

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DISTINTOS CULTIVARES DE AVENA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAULINA MACKARENA TORRES CORALES

TEMUCO – CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DISTINTOS CULTIVARES DE AVENA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAULINA MACKARENA TORRES CORALES
PROFESOR GUIA: DRA. FRANCISCA ACEVEDO CANALA-ECHEVARRÍA
TEMUCO – CHILE

2013

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DISTINTOS CULTIVARES DE AVENA

PROFESOR GUIA

: _____

DRA. FRANCISCA ACEVEDO CANALA-ECHEVARRÍA
QUIMICO FARMACEUTICO
MAGISTER EN CIENCIAS
DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES
CENTRO DE GENOMICA NUTRICIONAL
AGROACUICOLA

PROFESORA CONSEJERA

: _____

MONICA MATHIAS RAMWELL
INGENIERO AGRÓNOMO C/M PRODUCCIÓN VEGETAL
MAGÍSTER EN CIENCIAS VEGETALES C/M
MEJORAMIENTO VEGETAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

*A mi madre, por ser el pilar de mi vida en todo momento
y a los que me apoyaron a lo largo del
desarrollo de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto INNOVA-CORFO 12IDL2-13628 por financiar esta investigación. A mi tutora, Francisca Acevedo por su apoyo, paciencia y tiempo, a mi cotutora Monica Mathias por su buena disposición y ayuda, y a la Unidad de Tecnología y Procesos (UTP) del Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA) por haber proporcionado las instalaciones, equipos y el personal que me ha apoyado y ha hecho posible la realización de esta investigación.

Índice de contenidos

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 La avena	3
2.2 Polifenoles	4
2.3 Avenantramidas	5
2.4 Beneficios para la salud asociados al consumo de avena	6
2.4.1 Prevención del cáncer de colon.....	6
2.4.2 Disminución del riesgo asociado a enfermedades cardiovasculares	7
2.4.3 Biodisponibilidad de polifenoles y avenantramidas	7
2.5 Usos de la avena en alimentación	8
2.6 Avenantramidas y su función como fitoalexinas.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Materiales.....	11
3.1.1 Materia prima	11
3.1.2 Materiales de laboratorio y reactivos.....	12
3.1.3 Equipos e instrumentos.....	13
3.2 Métodos estadísticos	13
3.2.1 Método Plackett Burman	14
3.2.2 Metodología Superficie de Respuesta (MSR).....	15
3.3 Métodos experimentales.....	17
3.3.1 Determinación del contenido de polifenoles totales	17
3.3.2 Determinación de la actividad antioxidante	18
3.3.3 Validación del método de detección y cuantificación de avenantramidas por HPLC.....	20
3.3.4 Determinación contenido de avenantramidas	26

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Métodos estadísticos	27
4.1.1 Método Plackett Burman	27
4.1.2 Metodología Superficie de Respuesta (MSR).....	27
4.2 Métodos experimentales	32
4.2.1 Determinación del contenido de polifenoles totales	33
4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante	34
4.2.3 Validación del método de detección y cuantificación de avenantramidas	38
4.2.4 Determinación del contenido avenantramidas	44
5. CONCLUSIONES	47
6. LITERATURA CITADA	49

RESUMEN

El consumo de avena presenta innumerables efectos beneficiosos para la salud, dentro de los cuales se destaca su actividad antioxidante asociada a la presencia de polifenoles. Existe un grupo de polifenoles exclusivos de la avena llamados “avenantramidas” (Av), en donde las clases A, B y C son las más abundantes en el grano de avena.

En el presente trabajo se estandarizó metodologías para la medición de compuestos fenólicos totales (CPT), avenantramidas (Av-A, -B, -C) y capacidad antioxidante (AOA), en granos descascarados de avena. Para esto, se determinó las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos, realizando un “screening” mediante un diseño experimental Plackett Burman y luego de identificadas las variables con mayor influencia en el proceso de extracción, se desarrolló una metodología de superficie de respuesta (MSR). Paralelamente, se validó la metodología de detección y cuantificación de Av-A, -B, -C en términos de linealidad, precisión y exactitud. Para asegurar la eficiencia de la medición de Av a través del tiempo, se determinó la asimetría de los *peaks*, su ancho y platos teóricos. Finalmente se determinó el CPT (método Folin Ciocalteu), AOA (método ORAC y DPPH) y el contenido de Av-A, Av-B y Av-C en un grupo selecto de genotipos de avena (n=13).

Las condiciones óptimas de extracción de polifenoles desde granos descascarados de avena fueron: proporción agua:etanol 70:30 (v/v), cantidad avena:solvente 1:6 (p/v), temperatura 45 °C, agitación 200 rpm y tiempo 20 minutos. En cuanto a la medición de Av, la baja dispersión de los datos confirmó la precisión del sistema. Los límites de detección fueron 0,0857 - 0,851 - 1,2198 mg/L y los límites de cuantificación 0,2591 - 0,2436 - 3,2897 mg/L, para Av-A - Av-B - Av-C, respectivamente. En base a estos resultados, se concluye que el método cromatográfico utilizado en este estudio es preciso, exacto, lineal y sensible para ser aplicado en la cuantificación de avenantramidas en distintos genotipos de avena. Los valores de linealidad indicaron una estrecha relación entre la concentración de avenantramidas y la respuesta entregada por el detector.

En un grupo de diez genotipos de avena, el CPT fluctuó entre 8,061 y 66,399 mg equivalentes de ácido gálico/g de avena, obtenido en los cultivares AVE1 y AVE13, respectivamente. Utilizando

DPPH, se obtuvo valores de AOA entre $10,081 \pm 0,635$ y $18,997 \pm 1,830$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, para los genotipos AVE1 y AVE14, respectivamente. A través de ORAC, los valores de AOA fluctuaron entre $283,635 \pm 31,549$ y $436,738 \pm 53,969$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, para los cultivares AVE1 y AVE12, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitirán contribuir en la caracterización fenotípica de la calidad nutricional del grano de avena, para asistir el mejoramiento genético orientado a la generación de alimentos más saludables.

SUMMARY

Oat consumption possesses numerous health benefits, among which stand out its antioxidant activity associated with the presence of polyphenols. There is a group of unique polyphenols from oats called "avenanthramides" (Av), where classes A, B and C are the most abundant in the oat grain.

Methodologies for the measurement of total phenolic compounds (TPC), avenanthramides (Av-A, -B, -C) and antioxidant capacity (AOA) in hulled oat grain were standardized. For this, the optimum conditions for extraction of phenolic compounds were determined by a "screening" using a Plackett Burman experimental design, and then, once identified the most influential variables in the extraction process. A response surface methodology (RSM) was developed. Parallel to this, the method of detection and quantification of Av-A, -B and -C was validated in terms of linearity, precision and accuracy. To ensure the efficiency of the measurement over time, the asymmetry of the peaks were determined, as well as its width and theoretical plates. Finally, TPC (Folin-Ciocalteu method), AOA (DPPH and ORAC methods) and the content of Av-A, Av-B and Av-C was determined in a select group of oat genotypes (n = 13).

Optimum conditions for extraction of polyphenols from hulled oats grains were: water-ethanol ratio 70:30 (v/v), solid-liquid ratio 1:6 (p/v), temperature 45 °C, stirring 200 rpm and time 20 minutes. Regarding the measurement of Av, the low dispersion of the data confirmed the accuracy of the system. The detection limits were 0.0857 - 0.851 - 1.2198 mg/L and the quantification limits were 0.2591 - 0.2436 to 3.2897 mg/L, for Av-A - Av-B and Av-C, respectively. Based on these results, we conclude that the chromatographic method used in this study is accurate, precise, linear and sensitive to be applied to the quantification of avenanthramides in different oat genotypes. Linearity values indicated a close relationship between the concentration of avenanthramides and the response provided by the detector.

In a group of ten oats genotypes, the TPC fluctuated between 8,061 and 66,399 mg gallic acid equivalent /g of oat, obtained in the cultivars AVE1 and AVE13, respectively. Using DPPH, were obtained AOA values between $10,081 \pm 0,635$ and $18,997 \pm 1,830$ μmol Trolox equivalents/g of oats, for the cultivars AVE1 and AVE14, respectively. Through ORAC, AOA values fluctuated

between 31,549 and $436.738 \pm 283.635 \pm 53.969$ $\mu\text{mol Trolox equivalent/g}$ of oats, for the cultivars AVE1 and AVE12, respectively.

The results obtained in this work will allow contribute to the phenotypic characterization of the nutritional quality of oat grain to assist the genetic breeding oriented to the generation of healthier foods.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos se encuentran en constante contacto con diversos elementos químicos como carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Entre éstos, el oxígeno es vital para la existencia de los organismos aerobios, sin embargo puede llegar a ser un elemento potencialmente peligroso. Este fenómeno ocurre a causa de su alta reactividad debido a que en el último orbital presenta un electrón desapareado (radical libre) lo cual le confiere inestabilidad física (Davies, 1995), provocando la oxidación de moléculas orgánicas como lípidos, proteínas y ADN. A las especies reactivas se les denomina en general como radicales libres, sin embargo, cuando involucran a moléculas en las que el oxígeno es el elemento reactivo, se les conoce como especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO corresponden a un conjunto de moléculas reactivas producidas durante el metabolismo celular normal, las que juegan un rol bimodal en las funciones celulares. Por una parte, son beneficiosas ya que funcionan como agentes citotóxicos en contra de bacterias o parásitos, mientras que por otro lado, pueden producir daño al tejido normal. En respuesta a este daño, las células son capaces de producir y/o acumular numerosos compuestos antioxidantes y así contrarrestar los efectos perjudiciales causados por las ERO (Panglossi, 2006), previniendo la aparición de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Scalbert *et al.*, 2005).

Estudios epidemiológicos han sugerido que la dieta juega un papel crucial en la prevención de enfermedades asociadas al daño oxidativo como las enfermedades cardíacas, el cáncer, la diabetes y el Alzheimer (Willet, 1994; Temple, 2000), esto gracias a los diversos fitoquímicos que contienen, capaces de combatir las ERO. El consumo de alimentos ricos en antioxidantes como frutas, verduras, así como también algunos cereales, como maíz, trigo y avena, se ha asociado con un menor riesgo de padecer estas enfermedades (Temple, 2000).

La avena presenta fitoquímicos capaces de promover la captación de especies reactivas del oxígeno (Chen *et al.*, 2004), entre los que se encuentran los polifenoles que corresponden a metabolitos secundarios de las plantas y ejercen su actividad antioxidante actuando principalmente como donadores de átomos de hidrógeno (Shahidi y Naczki, 1995), inhibiendo de

este modo la propagación de las reacciones en cadena de radicales. Su potencial como antioxidantes depende de la cantidad y la disposición de los grupos hidroxilo, así como de la naturaleza de los sustituyentes en las estructuras del anillo. Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos el uno al otro, entre los que se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Un tipo de ácidos fenólicos encontrados en la avena y que son exclusivos de este cereal es decir, que no se encuentran en otros alimentos, son las avenantramidas las que presentan una gran capacidad antioxidante, siendo la avenantramida –A (Av-A), -B (Av-B) y –C (Av-C) las más abundantes en el grano (Bratt *et al.*, 2003; Emmons and Peterson, 1999).

La avena es utilizada como un alimento de grano entero, sin embargo desde una perspectiva científica es de gran importancia cuantificar los compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante del grano (Peterson, 2001). En efecto, la extracción de estos compuestos bioactivos a partir de la avena y el conocimiento de su capacidad antioxidante son necesarios para la elaboración de alimentos saludables con alto valor nutricional. Para una recuperación exitosa de estos compuestos antioxidantes, es necesario evaluar los efectos de diversos factores que intervienen en el proceso de extracción tales como la composición del disolvente, temperaturas de extracción, proporción sólido - líquido, así como la interacción entre ellos de modo de definir la condición óptima para maximizar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante. Por otra parte, existe información limitada sobre el contenido de avenantramidas en avena, por lo que su cuantificación en nuevos prototipos de avena contribuye positivamente a la producción de una avena diferenciada a nivel de calidad de grano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La avena

La avena es un cultivo de crecimiento anual perteneciente al reino *Plantae*, sub-reino *Tracheobionta* (planta vascular), superdivisión *Spermatophyta* (planta con semilla), división *Magnoliophyta* (planta con flor), clase *Liliopsida* (monocotiledonea), subclase *commelinidae*, orden *Cyperales*, familia *Poaceae* (gramínea), género *Avena* y nombre científico *Avena Sativa L.* (<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=AVSA>).

