

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS

**BIODISPONIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LOS
COMPUESTOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL
SALVADO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DEL
MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE CALIDAD Y
TRAZABILIDAD EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

POR

Nazaret Donoso Pineda

DIRIGIDO POR

Jonathan Delgado Adámez

M^a Concepción Ayuso Yuste

BADAJOS, Noviembre 2017

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Características y propiedades del arroz.....	7
1.2. Características y propiedades del salvado de arroz.....	8
1.3. Compuestos fenólicos y oryzanoles.....	13
1.4. Propiedades de los compuestos fenólicos y oryzanoles.....	18
1.5. Digestión <i>in vitro</i>	19
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Materiales.....	27
3.2. Proceso de extracción de compuestos bioactivos	27
3.3. Simulación del proceso de digestión.	28
a) Simulación oral	28
b) Simulación digestión gástrica	29
c) Simulación digestión intestinal	29
d) Simulación digestión en el intestino grueso	30
3.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	30
3.5. Actividad Antioxidante Total	31
3.6. Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1. Caracterización de los extractos	35
a) Extracto acuoso (EF1)	35
b) Extracto alcohólico (EO2)	36
4.2. Biodisponibilidad de compuestos funcionales.....	36
a) Extracto enriquecido en compuestos fenólicos.....	36
b) Extracto enriquecido en γ -oryzanol	41
5. CONCLUSIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

En este estudio se ha investigado la biodisponibilidad de los fitoquímicos de carácter antioxidante, mediante simulaciones de digestión *in vitro*, de extractos ricos en compuestos funcionales a partir de un subproducto de la industria alimentaria, el salvado de arroz (*Oryza sativa* L.). Para ello se ha llevado a cabo la caracterización de los extractos hidrófilo y lipófilo de salvado de arroz, así como la determinación de su actividad antioxidante.

En primer lugar, se procedió a la extracción de los compuestos bioactivos mediante el tamizado de arroz y el posterior mezclado con los distintos disolventes (agua o etanol) obteniendo los dos extractos correspondientes, para realizar el perfil por HPLC de fenoles y γ -oryzanos.

A continuación se llevó a cabo una simulación *in vitro* del proceso de digestión de cada uno de los extractos obtenidos anteriormente, de manera que se pudiera estudiar el comportamiento de los fenoles y γ -oryzanos en cada una de las fases mediante la caracterización de los compuestos obtenidos por HPLC.

Finalmente, se ha realizado la medida de la actividad antioxidante total (AAT) obtenida en cada una de las fases de la digestión, para ambos extractos, observándose una disminución de la AAT debida a la menor cantidad de compuestos fitoquímicos (extracto 1: fenoles; extracto 2: γ -oryzanol), ya que estos compuestos son los responsables de las propiedades antioxidantes.

ABSTRACT

In this study, the bioavailability of bioactive compounds, with antioxidant character, was investigated through the simulation of *in vitro* digestion of extracts rich in functional compounds. These were obtained from a by-product of the food industry, rice bran. To this end, it was carried out the characterization of two rice bran extracts, hydrophilic and lipophilic, as well as the determination of their antioxidant activity.

First, the active compounds were extracted by rice bran sieving and thereafter mixed with the solvent (water or ethanol) to obtain the two corresponding extracts, in order to perform the HPLC measurement of phenols and γ -oryzanol.

Then, it was performed an *in vitro* simulation of human digestion process for each of the extracts previously obtained, so that the behavior of the phenols and γ -oryzanol in each of the digestive phases could be studied by characterizing the compounds by HPLC.

Finally, the measurement of total antioxidant activity (TAA) was carried out in each of the digestive phases, for the two extracts, observing a decrease in the TAA due to the lower amount of phytochemical compounds (extract 1: phenols, extract 2: γ -oryzanol), since these compounds are responsible for antioxidant properties.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características y propiedades del arroz

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos más importantes. Alimenta a más del 50% de la población mundial, especialmente en los países asiáticos (Fei-fei, Liang, Yang, Chuan, Ya-ling y Jin-son, 2015) La mayoría de las variedades de arroz que se plantan y consumen en todo el mundo tienen pericarpio blanco, pero el arroz también puede producir granos con pericarpio rojo, negro o morado (Shao, Jin, Zhang, Lu, Shen y Bao, 2011).

El arroz de grano entero mostrado en la Figura 1, consiste en el germen, el salvado y el endospermo, y también se llama arroz integral, sus beneficios para la salud son principalmente aportados por un grupo de compuestos, los polifenoles. Los polifenoles del grano de arroz se pueden clasificar en tres subgrupos: ácidos fenólicos, que son los metabolitos secundarios más comunes en los granos de cereales; antocianinas, que sólo existen en granos negros o púrpuras oscuros; y proantocianidinas, que consisten principalmente en catequina en arroz rojo y se consideran los antioxidantes más eficaces en la naturaleza (Shao y Bao, 2015).

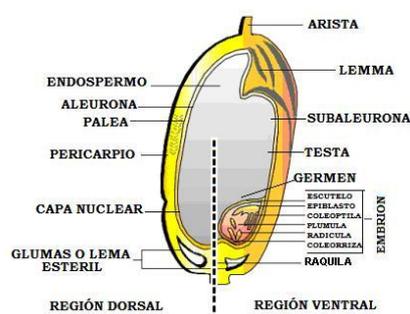


Figura 1. Partes del grano de arroz.

(Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)

Los granos enteros del arroz negro y del rojo contienen ácidos fenólicos (ácidos ferúlico, cumárico y cafeico). Los compuestos fenólicos libres (por ejemplo, ácido cinámico y ácido gálico) en el tracto digestivo pueden actuar después de la absorción, contra la incidencia de cáncer de colon y otras enfermedades crónicas. Para que los nutrientes y otros factores nutricionales puedan ser aprovechados adecuadamente por el organismo es necesaria una buena digestión de la comida (Sumczynski, Kotásková, Družbíková y Mlcek, 2016).

El arroz pigmentado presenta mayores cantidades de fitoquímicos que el arroz no pigmentado, ya que sus parámetros de color se correlacionan de forma positiva con el contenido en fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante (Shao et al., 2011). En relación con las variedades pigmentadas, se comprobó que el arroz negro presentaba el contenido más alto de antocianinas totales entre todos los granos coloreados estudiados (Abdel-Aal, Young y Rabalski, 2006).

1.2. Características y propiedades del salvado de arroz

El salvado es un importante subproducto de la molienda del arroz, constituye entre el 8 y el 10% del peso del arroz integral. Contiene componentes valiosos como proteínas, vitaminas y minerales esenciales, así como varios compuestos bioactivos como la vitamina E (tocoferol y tocotrienol), γ -oryzanol, fitoesteroles, ácido ferúlico y las antocianinas (Wang, Khir, Pan, y Yuan, 2017). Sin embargo, las diferentes variedades pueden presentar diversos efectos sobre ciertas actividades biológicas, ya que las composiciones y el contenido de sus compuestos bioactivos difieren entre sí (Sabir, Rafi, y Darusman, 2017). Además, estas diferencias no solo son debidas a factores varietales, sino también a factores los bióticos y abióticos durante el cultivo, así como al estado fenológico de la planta en el momento de la recolección (Renuka-Devi y Arumughan, 2007).

Estos compuestos bioactivos presentan actividad antioxidante y diversos efectos beneficiosos para la salud, mejoran la presión arterial, actúan sobre el perfil de lípidos y el metabolismo de la glucosa (Sabir et al., 2017). Sin embargo, el salvado de arroz es raramente utilizado por sus componentes bioactivos minoritarios, ya que es susceptible a la rancidez hidrolítica y oxidativa (Kim, Chung, y Lim, 2014).

En la Tabla 1 se presentan una recopilación de estudios con los principales efectos beneficiosos del salvado de arroz sobre la salud (Justo Gómez, 2014).

Tabla 1. Recopilación de estudios realizados con extractos de salvado de arroz desde el año 2000.

