

PRESENCIA DE POLIFENOLES, FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS BIOACTIVOS EN CULTIVARES DE ARROZ TIPO LARGO FINO

Pincirolli M.¹, Vidal A. A.¹, Quiroga A.², Domínguez Perles R.³, Guy A.⁴, Durand T.⁴, Galano J.M.⁴, Aphalo P.², Añon M.C.² y Gil Izquierdo A.³

Palabras claves: *Oryza sativa*, polifenoles, fitoprostanos, fitofuranos.

INTRODUCCIÓN

El consumo de granos enteros de arroz proporciona efectos protectores frente a enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, cáncer, hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, la actividad de los polifenoles en relación con la captación de radicales libres, sugiere valiosas funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienviejimiento (Velioglu *et al.*, 1998). Recientemente, se ha demostrado que el salvado de arroz contiene una mezcla compleja de compuestos fitoquímicos biológicamente activos tales como tocoferoles, tocotrienoles, γ -orizanol, y polifenoles, a los que se han atribuido actividades funcionales relacionadas con su capacidad antioxidante (Huang and Ng, 2012).

En mamíferos, el estrés oxidativo está asociado a la incidencia y severidad de diversas enfermedades crónicas. Los altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) conducen a daños oxidativos en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por este motivo, la identificación de matrices vegetales que presenten compuestos con actividad antioxidante ha sido promovida como una vía para la reducción de la prevalencia de enfermedades relacionadas con altos niveles de ROS. Además, estos compuestos son de relevancia para la industria alimentaria debido a su impacto en la calidad de los alimentos.

En numerosas especies vegetales, el ácido α -linolénico (ALA, 18: 3 ω -3) es el punto final de la biosíntesis de ácidos grasos, constituyendo un sustrato altamente reactivo en frente a ROS que dan lugar a reacciones de peroxidación no enzimática. Como consecuencia, en primer término se producen los fitoprostanos (FPs), en tanto que la adición de oxígeno molecular después de la ciclación inicial conduce a la generación de estructuras furánicas llamadas fitofuranos (FFs). Dadas la característica de sus rutas de síntesis y su analogía estructural con los derivados del ácido araquidónico, estos compuestos podrían tener un gran potencial como nuevos compuestos bioactivos. Tanto el perfil de FPs y FFs como su contenido cuantitativo son fuertemente dependientes de factores genéticos, de manejo, almacenamiento y procesamiento. Varios autores han estudiado el comportamiento de los fitoprostanos en las plantas sometidas a estrés hídrico (González-Collado *et al.* 2015) o térmico (Yonny *et al.*, 2016). Dado que el arroz es el alimento básico más importante del mundo, es probable que represente una fuente dietética significativa de estos compuestos para una gran proporción de la población.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características de distintos tipos de harina (de grano pulido, integral y salvado) obtenida de cuatro variedades de arroz en relación a su contenido en polifenoles, FPs y FFs, así como el efecto del tipo de procesamiento del arroz en los citados compuestos.

1

¹Ingenieros agrónomos Programa Arroz. FCAyF, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 119, 1900 La Plata, Argentina.

²Grupo de Investigación sobre calidad, seguridad y bioactividad de los alimentos vegetales. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo 25, 30100 Espinardo, Murcia, España.

³Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas (CIC-PBA), 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina.

⁴Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR CNRS 5247 – Université de Montpellier – ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahaut. 34093 Montpellier, France .

E-mail: mpincirolli@agro.unlp.edu.ar

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron granos de arroz de los cultivares: 'Camba INTA', 'Don Ignacio FCAYF', 'Guri INTA' e 'IRGA 424' provenientes de la Estación Experimental J. Hirschhorn y obtenidos del Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (34°52'S, 57°57'W, 9,8 msnm, La Plata, Argentina). La cosecha y la trilla se realizaron en forma manual, los granos se secaron en estufa a 41 °C. A partir del grano con cáscara, se obtuvo grano pulido, integral y salvado utilizando un molino experimental. Los granos pulido e integral se molieron y tamizaron (0,4 mm). Las harinas obtenidas y el salvado se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su evaluación analítica. Las muestras se analizaron por triplicado (n=3).

