que se realiza desde el CIGRAS para el desarrollo de nuevas variedades de arroz, ya que no se seleccionan con este fin nutricional.

En relación con la variedad índica aromática, esta posee como característica especial su aroma, el cual es producido por un gen recesivo presente en el cromosoma 8 del arroz (Pincioli et al., 2015), por lo que la presencia de este gen puede afectar la producción de ciertos compuestos, como la vitamina E y, por ende, su composición nutricional, es por esta razón que los arroces aromáticos pueden diferir a nivel nutricional de los arroces no aromáticos, en este caso, los índicos comerciales registrados e índicos promisorios en desarrollo, esta podría ser la razón de las diferencias encontradas al comparar la concentración de ciertos tocoferoles y tocotrienoles entre estas variedades.

Conclusiones

La cuantificación de los isómeros de la vitamina E en muestras de arroz cultivadas y comercializadas en Costa Rica, permitió obtener un perfil de dichos compuestos, lo cual sirvió para determinar cuáles son las subvariedades predominantes y deficientes respecto al contenido de tocoferoles y tocotrienoles, y cuáles isómeros son los que se presentan en mayor cantidad en el arroz; esto a su vez, permitió observar el aporte nutricional que presentan los materiales evaluados respecto a la vitamina E.

El contenido significativamente alto de tocoferoles y tocotrienoles observado en la muestra de la variedad Nayuribe ($33,20 \pm 7,40 \mu\text{g g}^{-1}$) (índica comercial registrada), evidenció que es posible encontrar acervos para alto contenido de vitamina E entre las variedades analizadas en este estudio y para otros nutrientes en grano. Este hallazgo propicia la posibilidad de incluir como uno de los objetivos del fitomejoramiento el desarrollo de variedades de arroz con granos biofortificados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación en el marco de los proyectos VI-734-C0-213 y VI-734-B2-060. También agradecen a la empresa SENUMISA por la donación de los materiales comerciales utilizados en la investigación.

Referencias

- Acevedo, M. A., Castrillo, W. A., & Belmonte, U. C. (2006). Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*, 56(2), 151-170.
- Ansolin, M., Tono de Souza, P., de Almeida Meirelles, A. J., & Caldas Batista, E. A. (2017). Tocopherols and tocotrienols: An adapted methodology by UHPLC/MS without sample pretreatment steps. *Food Analytical Methods*, 10(7), 2165–2174. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0768-z>

- Barrantes Rojas, J. P. (2019). *Determinación de la respuesta de cultivares de arroz criollo (Oryza sativa L.) costarricense a linajes de Pyricularia oryzae Cavara mediante pruebas de virulencia en condiciones de invernadero* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/11110>
- Bell, E. C., John, M., Hughes, R. J., & Pham, T. (2014). Ultra-performance liquid chromatographic determination of tocopherols and retinol in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 52(9), 1065–1070. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt161>
- Calvo-Castro, L. A., Sus, N., Schiborr, C., Bosity-Westphal, A., Duran, M. L., Fesenmeyer, D., Fesenmeyer, G., & Frank, J. (2019). Pharmacokinetics of vitamin E, γ -oryzanol, and ferulic acid in healthy humans after the ingestion of a rice bran-enriched porridge prepared with water or with milk. *European Journal of Nutrition*, 58(5), 2099–2110. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1770-6>
- Chen, D., Li, Y., Fang, T., Shi, X., & Chen, X. (2016). Specific roles of tocopherols and tocotrienols in seed longevity and germination tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Science*, 244, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.005>
- Corporación Arrocera Nacional. (2021a). *Informe anual estadístico 2020-2021*. <https://bit.ly/3UqI0PS>
- Corporación Arrocera Nacional. (2021b, junio 11). *Comportamiento del arroz en la canasta básica y el IPC general*. <https://bit.ly/3f52xcw>
- Delgado-Zamarreño, M., Bustamante-Rangel, M., Sierra-Manzano, S., Verdugo-Jara, M., & Carabias-Martínez, R. (2009). Simultaneous extraction of tocotrienols and tocopherols from cereals using pressurized liquid extraction prior to LC determination. *Journal of Separation Science*, 32(9), 1430–1436. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800707>
- Fu, J. -Y., Che, H. -L., Tan, D. M. -Y., & Teng, K. -T. (2014). Bioavailability of tocotrienols: Evidence in human studies. *Nutrition & Metabolism*, 11(1), Article 5. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-5>
- García, L., Ávila, M., Jayaro, Y., Alezones, J., Hernández, F., Lozada, C., & Romero, M. (2019). Caracterización de Dasmati: Cultivar de arroz aromático adaptado a las condiciones agroclimáticas de Venezuela. *Bioagro*, 31(3), 227–234. <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2661>
- Grebenstein, N., & Frank, J. (2012). Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver. *Journal of Chromatography A*, 1243, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.042>
- Guadamúz Mayorga, C. (2019). *Estudio de las principales propiedades físico—Químicas y sensoriales que influyen sobre la calidad del grano cocido de diferentes variedades de arroz (Oryza sativa) utilizando un método de cocción determinado* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/10135>
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., & Cai, Y. -Z. (2013). Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1153–1161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.129>
- Hay, F. R., Valdez, R., Lee, J. -S., & Sta. Cruz, P. C. (2019). Seed longevity phenotyping: Recommendations on research methodology. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 425–434. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery358>
- Huang, S. -H., & Ng, L. -T. (2011). Quantification of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol contents and their distribution in some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11150–11159. <https://doi.org/10.1021/jf202884p>