TIPO DE EXTRACTO DE SALVADO DE ARROZ		COMPUESTOS DESTACABLES	ACTIVIDAD TERAPÉUTICA	REFERENCIA	
OLEOSOS	Aceite	Fitosteroles AG poli-insaturados	Reducción de la actividad HMG-CoA	Ausman I., Rong N., Nicolosi R. (2005) (A)	
	Aceite	γ -oryzanol	Disminución de colesterol total, LDL-c y LDL-c/HDL-c	Berger A, Rein D, Schäfer A, Monnard I, Gremaud G, Lambelet P et al. (2005) (H)	
	Nanoemulsión	Composición general	Mejora de patologías de la piel como psoriasis o dermatitis	Bernardi D, Pereira T, Maciel N, Bortoloto J, Viera G, Oliveira G et al. (2011) (H)	
	Aceite	γ -oryzanol γ -tocotrienol	Reducción de la absorción de colesterol e incremento de receptores LDL	Chen C, Cheng H. (2006) (A)	
	Aceite	γ -oryzanol γ -tocotrienol	Mejora del perfil lipídico, índice aterogénico e hiperinsulinemia en diabetes tipo 2	Chou T, Ma C, Cheng H, Chen Y, Lai M. (2009) (A)	
	Estabilizado		γ -oryzanol	Efectos frente al deterioro neurodegenerativo	Hagl S, Kocher A, Schiborr C, Eckert S, Ciobanu I, Birringer M et al. (2013) (A)
				Efectos frente a la diabetes	Kaup R, Khayyal M, Verspohl E. (2013) (A)
	Aceite	Enriquecido con líquido de mantenimiento	Mejora de la calidad del semen congelado de jabalí	Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, Chanapiwat P. (2012) (A)	
	Aceite	γ -oryzanol, Fitosteroles Tocotrienoles	Disminución de colesterol y TG en suero	Arora S, Sharma S, Goel S, Singh U. (2005) (H)	
Aceite	γ -oryzanol Fitosteroles	Disminución de los niveles de LDL en pacientes hiperlipidémicos	Malve H, Kerkar P, Mishra N, Loke S, Rege N, Marwaha- Jaspal A et al. (2010) (H)		

	Aceite	α -tocotrienol γ -tocotrienol γ -oryzanol	Efecto anti-hipercolesterolémico	Most M, Tulley R, Morales S, Lefevre M. (2005) (H)
	Nanopartículas	Composición de origen	Actividad antioxidante y fotoprotectora	Niculae G, Lacatusu I, Badea N, Stan R, Vasile B, Meghea A. (2014) (A)

TIPO DE EXTRACTO DE SALVADO DE ARROZ		COMPUESTOS DESTACABLES	ACTIVIDAD TERAPÉUTICA	REFERENCIA
OLEOSOS	Aceite	γ -oryzanol γ -tocotrienol γ -tocoferol	Disminución del estrés oxidativo y mejora de la estructura de los tejidos en diabetes tipo 2	Posuwan J, Prangthip P, Leardkamolkarn V, Yamborisut U, Surasiang R, Charoensiri R et al. (2013) (A)
	Enriquecido	DAG	Disminución de los niveles de colesterol y TG en plasma	Dhara R, Dhar P, Ghosh M. (2012) (A)
	Aceite	γ -oryzanol y otros compuestos antioxidantes	Retraso de la carcinogénesis colónica inducida con DSS	Shih C, Ho C, Li S, Yang S, Hou W, Cheng H. (2011) (A)
	Aceite	Tocotrienoles	Prevención de la nefropatía diabética	Siddiqui S, Ahsan H, Khan M, Siddiqui W. (2013) (A)
	Aceite	Composición de AG	Disminución del índice aterogénico	Utarwuthipong T, Komindr S, Pakpeankitvatana V, Songchitsomboon S, Thongmuang N. (2009) (H)
	Aceite	γ -oryzanol Tocoferoles	Reducción de lipoproteínas no-HDL e incremento de HDL en plasma	Wilson T, Nicolosi R, Woolfrey B, Kritchevsky D. (2007) (A)
	Aceite	γ -oryzanol	Mejora de factores de riesgo CV en pacientes hiperlipidémicos	Zavoshy R, Noroozi M, Jahanihashemi H. (2012) (H)

LIOFILIZADOS	Extracto etanólico y tratado con Driselasa	Composición general	Mejora de la presión arterial, metabolismo de la glucosa y perfil lipídico en ratas hipertensas	Shirakawa H, Koseki T, Hashizume K, Komai M, others. (2007) (A)
	Tratado con Driselasa	Adenosina	Atenúa SM en ratas hipertensas	Shirakawa H, Shimeno T, Koseki T, Shiono Y, Murayama T, Hatakeyama E et al. (2009) (A)
	Tratado con CO2	Ácido linoléico γ-tocotrienol γ-oryzanol	Actividad frente a la pérdida del cabello	Choi J, Jeon M, Moon W, Moon J, Cheon E, Kim J et al. (2014) (A)

TIPO DE EXTRACTO DE SALVADO DE ARROZ		COMPUESTOS DESTACABLES	ACTIVIDAD TERAPÉUTICA	REFERENCIA
LIOFILIZADOS	Exo-biopolímero	Arabinosilano	Aumento de IFN- Y sin efectos adversos. Actúa como inmunoestimulante.	Choi J, Paik D, Kwon D, Park Y. (2014) (H)
	Liofilizado	Proteínas	Regeneración de células osteogénicas	Fukumoto K, Tsuno T, Taniguchi M, Terada S. (2013) (A)
	Extracto metanólico	γ-oryzanol Compuestos fenólicos	Actividad antioxidante	Laokuldilok T, Shoemaker C, Jongkaewwattana S, Tulyathan V. (2010) (A)
	Niosomas para uso tópico	Ácido ferúlico γ-oryzanol Ácido fítico	Efecto anti-edad	Manosroi A, Chutoprapat R, Abe M, Manosroi W, Manosroi J. (2012) (A)
	Disolución	---	Inhibición de la proliferación de células cancerosas del colon	Takashima A, Ohtomo M, Kikuchi T, Iwashita J, Abe T, Hata K. (2013) (A)

ENZIMÁTICOS	Extracto Enzimático de Salvado de Arroz (EESA)	Y-oryzanol Fitosteroles Proteínas	Prevención de enfermedades crónicas relacionadas con elevado estrés oxidativo	Parrado J, Miramontes E, Jover M, Márquez J, Mejías M, de Terán L et al. (2003) (A)
			Efecto anti-proliferativo	Parrado J, Miramontes E, Jover M, Gutierrez J, Collantes de Terán L, Bautista J. (2006) (A)
			Efecto anti-hipercolesterolémico y antioxidante	Revilla E, María C, Miramontes E, Bautista J, García-Martínez A, Cremades O et al. (2009) (A)
			Efecto anti-radicalario. Protección UVB	Santa-María C, Revilla E, Miramontes E, Bautista J, García-Martínez A, Romero E et al. (2010) (A)
			Efecto anti-proliferativo e inmunoestimulante	Revilla E, Santa-María C, Miramontes E, Candiracci M, Rodríguez-Morgado B, Carballo M et al. (2013) (A)

(H): ensayos clínicos; (A): estudios en animales; AG: Ácidos grasos; DAG: diacil-glicerol; TG: triglicéridos; CV: cardiovascular; SM: síndrome metabólico; IFN- γ : interferón-gamma; UVB: ultravioleta B

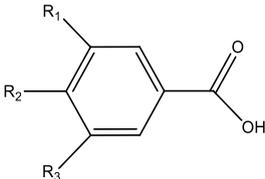
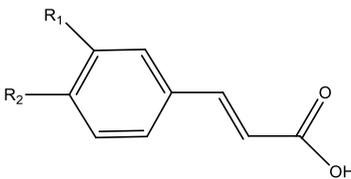
1.3. Compuestos fenólicos y oryzanoles

Los compuestos antioxidantes naturales de origen vegetal son fundamentalmente flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, terpenos, tocoferoles, fosfolípidos y ácidos orgánicos polifuncionales, entre otros. Las fuentes de estos antioxidantes naturales se pueden encontrar en todas las partes de las plantas, así como en frutas, verduras, nueces, semillas, hojas, harinas, raíces y cortezas (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Los compuestos fenólicos, son conocidos por servir como bioactivos polivalentes y están ampliamente extendidos por todo el reino vegetal. La mayoría de ellos son una parte integral de la dieta humana y también se consumen como preparaciones medicinales. Muchos de los efectos protectores de la salud de los compuestos fenólicos se han atribuido a sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas y otras biológicas (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

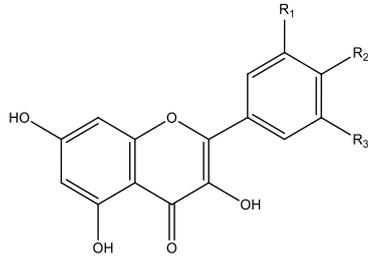
Los derivados sustituidos de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico son los ácidos fenólicos predominantes en las plantas, siendo los ácidos hidroxicinámicos los más comunes (Tabla 2). Frecuentemente se encuentran en los alimentos como simples ésteres con ácido quínico o glucosa. El más conocido es el ácido clorogénico, que se combina con ácidos cafeico y quínico. Estos derivados difieren en el patrón de hidroxilación y metoxilación en sus anillos aromáticos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Tabla 2. Estructuras químicas principales de los compuestos fenólicos y sus compuestos representativos (Fuente: Manach et al., 2004).