Es producida en diversos países alrededor del mundo, siendo la Unión Europea, Rusia y Canadá los principales productores de avena en el mundo. Chile se posiciona en el cuarto puesto en exportación a nivel mundial luego de Canadá, Australia y la Unión Europea; y en el segundo en rendimiento con 5,41 toneladas métricas por hectárea, rendimiento histórico solo superado por Irlanda con 8,00 toneladas métricas por hectárea. A pesar de que este valor es bastante inferior comparado con Irlanda, está muy por encima de la media mundial de 2,17 toneladas métricas por hectárea (USDA, 2013).

Corresponde al tercer cultivo anual con mayor superficie a nivel nacional, siendo la Región de La Araucanía la principal zona productora con una superficie de 75.987 hectáreas correspondientes al 60% de la producción nacional, seguida por la Región del Bío Bío, con un 24% del total (ODEPA, 2013). Este cereal es estratégico para la región de La Araucanía, no solo debido a la amplia superficie sembrada, sino además porque corresponde al primer producto agrícola de exportación de la zona.

Este cereal es generalmente consumido como grano entero y destaca entre los cereales debido a sus características multifuncionales y su perfil nutricional (Masood *et al.*, 2008), ayudando así en

la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares, sobrepeso y obesidad. Esto gracias a los fitoquímicos bioactivos encontrados en sus granos entre los que destacan polifenoles y avenantramidas, compuestos benéficos para la salud dado principalmente por su actividad antioxidante.

2.2 Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas (Harborne, 1989) que por lo general se encuentran involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Harborne y Williams, 2000). Estos compuestos se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos, clasificándose en ácidos fenólicos (hidroxicinámicos, hidrobenczoicos, clorogénicos), flavonoides, estilbenos y lignanos (Manach *et al.*, 2004), en donde su estructura físico-química determina la absorción, metabolismo, biodisponibilidad y actividad antioxidante de estos compuestos (Scalbert y Williamson, 2000).

El creciente interés por los polifenoles en la última década ha sido provocado por los resultados de estudios epidemiológicos que vinculan el consumo de dietas ricas en alimentos de origen vegetal con un menor riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Scalbert *et al.*, 2005).

Frutas, té, vino tinto y café, han sido considerados como las principales fuentes de polifenoles, sin embargo, verduras, leguminosas y cereales también son buenas fuentes de estos compuestos bioactivos (Manach *et al.*, 2004). La ingesta diaria recomendada de polifenoles es >100 mg/día por persona, en contraste con la ingesta establecida de importantes nutrientes esenciales tales como vitamina E (8,5 mg/día) y vitamina C (80 mg/día), como también el beta-caroteno (1,9 mg/día), proporcionando una fuerte evidencia de que estos compuestos constituyen una parte

importante de la ingesta dietética total de compuestos biológicamente activos (Hooper y Cassidy, 2006).

Muchos polifenoles, especialmente los ácidos fenólicos, están directamente involucrados en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés contribuyendo así en la curación por lignificación de las zonas dañadas y propiedades antimicrobianas, en donde sus concentraciones pueden aumentar luego de la infección (Parr y Bolwell, 2000; Grayer y Kokubun, 2001; Yang *et al.*, 2004), actuando como potentes antioxidantes vía eliminación de especies reactivas del oxígeno no solo en plantas sino también en animales (Adom y Liu, 2002).

Estos compuestos han sido identificados en distintos cereales tales como trigo, arroz, maíz y avena (Osawa, 1999; Emmons y Peterson, 2001; Adom y Liu, 2002; Manach *et al.*, 2004; Alvarez-Jubete *et al.*, 2010), en donde la avena contiene un tipo de polifenoles exclusivos denominados avenantramidas (Collins, 1989).

2.3 Avenantramidas

Collins (1989) fue el primer investigador en identificar y caracterizar un grupo de alcaloides de bajo peso molecular, encontrados exclusivamente en la avena, a los que denominó avenantramidas. Estos compuestos consisten en conjugados de amida de ácido antranílico o sus derivados hidroxilados y ácidos hidroxicinámicos (Collins y Mullin, 1988; Collins, 1989), claves en los mecanismos de defensa de la avena contra ciertos patógenos (Miyagawa *et al.*, 1995).

Existen cerca de 40 tipos de avenantramidas, en donde las más abundantes son la 2p, 2c y 2f (“2” indica el ácido 5-hidroxiantranílico y “p, c y f” indicando el ácido hidroxicinámico p-cumárico, cafeico y ferúlico, respectivamente). Estas avenantramidas son más comúnmente conocidas como avenantramida-A (Av-A), avenantramida-B (Av-B) y avenantramida-C (Av-C), respectivamente (Bratt *et al.*, 2003; Emmons and Peterson, 1999).

Se ha reportado que las avenantramidas exhiben actividad antioxidante tanto *in vitro* (Peterson *et al.*, 2002; Bratt *et al.*, 2003) como *in vivo* (Ji *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004) y que existe una estrecha relación entre contenido de avenantramidas y actividad antioxidante (Emmons y Peterson, 1999; Emmons y Peterson, 2001) y su biodisponibilidad ha sido demostrada tanto en animales (Chen *et al.*, 2004) como seres humanos (Chen *et al.*, 2007). Además se ha encontrado que las avenantramidas contribuyen en la preservación del color y sabor fresco de los productos de avena (Molteberg *et al.*, 1996) sugiriendo un posible efecto en la disminución de la rancidez de éstos.

2.4 Beneficios para la salud asociados al consumo de avena

2.4.1 Prevención del cáncer de colon

Estudios sugieren que el consumo de avena puede reducir el riesgo de cáncer de colon no sólo debido a su alto contenido de fibra, sino también a la presencia de avenantramidas, compuestos polifenólicos capaces de inhibir potencialmente la proliferación de células de cáncer de colon, mediante su efecto sobre macrófagos e inhibición directa de la proliferación de células cancerígenas e inflamación (Meydani, 2009; Weimin Guo *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que el estudio de las propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias de las avenantramidas, pueden ser las bases para el desarrollo de fuentes naturales de quimiopreventivos y quimioterapéuticos enfocados en el tratamiento de cáncer de colon (Weimin Guo *et al.*, 2010).

2.4.2 Disminución del riesgo asociado a enfermedades cardiovasculares

En el año 2008 murieron cerca de 17,3 millones de personas por enfermedades cardiovasculares (CVDs) y se estima que para el 2030 más de 23 millones de personas mueran anualmente por esta enfermedad (OMS, 2013).

Los factores dietéticos desempeñan importantes roles etiológicos en el desarrollo de CVDs en donde la inclusión regular de avena en la alimentación diaria, no sólo puede proporcionar un beneficio a partir del contenido de fibra soluble en la reducción del colesterol, sino también por sus propiedades antioxidantes que previenen y/o retrasan el desarrollo y progresión de aterosclerosis y otras CVDs (Genkinger *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2004), por los polifenoles que han demostrado poseer actividades antiaterogénicas y anti-inflamatorias (Wu *et al.*, 1999) y también por las avenantramidas que han sido implicadas en la modulación del proceso inflamatorio asociado al desarrollo de aterosclerosis (Liu *et al.*, 2004). Estos hallazgos sugieren que estos compuestos pueden usarse como potenciales nutraceuticos dirigidos hacia la disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Todos estos beneficios son muy importantes y demuestran que la avena ayuda a la prevención de enfermedades anteriormente mencionadas. Sin embargo, para establecer una prueba concluyente de la efectividad de los polifenoles de la dieta en la prevención de enfermedades, es necesario definir la biodisponibilidad de éstos.

2.4.3 Biodisponibilidad de polifenoles y avenantramidas

La biodisponibilidad se define como la velocidad y medida en que se absorbe un ingrediente activo o la fracción activa de un fármaco y se hace disponible en el sitio de acción (FDA, 2003).

Chen (2007) investigó acerca de la biodisponibilidad de avenantramidas en plasma sanguíneo, en donde a seis sujetos se les administraron distintas concentraciones de Av-A, -B y -C. Luego del consumo, las tres avenantramidas fueron detectadas en el plasma, siendo la Av-A la más biodisponible. Los resultados indicaron que estos compuestos son biodisponibles y son capaces de incrementar algunos biomarcadores de capacidad antioxidante sin aparentes efectos adversos vía el aumento de GSH (glutación reducido) y actuando en sinergia con otros antioxidantes como la vitamina E, sin embargo más estudios son necesarios. En estudios previos de farmacocinética usando hamsters, se observó que el tiempo al cual se alcanzó la máxima concentración de avenantramidas en el plasma fue a los 40 minutos (Chen *et al.*, 2004), en contraste con el de humanos que fue entre 1,5 y 2,3 horas, lo que indica que la absorción y el metabolismo de las avenantramidas es especie-dependiente. Sin embargo, más estudios son necesarios para demostrar que el consumo de productos de la avena genera concentraciones plasmáticas con efectos fisiológicos significativos, siendo necesario dilucidar si la ingesta prolongada de productos de avena conduce a una mayor acumulación de las avenantramidas en tejidos distintos a la sangre (Chen *et al.*, 2007).

2.5 Usos de la avena en alimentación

La avena presenta numerosos usos en la alimentación humana, entre los que destaca una variedad de productos horneados como por ejemplo tortas de avena, galletas de harina de avena y pan de avena. También es usada como ingrediente en muchos cereales fríos, como muesli y granola y productos como helado y leche de avena.

Gracias a sus preservantes naturales y cualidades antioxidantes, la avena es utilizada en la elaboración de pan, leche, mantequilla, helado, aceite de pescado, aceite de oliva, tocino, manteca de cerdo, pescado congelado, salchichas congeladas ya que contribuye en la preservación del color y sabor fresco de los productos (Molteberg *et al.*, 1996). La harina de avena se añade al pan

como saborizante, como también puede ser utilizado como un sustituto del café y para la preparación de la cerveza. Los lípidos de la avena tienen potencial como excelentes emulsionantes para uso en el pan y chocolate mientras que la goma de avena se ha sugerido como una alternativa a la gelatina por su acción como agente espesante y estabilizador en helados, salsas y aderezos para ensaladas (Rajinder Singh *et al.*, 2013).

Por otro lado, la avena también ha sido usada en alimentación animal, en donde vacas alimentadas con avena descascarada produjeron leche con mayor estabilidad oxidativa, aumentando así la vida útil del producto (Fearon *et al.*, 1998).

Se ha reportado que las avenantramidas no solo son beneficiosas para la salud humana, sino también para las mismas plantas que la producen debido a su acción como fitoalexinas en respuesta al ataque de patógenos (Yang *et al.*, 2004).

2.6 Avenantramidas y su función como fitoalexinas

Las plantas son capaces de defenderse del ataque de patógenos a través de diversas respuestas. Estas incluyen muerte celular hipersensitiva, refuerzo de las paredes celulares, inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), y la síntesis de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular conocidos como fitoalexinas (Grayer *et al.*, 2001). Estos metabolitos secundarios pueden jugar un rol importante en el rechazo de agentes patógenos. Las avenantramidas han sido identificadas como fitoalexinas en hojas avena infectadas con *Puccinia coronata*, hongo que ataca a la avena (Mayama *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 2004). Estas respuestas son temporales y espacialmente destinadas a defender a la planta contra el ataque de patógenos. La acumulación rápida y localizada de estas sustancias de las avenantramidas en el sitio de la infección es esencial para inhibir la invasión de patógenos (Yang *et al.*, 2004).

Por lo tanto, mediante los antecedentes recopilados se planteó la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

H₀: Los distintos cultivares de avena provenientes de microparcels de INIA-Carillanca correspondientes a la cosecha 2012/13, no presentan diferencias en cuanto a su contenido de polifenoles, avenantramidas y actividad antioxidante.

