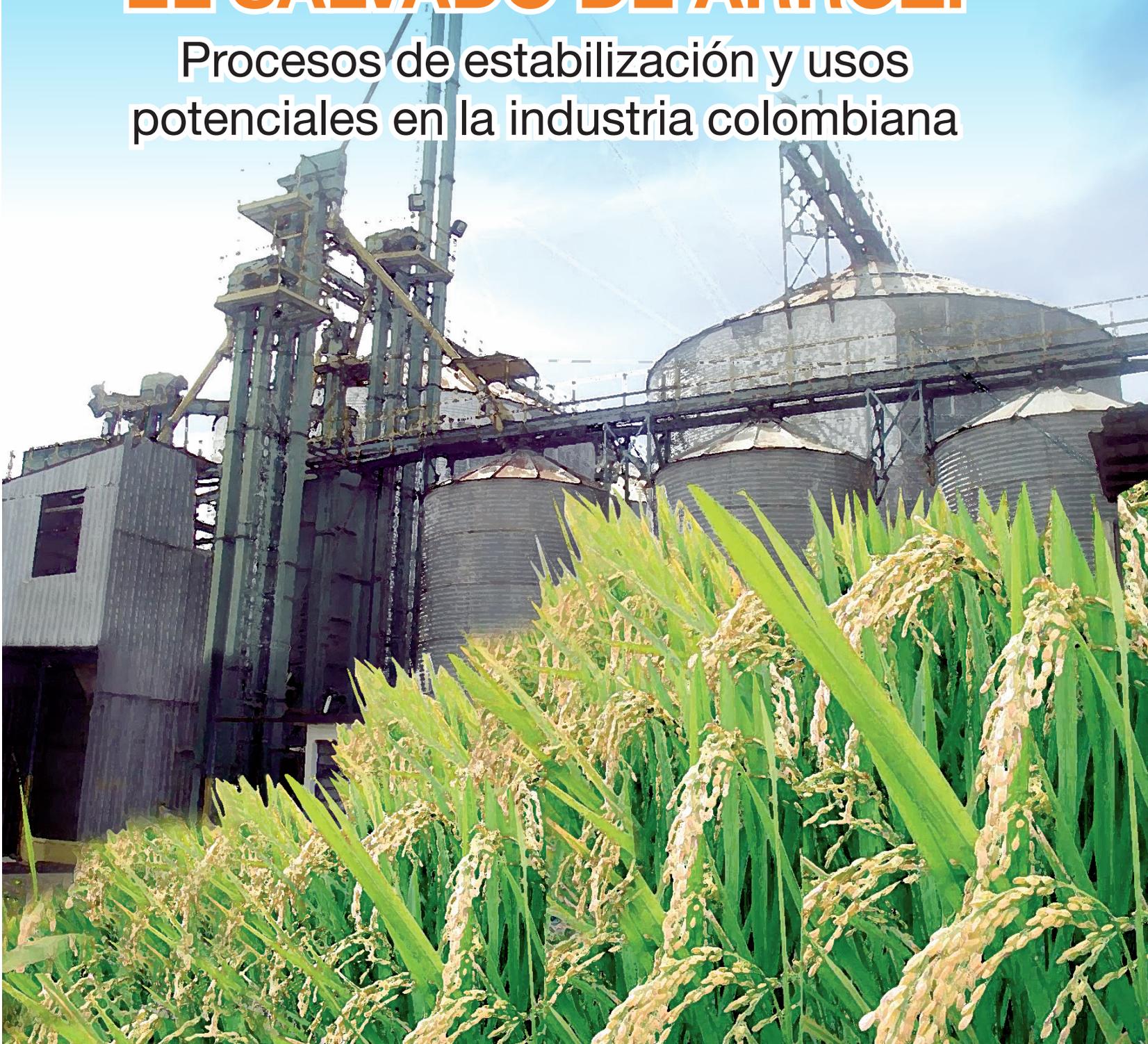


Edgar Mauricio Vargas

Marisol Aguirre

EL SALVADO DE ARROZ:

Procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana



Libertad y Orden

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
República de Colombia



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
E INGENIERÍA



Cámara Induarroz

EL SALVADO DE ARROZ:

Procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana



Libertad y Orden

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
República de Colombia



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
E INGENIERÍA



ANDI

Cámara Induarroz

Vargas, Edgar Mauricio

El salvado de arroz: procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana / Edgar Mauricio Vargas, Marisol Aguirre; coautores Rubén Danilo Bourdon ... [et al.]. – Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, ANDI. Cámara Induarroz, 2011.
252 p. : il.; 28 cm.