Ácidos fenólicos	
Ácidos hidroxibenzoicos:	Ácidos hidroxicinámicos:
	
Ác. protocatecuico: $R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$	Ác. cumárico: $R_1 = \text{OH}$
Ác. gálico: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$	Ác. cafeico: $R_1 = R_2 = \text{OH}$
	Ác. ferúlico: $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$

Flavonoides

Flavonoles:

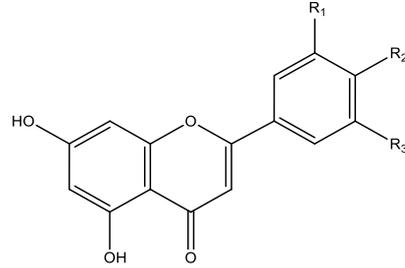


Kaempferol: $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

Quercetina: $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$

Miricetina: $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

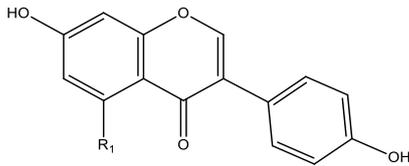
Flavonas:



Apigenina: $R_1 = H, R_2 = OH$

Luteolina: $R_1 = R_2 = OH$

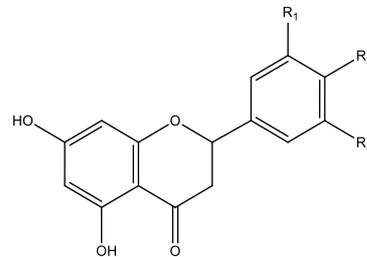
Isoflavonas:



Daidzeína: $R_1 = H$

Genisteína: $R_1 = OH$

Flavanonas:

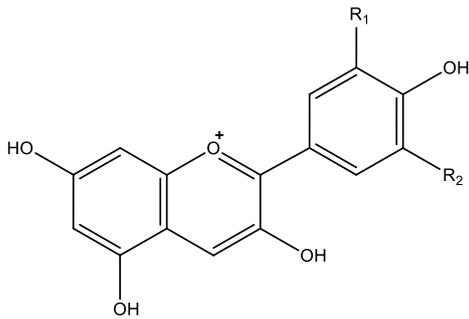


Naringenina: $R_1 = H, R_2 = OH$

Eriodictiol: $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

Hesperetina: $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$

Antocianidinas:



Pelargonidina: $R_1 = R_2 = H$

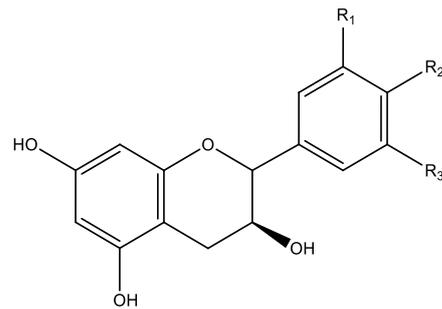
Cianidina: $R_1 = OH, R_2 = H$

Delfinidina: $R_1 = R_2 = OH$

Petunidina: $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$

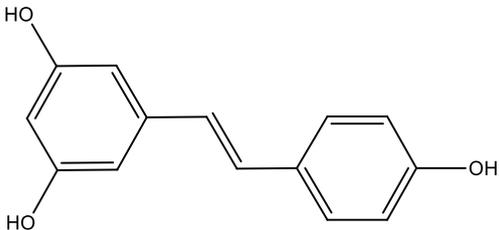
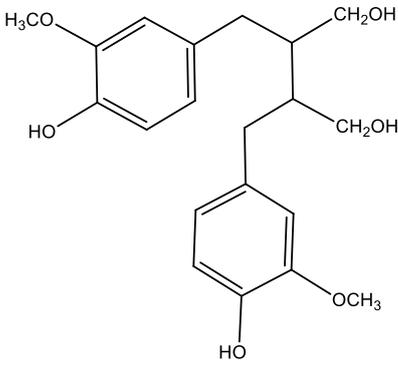
Malvidina: $R_1 = R_2 = OCH_3$

Flavanoles:



Catequinas: $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$

Galocatequina: $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

Estilbenos	Lignanos
<p style="text-align: center;"><u>Resveratrol:</u></p> 	<p style="text-align: center;"><u>Secoisolariciresinol:</u></p> 

Shahidi y Ambigaipalan (2015) señalaron que el ácido cafeico, uno de los ácidos cinámicos naturales más prominentes, bloquea selectivamente la biosíntesis de leucotrienos, componentes implicados en enfermedades de inmunorregulación, asma y reacciones alérgicas, por otra parte confirmaron que el ácido cafeico y algunos de sus ésteres pueden poseer actividad antitumoral contra la carcinogénesis del colon.

Los ácidos fenólicos se comportan como antioxidantes, debido a la reactividad de su grupo fenol (sustituyente hidroxilo en el anillo aromático). Aunque existen varios mecanismos, se cree que el modo predominante de actividad antioxidante es la eliminación de radicales mediante la donación de átomos de hidrógeno. Los sustituyentes en el anillo aromático afectan tanto a la estabilización como a la capacidad radical de estos ácidos fenólicos. Por lo tanto, diferentes ácidos tienen diferentes actividades antioxidantes (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Uno de los principales ácidos fenólicos es el ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) que se encuentra en las paredes celulares de las semillas y en las hojas. Se suele utilizar para la prevención del envejecimiento celular gracias a su poder antioxidante (Perez-Ternero, Alvarez de Sotomayor y Herrera, 2017).

Por otro lado, otro grupo de compuestos fenólicos son los fitoesteroles que son esteroides vegetales que tienen funciones estructurales y biológicas similares al colesterol, comprenden una familia de alrededor de 200 compuestos, siendo los más abundantes: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol. (Shahzad et al., 2017)

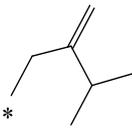
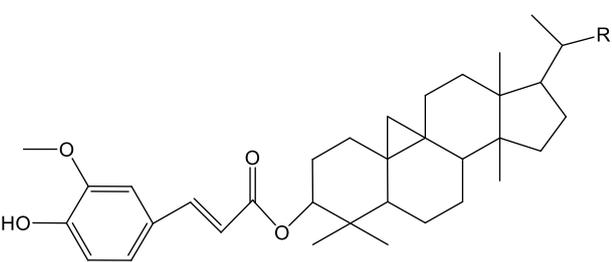
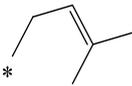
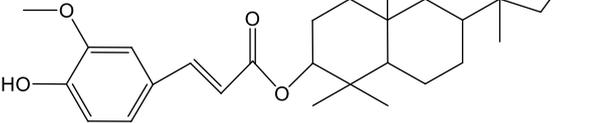
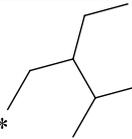
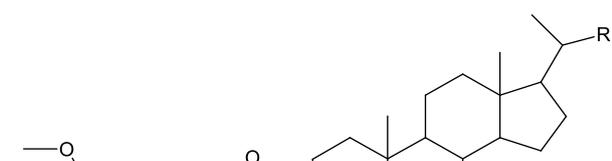
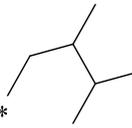
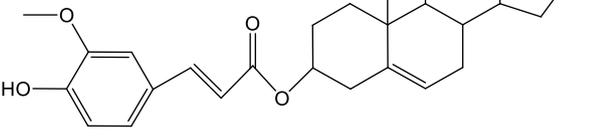
En relación con las fuentes de alimentos que presentan contenidos más altos en fitosteroles totales, como suma de los tres compuestos anteriores, destacan los aceites de salvado de arroz, maíz, germen de trigo, semillas de lino, semillas de algodón, de soja, cacahuetes y aceite de oliva. Estos han demostrado protección contra diversas enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Shahzad et al., 2017).

Un gran grupo son los flavonoides que son ciclados difenilpropano que se producen comúnmente en las plantas y en particular los alimentos vegetales. Son derivados de un compuesto parental formado por tres anillos fenólicos. Los derivados de flavonoides varían en su estructura alrededor del anillo de oxígeno heterocíclico, pero todos tienen el característico esqueleto de carbono C6-C3-C6. Los miembros de la familia inmediata de flavonoides incluyen flavonas, flavonol, isoflavonas, flavanonas, flavanonol, flavanol y antocianidina (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Por último se encuentran los estilbenos, en particular el trans-resveratrol y su glucósido, que son beneficiosos para la salud, con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antitumorales. En las plantas, una forma principal de resveratrol es el trans-resveratrol-3-O- β -D-glucósido, a menudo denominado como piceida o polidatina. Este es producido por las plantas en respuesta a los daños, en particular en las vides, pinos y legumbres (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Por otro lado, el γ -oryzanol es una mezcla de ésteres esterilicos y triterpenílicos de ácido ferúlico, los principales triterpenoides son 24-methylenecycloartanol, cycloartenol, campesterol, y sitosterol, siendo cicloartenol y 24-metilenocicloartenol los componentes mayoritarios en el γ -oryzanol de arroz (Moon et al., 2017). Las estructuras moleculares de los trans-ferulatos se muestra en la Tabla 3 (Lerma-García et al., 2009).

Tabla 3. Estructuras químicas de los principales componentes de γ -oryzanol (Fuente: Lerma-García et al., 2009)

Compuesto	R	Estructura molecular
24-Metilen-cicloartanilferulato		
Cicloartenilferulato		
β -Sitosterilferulato		
Campesterilferulato		

El γ -oryzanol contiene, además, concentraciones más bajas de ésteres de ácido trans-ferúlico con Δ 7-estigmasterol, estigmasterol, Δ 7-campesterol, Δ 7-sitostenol, campestenol y sitostenol, así como ésteres de los ácidos cis-ferúlico y cafeico. (Lerma-García et al., 2009).