H₁: Los distintos cultivares de avena provenientes de microparcels de INIA-Carillanca correspondientes a la cosecha 2012/13, presentan diferencias en cuanto a su contenido de polifenoles, avenantramidas y actividad antioxidante.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante en granos descascarados de distintos cultivares de avena.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el método de extracción de polifenoles y cuantificación de la actividad antioxidante de la avena.
2. Validar el método de detección y cuantificación de avenantramidas por Cromatografía Líquida en Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD).
3. Evaluar el contenido de avenantramidas, polifenoles y actividad antioxidante en distintos cultivares de avena.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

Para el desarrollo de las actividades experimentales se utilizaron granos descascarados de distintos cultivares de avena, proporcionados por el Programa de Fitomejoramiento de Avena del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Carillanca (**Tabla 1**). Estos corresponden a la cosecha del año 2012/13, provenientes de microparcels sembradas en invierno (25 junio 2012). Luego de cosechadas, las semillas fueron descascaradas a través de una máquina peladora y almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Código	Especie	Tipo de germoplasma	Origen
AVE1	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	ALEMANIA
AVE3	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	ALEMANIA
AVE4	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	ALEMANIA
AVE8	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	AUSTRALIA
AVE11	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE12	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE13	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE14	<i>Avena nuda</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE15	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE16	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE
AVE51	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	ESTADOS UNIDOS
AVE52	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	ESTADOS UNIDOS
AVE53	<i>Avena sativa</i>	CULTIVAR	CHILE

Tabla 1. Cultivares utilizados en la investigación.

3.1.2 Materiales de laboratorio y reactivos

Tubos de ensayo

Gradillas

Tubos eppendorf

Tubos Falcon

Espatulas

Micropipetas

Pipetas

Cubetas de vidrio para espectrofotometría

Matraces erlenmeyer

Vasos precipitados

Papel filtro

Acetonitrilo grado HPLC

Metanol grado HPLC

Ácido fórmico (CH_2O_2)

Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)

Etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)

Buffer fosfato (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)

AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro)

DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil)

Trolox (3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-carboxílico)

Ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$)

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)

Estándares de avenantramidas (A, B, C)

3.1.3 Equipos e instrumentos

Balanza analítica

Espectofotómetro

Estufa

HPLC-DAD

Molinillo

pHmetro

Refrigerador -20 °C y -80°C

Sonicador

Shaker

3.2 Métodos estadísticos

Para optimizar el método de extracción de polifenoles y cuantificación de compuestos antioxidantes en avena, en primer lugar se realizó un *screening*, mediante un diseño experimental Plackett Burman (Plackett y Burman, 1946), con el objetivo de identificar las variables con mayor influencia en el proceso de extracción. Luego de identificadas estas variables, se desarrolló una metodología de superficie de respuesta (MSR), con el fin de determinar las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles en avena. Ambas metodologías fueron analizadas con el software estadístico Design-Expert® 6.0.6.

3.2.1 Método Plackett Burman

Las variables elegidas para el *screening* fueron proporción agua:etanol (v/v, X_1), cantidad avena:solvente (p/v, X_2), temperatura ($^{\circ}\text{C}$, X_3), agitación (rpm, X_4) y tiempo de contacto (minutos, X_5), con sus respectivos niveles de trabajo codificados como -1 y 1 (ver **Tabla 2**), elegidos según lo reportado en bibliografía y lo observado en ensayos preliminares. Como respuesta se determinó el contenido de polifenoles totales (Y).

Variables independientes	-1	1
Proporción agua:etanol (X_1)	30:70	70:30
Cantidad avena:solvente (X_2)	1:20	1:5
Temperatura (X_3)	25	45
Agitación (X_4)	100	200
Tiempo de contacto (X_5)	20	120

Tabla 2. Variables independientes y niveles de trabajo utilizados en el diseño experimental Plackett Burman.

Las variables fueron combinadas por el programa estadístico, asignando valores de -1 y 1 para cada uno de los niveles de trabajo (ver **Tabla 3**). Con estas combinaciones se procedió a determinar el contenido de polifenoles totales, mediante el método de Folin-Ciocalteu (cada punto del diseño se midió por duplicado), y con estos valores identificar las variables con mayor influencia en el proceso. El criterio de elección de estas variables fue el valor de F, obtenido según el análisis de varianza de una vía.

Punto diseño	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	-1	-1	-1	1	1
2	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	-1	-1	-1
4	1	-1	-1	-1	-1
5	-1	1	-1	-1	1
6	-1	1	-1	-1	1
7	1	1	-1	1	-1
8	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	1	1	-1
10	-1	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1
13	-1	1	1	-1	-1
14	-1	1	1	-1	-1
15	1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	-1

Tabla 3. Matriz utilizada en el diseño experimental Plackett Burman.

3.2.2 Metodología Superficie de Respuesta (MSR)

Se desarrolló una metodología de Superficie de Respuesta (MSR) usando un diseño central compuesto, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para la extracción de compuestos polifenólicos a partir de granos descascarados de avena. Para esto, se evaluó el efecto de las tres variables independientes con mayor influencia, previamente identificadas en el *screening*, sobre la extracción de polifenoles totales. El contenido total de polifenoles fue determinado con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Estas variables, X₁, X₂ y X₃, se trabajaron en cinco niveles de trabajo: axial inferior (- α), mínimo (-1), central (0), máximo (1) y axial superior (+ α), en donde los puntos axiales se calcularon según la **Ecuación 1**.

$$\pm\alpha = \sqrt[4]{2^n} \text{ (Ecuación 1)}$$

Punto diseño	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1
3	1	-1	-1
4	1	-1	-1
5	-1	1	-1
6	-1	1	-1
7	1	1	-1
8	1	1	-1
9	-1	-1	1
10	-1	-1	1
11	1	-1	1
12	1	-1	1
13	-1	1	1
14	-1	1	1
15	1	1	1
16	1	1	1
17	-1,68	0	0
18	-1,68	0	0
19	1,68	0	0
20	1,68	0	0
21	0	-1,68	0
22	0	-1,68	0
23	0	1,68	0
24	0	1,68	0
25	0	0	-1,68
26	0	0	-1,68
27	0	0	1,68
28	0	0	1,68
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0

Tabla 4. Matriz utilizada en la metodología de superficie de respuesta (MSR).

De acuerdo a la fórmula el valor de $-\alpha$ corresponde a -1,68 y el de $+\alpha$ a 1,68, como se observa en la **Tabla 4**.

El modelo central compuesto consistió en un total de 31 experimentos, 16 correspondientes a un diseño factorial 2^3 , más 12 puntos axiales y 3 puntos centrales.

Una vez identificadas las condiciones óptimas, se procedió a cuantificar el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en diferentes genotipos de avena.

3.3 Métodos experimentales

3.3.1 Determinación del contenido de polifenoles totales

Para determinar el contenido de polifenoles totales, se siguió el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Para esto, fueron agregados en tubos de ensayo 0,2 ml de muestra, 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) y 0,8 ml de Na_2CO_3 (7,5% p/v). Luego de homogenizados los componentes con un vórtex, se incubaron por 15 minutos a 45°C en un baño seco. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a determinar la absorbancia de las muestras.

Paralelo a esto, se preparó una curva de calibración de seis puntos, usando como estándar el ácido gálico (0, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L).

La absorbancia se midió a 765 nm, en un espectrofotómetro con cubetas de vidrio, usando como blanco agua destilada. Cada muestra se midió en duplicado. Los datos de la curva de calibración fueron graficados usando como variable independiente a la concentración de ácido gálico y como variable dependiente la absorbancia.

De acuerdo con la curva estándar que se obtuvo con el ácido gálico, se determinó el contenido de polifenoles de la muestra. La cantidad total de compuestos polifenólicos se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco de granos descascarados de avena.

3.3.2 Determinación de la actividad antioxidante

3.3.2.1 Método DPPH

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) ha sido ampliamente usado para investigar y comparar la capacidad de captar radicales libres de algunos alimentos (Sharma y Gujral, 2010; Ryan y Prescott, 2010). Este radical presenta un color violeta intenso tornándose incoloro frente a la presencia de compuestos antioxidante, lo que es cuantificado mediante espectrofotometría.

La actividad antioxidante de los diferentes cultivares de avena se evaluó por la capacidad de estos de reducir el DPPH, usando el método de Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones.

Para esto, se agregó a tubos de ensayo 1 ml de muestra, 2,2 ml de etanol y 0,8 ml de DPPH (160 ppm). Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad, para luego medir la absorbancia.

En paralelo, se preparó una curva de calibración de seis puntos, usando como estándar el antioxidante Trolox (0 – 5 – 10- 15- 20 – 25 μm).

La absorbancia se midió a 520 nm, en un espectrofotómetro con cubetas de vidrio, usando como blanco al etanol. Cada muestra se midió en duplicado. Los datos de la curva de calibración se graficaron usando como variable independiente la concentración de Trolox y como variable dependiente la absorbancia.

De acuerdo con la curva estándar que se obtuvo con el Trolox, se determinó la capacidad antioxidante de cada muestra, la que se expresó como μm equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco de granos descascarados de avena.

3.3.2.2 Método ORAC

La Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) es un ensayo que permite cuantificar la capacidad antioxidante de compuestos puros o de mezclas como alimentos, suplementos dietéticos o productos cosméticos (Ou *et al.*, 2001). En este ensayo, el 2,2'-azobis (2-amidopropano) dihidrocloruro (AAPH) es usado para producir radicales peroxilo, los que al reaccionar con la fluoresceína (3',6'-dihidroxi-3H-espiro [2 - benzofurano-1, 9'-xanten] - 3-ona) la dañan resultando en la pérdida de la fluorescencia. Los antioxidantes son capaces de proteger a la fluoresceína del daño ocasionado por los radicales. El efecto protector del antioxidante se cuantifica mediante la evaluación del área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia.

La actividad antioxidante de los cultivares de avena se evaluó por la capacidad de éstos de impedir la disminución de la fluorescencia ocasionada por la acción de los radicales, usando una modificación del método de Ou *et al.*, (2001). La fluoresceína (91,85 µM) se usó como la sonda fluorescente y los radicales peroxilo se generaron a partir de AAPH (35 mM) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4).

La reacción fue monitoreada periódicamente por 150 minutos a 37°C con un filtro de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 520 nm usando un lector de placas marca Biotek, modelo Synergy HT.

En una placa de fondo negro de 96 pocillos fueron pipeteados 100 µl de muestra, 100 µl de fluoresceína y 100 µl de AAPH preparado y agregado previo a la medición, los últimos dos a 37°C. Las mediciones se llevaron a cabo en dos repeticiones con tres réplicas cada una. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura.

La curva de calibración se realizó con seis puntos (0 – 1,2 – 4 – 8 – 12 – 16 µM), usando como estándar el antioxidante Trolox.

El cálculo de las áreas bajo la curva fue llevado a cabo mediante el software KC4 3.4 y el valor de ORAC se expresó como micromoles equivalentes de Trolox/gramo de avena.

3.3.3 Validación del método de detección y cuantificación de avenantramidas por HPLC.

Con la finalidad de confirmar la confiabilidad de los resultados obtenidos sean confiables, se validó el método de detección y cuantificación de avenantramidas A, B y C por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) y se determinó la eficiencia de medición a través del tiempo.

3.3.3.1 Instrumentación

En la detección y cuantificación de avenantramidas se utilizó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Jasco equipado con una bomba de gradiente cuaternaria Jasco PU-2089 Plus, un detector de múltiples longitudes de onda Jasco MD-2010 Plus, una unidad de interfase Jasco LC-Net II/ADC y el software Jasco ChromPass Chromatography data system. Para la inyección de las muestras se utilizó un inyector manual Rheodyne 71251 con loop de inyección de 20 μ l. La separación cromatográfica se llevó a cabo en fase reversa con la columna Inertsil ODS-3 (5 μ m 4.6 x 250 mm). Todas las pesadas se realizaron en una balanza analítica Radwag modelo AS 220/C/2. Las fases móviles fueron sonicadas con el sonicador Misonix modelo ultrasonic processor XL con electrodo de CO₂.