- Irías-Mata, A., Stuetz, W., Sus, N., Hammann, S., Gralla, K., Cordero-Solano, A., Vetter, W., & Frank, J. (2017). Tocopherols, tocomonoenols, and tocotrienols in oils of Costa Rican Palm Fruits: A comparison between six varieties and chemical versus mechanical extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7476–7482. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02230>
- Ito, V. C., & Lacerda, L. G. (2019). Black rice (*Oryza sativa* L.): A review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies. *Food Chemistry*, 301, Article 125304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125304>
- Keurentjes, J. J. B., Bentsink, L., Alonso-Blanco, C., Hanhart, C. J., Blankestijn-De Vries, H., Effgen, S., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2007). Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics*, 175(2), 891–905. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066423>
- Lauridsen, C., Leonard, S. W., Griffin, D. A., Liebler, D. C., McClure, T. D., & Traber, M. G. (2001). Quantitative analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 289(1), 89–95. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4913>
- Lee, J. -S., Kwak, J., Cho, J. -H., Chebotarov, D., Yoon, M. -R., Lee, J. -S., Hamilton, N. R. S., & Hay, F. R. (2019). A high proportion of beta-tocopherol in vitamin E is associated with poor seed longevity in rice produced under temperate conditions. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 17(04), 375–378. <https://doi.org/10.1017/S147926211900008X>
- Lee, J. -S., Kwak, J., Yoon, M. -R., Lee, J. -S., & Hay, F. R. (2017). Contrasting tocol ratios associated with seed longevity in rice variety groups. *Seed Science Research*, 27(4), 273–280. <https://doi.org/10.1017/S0960258517000265>
- Longvah, T., Mangthya, K., Subhash, K., Sen, S., & Rathi, S. (2021). Comprehensive nutritional evaluation of popular rice varieties of Assam, Northeast India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 101, Article 103952. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103952>
- Meganathan, P., & Fu, J. -Y. (2016). Biological properties of tocotrienols: Evidence in human studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), Article 1682. <https://doi.org/10.3390/ijms17111682>
- Molkenbuhr, E. L. (2020). *Arroz: Temporada 2019/20- 2020/21*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://bit.ly/3DJv0eA>
- Monge-Rojas, R., & Nuñez, H. C. (2006). *Tabla de composición de alimentos de Costa Rica: Ácidos grasos*. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. <https://bit.ly/36TPs26>
- Oficina Nacional de Semillas. (2020). *Características varietales de arroz. Programa de certificación de semilla de arroz*. Oficina Nacional de Semillas. <http://ofinase.go.cr/certificacion-de-semillas/certificacion-de-semilla-de-arroz/>
- Olcott, H. S., & Mattill, H. A. (1931). The unsaponifiable lipids of lettuce. 3. *Antioxidant*. *Journal of Biological Chemistry*, 93, 65–70. <https://bit.ly/3qTscrg>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *La producción, la utilización y el comercio de cereales alcanzarán niveles récord en 2021/22*. <https://bit.ly/3mjfW13>
- Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, & Institute of Medicine. (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9810>

- Pincirololi, M., Ponzio, N. R., & Salsamendi, M. (2015). *El arroz: Alimento de millones* (1ª ed.). Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. http://www.faa.unicen.edu.ar/archivos/Arroz_Alimento_de_millones.pdf
- Presidencia de la República, & Ministerio de Salud. (2002, enero 2). *Reforma reglamento para el enriquecimiento del arroz No 30031-S*. Sistema Costarricense de Información Jurídica. <https://bit.ly/3mlo9S6>
- Salazar, H., Barazarte, H., Padua, M., & Estanga, M. (2019). Evaluación del proceso de parbolizado y calidad de las variedades de Arroz Payara IFL y SD20A. *Agroindustria, Sociedad y Ambiente*, 2(13), 4–23. <https://bit.ly/3NRa7Er>
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2007). Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 692–728. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.03.001>
- Shammugasamy, B., Ramakrishnan, Y., Ghazali, H. M., & Muhammad, K. (2015). Tocopherol and tocotrienol contents of different varieties of rice in Malaysia: Vitamin E content of Malaysian rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 672–678. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6742>
- Szewczyk, K., Chojnacka, A., & Górnicka, M. (2021). Tocopherols and tocotrienols—bioactive dietary compounds; what is certain, what is doubt? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Article 6222. <https://doi.org/10.3390/ijms22126222>
- Yu, X., Chu, M., Chu, C., Du, Y., Shi, J., Liu, X., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, Z., & Yan, N. (2020). Wild rice (*Zizania* spp.): A review of its nutritional constituents, phytochemicals, antioxidant activities, and health-promoting effects. *Food Chemistry*, 331, Article 127293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127293>
- Zhang, G. -Y., Liu, R. -R., Zhang, P., Xu, Y., Zhu, J., Gu, M. -H., Liang, G. -H., & Liu, Q. -Q. (2012). Variation and distribution of vitamin E and composition in seeds among different rice varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 38(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(11\)60098-9](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(11)60098-9)
- Zhu, L., Yang, S., Li, G., Zhang, X., Yang, J., Lai, X., & Yang, G. (2016). Simultaneous analysis of tocopherols, tocotrienols, phospholipids, γ -oryzanols and β -carotene in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to a linear ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Analytical Methods*, 8(28), 5628–5637. <https://doi.org/10.1039/C6AY00556J>
- Zubair, M., Anwar, F., Ali, S., & Iqbal, T. (2012). Proximate composition and minerals profile of selected Rice (*Oryza sativa* L.) varieties of Pakistan. *Asian Journal of Chemistry*, 24(1), 417–421. <https://bit.ly/3Q7GyzN>