Se plantea la hipótesis de que el γ -oryzanol se hidroliza en el intestino en ácido ferúlico y los alcoholes triterpénicos o esteroides como moléculas libres, que se podrían absorber y tener efectos sistémicos (Perez-Ternero, Alvarez de Sotomayor y Herrera, 2017).

En los últimos años, se ha explorado el potencial de los productos vegetales para servir como antioxidantes y proteger contra diversas enfermedades inducidas por los radicales libres (Shahidi y Ambigaipalan, 2015). Además de eliminar los radicales libres, las múltiples actividades de los antioxidantes incluyen inactivar los catalizadores metálicos por quelación, reducir los hidroperóxidos en derivados hidroxilo estables, e interactuar sinérgicamente con otros compuestos reductores.

1.4. Propiedades de los compuestos fenólicos y oryzanoles

Las características químicas descritas previamente se han relacionado con los múltiples efectos beneficiosos para la salud que poseen los compuestos fenólicos, tales como actividad antioxidante, antiinflamación, antibacteriana, antiviral, reacción antialérgica, propiedades antimutagénicas y anticancerosas (Sharma, Joshi, Kumar, Agrawal, y Prasad, 2017).

Las plantas necesitan compuestos fenólicos para la pigmentación, el crecimiento, la reproducción, la resistencia a patógenos y para muchas otras funciones. Así, los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de sustancias en el reino vegetal. Su contenido en los alimentos vegetales está en gran medida influenciado por factores genéticos y condiciones ambientales, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes de las plantas, el clima, la infección de patógenos y el ataque de plagas (Sharma et al., 2017).

El aumento de la popularidad de los aditivos alimentarios naturales puede inducir a más fabricantes de alimentos a reemplazar los antioxidantes sintéticos por ingredientes que contienen compuestos antioxidantes naturales. Por lo tanto, la investigación sobre aditivos naturales ha ganado impulso ya que se perciben como no plantea ningún riesgo para la salud de los consumidores (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Los flavonoides son los polifenoles naturales que representan una de las clases más frecuentes de compuestos en hierbas medicinales y también en verduras, frutos secos, frutas y bebidas como café, té y vino tinto; son también el grupo más habitual de fenoles en la dieta humana como en la animal. Los flavonoides son potentes depuradores de radicales libres con capacidad antioxidante, probados bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (Sharma et al., 2017).

El γ -oryzanol, como ya se ha dicho, es una mezcla de ésteres de ácido ferúlico y entre sus funciones se encuentran la reducción del colesterol, siendo anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos y antioxidantes. El potencial antioxidante de γ -oryzanol se debe a la capacidad de donación de hidrógeno del grupo fenólico de ácido ferúlico. Los esteroides vegetales esterificados con ácido férulico, tales como el γ -oryzanol,

aumentan el potencial antioxidante promoviendo el acceso molecular a componentes hidrófobos que son más susceptibles a la destrucción celular oxidativa, debido a que el potencial antioxidante aumenta con la extensión de hidroxilación de anillos aromáticos (Massarolo, Ribeiro, Furlong, y de Souza Soares, 2017).

Los antioxidantes son responsables de la inhibición y reducción de los radicales libres en la célula, para que estos sean considerados buenos antioxidantes es necesario que tengan como sustituyentes hidrógeno o electrones donantes al radical (Massarolo et al., 2017).

Esta mezcla de compuestos ha demostrado ser prometedora en el desarrollo de alimentos funcionales y aplicaciones industriales para estabilizar aceites y grasas (Massarolo et al., 2017).

1.5. Digestión *in vitro*.

Los nutricionistas y científicos de los alimentos han hecho esfuerzos importantes para encontrar sustancias bioactivas de plantas comestibles con potencial actividad de promoción de la salud, siendo el arroz un producto muy interesante (Sun, Huang, Cai, Cao y Han, 2015). Hasta donde sabemos, ninguno de los estudios anteriores sobre la actividad antioxidante del arroz ha incorporado un modelo de digestión *in vitro*.

Es importante evaluar los compuestos funcionales en los alimentos después de la digestión ya que esta puede afectar a las propiedades funcionales de los compuestos bioactivos. Investigaciones recientes han elucidado las propiedades funcionales de fenoles, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal *in vitro* en algunas verduras, frutas y sus extractos (Ti, Zhang, Li, Wei y Zhang, 2015).

Para investigar la digestibilidad de los alimentos con almidón, se han desarrollado tanto modelos animales *in vivo* como modelos simulados *in vitro* para representar el sistema de digestión gastrointestinal. Recientemente, se ha demostrado la facilidad de utilizar un proceso de digestión simulado *in vitro*, así como su flexibilidad con respecto a las condiciones experimentales y su capacidad para observar cambios en los atributos alimentarios (Tamura, Okazaki, Kumagai, y Ogawa, 2017).

Generalmente, los enfoques *in vitro* consisten en un sistema de digestión simulado en dos etapas en el que se establece una etapa gástrica con un pH bajo y pepsina y una fase intestinal posterior, con un pH neutro y enzimas intestinales. Sin embargo, normalmente no se ha considerado una etapa de digestión oral. Esta fase, que es un sistema intrínseco para el cuerpo humano, es necesaria para estudios *in vitro* en alimentos con almidón, porque las muestras se preparan a menudo como un polvo o una suspensión para reducir el tiempo experimental (Tamura et al., 2017).

La digestión oral como primer paso de la digestión de alimentos tiene dos acciones simultáneas: masticar para proporcionar molienda mecánica e hidrólisis de almidón enzimática que es mediada por la saliva. Después de que los alimentos se trituran en trozos pequeños y se mezclan con saliva con masticación, entonces la amilasa que está presente en la saliva es capaz de actuar sobre el almidón en el alimento (Tamura et al., 2017).

La digestión gastrointestinal simulada *in vitro* es un método convencional para determinar el potencial antioxidante de los polifenoles. Los compuestos polifenólicos alimentarios de los alimentos expuestos a la digestión *in vitro*, fueron expuestos a varias enzimas y los transformaron en diferentes formas estructurales, con diferentes propiedades químicas. Por otra parte, la cantidad de nutrientes y fitoquímicos absorbidos durante la digestión se rige por las propiedades físicas de la matriz alimentaria, lo que afecta la eficiencia de la digestión física, enzimática y química (Tamura et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, los beneficios para la salud de los compuestos antioxidantes resultan de gran interés. El salvado de arroz (*Oryza sativa* L.) es rico en compuestos de carácter funcional, por lo que se constituye como una fuente de compuestos fitoquímicos. Además, nuestro país es un importante productor de arroz, siendo el salvado de arroz un subproducto de la industria que podría ser utilizado para la obtención de antioxidantes, proporcionando un valor añadido, en lugar de suponer una importante pérdida para las industrias. Para conocer la capacidad de aprovechamiento de los compuestos bioactivos del salvado de arroz, se estudió la biodisponibilidad de éstos en el cuerpo humano mediante simulaciones de digestión *in vitro* de extractos ricos en compuestos funcionales. Las extracciones se hicieron tanto en medio acuoso como etanólico, y podrían ser aplicados en diferentes procesos de producción de alimentos, en resumen, conseguir la revalorización de residuos agroalimentarios.

Puesto que la tendencia actual es realizar elaboraciones mediante procesos respetuosos con el medio ambiente y exentos de aditivos sintéticos, como la extracción realizada de salvado de arroz. En este trabajo se propone además un método para conocer la biodisponibilidad y la actividad antioxidante de los compuestos en el cuerpo humano tras un proceso de digestión simulada, para conocer qué cantidad de éstos podrían sufrir alguna modificación que afectara a sus propiedades funcionales durante la digestión *in vitro*.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Caracterización de los extractos hidrófilo y lipófilo de salvado de arroz, así como la determinación de su actividad antioxidante.

Evaluación de la biodisponibilidad y funcionalidad de los extractos hidrófilo y lipófilo de salvado de arroz, mediante la simulación de una digestión *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El material empleado para el desarrollo del trabajo fin de máster fue salvado de arroz (*Oryza sativa* L.) de cultivo ecológico. El producto se empleó directamente para la preparación de las disoluciones sin realizar ningún pretratamiento a la muestra.

Los reactivos cloruro sódico, cloruro potásico, hidrogeno fosfato sódico y urea se han adquirido en la casa comercial Panreac®. Las enzimas usadas para las digestiones fueron: mucina del estómago porcino (M2378), pepsina de la mucosa gástrica porcina (77161), lipasa del páncreas porcino (L3126), pancreatina del páncreas porcino (P1750), se adquirieron en la casa comercial Sigma-Aldrich®, al igual que los siguientes reactivos: ácido cólico, ácido desoxicólico, fosfato dihidrógeno potásico, lactato sódico, urato sódico. El citrato potásico fue adquirido en la casa comercial Alfa-Aesar® y por último el nitrato amónico fue adquirido en la casa Emplura®.