3.3.3.2 Condiciones cromatográficas

Se siguió la metodología de Ren *et al.* (2011). La fase móvil A consistió en ácido fórmico 10 mM, mientras que la fase móvil B fue acetonitrilo grado HPLC. Ambos solventes fueron sonicados por un período de 10 min, previo a su utilización. La longitud de onda a la cual se midieron los distintos *peaks* fue 340 nm. El flujo del gradiente de elución fue 0,5 ml/min y se llevó a cabo con las siguientes condiciones:

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
5	80	20
10	60	40
15	55	45
20	50	50
25	45	55
30	40	60
40	20	80

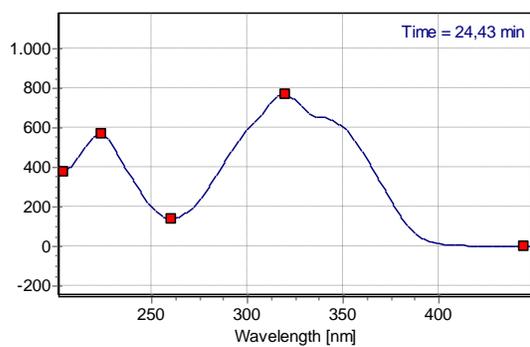
Tabla 5. Parámetros de gradiente de elución.

3.3.3.3 Preparación de los estándares

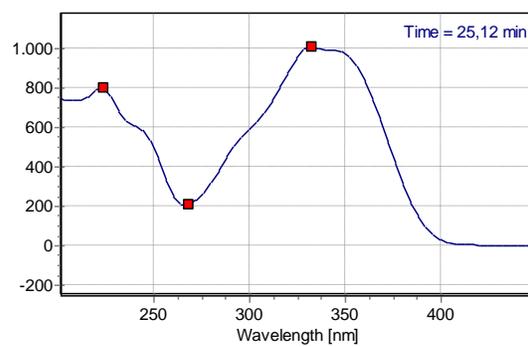
Las soluciones stock de los estándares fueron preparadas a una concentración de 100 ppm, disolviendo 1 mg de estándar en 10 ml de etanol absoluto. Todas las soluciones fueron guardadas a -20°C.

3.3.3.4 Espectros de absorción de los estándares

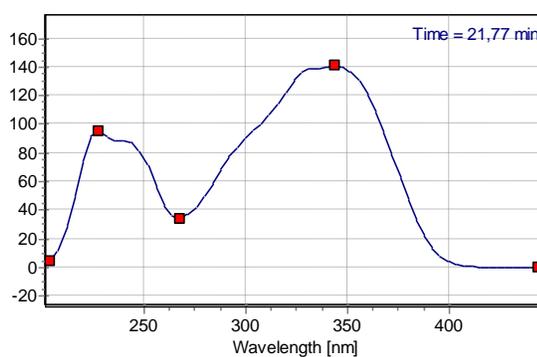
Cada uno de los estándares fue inyectado por separado obteniéndose los siguientes espectros de absorción.



Espectro de absorción 1. Estándar avenantramida A.



Espectro de absorción 2. Estándar avenantramida B.



Espectro de absorción 3. Avenantramida C.

3.3.3.5 Medición de asimetría, ancho de los *peaks* y platos teóricos.

Con el objetivo de determinar la eficiencia de la medición a través del tiempo se determinaron los valores de asimetría, ancho de los *peaks* y platos teóricos (Quattrocchi *et al.*, 1992).

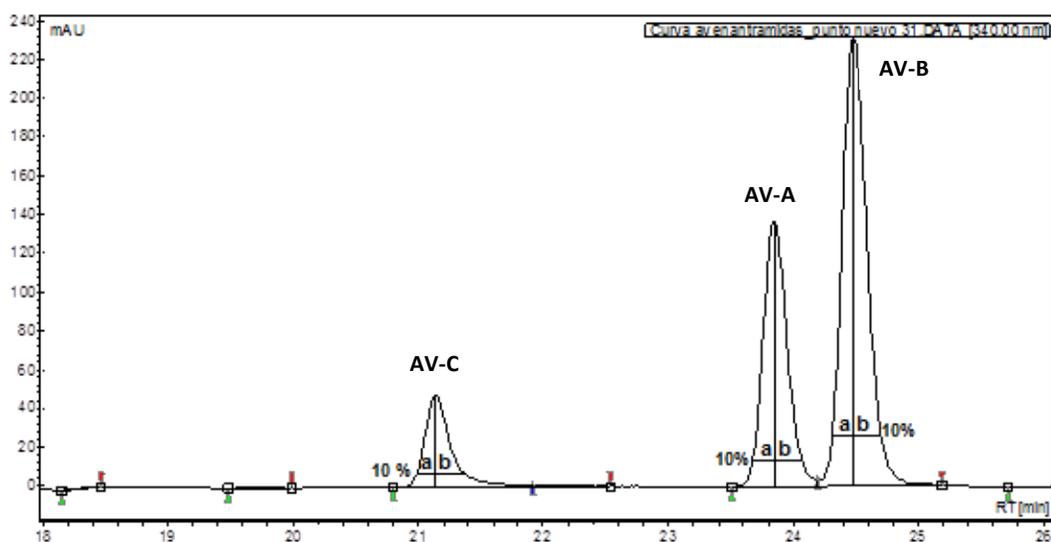
3.3.3.6 Asimetría de los *peaks*

La asimetría de los distintos *peaks* se obtuvo midiendo manualmente el segmento entre la línea que une el máximo del *peak* con la línea base y los extremos anterior y posterior de cada *peak*, tomados al 10% de la altura (**Ecuación 2**) (**Cromatograma 1**). Cada *peak* se analizó por triplicado.

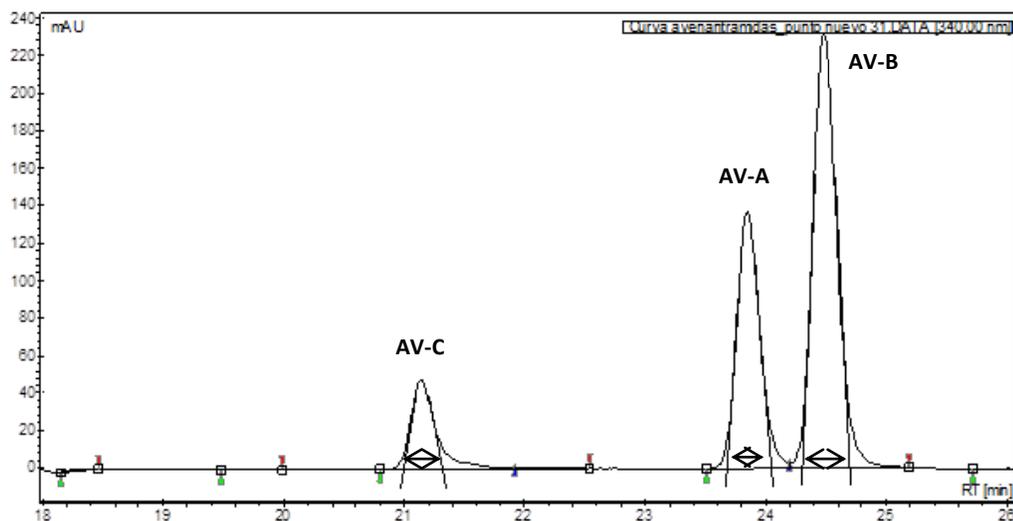
$$AS_{10\%} = \frac{b}{a} \quad (\text{Ecuación 2})$$

3.3.3.7 Ancho de los *peaks*

Es una medición necesaria para determinar la eficiencia de la columna (platos teóricos). Este valor se obtiene prolongando la línea base por debajo del *peak* y midiendo el segmento de esta línea, delimitado por la extrapolación de las ramas ascendentes y descendentes del *peak* (**Cromatograma 2**). Cada *peak* se analizó por triplicado.



Cromatograma 1. Ejemplo representativo medición asimetría de *peak*.



Cromatograma 2. Ejemplo representativo medición ancho de *peak*.

3.3.3.8 Platos teóricos

Corresponden a los cortes o rodajas imaginarias donde existe un equilibrio transitorio durante el flujo de la fase móvil, antes de que éste avance hacia el siguiente corte. El número de platos teóricos determina la eficiencia de la columna cromatográfica, y por lo tanto su poder separativo.

$$N = 16 \left(\frac{t_n}{W_{tan}} \right)^2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

N= Número de platos teóricos

t_n = Tiempo de retención del *peak*.

W_{tan} = Ancho del *peak* expresado en unidades de tiempo.

3.3.3.9 Validación del método

Con la finalidad de validar el método de identificación y cuantificación de avenantramidas, fueron verificados los parámetros de linealidad, precisión y sensibilidad, para confirmar que los resultados obtenidos sean confiables.

3.3.3.9.1 Linealidad

Corresponde a la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del detector. La linealidad fue evaluada mediante la mezcla de los tres estándares de avenantramidas y posterior dilución en etanol-agua (50:50) a diferentes concentraciones (0,825 -1,65 - 3,63 -4,95 - 6,6 - 8,25 mg/L). La curva de calibración fue construida usando la relación entre mg de avenantramida/L y área bajo la curva (mAU/min) de los distintos estándares. Cada punto de la curva fue analizado por triplicado.

3.3.3.9.2 Precisión

Corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Para determinar la precisión del método se calculó la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

3.3.3.9.3 Sensibilidad

Se define como la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Para determinar la sensibilidad se calcularon los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) para cada uno de los estándares.

3.3.4 Determinación contenido de avenantramidas

El contenido de avenantramidas se determinó según el método de Ren *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Para esto, 1 gramo de granos de avena descascarados fue pesado y molido hasta formar harina. Los compuestos fueron extraídos desde la harina, dos veces, con etanol/agua/ácido acético (80:20:0,1) en una proporción sólido-líquido de 1:8 por 2 horas a 40 °C en agitación, luego fueron centrifugados por 10 minutos a 1250 g y filtrados al vacío con un filtro cuantitativo N° 541. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los solventes fueron evaporados a 100 °C en una estufa de secado y los sólidos disueltos pesados para la posterior cuantificación de los compuestos. Los extractos secos fueron resuspendidos en 800 µl de etanol al 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Métodos estadísticos

4.1.1 Método Plackett Burman

Mediante el *screening* se determinó que las variables que presentaron mayor influencia en el proceso de extracción de polifenoles según los valores de F obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA) fueron: proporción agua:etanol (v/v), cantidad avena:solvente (p/v) y temperatura (°C), con valores de 5,69 - 4,43 y 2,47, respectivamente.

4.1.2 Metodología Superficie de Respuesta (MSR)

Con las variables que presentaron mayor influencia en el proceso de extracción de polifenoles, proporción agua:etanol (X_1), cantidad avena:solvente (X_2) y temperatura (X_3), obtenidas en el *screening*, se desarrolló una MSR usando un diseño central compuesto, para determinar las condiciones óptimas de extracción de polifenoles. Estas variables se trabajaron en cinco niveles de trabajo como se muestra en la **Tabla 6**. Las variables restantes: agitación y tiempo de contacto, se mantuvieron constantes en 200 rpm y 20 minutos, debido a que no presentaron efectos significativos sobre la respuesta.

Variable independiente	Código	- α	-1	0	1	+ α
Proporción agua:etanol (v/v)	X_1	16:84	30:70	50:50	70:30	84:16
Cantidad avena:solvente (p/v)	X_2	1:100	1:20	1:8	1:5	1:4
Temperatura (°C)	X_3	18	25	35	45	52

Tabla 6. Niveles de trabajo usados en la metodología superficie de respuesta.

Las variables (X_1 , X_2 y X_3) y sus respectivos niveles de trabajo ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$) fueron combinados por el programa estadístico, cuantificándose la influencia de estas combinaciones sobre la respuesta (Y) (ver **Tabla 7**) y posteriormente identificando las combinaciones que entreguen la mayor concentración de estos compuestos bioactivos.

Los datos fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple, obteniéndose una ecuación empírica de segundo grado capaz de modelar la conducta de la respuesta (**Ecuación 4**).

$$Y = 14.92086 + 0.39946X_1 - 2.59538X_2 - 0.48843X_3 - 0.00203X_1^2 - 51.49369X_2^2 + 0.01248X_3^2 + 1.0246X_1X_2 - 0.002118X_1X_3 - 1.14275X_2X_3 \text{ (Ecuación 4).}$$

El análisis de varianza de los datos indicó que el modelo es significativo ($p < 0,05$). Dicha significancia se debe a que previamente se realizó un *screening* en donde se determinaron los factores con mayor incidencia en el proceso de extracción de polifenoles. La variable con mayor importancia en el proceso de extracción fue proporción agua:etanol ($p < 0,05$). El coeficiente de determinación (r^2) fue 0,7268 lo que indica que aproximadamente el 72% de la extracción está influenciada por las variables independientes (X_1 , X_2 y X_3). Respecto a la diferencia entre los valores experimentales y teóricos (**Tabla 7**), se observa que las diferencias son mínimas por lo que se puede concluir que la ecuación presenta capacidad predictiva.