ISBN: 978-958-725-082-4

1. SALVADO DE ARROZ. 2. PRODUCTOS DEL ARROZ. I. Aguirre, Marisol.
II. Bourdon, Rubén Danilo. tit.

CDD664.725"V426"

Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

Carrera 4 N° 22-61 – PBX: 242 7030 – www.utadeo.edu.co

EL SALVADO DE ARROZ: Procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana

ISBN: 978-958-725-082-4

© Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2011

Rector: José Fernando Isaza Delgado

Vicerrector académico: Diógenes Campos Romero

Decano Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería: Daniel Bogoya

Director Departamento de Ingeniería: Edgar Mauricio Vargas

Decana Programa de Ingeniería de Alimentos: Gilma Janeth Luna Cortés

Director editorial (E): Jaime Melo Castiblanco

Coordinación editorial: Henry Colmenares Melgarejo

Diseño y diagramación: Oscar Joan Rodríguez

Corrección de estilo: Oscar Joan Rodríguez

Impresión:

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin autorización escrita de la
Universidad.

IMPRESO EN COLOMBIA - PRINTED IN COLOMBIA

EL SALVADO DE ARROZ:

Procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana

Autores

Edgar Mauricio Vargas
Marisol Aguirre

Coautores

Rubén Danilo Bourdon
Ivonne Alejandra González
Leslie Dayana López
Hernán Felipe Ovalle
Jenifer Guzmán
Diana Milena Parra
David Álvarez
Carol Díaz
Marisol Aguirre
Nancy Liliana Cobos
Victoria Eugenia Avendaño
Laura Cristina Durán
Andrea Nieto



Libertad y Orden

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
República de Colombia



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
E INGENIERÍA



Cámara Induarroz

AGRADECIMIENTOS

El profesor Edgar Mauricio Vargas agradece la financiación para realizar esta investigación al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (proyecto ref: 176-2008B3477-3243); a la Cámara Induarroz de la ANDI; a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano; y a todos los estudiantes, profesionales y profesores que participaron en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CONTEXTO GENERAL	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9

Capítulo 1

Metodologías estandarizadas para caracterizar el salvado de arroz en cada etapa de pulido de arroz (molino industrial).	13
--	-----------

Introducción	14
Metodologías estandarizadas para la extracción del aceite crudo de salvado de arroz; separación y cuantificación cromatográfica de tocoferoles, tocotrienoles, γ -orizanol y ácidos grasos insaturados totales (oléico, linoléico y linolénico)	

Capítulo 2

Clasificación del salvado de arroz de cada etapa de pulido de acuerdo con la calidad encontrada del producto (análisis composicional).	29
---	-----------

Introducción	30
Estudio del efecto de la variedad de arroz y la etapa de pulido en la calidad nutricional del salvado de arroz colombiano	32
Estudio del efecto de la variedad de arroz y la etapa de pulido en la calidad funcional del salvado de arroz colombiano	45

Capítulo 3

Análisis experimental y de resultados de técnicas de estabilización de salvado de arroz, mediante el uso de enzimas, ácidos y calor.	71
---	-----------

Introducción	72
Estabilización térmica: estabilización del salvado de arroz colombiano mediante tratamiento térmico para evaluar la conservación de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles)	76
Estabilización del salvado de arroz colombiano mediante tratamiento enzimático (papaína) para evaluar la conservación de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles)	87
Estabilización del salvado de arroz colombiano mediante tratamiento enzimático (bromelina) para evaluar la conservación de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles)	104

Estabilización del salvado de arroz colombiano mediante tratamiento con ácidos para evaluar la conservación de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles)	118
--	-----

Capítulo 4

Usos potenciales del salvado de arroz estabilizado en las industrias de alimentos, cosmetológica y farmacéutica, y usos alternos a dichas industrias.	127
--	------------

Introducción	128
El salvado de arroz en la industria de los alimentos	128
El salvado de arroz en la industria cosmetológica	142
El salvado de arroz en la industria farmacéutica	142
El salvado de arroz con nuevas aplicaciones	156