3.2. Proceso de extracción de compuestos bioactivos

En primer lugar se procedió al tamizado del salvado de arroz, para posteriormente poder mezclarlo con el disolvente correspondiente, en el Extracto enriquecido con compuestos fenólicos (EF1), con agua como extractante y en el Extracto enriquecido con compuestos oryzanoles (EO2), con etanol como disolvente extractante, en relación 1:10 (p/v). Una vez obtenidos los extractos, la mezcla se mantuvo en un baño con agitación, Selecta Unitronic OR, a la temperatura y durante el tiempo necesario, 41,8°C y 138,6 min y 60°C y 97 min para cada extracto respectivamente. Estas condiciones se determinaron tras una metodología previa de optimización del proceso (datos no mostrados).

A continuación cada extracto, EF1 y EO2 se pasó por un juego de tamices y se centrifugó en un equipo Sorvall Legend XTR (Thermo Scientific, Langenselbold, Alemania) a 4°C, durante 10 min, a 1000 rpm, y se recogió el sobrenadante. Finalmente se realiza la medida en HPLC, de fenoles y γ -oryzanol de ambos extractos.

3.3. Simulación del proceso de digestión.

Para poder establecer las fases que influyen de forma directa sobre el proceso de digestión de los compuestos bioactivos del salvado de arroz, se desarrolló un modelo *in vitro* para lo que se tuvo en cuenta el estudio realizado por Lee, Lee, Chung, y Hur, (2016). Incluyó todas las etapas del sistema de digestión humana, de manera que se pudiese utilizar este modelo para detectar rápidamente la digestibilidad y la biodisponibilidad de los materiales alimenticios durante la digestión humana simulada *in vitro*. Finalmente se eligieron las siguientes fases:

- Simulación oral
- Simulación digestión gástrica
- Simulación digestión intestinal
- Simulación digestión en el intestino grueso

Una vez seleccionadas las fases que afectan al proceso, se procedió a realizar cada una de ellas en el orden descrito.

a) Simulación oral

En primer lugar, se procedió a la preparación de la saliva sintética (SSF, pH 6,8), según (Espinal-Ruiz et al., 2016), la cual contiene un 3,0% (p/p) de mucina y se preparó de acuerdo con la composición que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición química del fluido de saliva sintética.

Compuesto	Fórmula Química	Pesado (g)
Cloruro sódico	NaCl	1,6010
Nitrato amónico	NH ₄ NO ₃	0,3291
Fosfato dihidrogeno potásico	KH ₂ PO ₄	0,6264
Cloruro potásico	KCl	0,2021
Citrato potásico	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O	0,3091
Urato sódico	C ₅ H ₃ N ₄ O ₃ Na	0,0212
Urea	H ₂ NCONH ₂	0,1983
Lactato sódico	C ₃ H ₅ O ₃ Na	0,1451
Mucina	-	30

Una vez preparada la SSF, la simulación de la fase oral se desarrolló en un tubo falcon que contenía la mezcla extracto – SSF, 0,5g en 20mL, las mezclas fueron incubadas en un equipo Orbital Shaker Incubator (OPTIC ivymen SYSTEM) a 37°C con agitación continua a 100 rpm durante 10 minutos, para imitar las condiciones de la boca. Aunque el periodo de 10 minutos de incubación es algo más largo que *in vivo* (aproximadamente 1 minuto); la exactitud y la reproducibilidad en una situación de laboratorio puede verse comprometida si se utiliza cualquier tiempo de digestión más corto. Además, se ha recomendado un tiempo de digestión oral de 10 minutos para compensar la falta de una acción mecánica adecuada para modelos estáticos, que en la mayoría de los casos es difícil de simular (Espinal-Ruiz et al., 2016).

Para el análisis, después de cada fase de la digestión, las mezclas obtenidas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4°C a 10000 rpm para eliminar las partículas sólidas empleando un equipo Allegra 25R (Beckman Coulter, Brea, California)

b) Simulación digestión gástrica

El fluido gástrico sintético (SGF), se preparó de acuerdo con el método The United States Pharmacopeial Convention, Inc, (2000), añadiendo 0,16 g de pepsina y 0,10 g de cloruro sódico en agua MiliQ hasta un volumen final de 50 mL a pH 1,5 (Martín-Vertedor, Garrido, Pariente, Espino, y Delgado-Adámez, 2016).

A continuación, a la mezcla extracto - SSF se le añadieron 3,6 mL de SGF para obtener una mezcla final a pH 2,2 la cual se agitó durante 2 horas a 37°C y 100 rpm en el incubador (Lee et al., 2016).

c) Simulación digestión intestinal

El fluido intestinal sintético (SIF) se preparó en tampón PBS 0,1 M (100 mL, pH 7,4) añadiendo 20 mg de pancreatina, 5 mg de lipasa, 10 mM de ácido cólico y 10 mM de ácido desoxicólico (Martín-Vertedor et al., 2016).

Posteriormente a la mezcla obtenida en la fase de simulación digestiva gástrica se le ajustó el pH a 6,5 con NaOH para inactivar la pepsina. Se añadieron 3,6 mL de SIF al resultado de la fase gástrica, ajustando el pH final a 6,5 y la mezcla se agitó durante 2 horas a 37°C y 100 rpm en el incubador (Martín-Vertedor et al., 2016).

d) Simulación digestión en el intestino grueso

Para la simulación de la digestión en el intestino grueso se siguió la metodología establecida por Lee et al., (2016) en la cual, *E. coli* y *L. casei* se inoculan a la muestra después de la simulación de la digestión en el intestino delgado. Para ello, ambas bacterias fueron cultivadas por separado en caldo Mueller-Hinton a 37°C durante 24-48 horas.

Después de la incubación, el número final de bacterias se encontró entre 10^8 y 10^{10} UFC/mL. Para la simulación del proceso de digestión en el intestino grueso, se añadieron 9 mL del caldo que contenía ambas bacterias, y se incubó durante 4 horas a 37°C. Una vez pasado este tiempo, se centrifugó el resultante y se congeló a -80°C hasta análisis.

Simultáneamente se preparó la misma cantidad de medio de cultivo, pero esta vez sin bacterias, para eliminar la posibilidad de que el propio medio fuese el causante de alguna contaminación (blanco).

3.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la realización de la determinación de los compuestos bioactivos se utilizó un sistema HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador automático y un detector de red de diodos (DAD). La columna analítica empleada fue una columna C-18 Gemini-NX (Phenomenex, 4,6 μ m, 4,6 x 150 mm) mantenida a 40 °C con un termostato.

Para realizar el análisis de los compuestos fenólicos se empleó como disolvente para la fase móvil: agua (A) y acetonitrilo (B), conteniendo cada uno de ellos 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. El modo gradiente fue establecido de la siguiente manera: condiciones iniciales 3 % B; de 0 a 30 minutos 35 % B; de 30 a 33 minutos 50 % B; y de 33 a 34 minutos 100 % B. El flujo se fijó en 1,0 mL/min para todos los experimentos, y el volumen inyectado fue de 10 μ L de muestra.

La detección de los compuestos se llevó a cabo a 280 y 320 nm, y la cuantificación se realizó mediante el método de patrón externo, empleando como patrones: ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico y ácido gálico, medidos en mg/L. El procesamiento de los datos cromatográficos se realizó mediante el software HP ChemStation (Rev.B.04.01., Agilent Technologies, California, USA).

3.5. Actividad Antioxidante Total

La medida de la actividad antioxidante total (AAT) sobre los extractos obtenidos del salvado de arroz se determinó tanto para el caso de los compuestos fenólicos como para los oryzanoles.

En el caso de los compuestos fenólicos, al tratarse de muestras hidrófilas, se llevó a cabo según el método de Turoli et al., (2004). Este método se basa en la reacción que tiene lugar cuando el compuesto ABTS ([2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)]), que es incoloro, se encuentra en presencia de persulfato de potasio, constituyendo así un equilibrio con su radical ABTS* (cromóforo azul-verdoso).

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto se realiza midiendo la disminución de la absorbancia del radical ABTS*, ya que esta reacción revierte si en el medio se encuentra una sustancia antioxidante.

La generación de este radical se produce por reacción del mismo con persulfato en presencia de tampón fosfato (pH 7,5, 50 mM). La mezcla de ambos compuestos debe permanecer durante 24 horas en oscuridad para que se estabilice, antes de realizar las medidas. Una vez generado el radical, se adicionan 10 µL del extracto de la muestra, sobre el cual se ha realizado previamente una dilución 1:2 con agua MilliQ, a 100 µL de ABTS y se observa la disminución de la absorbancia, realizando las medidas a 750 nm.

Para cuantificar la actividad antioxidante, se llevó a cabo el método de patrón externo empleando como antioxidante sintético el compuesto Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), y expresando los resultados como mmoles Trolox / L de extracto. Este método se encuentra adaptado a lectores multiplaca (Thermo Scientific Appliskan[®], Vantaa, Finlandia), permitiendo así la realización de un gran número de medidas con pocos reactivos.

Para el caso del γ -oryzanol, al tratarse de muestras lipófilas, en lugar de emplear como disolvente tampón fosfato, se utiliza etanol acidificado. Las medidas de absorbancia también se realizaron a 750 nm.