Punto diseño	X ₁	X ₂	X ₃	Valor Experimental	Valor Teórico
1	30:70	1:20	25	18,850 ± 1,179	18,93
2	30:70	1:20	25	20,610 ± 0,716	18,93
3	70:30	1:20	25	27,390 ± 1,013	26,73
4	70:30	1:20	25	27,620 ± 1,887	26,73
5	30:70	1:5	25	13,740 ± 0,244	16,92
6	30:70	1:5	25	12,400 ± 0,39	16,92
7	70:30	1:5	25	33,340 ± 3,147	30,84
8	70:30	1:5	25	32,030 ± 0,572	30,84
9	30:70	1:20	45	22,640 ± 0,663	24,23
10	30:70	1:20	45	27,040 ± 4,677	24,23
11	70:30	1:20	45	38,000 ± 2,525	30,33
12	70:30	1:20	45	35,280 ± 1,21	30,33
13	30:70	1:5	45	20,510 ± 1,272	18,79
14	30:70	1:5	45	20,440 ± 0,53	18,79
15	70:30	1:5	45	31,310 ± 0,241	31,02
16	70:30	1:5	45	34,040 ± 0,241	31,02
17	16:84	1:8	35	15,310 ± 0,818	13,86
18	16:84	1:8	35	15,690 ± 1,35	13,86
19	84:16	1:8	35	25,190 ± 2,019	30,7
20	84:16	1:8	35	25,980 ± 0,598	30,7
21	50:50	1:100	35	18,980 ± 0,134	24,4
22	50:50	1:100	35	20,970 ± 1,339	24,4
23	50:50	1:4	35	21,350 ± 1,893	23,19
24	50:50	1:4	35	25,450 ± 1,704	23,19
25	50:50	1:8	18	26,590 ± 0,829	25,8
26	50:50	1:8	18	27,890 ± 0,276	25,8
27	50:50	1:8	52	23,850 ± 1,677	30,41
28	50:50	1:8	52	27,150 ± 1,677	30,41
29	50:50	1:8	35	25,460 ± 0	24,57
30	50:50	1:8	35	27,070 ± 0,379	24,57
31	50:50	1:8	35	23,890 ± 1,454	24,57

Tabla 7. Combinaciones de las variables proporción agua/etanol (X₁), cantidad avena / solvente (X₂), temperatura (X₃), valores teórico y experimental de la respuesta contenido de polifenoles totales expresados como mg eq. de ácido gálico/g de muestra seca.

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Tabla 7**, se observa que el mayor contenido de polifenoles totales fue $38 \pm 2,52$ mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca, correspondiente a las condiciones razón agua:etanol 70:30 (X_1); cantidad avena:solvente 1:20 g/ml (X_2) y 45°C (X_3) y el menor resultado fue $12,4 \pm 0,39$ mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca, correspondiente a las condiciones razón agua:etanol 30:70 (X_1); cantidad avena:solvente 1:5 g/ml (X_2) y 25°C (X_3). Debido a que la variable X_1 fue el factor más influyente en el proceso de extracción, podemos inferir que la variación en el contenido de polifenoles totales se debe principalmente a que los compuestos polifenólicos de la avena analizados presentan una concentración superior de compuestos polares con mayor afinidad por el agua que por el etanol, a diferencia de lo reportado por otros autores (Collins *et al.*, 1991; Emmons y Peterson, 1999; Liu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Alvarez-Jubete *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2011; Rezaire *et al.*, 2014), en donde la mayoría de las extracciones son realizadas con una proporción de etanol superior a la de agua.

El modelo central compuesto entrega nueve posibles soluciones para la optimización del proceso de extracción de polifenoles en avena, en donde las condiciones óptimas que sugiere la metodología se pueden observar en la **Tabla 8**, donde X_1 , X_2 y X_3 corresponden a las variables independientes proporción agua:etanol, cantidad avena:solvente y temperatura, respectivamente e Y corresponde a la variable dependiente contenido de polifenoles totales.

Número	X_1	X_2	X_3	Y
1	70:30	1:6	45	31,064
2	70:30	1:6	45	31,061
3	70:30	1:55	45	31,059
4	70:30	1:6,2	45	31,058
5	70:30	1:7,6	45	30,981
6	70:30	1:5	25	30,832
7	70:30	1:12	45	30,700
8	70:30	1:5	29	30,029
9	70:30	1:5	34	29,682

Tabla 8. Posibles soluciones para la optimización del proceso de extracción.

De estas soluciones se eligieron tres, la número 1, 6 y 9, con el objetivo de corroborar cuál solución era la más adecuada para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de polifenoles, es decir, la que otorgara el mejor resultado, en donde el mejor resultado se obtuvo con la solución número 1. Las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles totales en avena, se pueden observar en la **Tabla 9**.

Variables	Valor óptimo
Proporción agua:etanol (ml)	70:30
Cantidad avena:solvente (g/ml)	1:6
Temperatura (°C)	45
Agitación (rpm)	200
Tiempo de contacto (minutos)	20

Tabla 9. Condiciones óptimas para la extracción de polifenoles totales en avena.

Se obtuvo un gráfico tridimensional cuya finalidad fue indicar la región en donde se obtuvo la mejor combinación de las variables elegidas (**Figura 1**).

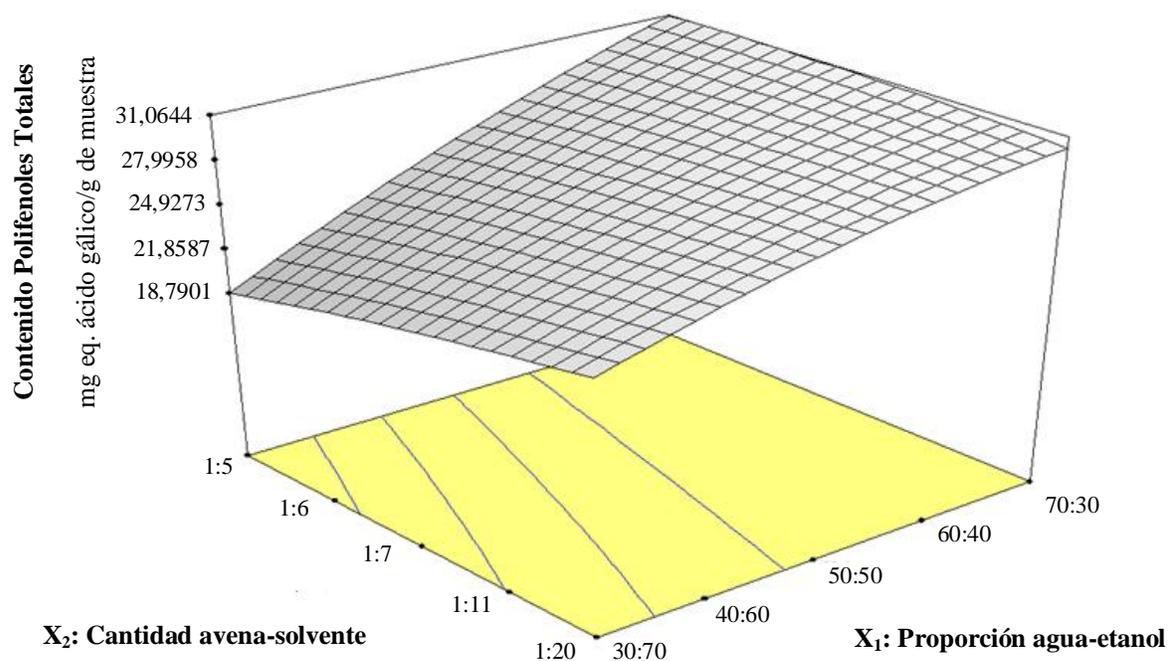


Figura 1. Efecto de la combinación de variables proporción agua:etanol (X_1) y cantidad avena:solvente (X_2) a una temperatura de 45°C , sobre el contenido de polifenoles totales (Y).

En la **Figura 1**, la superficie achurada indica la respuesta de la combinación de las variables, proporción agua:etanol con una proporción entre 60:40 y 70:30 ml/ml y cantidad avena:solvente con una proporción entre 1:5 y 1:6 g/ml, a una temperatura de 45°C .

4.2 Métodos experimentales

Luego de optimizar la metodología de extracción de compuestos polifenólicos se procedió a determinar el contenido de estos compuestos en diez cultivares de avena, codificados como AVE1, AVE3, AVE4, AVE8, AVE11, AVE12, AVE13, AVE14, AVE15 y AVE16.

4.2.1 Determinación del contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó usando el método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Los valores de CPT fluctuaron entre 8,061 y 66,399 mg equivalentes de ácido gálico/gramo de avena, para los cultivares AVE1 y AVE13, respectivamente, valores superiores a los reportados por Chu *et al.* (2013), los que fluctuaron entre 0,57 mg/g y 0,94 mg equivalente de ácido gálico/g de avena.

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el CPT de los distintos cultivares de avena, se realizó un análisis de varianza de una vía. Este análisis indicó que al menos uno de los genotipos presentaba diferencias significativas en cuanto a su contenido de polifenoles ($p < 0,05$). Para precisar cuáles fueron estas diferencias, se realizó un test de Duncan, de comparación múltiple de promedios, con el software estadístico SPSS 11.5.

El test de Duncan determinó que los cultivares con mayor CPT fueron AVE13, AVE14 y AVE16 con $66,39 \pm 4,74$, $62,178 \pm 4,341$ y $64,150 \pm 3,270$ mg equivalentes de ácido gálico/g de avena, respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre AVE14 y AVE16, pero sí con respecto a AVE13 que fue el cultivar con mayor CPT. Los cultivares con menor contenido de polifenoles totales fueron AVE1 y AVE3 ($8,061 \pm 0,337$ y $8,353 \pm 0,184$ mg equivalentes de Ácido gálico/g de avena, respectivamente), sin diferencias significativas entre ambos, pero si con respecto a AVE13, AVE14 y AVE16. Estos valores son sustancialmente menores comparados con los obtenidos por frutos como el patabá y açai (306 y 368 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra, respectivamente) (Rezaire *et al.*, 2014), por otro lado mayores comparados con otro fruto como guayaba (1,7 a 3,4 mg equivalentes de ácido gálico/g) (Thaipong *et al.*, 2006). Emmons y Peterson (1999) reportaron niveles de TPC de 2,09 a 2,94 mg equivalentes de ácido gálico/gramo de muestra en cuatro cultivares de avena, siendo estos valores muy bajos en comparación con los cultivares analizados en este estudio, sin embargo esto puede atribuirse a diferencias en los cultivares y método de extracción.

Por otra parte, autores han reportado que no existe una relación directa entre el CPT y los valores de ORAC o DPPH (Chu *et al.*, 2013; Rezaire *et al.*, 2014). Esto puede deberse a la presencia de

otros compuestos, como azúcares, ácido ascórbico y otros compuestos reductores conocidos por interferir con las pruebas de Folin-Ciocalteu y AOA o a diferencias en la composición fenólica que no se reflejan en la evaluación de fenoles totales (Rezaire *et al.*, 2014).