El contenido en polifenoles solubles en agua se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo el protocolo descripto por Singleton *et al.* (1965). Para su cuantificación se emplearon soluciones de ácido gálico (de 0,1 a 0,5 mg/mL) como patrón y la concentración se expresó en equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca ($\mu\text{g EAG/g ms}$).

La extracción y el análisis de FPs y FFs se realizó siguiendo la metodología descrita por Leung *et al.* (2014) y Yonny *et al.* (2016) con modificaciones para su adaptación a muestras líquidas. Su separación cromatográfica se realizó utilizando un UHPLC junto con un 6460 triple cuadrupolo-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La columna analítica fue una BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm) (Waters, Milford, M.A.). Para su cuantificación se emplearon soluciones de los patrones con concentraciones entre 0,002 y 0,250 ng/g. Los FPs y FFs analizados fueron: **PP1**: 9-F_{1t}-PhytoP; **PP2**: Ent-16-F_{1t}-PhytoP + Ent-16-epi-16-F_{1t}-PhytoP; **PP3**: 9-epi-9-F_{1t}-PhytoP; **PP4**: 9-epi-9-D_{1t}-PhytoP; **PP5**: 9-D_{1t}-PhytoP; **PP6**: Ent-16-B₁-PhytoP + 16-B₁-PhytoP; **PP7**: Ent-9-L₁-PhytoP + 9-L₁-PhytoP; **PF1**: Ent-16-(RS)-9-epi-ST- Δ^{14} -10-PhytoF; **PF2**: Ent-9-(RS)-12-epi-ST- Δ^{10} -13-PhytoF y **PF3**: Ent-16-(RS)-13-epi-ST- Δ^{14} -9-PhytoF. Se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando como fuentes de variación los cultivares y los tipos de harina. Paralelamente se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson, utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion Version XV.I (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de estos tres grupos de compuestos bioactivos se encontraron marcadamente relacionadas entre sí y con las diversas variedades de arroz y tipos de harina. El análisis de las concentraciones de polifenoles, FPs y FFs totales en las distintas variedades evidenció un comportamiento equivalente en respuesta al tipo de harina (Tabla 1). Así, los compuestos fenólicos se presentaron en mayor concentración en el salvado de todos los cultivares (70,9-103,2 $\mu\text{gEAG/g}$), intermedia en grano integral (9,8-13,7 $\mu\text{gEAG/g}$) y menor en grano pulido (2,7-4,3 $\mu\text{gEAG/g}$), observándose abundancias relativas de 22,0:1,0 y 3,4:1,0 en el salvado y el integral en relación al grano pulido, respectivamente. Estas concentraciones están de acuerdo con los valores descriptos por Huang and Ng (2012), donde la relación con respecto al grano pulido resultó de 14,0:1,0 y 2,5:1,0 en distintas variedades de arroz de tipo largo fino. Posiblemente esto se deba a la proporción de pericarpio presente en las diferentes partes del grano. No se observaron diferencias entre los cultivares en grano pulido e integral. En el salvado 'IRGA 424' presentó mayor concentración de polifenoles (103,2 $\mu\text{gEAG/g}$) (Tabla 1).

Al igual que los polifenoles, los FPs también presentaron mayores concentraciones en el salvado (22,2-106,7 ng/g), intermedias en el grano integral (10,1-22,0 ng/g) y menores o iguales en grano pulido (2,6-22,5 ng/g). Esta tendencia parece ser una consecuencia de la mayor abundancia del ácido linolénico en las capas externas del grano (Fujino, 1978). Los FPs identificados en las muestras de grano de arroz también han sido determinados en

otras matrices alimentarias. Así, las concentraciones totales de FPs en aceite de oliva han sido descrita en los rangos 15,0-39,0 ng/ml (Collado-Gonzalez *et al.*, 2015), en algas entre 6,0 y 1.381,0 ng/100 g peso seco (Barbosa *et al.*, 2015), en aceitunas verdes entre 581,0-999,0 ng/100 g (Collado Gonzalez *et al.*, 2014) y en almendras entre 40,2-238,1 ng/g (Carrasco-Del Amor *et al. s/f*). En todos los casos se observa amplitud en los rangos encontrados. Los contenidos de fitoprostanos cuantificados en salvado de arroz solo son un 50% inferior a los encontrados en almendras. Este dato no deja de ser relevante dada la diferencia relativa del contenido graso de ambas matrices (18,3 y 46,5% en salvado y almendras respectivamente), lo que *a priori* debería condicionar la síntesis de oxilipinas.