3.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos del análisis de los compuestos extraídos, se realizó mediante el programa GraphPad Prism 6.01 (1992-2012 GraphPad Software, Inc.). Los resultados obtenidos se estudiaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) aplicándose el test de comparación de medias de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los extractos

a) Extracto acuoso (EF1)

El primero de los extractos fue el obtenido con agua como extractante, y se caracterizó mediante cromatografía líquida de alta resolución. En él, se encontraron las siguientes concentraciones de compuestos bioactivos, mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5: *Compuestos bioactivos y AAT del extracto acuoso de salvado de arroz.*

	Media \pm SD
Ácido ferúlico (mg/g)	1,00 \pm 0,03
Ácido p-cumárico (mg/g)	0,19 \pm 0,02
Ácido sinápico (mg/g)	0,09 \pm 0,02
γ -oryzanol (mg/g)	0,079 \pm 0,002
AAT (mmol Trolox/L extracto)	14,3 \pm 1,5

AAT: Actividad antioxidante total del extracto inicial.
Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

Como se puede observar, este extracto mostró una elevada concentración en ácidos hidroxicinámicos, de los cuales, el mayoritario es el ácido ferúlico. Este resultado concuerda con el obtenido en estudios anteriores (Butsat y Siriamornpun, 2010). Además, el extracto contenía otros compuestos fenólicos en menor proporción y que no han sido identificados hasta el momento. Por otro lado, se cuantificó la cantidad de γ -oryzanol presente en la muestra. La cantidad de γ -oryzanol presente en el extracto estudiado fue más baja que la encontrada en estudios anteriores (Butsat y Siriamornpun, 2010), debido, probablemente a su baja solubilidad en agua.

Finalmente, se cuantificó la actividad antioxidante del extracto por el método ABTS, obteniendo 14,3 \pm 1,5 mmol Trolox/L extracto, este resultado se puede comparar con la actividad oxidante obtenida por Mareček, Mikyška, Hampel, Čejka, Neuwirthova, Malachova, y Cerkal (2016) en el estudio de otros cereales como la cebada y la malta.

b) Extracto alcohólico (EO2)

El segundo extracto, obtenido con etanol como disolvente extractante, fue caracterizado igualmente obteniendo los siguientes resultados, mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6: *Compuestos bioactivos y AAT del extracto alcohólico de salvado de arroz.*

	Media \pm SD
Ácido ferúlico (mg/g)	0,117 \pm 0,001
Ácido p-cumárico (mg/g)	0,58 \pm 0,007
Ácido sinápico (mg/g)	0,0048 \pm 0,0002
γ -oryzanol (mg/g)	14,41 \pm 0,26
AAT (mmol Trolox/L extracto)	6,5 \pm 1,6

AAT: Actividad antioxidante total del extracto inicial.
Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

El γ -oryzanol se encuentra en este extracto de forma mayoritaria, aunque también se han encontrado cantidades significativas de ácidos hidroxicinámicos. El resultado obtenido es similar al de otros autores (Proctor y Bowen, 1996; Iqbal, 2005), con la diferencia de que el extracto fue obtenido en una matriz alcohólica mientras que estos autores emplearon el hexano o isopropanol como extractante, lo que hace difícil su uso en para el consumo humano en alimentación, debido al carácter tóxicos de estos solventes orgánicos.

Por último, se evaluó la AAT del extracto, siendo inferior a la del anterior. Esto puede ser debido a que en el primero la concentración en compuestos fenólicos, conocidos por su poder antioxidante, fuera muy superior.

4.2. Biodisponibilidad de compuestos funcionales

a) Extracto enriquecido en compuestos fenólicos

Una vez caracterizado el extracto acuoso, se procedió a la simulación del proceso de digestión humana. Para ello, se siguió la metodología explicada en materiales y métodos. Al final de cada paso del proceso, se obtuvo una cantidad de

muestra suficiente para la realización del análisis. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos del extracto acuoso de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión.

Fase	Ácido ferúlico (mg/ g extracto)	Ácido p-cumárico (mg/ g extracto)	γ -oryzanol (mg/ g extracto)	AAT (mmol Trolox/L extracto)
Extracto	1,00 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	0,079 \pm 0,002	14,3 \pm 1,5
Oral	0,023 \pm 0,004	0,0022 \pm 0,0002	n.d.	n.d.
Gástrica	1,67 \pm 0,03	0,300 \pm 0,006	n.d.	3,1 \pm 0,7
Intestino delgado	0,574 \pm 0,007	0,111 \pm 0,005	n.d.	7,2 \pm 0,5
Intestino grueso	0,92 \pm 0,03	0,180 \pm 0,007	n.d.	n.d.
Intestino grueso blanco	1,13 \pm 0,15	0,008 \pm 0,002	n.d.	n.d.
Nivel de significación	*	*	-	-

AAT: Actividad antioxidante total.

Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

*: indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada parámetro entre las diferentes fases de la digestión.

n.d.: indica que no se ha detectado el parámetro.

En la Tabla 7 se muestra la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos del extracto acuoso en cada una de las fases de la digestión. Se puede observar cómo va variando la biodisponibilidad de los ácidos hidroxicinámicos, en cambio el γ -oryzanol a partir de la fase oral no se detecta en ninguna de las fases.

En la Figura 2 se puede observar la evolución de los compuestos bioactivos asimilados en el proceso de digestión.

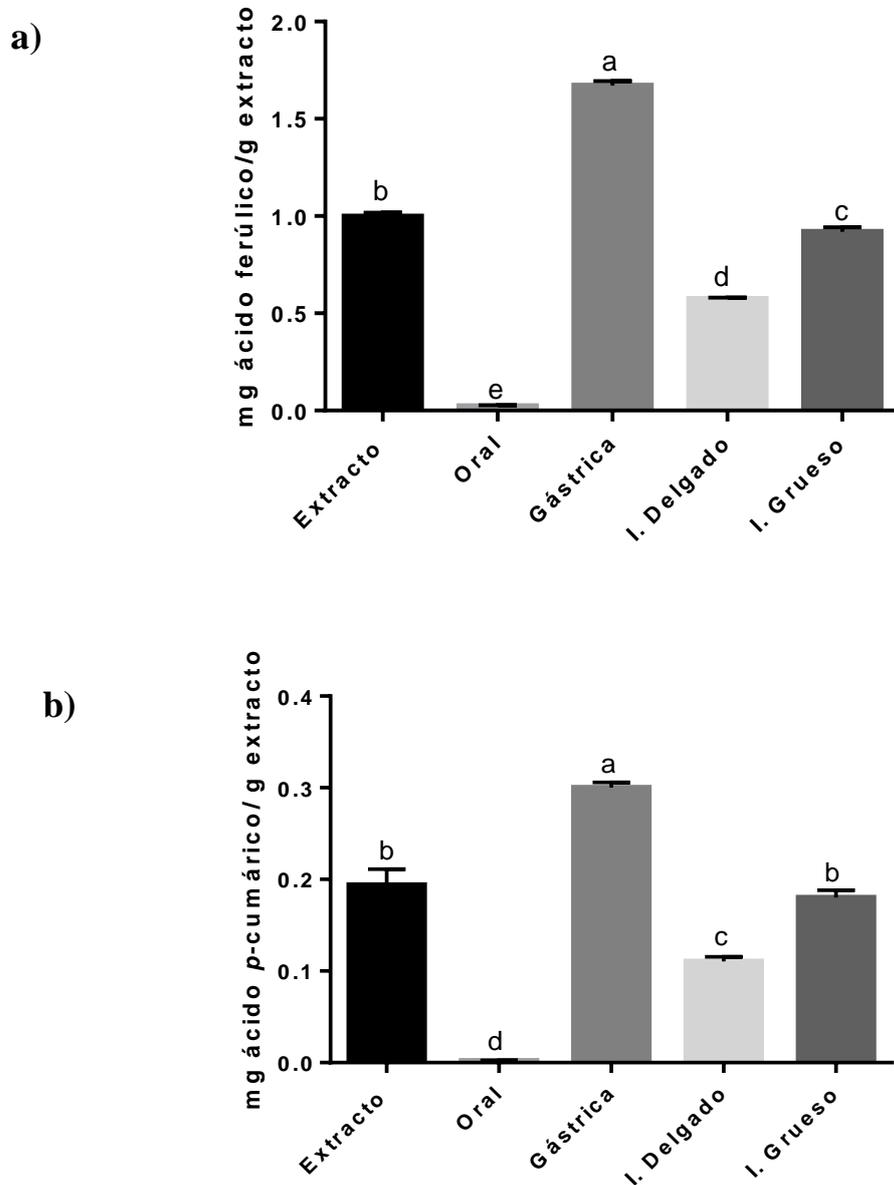


Figura 2. Disponibilidad de compuestos fenólicos del extracto acuoso de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión. a) Ácido ferúlico b) Ácido *p*-cumárico
Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras a lo largo de la simulación de la digestión. Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

Se puede observar como a nivel oral, se produjo una reducción de ambos compuestos fenólicos presentes en el extracto, esto es debido a que en la fase oral se produce una estructura compleja en la cual las moléculas se adhieren entre sí y no son detectables, por lo que no están disponibles y los niveles de compuestos fenólicos son mínimos. Sin embargo, es interesante que a nivel gástrico, la cantidad de ácidos ferúlico y *p*-cumárico disponibles sea incluso mayor que en el extracto base. Esto puede ser debido a que estuvieran retenidos en la matriz, unidos a azúcares o formando parte del γ -oryzanol y con la digestión ácida los enlaces se rompan y se liberen estos compuestos. De hecho, estudios como el de Mandak y Nyström (2012) muestran esta ruptura de los enlaces liberando ácido ferúlico y esteroides. Por otro lado, tras la digestión en el intestino delgado, se produce una reducción de los compuestos biodisponibles hasta poco más del 50% del valor en el extracto inicial. Esto está de acuerdo con el estudio de (Martín-Vertedor et al., 2016) en el que se muestra una reducción paulatina de los compuestos biodisponibles a medida que transcurren las diferentes fases de la digestión *in vitro* en extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de olivo.