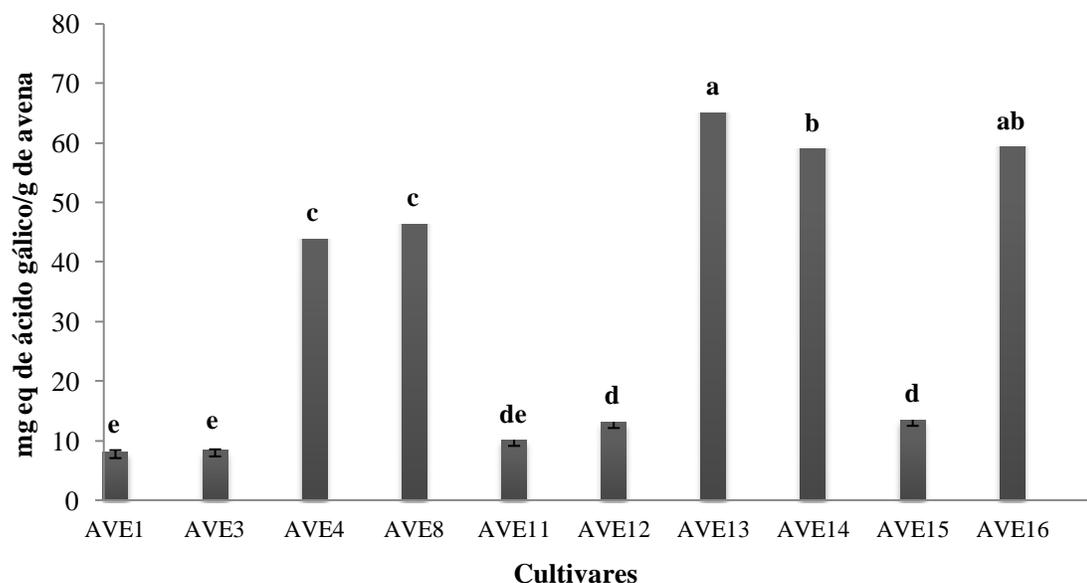


Gráfico 1. Contenido de polifenoles totales de diez cultivares de avena.

4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante

4.2.2.1 Ensayo DPPH

El ensayo de DPPH es uno de los métodos más populares en la determinación de la capacidad antioxidante en alimentos o productos agrícolas principalmente debido a la simplicidad de su funcionamiento y bajo requerimiento de equipos, en comparación con el ensayo de ORAC, en donde la principal desventaja radica en el requerimiento de equipo costoso (Awika *et al.*, 2003).

La actividad antioxidante (AOA) fue determinada mediante el método de Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones, entregando valores que fluctuaron entre $10,081 \pm 0,635$ y $18,997 \pm 1,830$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, para los cultivares AVE1 y AVE14, respectivamente.

El análisis de varianza de una vía indicó diferencias entre los cultivares respecto a su AAO ($p < 0,05$). Para identificar estas diferencias se realizó un test de Duncan con el software estadístico SPSS 11.5. El test de Duncan precisó estas diferencias indicando que los cultivares AVE14 y AVE16 ($18,997 \pm 1,830$ y $18,896 \pm 1,856$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, respectivamente) tuvieron la mayor AOA, sin diferencias significativas entre ambos, sin embargo con diferencias respecto a los otros cultivares. La AOA menor fue de los AVE1 y AVE3 ($10,081 \pm 0,635$ y $11,913 \pm 0,151$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, respectivamente), sin diferencias encontradas entre ellos, pero si en comparación con los otros cultivares. Los valores obtenidos en los distintos cultivares de avena son aproximadamente 3 veces mayores que los reportados por Stevelson *et al.*, (2008) quienes encontraron niveles de AOA entre 1,22 y 3,58 μ moles equivalentes de Trolox/g de avena pero menores a los reportados por Brindzová *et al.* (2008), quienes analizaron la AOA de ocho cultivares comerciales de avena y reportaron valores entre 13,732 y 71,125 μ moles equivalentes de Trolox/g de avena.

Estudios previos ya indicaban la alta AOA encontrada en la avena en comparación con otros cereales. Adom y Liu (2002) determinaron que la avena presenta la más alta actividad antioxidante seguida del arroz, maíz y trigo.

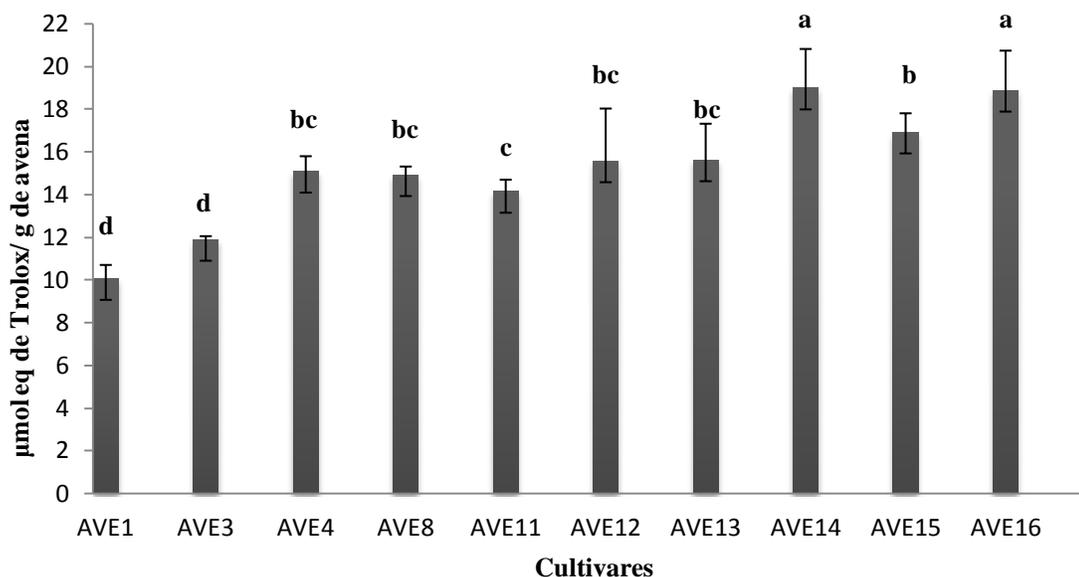


Gráfico 2. Actividad antioxidante de diez cultivares de avena determinada mediante el ensayo DPPH.

4.2.2.2 Ensayo ORAC

En los últimos años, los ensayos de ORAC han sido ampliamente utilizados para medir la capacidad antioxidante de bebidas (Seeram *et al.* 2008), suplementos (Prior *et al.*, 2005), verduras, frutas (Rezaire *et al.*, 2014), muestras biológicas (Fernández-Pachón *et al.* 2005) y cereales, como la avena (Chu *et al.*, 2013). Este ensayo se considera más relevante para definir el nivel de antioxidantes en un sistema biológico debido a que utiliza una fuente de radicales biológicamente importante (Prior *et al.*, 2003).

Mediante el método de Ou *et al.* (2001) con algunas modificaciones, fue determinada la actividad antioxidante en diez cultivares de avena. Los valores de AOA fluctuaron entre $283,635 \pm 31,549$ y $436,738 \pm 53,969$ µmoles equivalentes de Trolox/g de avena, para los cultivares AVE1 y AVE12, respectivamente.

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que al menos uno de los genotipos presentaba diferencias significativas respecto a su AOA ($p < 0,05$). Para precisar estas diferencias, se realizó un test de Duncan, de comparación múltiple de promedios, con el software estadístico SPSS 11.5.

El test de Duncan determinó que los genotipos con mayor AOA fueron AVE8 y AVE12 con $430,296 \pm 47,221$ y $436,738 \pm 53,969$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre éstos, pero sí en comparación con los cultivares restantes. Los genotipos con menor AOA fueron AVE1 y AVE16 ($283,635 \pm 31,549$ y $288,422 \pm 35,161$ μ moles equivalentes de Trolox/g de avena, respectivamente), sin diferencias significativas entre ambos, pero sí con respecto a los demás genotipos.

Los valores obtenidos son 100 veces mayores a los reportados por Chu *et al.* (2013) (17 a 28 μ moles equivalentes de Trolox/g de avena), quienes fueron los primeros en determinar la AOA en variedades comerciales de avena mediante el ensayo de ORAC. También fueron mayores a los reportados por Qiu *et al.* (2009) los que determinaron valores de ORAC en distintos cultivares comerciales de arroz, obteniendo valores entre 40,69 y 60,64 μ moles equivalentes de Trolox/g de arroz. Al comparar los niveles de ORAC obtenidos en este estudio con los de cereales como la cebada y el salvado de trigo, la AOA de los cultivares analizados es sustancialmente mayor (33,4 y 83,9, respectivamente). Sin embargo, los datos son muy variables y difíciles de comparar debido a las diferencias en los métodos de extracción y análisis.

Los altos valores de ORAC obtenidos sugieren un potencial de generar alimentos con un alto contenido de antioxidantes a partir de avena cultivada en la novena región de La Araucanía.

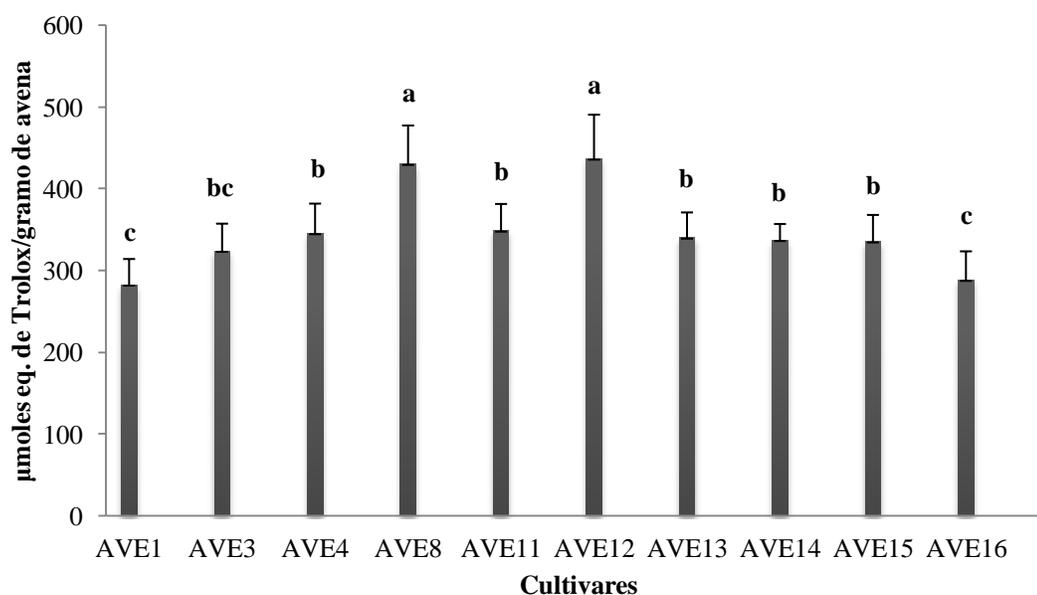


Gráfico 3. Actividad antioxidante de diez cultivares de avena determinada mediante el ensayo de ORAC.

4.2.3 Validación del método de detección y cuantificación de avenantramidas

4.2.3.1 Espectros de absorción de los estándares

Los espectros de absorción indican principalmente dos *peaks* con mayor intensidad de absorción en cada uno de los estándares. En el estándar de avenantramida A éstos corresponden a 224 y 320 nm; en el de avenantramida B a 224 y 334 nm y el de avenantramida C, 228 y 344 nm. Con estos datos se determinó que la longitud de onda a la cual se cuantificarán las avenantramidas A, B y C será a 340 nm, al igual que lo reportado por Ren *et al.* (2011).

Con el objetivo de validar la metodología de cuantificación en términos de linealidad, precisión, exactitud y también determinar la eficiencia de la medición a través del tiempo se evaluaron los valores de asimetría, ancho de los *peaks* y platos teóricos (Quattrocchi *et al.*, 1992).

4.2.3.2 Medición de asimetría, ancho de los *peaks* y platos teóricos.

Los valores de asimetría, ancho de los *peaks* y platos teóricos fueron cuantificados con el objetivo de determinar la eficiencia de la medición a través del tiempo. Dicha medición se volvió a realizar una vez terminadas las respectivas determinaciones con el fin de comparar la eficiencia y reproducibilidad de la medición.

Avenantramida	Asimetría		Ancho		Platos teóricos	
	mar-13	dic-13	mar-13	dic-13	mar-13	dic-13
A	1,33	1,03	0,15	0,15	53920	66622
B	1,16	1,03	0,15	0,14	56805	69939
C	1,60	1,20	0,16	0,14	35996	52969

Tabla 10. Resultados de asimetría, ancho de peak y platos teóricos, determinados en marzo 2013 y diciembre 2013.

En lo que se refiere a la asimetría del *peak*, un factor de asimetría de 1 es ideal sin embargo, un rango aceptable es $0,8 < A_s < 1,8$ (Hagel *et al.*, 2008), por lo tanto los *peaks* de avenantramidas presenten una muy buena asimetría la cual mejoró con el tiempo. Los bajos valores de ancho de los *peaks* indican una excelente resolución, la cual se mantuvo prácticamente igual a lo largo del tiempo. Con respecto a los platos teóricos, en cuanto mayor sea el número, mayor es la eficiencia del proceso de separación y al igual que la asimetría, los valores aumentaron, lo que indica que la eficiencia de la medición aumentó a través del tiempo (**Tabla 10**).