La concentración de FFs fue mayor en el salvado de las variedades estudiadas con excepción de la variedad 'Camba', que presentó los mayores niveles en harina de grano integral. Es habitual que durante el proceso de molinado parte del endosperma endosperma (grano pulido) pase al salvado con la consecuente 'dilución' del contenido graso de las muestras.

Tabla 1. Concentración de polifenoles, fitoprostanos y fitofuranos en los 3 tipos de harina en los 4 cultivares.

	Polifenoles (µg EAG/g)			Fitoprostanos (ng/g)			Fitofuranos (ng/g)		
	harina de grano pulido	harina de grano integral	salvado	harina de grano pulido	harina de grano integral	salvado	harina de grano pulido	harina de grano integral	salvado
'Cambá'	2,72a	9,81a	70,93b	9,98b	22,03a	22,20d	0,89a	5,70a	3,05d
'Don Ignacio'	4,34a	13,72a	74,96b	2,55c	20,38a	74,75c	0,2a	5,42a	8,97c
'Guri INTA'	4,11a	12,83a	68,50b	22,47a	14,24b	106,68a	1,60a	1,96b	22,51a
'IRGA 424'	2,82a	11,70a	103,18a	7,35b	10,13b	81,27b	0,39a	1,41b	15,39b
LSD (p<0,05)	5,16	4,43	15,19	2,72	4,16	9,54	0,23	2,30	3,20
p-value	N.s.	N.s.	***	***	***	***	***	***	***

Medias (n=3) seguidas de letras diferentes dentro de una misma columna expresan diferencias significativas entre cultivares.

El estudio de las diferentes harinas de arroz permitió identificar y cuantificar 6 FPs (PP4, 9-E₁₁-PhytoP; PP5, 9-*epi*-9-E₁₁-PhytoP; PP6, *Ent*-16-B₁-PhytoP + 16-B₁-PhytoP; PP7, *Ent*-9-L₁-PhytoP + 9-L₁-PhytoP; y las formas esterificadas PP6S y PP7S) y 3 FFs (PF1, *Ent*-16-(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF; PF2, *Ent*-9-(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF; PF3, *Ent*-16-(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF) (Tabla 2). Se observó una concentración decreciente de los compuestos: PP6S (12,2 ng/g) > PP5 (8,1 ng/g) > PP7S (5,7 ng/g) > PP4 (3,9 ng/g) > PP7 (2,1 ng/g) > PP6 (0,9 ng/g). Las concentraciones de PP4, PP5, PP6S y PPS7 no presentaron diferencias entre variedades (Tabla 2).

Tabla 2. Valores medios de Fitoprostanos y Fitofuranos en los 4 cultivares promedio de los 3 tipos de harina.

	Fitoprostanos							Fitofuranos			
	PP4	PP5	PP6	PP6S	PP7	PP7S	Total	PF1	PF2	PF3	Total
'Cambá'	2,90a	3,01a	0,46 b	7,00 a	1,28b	3,42a	18,07 a	2,20 a	0,48 a	0,54a	3,22a
'Don Ignacio'	4,61a	7,45a	0,94ab	11,82a	1,86b	5,87a	32,56 a	2,85 a	0,90a	1,14a	4,89a
'Guri INTA'	4,16a	10,20a	1,47 a	19,37a	3,82a	8,76a	47,79 a	4,31 a	1,53 a	2,85a	8,69a
'IRGA 424'	3,91a	11,60a	0,65ab	10,58a	1,54b	4,63a	32,92 a	3,19 a	0,50 a	2,04a	5,73a
LSD	1,33	3,60	0,25	4,23	0,45	1,99	11,05	1,23	0,43	0,65	2,24
p-value			***		***						

Fitoprostanos: PP4, 9-E₁₁-PhytoP (AG 441 B); PP5, 9-*epi*-9-E₁₁-PhytoP (AG 441 A); PP6, *Ent*-16-B₁-PhytoP (SE 175 A) + 16-B₁-PhytoP (SE 175 B); PP7, *Ent*-9-L₁-PhytoP (SE 194 R) + 9-L₁-PhytoP (SE 194 S); and PP6S y PP7S sus formas esterificadas; **Fitofuranos:** PF1, *Ent*-16-(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF; PF2, *Ent*-9-(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF; PF3, *Ent*-16-(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF. Letras minúsculas dentro de una misma columna expresan diferencias significativas entre cultivares (Test de Tukey, p<0,05).