Por último, se realizó la cuantificación de compuestos bioactivos tras el proceso de digestión simulada en el intestino grueso. Estudios anteriores han demostrado que las bacterias presentes en el intestino grueso pueden modificar la estructura de los compuestos fenólicos, llevando a cabo apertura de anillos, reducciones, metilaciones, hidroxilaciones, etc. (Pathways, The, y Phenolic, 2009; Braune y Blaut, 2016; Williamson y Clifford, 2010).

Por su parte, el γ -oryzanol no estaba presente en ninguna de las fases de la digestión analizadas. Lo que indica que estos compuestos no están disponibles de esta forma, ya que se pierden en el proceso de digestión.

Tras la medida del contenido de compuestos fenólicos y γ -oryzanol mediante HPLC, en el extracto acuoso, se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante total. En la Figura 3 se puede observar el estudio de la actividad antioxidante total del extracto en las diferentes fases del proceso de digestión.

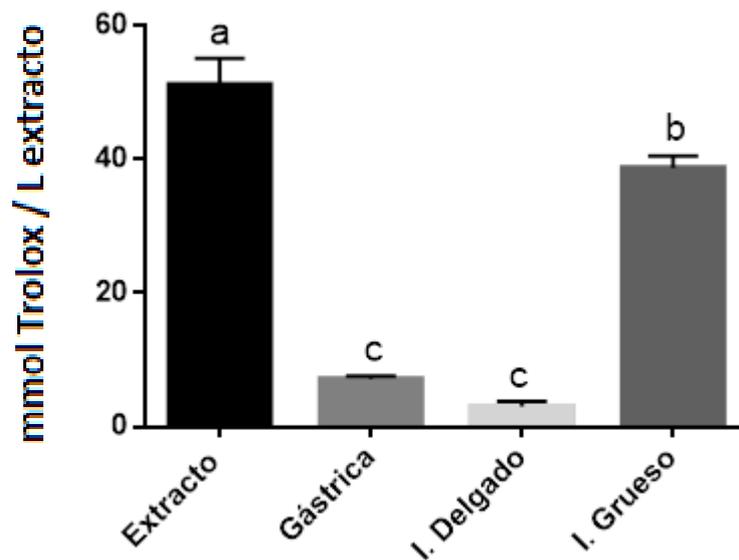


Figura 3. Actividad antioxidante del extracto acuoso de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión.

Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras a lo largo de la simulación de la digestión. Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

En cuanto a la actividad antioxidante, como se puede observar en la Figura 3, en el caso del extracto inicial la concentración de compuestos antioxidantes es superior a la que se encuentra en cualquiera de las otras fases del proceso digestivo. En cambio, parece interesante que, tanto en la fase gástrica como en el intestino delgado, la actividad antioxidante sea muy inferior a la del intestino grueso. Esto puede ser debido a que en la última fase están presentes las bacterias, pudiendo modificar la estructura de los compuestos fenólicos transformándolos en compuestos antioxidantes.

b) Extracto enriquecido en γ -oryzanol

Análogamente al proceso anterior, el extracto etanólico se sometió a un proceso de digestión, mostrándose los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos del extracto etanólico de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión.

Fase	Ácido ferúlico (mg/ g extracto)	Ácido p-cumárico (mg/ g extracto)	γ -oryzanol (mg/ g extracto)	AAT (mmol Trolox/L extracto)
Extracto	0,1169 \pm 0,003	0,058 \pm 0,007	14,41 \pm 0,26	6,5 \pm 1,6
Oral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gástrica	0,094 \pm 0,004	0,0118 \pm 0,0007	n.d.	3,1 \pm 0,6
Intestino delgado	0,095 \pm 0,004	0,020 \pm 0,003	n.d.	3,3 \pm 0,8
Intestino grueso	0,097 \pm 0,007	0,04 \pm 0,01	n.d.	n.d.
Intestino grueso blanco	0,11 \pm 0,03	0,023 \pm 0,04	n.d.	n.d.
Nivel de significación	*	*	-	-

AAT: Actividad antioxidante total.

Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

*: indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada parámetro entre las diferentes fases de la digestión.

n.d.: indica que no se ha detectado el parámetro.

En la Tabla 8 se muestra la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos del extracto etanólico en cada una de las fases de la digestión. Se puede observar que al igual que en el extracto acuoso el γ -oryzanol no se detecta a partir de la fase oral.

En nuestro estudio se ha observado un desplazamiento de los picos en el cromatograma, sin embargo, todavía no ha sido posible identificar si este desplazamiento se debe a cambios estructurales en las moléculas estudiadas o simplemente se debe al cambio de medio en el que se encuentran.

La concentración de los compuestos bioactivos encontrados tras cada fase de digestión pueden observarse en la siguiente Figura 4.

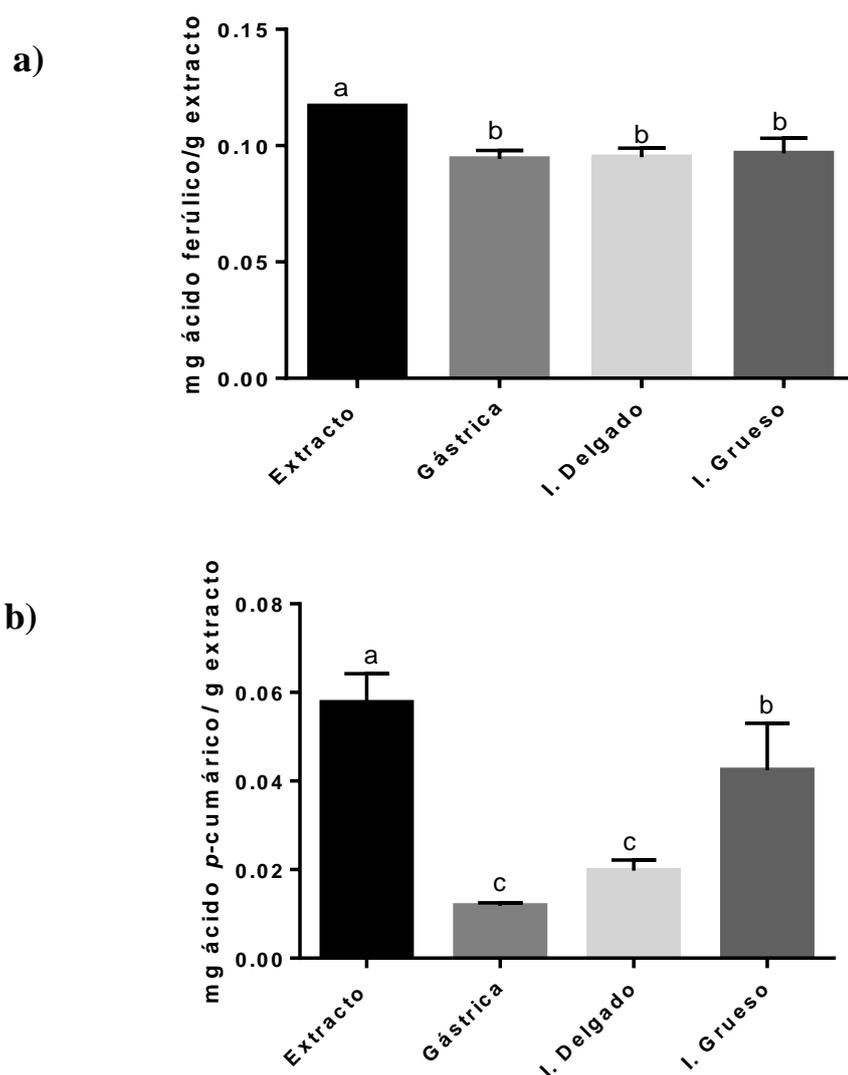


Figura 4. Disponibilidad de compuestos bioactivos del extracto etanólico de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión. a) Ácido ferúlico b) Ácido p-cumárico

Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras a lo largo de la simulación de la digestión. Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

Como se puede observar, la cantidad de ácido ferúlico se mantiene constante a lo largo de todo el proceso de digestión, y solo ligeramente inferior al cuantificado en el extracto inicial. Si se compara este resultado con el anterior, (Figura 2a), se puede observar que mientras en el primer caso la cantidad iba aumentando o reduciéndose, obteniendo su máxima concentración en la fase gástrica, en el extracto EO2 todas las fases del proceso digestivo tienen la misma concentración.