4.2.3.3 Validación del método

El método de detección y cuantificación de avenantramidas fue validado en términos de linealidad, precisión y exactitud, con el objetivo de comprobar que éste sea apto para la correcta determinación de estos compuestos.

4.2.3.3.1 Linealidad

La linealidad del método se estudió para seis niveles de concentración de las estándares de avenantramidas, realizando tres réplicas de cada una de éstas con valores que fluctuaron entre 0,825 y 8,25 ppm.

Los valores de linealidad indican que existe una estrecha relación entre la concentración de avenantramidas y la respuesta entregada por el detector, obteniéndose un comportamiento lineal. En las **Figuras 2, 3 y 4** se presentan las curvas de calibración (concentración vs área bajo la curva).

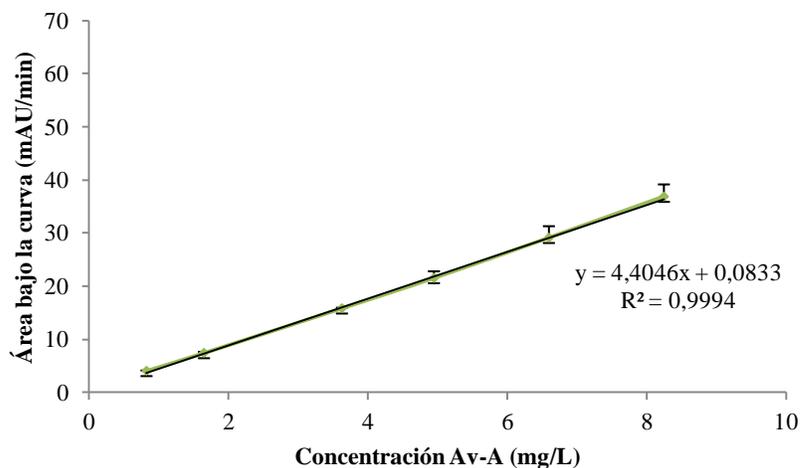


Figura 2. Curva de calibración para linealidad de avenantramida A.

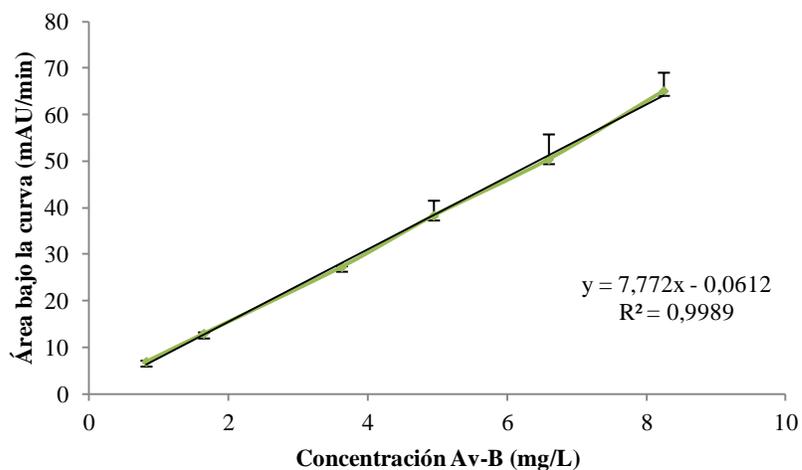


Figura 3. Curva de calibración para linealidad de avenantramida B.

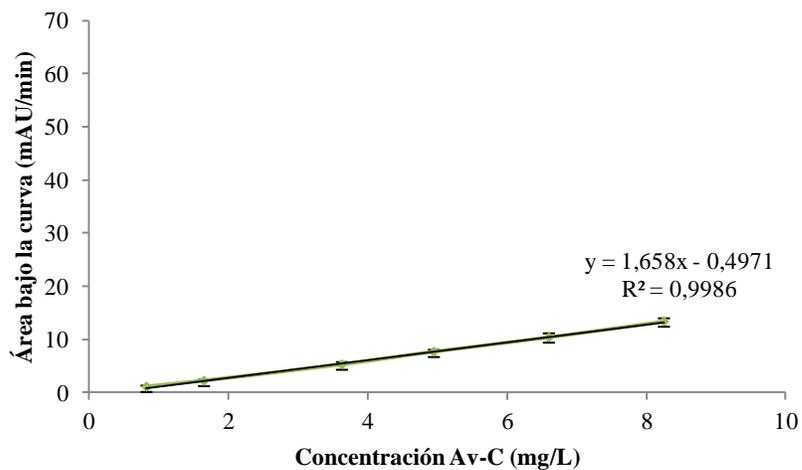


Figura 4. Curva de calibración para linealidad de avenantramida C.

Con respecto a los valores de coeficiente de determinación (r^2) de los estándares de avenantramida A, B y C éstos fueron altos, con valores de 0,9994, 0,9989, 0,9986, respectivamente, lo cual indica una excelente linealidad entre la concentración de los estándares y las respectivas áreas.

4.2.3.3.2 Precisión

La precisión del método fue determinada calculando los valores de desviación estándar (s) que corresponde a la medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio, y desviación estándar relativa (% RSD) que representa la dispersión de los datos con respecto a la media expresada como porcentaje, de cada punto de las curvas de calibración de los distintos estándares por triplicado.

La desviación estándar entregó valores entre 0,100 y 5,381, representados en las barras de error de las **Figuras 2, 3 y 4** y la desviación estándar relativa, de un 4% aproximadamente para los tres estándares, lo que indica una buena precisión del método analítico. Esta precisión también es apreciable visualmente al observar la baja dispersión de los datos representada por las barras de error de las **Figuras 2, 3 y 4**.

Avenantramida	Concentración (ppm)	s	% RSD
A	8,25	0,566	1,485
B		1,273	1,891
C		0,586	4,384
A	6,6	1,273	4,215
B		1,980	3,708
C		0,764	7,367
A	4,95	1,249	5,809
B		0,778	1,937
C		0,212	2,702
A	3,63	0,100	0,633
B		0,173	0,634
C		0,451	8,562
A	1,65	0,200	2,703
B		0,306	2,356
C		0,200	9,091
A	0,825	0,058	1,431
B		0,252	3,630
C		0,141	11,785

Tabla 11. Resultados de desviación estándar (s) y % desviación estándar relativa (% RSD).

4.2.3.3.3 Sensibilidad

La sensibilidad se determinó evaluando los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cada uno de los estándares de avenantramida.

Av	Límite de detección (mg/L)	Límite de cuantificación (mg/L)
A	0,0857	0,2591
B	0,0851	0,2436
C	1,2198	3,2897

Tabla 12. Límites de detección y cuantificación de los estándares de avenantramidas.

El límite de detección determinado a partir de las distintas concentraciones de los estándares fluctuó entre 0,0851 y 1,2198 mg/L para avenantramida B y C, respectivamente. Por otro lado, el límite de cuantificación osciló entre 0,2436 mg/L para avenantramida B y 3,2897 mg/L para avenantramida C.

Determinar la sensibilidad del método al identificar los límites de detección y cuantificación de estos compuestos, es una herramienta útil a la hora de confirmar que los resultados obtenidos sean confiables.

4.2.4 Determinación del contenido avenantramidas

Una vez validada la metodología de cuantificación de avenantramidas, se procedió a determinar el contenido de estos compuestos en trece cultivares de avena, codificados como AVE1, AVE3, AVE4, AVE8, AVE11, AVE12, AVE13, AVE14, AVE15, AVE16, AVE51, AVE52 y AVE53.

Existe un gran interés por las avenantramidas debido a sus propiedades antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*, así como los potenciales beneficios para la salud (Gray *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Meydani, 2009). Este hecho se debe a que la capacidad antioxidante de las avenantramidas es 10 a 30 veces superior que la de otros compuestos fenólicos de la avena (Emmons y Peterson, 2001; Bratt *et al.*, 2003), sugiriendo que la actividad antioxidante de la avena está dada principalmente por la presencia de estos compuestos.

El análisis de varianza de una vía indicó que el modelo fue significativo ($p < 0,05$; $R^2 = 0,99$), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares de avena. A pesar de estas diferencias, los valores pueden estar altamente influenciados por las condiciones medioambientales, debido a que la síntesis de avenantramidas y compuestos fenólicos es dependiente no solo del cultivar sino también de la localización geográfica de éste (Emmons y Peterson, 2001). Por otra parte, numerosos factores distintos de la variedad y la localización pueden afectar el contenido de polifenoles de las plantas. Estos factores incluyen la madurez en el momento de la cosecha, el procesamiento y condiciones de almacenamiento (Dimberg *et al.*, 1996).

Genotipo	Av	mg/kg	Concentración total (mg/kg)
AVE1	a	*	44,168
	b	12,608	
	c	31,56	
AVE3	a	*	*
	b	*	
	c	*	
AVE4	a	*	7,172
	b	7,172	
	c	*	
AVE8	a	16,159	64,581
	b	9,855	
	c	38,567	
AVE11	a	*	4,705
	b	4,705	
	c	*	
AVE12	a	47,438	155,158
	b	20,008	
	c	87,712	
AVE13	a	19,128	27,963
	b	8,835	
	c	*	
AVE14	a	26,799	40,557
	b	13,758	
	c	*	
AVE15	a	19,905	19,905
	b	*	
	c	*	
AVE16	a	13,06	13,06
	b	*	
	c	*	
AVE51	a	169,556	370,718
	b	87,446	
	c	113,718	
AVE52	a	125,886	329,887
	b	42,693	
	c	161,31	
AVE53	a	9,057	10,761
	b	1,704	
	c	*	

Tabla 13. Contenido de avenantramidas A, B y C y avenantramidas totales en trece cultivares de avena, expresado en mg/kg.

*Valores bajo el límite de cuantificación.

Los valores de concentración obtenidos para Av-A, Av-B y Av-C fluctuaron entre 9,057 a 169,556; 1,704 a 87,446 y 31,560 a 161,310 mg/kg de avena (**Tabla 13**), respectivamente.

El genotipo AVE51 mostró los valores más altos para Av-A y Av-B, mientras que para Av-C, el genotipo AVE52 presentó la mayor concentración. De las tres avenantramidas analizadas, la Av-C obtuvo los valores más bajos de concentración, al igual que lo reportado por Peterson *et al.* (2001). El mayor contenido total cuantificable de las avenantramidas más abundantes en el grano de avena lo obtuvo el cultivar AVE51 con 370,718 mg/kg (**Tabla 13**), siendo este valor tres veces superior al reportado previamente por Chu *et al.* (2013). El valor más bajo de avenantramidas totales cuantificables fue de 4,705 mg/kg para el cultivar AVE11.

Peterson *et al.* (2001) evaluaron la concentración de avenantramidas en una mezcla de cultivares comerciales de avena, determinando valores de 48, 22 y 12 mg/kg para Av-A, Av-B y Av-C respectivamente, lo que indica que los cultivares analizados en este estudio presentan mayor contenido de avenantramidas.

Sin embargo, a pesar de que el contenido de avenantramida representa una porción importante de los polifenoles totales presentes en la avena, no existe una correlación directa entre el contenido de avenantramidas y el valor de ORAC total, al igual que lo reportado por Chu *et al.* (2013). Este hallazgo sugiere que otros fitoquímicos tales como tocoferoles, esteroides y ácido fítico pueden contribuir a los valores de actividad antioxidante (Chu *et al.*, 2013).

5. CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles totales fueron determinadas, siendo una herramienta útil para la cuantificación exacta de estos compuestos bioactivos en granos de avena.

Con la optimización del proceso, se determinó de manera eficiente el contenido de polifenoles en distintos cultivares de avena.

El método de detección y cuantificación de avenantramidas por HPLC-DAD fue validado. Con los resultados obtenidos se concluye que el método cromatográfico utilizado en este estudio es preciso, exacto, lineal, sensible y eficiente en cuanto a la medición a través del tiempo, para ser aplicado en la cuantificación de avenantramidas en distintos cultivares de avena.

Los cultivares de avena en estudio presentaron una importante fuente de polifenoles totales y avenantramidas, mostrando diferencias significativas entre los cultivares.