PP7 se observó en mayores concentraciones en la variedad 'Guri INTA' (3,82 ng/g), mientras PP6 presentó concentraciones superiores también en 'Guri INTA' (19,37 ng/g), intermedias en 'IRGA 424' y 'Don Ignacio' (valor medio 1,40 ng/g) e inferiores en 'Cambá' (1,28 ng/g) (Tabla 2). PP4 and PP5 resultaron los más abundantes en aceites extra virgen, de oliva y de girasol refinado con valores máximos de 57,3 y 46,5 ng/mL, respectivamente (Collado Gonzales *et al.*, 2015). Los compuestos PP6 and PP7 han sido descritos en concentraciones similares en aceite extra virgen de oliva (0,66 y 2,88 ng/mL) (Collado Gonzales *et al.*, 2014) y en almendras (0,38 y 11,56 ng/g) (Carrasco-Del Amor *et al.*, s/f).

En relación con los niveles de FFs, las concentraciones promedio de las cuatro variedades decrecieron en el siguiente orden: FF1 (3,14 ng/g) > FF3 (1,64 ng/g) > FF2 (0,85 ng/g). El FF3 ha sido cuantificado previamente en piñones, nueces, semillas de chía y lino con valores que oscilan entre 0,3 y 9,0 ng/g (Cuyamendous *et al.*, 2015), en tanto que FF1 y FF2 sólo se han descrito en hojas de melón (matriz no comestible) en cantidades muy superiores a las halladas en harina de arroz (130-4400 ng/g) (Yonny *et al.*, 2016).

A modo de integración, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones totales de los diferentes grupos de compuestos. Ésta permitió observar una correlación significativamente positiva entre todos los grupos de compuestos evaluados, con elevados coeficientes que oscilaron entre 0,731 y 0,949 y un nivel de significancia de $p < 0,001$. Este resultado sería de esperar ya que todos estos compuestos están relacionados con el estrés oxidativo y la señalización en condiciones de elevadas concentraciones de ROS.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que proporciona información relativa con la concentración de polifenoles, FPs y FFs en material vegetal derivado del cultivo de arroz. Tanto el perfil de FPs como de FFs, así como su concentración en harinas de arroz resultan dependientes de factores genéticos y el tipo de harina, así como de su procesado. 'Guri INTA' aparece como una variedad prometedora por su elevado contenido en fitoprostano y fitofurano, mientras 'Irga 424' por su contenido de polifenoles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLLADO-GONZÁLEZ, J., DURAND, T., FERRERES, F., Medina S., Torrecillas, A. & Gil-Izquierdo, A. Phytoprostanes. **Lipid Technology**, v. 27, n.6, p.127-130.
- FUJINO Y. Rice Lipids. **Cereal Chemistry**, v. 55, n.5, p. 559-571, 1998.
- HUANG, S.H. and NG, L.T. 2012. Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 26, p. 122–127, 2015.
- LEUNG, K.S., CHEN, X., ZHONG, W., YU, A.C.H., Lee, C. Y. J. Microbubble-mediated sonoporation amplified lipid peroxidation of Jurkat cells. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 53–60, 2014.
- SINGLETON V. L., ROSSI J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- VELIOGLU, Y.S., MAZZA, G.; GAO, L. and B.D. OOMAH. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.46, p.4113-4117, 1998.
- YONNY, M. E., RODRÍGUEZ TORRESI, A., CUYAMENDOUS, C., RÉVERSAT, G., OGER, C., GALANO, J.-M., DURAND, T., VIGOR, C. & NAZARENO, M. A. Thermal stress in melon plants: Phytoprostanes and phytofurans as oxidative stress biomarkers and the effect of antioxidant supplementation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.64, p.8296-8304, 2016.