Por otro lado, la cantidad de ácido p-cumárico se reduce mucho en la fase gástrica y posteriormente va aumentando progresivamente durante el proceso digestivo, siendo siempre inferior a lo obtenido en el extracto inicial. Si se compara con el resultado anterior (Figura 2b), se puede observar, que el ácido ferúlico, presentó una notable diferencia entre ambas fases gástricas, siendo en el caso anterior la concentración mucho más elevada.

En cuanto al γ -oryzanol, al igual que en el caso anterior, y pese a encontrarse en una cantidad mucho mayor en el extracto inicial, no se detectó en ninguna de las fases del proceso.

Tras la medida del contenido de compuestos fenólicos y oryzanoles mediante HPLC, en el extracto etanólico, se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante.

En la Figura 5 se puede observar el estudio de la actividad antioxidante total del extracto en las diferentes fases del proceso de digestión.

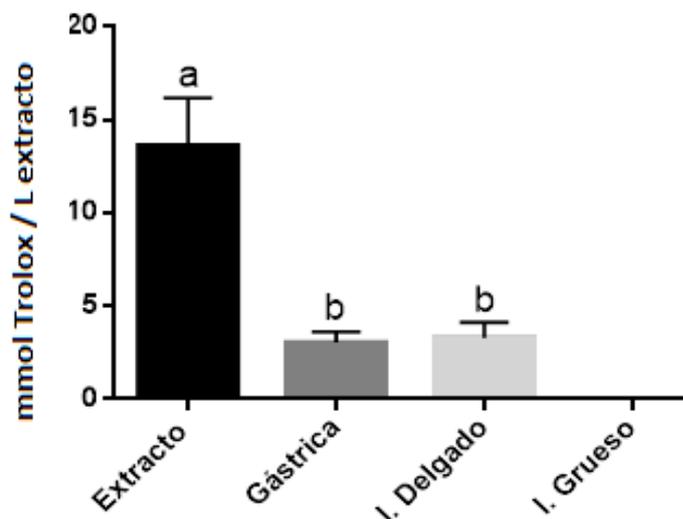


Figura 5. Actividad antioxidante del extracto etanólico de salvado de arroz en diferentes fases de la digestión.

Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras a lo largo de la simulación de la digestión. Se representa la media \pm desviación estándar. (n=3).

En cuanto a la actividad antioxidante, como se puede observar en la Figura 5, en el caso del extracto puro la actividad antioxidante fue superior a la que se encontró en cualquiera de las otras fases del proceso digestivo, excepto en la última fase, la del intestino grueso, que en este caso el valor de la actividad antioxidante total fue cero.

Si se compara la AAT con la del extracto EF1 (Figura 3), se puede observar una gran diferencia en los valores del intestino grueso, siendo en el extracto acuoso (EF1) notoriamente superior a las otras fases, gástrica e intestino delgado, y en el extracto etanólico (EO2) no se encontró ninguna señal de actividad antioxidante total.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- La caracterización fitoquímica del extracto acuoso mostró una mayor concentración de compuestos fenólicos que el extracto etanólico, que presentó a su vez niveles de γ -oryzanol mayores.
- En el extracto acuoso la AAT fue mayor, este hecho es indicativo de que los ácidos hidroxicinámicos, componente principal de los extractos acuosos, presentan más bioactividad que el γ -oryzanol, mayoritario en los extractos lipófilos.
- Las dos digestiones conllevan una disminución de los compuestos fitoquímicos (extracto 1: fenoles; extracto 2: γ -oryzanol), observándose que en la fase oral la biodisponibilidad es prácticamente nula, produciéndose luego un aumento de esta posiblemente debida a la rotura de los enlaces formados.
- En ambos extractos se produce una disminución de la AAT debida a la menor cantidad de compuestos fitoquímicos (extracto 1: fenoles; extracto 2: γ -oryzanol), ya que estos compuestos son los responsables de dicha propiedad.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E.S., Young, J.C., Rabalski, I.(2006) Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4696–4704
- Braune, A., y Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary fl avonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216–234.
- Butsat, S., Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk , bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2), 606–613.
- Espinal-Ruiz, M., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E., McClements, D. J. (2016). Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) pectins. *Food Hydrocolloids*, 52, 329–342.
- Fei-fei, X. U., Liang, J. I. N., Yan, H., Chuan, T., Ya-ling, C., Jin-song, B. A. O. (2015). Association mapping of quantitative trait loci for yield-related agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 3119(15), 1–15.
- Iqbal, S. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93, 265–272.
- Justo Gómez, M^a Luisa. (2014).Caracterización de las propiedades funcionales a nivel cardiovascular y del síndrome metabólico de un extracto enzimático de salvado de arroz. Tesis Doctoral. Unversidad de Sevilla.
- Kim, S. M., Chung, H. J., y Lim, S. T. (2014). Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 243–248.
- Lee, S. J., Lee, S. Y., Chung, M. S., y Hur, S. J. (2016). Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121.
- Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F., Mendonça, C. R. B., y Ramis-Ramos, G. (2009). Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. *Food Chemistry*, 115(2), 389–404.
- Mandak, E., y Nyström, L. (2012). The effect of in vitro digestion on steryl ferulates from rice (*Oryza sativa* L.) and other grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(24), 6123–6130.
- Martín-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J. A., Espino, J., y Delgado-Adámez, J. (2016). Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value: Potential Health Benefits of Olive Leaf Extract. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1172–1179.
- Massarolo, K. C., Ribeiro, A. C., Furlong, E. B., y de Souza Soares, L. A. (2017). Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. *Journal of Cereal Science*, 75, 54–60.

- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthova, J., Malachova, A. y Cerkal, R. (2016). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40-45.
- Moon, S.-H., Kim, D., Shimizu, N., Okada, T., Hitoe, S., y Shimoda, H. (2017). Ninety-day oral toxicity study of rice-derived γ -oryzanol in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Reports*, 4, 9–18.
- Pathways, M. M., The, O. F., y Phenolic, D. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota : Role in Human Health, 6485–6501.
- Perez-Tertero, C., Alvarez de Sotomayor, M., y Herrera, M. D. (2017). Contribution of ferulic acid, γ -oryzanol and tocotrienols to the cardiometabolic protective effects of rice bran. *Journal of Functional Foods*, 32, 58–71.
- Proctor A., Bowen DJ. (1996) Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 73(6): 811-813
- Renuka Devi, R., Arumugan, C. (2007) Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresource Technology*, 98 (16): 3037-3043
- Sabir, A., Rafi, M., Darusman, L. K. (2017). Discrimination of red and white rice bran from Indonesia using HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics. *Food Chemistry*, 221, 1717–1722.
- Shahidi, F., y Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shahzad, N., Khan, W., MD, S., Ali, A., Saluja, S. S., Sharma, S., Al-Allaf, F., Abduljaleef, Z., Ibrahim, I., Abdel-Wahab, A., Afify, M., Al-Ghamdi, S. S. (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 88, 786–794.
- Shao, Y., y Bao, J. (2015). Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*, 180, 86–97.
- Shao, Y., Jin, L., Zhang, G., Lu, Y., Shen, Y., y Bao, J. (2011). Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(5), 1005–1016.
- Sharma, A., Joshi, N., Kumar, R. A., Agrawal, P. K., y Prasad, S. (2017). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant properties from different cultivars of *Cyamopsis tetragonaloba* (L.) Taub. *Microchemical Journal*, 133, 622–628.
- Sumczynski, D., Kotásková, E., Družbíková, H., y Mlcek, J. (2016). Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food Chemistry*, 211, 339–346.
- Sun, D., Huang, S., Cai, S., Cao, J., y Han, P. (2015). Digestion property and synergistic effect on biological activity of purple rice (*Oryza sativa* L.) anthocyanins subjected to a simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Food Research International*, 78,

114–123.

Tamura, M., Okazaki, Y., Kumagai, C., y Ogawa, Y. (2017). The importance of an oral digestion step in evaluating simulated in vitro digestibility of starch from cooked rice grain. *Food Research International*, 94, 6–12.

The United States Pharmacopeial Convention, Inc. (2000). *United States Pharmacopeia and National Formulary USP 24–NF 19*. Rockville, MD.

Ti, H., Zhang, R., Li, Q., Wei, Z., y Zhang, M. (2015). Effects of cooking and in vitro digestion of rice on phenolic profiles and antioxidant activity. *Food Research International*, 76(Part3), 813–820.

Universidad Nacional Autónoma de México, 2013. http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=24. [Consultado en Septiembre 2017]

Wang, T., Khir, R., Pan, Z., y Yuan, Q. (2017). Simultaneous rough rice drying and rice bran stabilization using infrared radiation heating. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 281–288.

Williamson, G., y Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols : the missing link to biological activity, *The British Journal of Nutrition*, 104(3), 48–66.