Los cultivares analizados mostraron diferencias significativas en cuanto a su AOA en ambos ensayos (DPPH y ORAC), no existiendo una relación directa entre los resultados debido a las diferencias de los métodos.

No existió una relación clara entre el TPC y AOC, probablemente debido a la interferencia de otros compuestos presentes en las muestras de avena.

Debido a que los distintos cultivares de avena, provenientes de microparcels de INIA-Carillanca y correspondientes a la cosecha 2012/13, presentaron diferencias en cuanto a su contenido de polifenoles, avenantramidas y actividad antioxidante, fue rechazada la hipótesis nula (H_0) y por ende, aceptada la hipótesis alternativa (H_1).

Dada la importancia de la avena en la prevención de enfermedades cardiovasculares, sobrepeso y obesidad, gracias a los compuestos con actividad antioxidante que ésta presenta (polifenoles y avenantramidas), los mejoradores vegetales trabajan en generar nuevos cultivares que posean una mayor calidad nutricional en el grano, permitiendo este estudio contribuir en la caracterización fenotípica de la calidad nutricional de la avena y pudiendo la variabilidad encontrada en los cultivares de avena evaluados, contribuir en la selección de los progenitores en los programas de mejoramiento genético de avena orientado a la generación de alimentos más saludables.

6. LITERATURA CITADA

- Adom K. K. & Liu, R. H.** (2002) Antioxidant activity of grains *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182–6187.
- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E.** (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.*, 119:770–778.
- Awika J. M., Rooney L.W., Wu X., Prior R. L., Cisneros-Zevallos, L.** (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, 51:6657–6662.
- Belobrajdic D. P., Lam Y.Y., Mano M., Wittert G. A., Bird A.R.** (2011). Cereal based diets modulate some markers of oxidative stress and inflammation in lean and obese Zucker rats. *Nutr Metab.*, 8:27-36.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.** (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28:25–30.
- Bratt K., Sunnerheim K., Bryngelsson S., Fagerlund A., Engman L., Andersson R.E., Dimberg L.H.** (2003). Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.*, 51:594–600.
- Brindzová L., Čertík M., Rapta P., Zalibera M., Mikulajová A., Takácsová M.** (2008). Antioxidant activity, β -glucan and lipid contents of oat varieties. *Czech J. Food Sci.*, 26:163–173.
- Bryngelsson S., Dimberg L.H. y Kamal-Eldin A.** (2002). Effects of Commercial Processing on Levels of Antioxidants in Oats (*Avena sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 50:1890-1896.
- Chen C.Y., Milbury P.E, Kwak H.K., Collins F.W., Samuel P. y Blumberg J.B.** (2004). Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J. Nutr.* 134: 1459–1466.

Chen C.Y., Milbury P.E., Collins F.W., Blumberg J.B. (2007). Avenanthramides Are Bioavailable and Have Antioxidant Activity in Humans after Acute Consumption of an Enriched Mixture from Oats. *J. Nutr.* 137:1375–1382.

Chen C.Y., Milbury P.E., Kwak H.K., Collins F.W., Samuel P., Blumberg J.B. (2004). Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr*, 134:1459–66.

Chu Y.F., Wise M.L., Gulvady A.A., Chang T., Kendra D.F., B Jan-Willem van Klinken B., Shi Y., O'Shea M. (2013). In vitro antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of seven common oats. *Food Chem.*, 139:426–431.

Collins F.W., McLachlan D.C., Blackwell B.A. (1991). Oat phenolics: Avenaluminic acids, a new group of bound phenolic acids from oat groats and hulls. *Cereal Chem.* 68, 184-189.

Collins F.W. (1989). Oat Phenolics: Avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *J. Agric. Food Chem.*, 37:60–6.

Collins F.W., Mullin W.J. (1988). High-performance liquid chromatographic determination of avenanthramides, N-aroylanthranilic acid alkaloids from oats. *J. Chromatogr.*, 45:363–370.

Collins F.W., McLachlan D.C., Blackwell B.A., (1991). Oat phenolics: avenaluminic acids, a new group of bound phenolic acids from oat groats and hulls. *Cereal Chem.*, 68:184-189.

D'Archivio M., Filesi C., Vari R., Scaccocchio B. y Masella R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 1:1321-1342.

Davies K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 1–31.

Dimberg L.H., Theander O., Lingnert H. (1993). Avenanthramides: a group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chem.*, 70:637-641.

Dimberg L.H., Molteberg E.L., Solheim R., Frølich W. (1996). Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment. I: Phenolic compounds. *J. Cereal Sci.*, 24:263–272.

Emmons C.L. and Peterson D.M. (1999). Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem.*, 76:902–906.

Emmons C.L. and Peterson D.M. (2001). Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location. *Crop Sci.* 41: 1676–81.

Fearon A. M., Mayne C. S. & Charlton C. T. (1998) Effect of naked oats in the dairy cow's diet on the oxidative stability of the milk fat. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 546–552.

Fernandez-Pachon M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2005). Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *J. Agric. Food Chem.*, 53:5024–5029.

Genkinger J.M., Platz E.A., Hoffman S.C., Comstock G.W. & Helzlsouer K.J. (2004) Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. *Am. J. Epidemiol.*, 160, 1223–1233.

Gray D.A., Clarke M.J., Baux C., Bunting J.P., Salter A.M. (2002). Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays. *J. Cereal Sci.*, 36: 209–218.

Grayer R.J. y Kokubun T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem.*, 56:253-263.

Grayer R.J., Kokubun T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem.*, 56: 253-263.

Hagel L., Jagschies G. & Sofer G. (2008). Handbook of process chromatography 2nd ed., New York : John Wiley and Sons, Inc.

Harborne J.B., & Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.*, 55:481–504.

Harborne J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in Plant Biochemistry 1, Plant Phenolics*. New York: Academic Press.

Panglossi H.V. (2006). *Antioxidants: New Research*. New York: Nova Science Publishers.

Hooper L., & Cassidy A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *J. Sci. Food and Agric.*, 86:1805–1813.

Hung H.C., Joshipura K.J., Jiang R., Hu F.B., Hunter D., Smith-Warner S.A., Colditz G.A., Rosner B., Spiegelman D. & Willett W.C. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96:1577–1584.

Liu L., Zubik L., Collins F.W., Marko M., & Meydani M. (2004). The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, 175:39–49.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79:727–47.

Masood S.B., Muhammad T.N., Muhammad K.I.K., Rabia S., Mehmood S.B. (2008). Oat: unique among the cereals European. *J. Nutr.*, 47(2):68-79.

Meydani M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutr Rev.*, 67:731–735.

Miyagawa H., Ishihara A., Nishimoto T., Ueno T., and Mayama S. (1995). Induction of avenanthramides in oat leaves inoculated with crown rust fungus, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:2305-2306.

Molteberg E. L., Solheim R., Dimberg L.H., & Frolich W. (1996). Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment II: Sensory quality. *J. Cereal Sci.*, 24:273–282.

Nie L., Wise M.L., Peterson D.M., Meydani M. (2006). Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186:260–266.

ODEPA. (2013). Avena: Bajan los precios para esta temporada. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Boletín N°234, Agosto 2013.

OMS. 2013. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/

- Osawa T.** (1999). Protective role of rice polyphenols in oxidative stress. *Anticancer Res.*, 19:3645-3650.
- Ou B. X., Hampsch-Woodill M., & Prior R. L.** (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49:4619–4626.
- Parr A.J., Bolwell G.P.** (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *J. Agric. Food Chem.* 80:985–1012.
- Peterson D. M.** (2001). Oat antioxidants. *J.Cereal Sci.*, 33, 115-129.
- Peterson D.M., Emmons C.L., Hibbs A.H.** (2001). Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity in Pearling Fractions of Oat Groats. *J Cereal Sci.*, 33: 97–103.
- Peterson D.M., Emmons C.L., Hibbs A.H.** (2001). Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *Cereal Sci.*, 33:115-129.
- Peterson D.M., Hahn M.J., Emmons C.L.** (2002). Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chem.*, 79:473–8.
- Plackett R.L., Burman J.P.** (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4):305-325.
- Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R.** (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 51:3273-3279.
- Prior R.L., Wu X.L., Schaich K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 4290–4302.

- Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R.** (1992). *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro.
- Rajinder S., Subrata D., Asma B.** (2013). *Avena sativa* (Oat), A Potential Nutraceutical and Therapeutic Agent: An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53:2, 126-144.
- Ren Y., Yang X., Niu X., Liu S., Ren G.** (2011). Chemical characterization of the avenanthramide-rich extract from oat and its effect on D-galactose-induced oxidative stress in mice. *J. Agric. Food Chem.* 59:206-11.
- Rezaire A., Robinson J.-C., Bereau D., Verbaere A., Sommerer N., Khan M.K., Durand P., Prost E., Fils-Lycaon B.** (2014). Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): Chemical and biological antioxidant activity – Phytochemical composition. *Food Chem.*, 149:62–70.
- Ryan L., Thondre P.S., Henry C.J.K.** (2011). Oat-based breakfast cereals are a rich source of polyphenols and high in antioxidant potential. *J. Food Comp. Anal.*, 24: 929–934.
- Ryan L., Prescott S.L.** (2010). Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45:1191–1197.
- Scalbert A. & Williamson G.** (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073–2085.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., & Jimenez L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45:287–306.
- Seeram N.P., Aviram M., Zhang Y., Henning S.M., Feng L., Dreher M., Heber D.** (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric Food Chem.*, 56:1415–1422.
- Shahidi F, Naczk M.** (1995). *Food Phenolics: sources, chemistry, effects, applications*. Pennsylvania: Technomic Publishing.
- Sharma P., Gujral H.S.** (2010). Antioxidant and polyphenol oxidase activity of germinated barley and its milling fractions. *Food Chem.*, 120: 673–678.

Singleton V. L., Rossi J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16:144-158.

Stevenson D.G., Inglett G.E., Chen D., Biswas A., Eller F.J., Evangelista R.L. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide-treated and air-classified oat bran concentrate microwave-irradiated in water or ethanol at varying temperatures. *Food Chem.*, 108: 23–30.

Temple N. J. (2000). Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutr. Res.*, 20: 449-459.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrn D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food. Comp. Anal.* 19: 669–675.

USDA. (2013). World Agricultural Production. Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture. Circular Series WAP 11-13.

Weimin G., Lin N., Dayong W., Wise M.L., Collins F.W., Meydani S.N., Meydani M. (2010). Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro. *Nut.Cancer*, 62(8):1007–1016.

Willet W.C. (1994). Diet and Health: what should we eat. *Science* 264:532-537.

Wu D., Koga T. Martin K.R., Meydani M. (1999). Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis*, 147:297–307.

Yang Q., Trinh H.X., Imai S., Ishihara A., Zhang L., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S. (2004). Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Mol Plant Microbe Interact.*, 17:81-89.

Productividad científica

Congresos

Torres, P.; Acevedo F.; Rubilar M.; Mathias M.; Salvo-G H. Validación del método de identificación y cuantificación de avenantramidas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD). XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Innovación y Seguridad claves para el desarrollo de alimentos saludables. 27-30 Octubre, Antofagasta, Chile.

Torres, P.; Acevedo F.; Morales E.; Rubilar M.; Mathias M.; Salvo-G H. Analisis plackett-burnam para la extraccion de polifenoles en la variedad de avena “SUPERNOVA-INIA” 27-30 Octubre, Antofagasta, Chile.

Torres, P.; Acevedo F.; Rubilar M.; Mathias M.; Salvo-G H. Determination of avenanthramide content in de-hulled grains of oat (*Avena sativa* L.) 4th International Workshop in Advances in Science and Technology of Bioresource. 4-6 Diciembre 2013, Pucón, Chile.

Torres, P.; Acevedo F.; Morales E.; Rubilar M.; Mathias M.; Salvo-G H. Optimization of the total polyphenol extraction and quantification of antioxidant activity in oat genotypes. VIII Reunión de Biología Vegetal, 2-5 Diciembre, Pucón, Chile.

Paper en preparación

Paulina Torres, Francisca Acevedo, Eduardo Morales, Mario Villarroel, Mónica Mathias, Mónica Rubilar, Haroldo Salvo. Variability in polyphenol content and antioxidant activity of novel oat genotypes (*Avena sativa* L.).