Capítulo 5

Elaboración de productos alimenticios con salvado de arroz estabilizado.	183
---	------------

Introducción	184
Evaluación de una harina de trigo (<i>Triticum durum</i>) y salvado de arroz colombiano (<i>Oryza sativa</i>) para panificación	186
Evaluación de una harina de trigo (<i>Triticum durum</i>) y salvado de arroz colombiano (<i>Oryza sativa</i>) para preparar pasta alimenticia	202

Capítulo 6

Diseño y dimensión del proceso de estabilización del salvado de arroz colombiano.	215
--	------------

Introducción	216
Diseño de una planta de estabilización térmica para la estabilización de salvado de arroz colombiano	218

CONTEXTO GENERAL

La cadena productiva del arroz es una importante fuente generadora de empleo. A nivel de cultivo, el III Censo Nacional Arrocerero realizado en 2007 identificó la existencia de 12.414 productores y 17.352 unidades productoras de arroz (UPA) empleando en forma directa a 65.000 personas. Por su parte, en el país existen cerca de 90 empresas procesadoras de arroz que emplean de forma directa a 4.650 personas y financian cerca del 30% del área sembrada de arroz.

La mayor parte de la capacidad instalada de la molinería de arroz de Colombia tiene un desarrollo tecnológico avanzado (en molienda y secado) si se compara con los estándares tecnológicos registrados por Estados Unidos, Brasil, Uruguay y Venezuela. El principal producto del proceso de molinería es el arroz blanco, seguido por subproductos como la cascarilla y el salvado de arroz (SA), y el arroz partido, grande y pequeño.

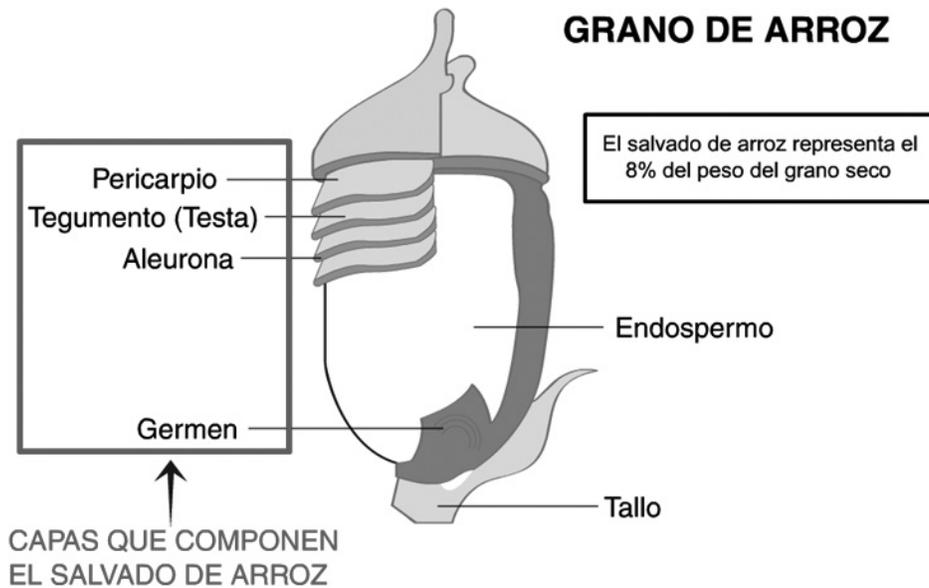
El arroz es un cultivo social y económicamente importante para el país por su alta participación en el área cosechada, en el valor de la producción agrícola y, como se había mencionado anteriormente, en la generación de empleo. En el año 2009, en Colombia se cultivaron 468.892 hectáreas (Ha) con una producción de 2'363.519 toneladas métricas (Tm) de arroz paddy seco, equivalente a cerca de 1'607.719 Tm de arroz blanco. El arroz es el tercer cultivo agrícola en extensión después del café y el maíz. Representa el 13% del área cosechada en Colombia y el 30% de los cultivos transitorios. Su producción representa el 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola colombiana. El valor generado por este producto es equivalente al 58% del valor constituido por el cultivo del café.

En general, la industria arrocera colombiana desempeña varias funciones dentro de la cadena: financia productores, acopia, acondiciona, almacena y financia almacenaje, procesa, hace mercadeo y desarrollo de productos, y vende. En este último tema, la década de los noventa se caracterizó por la consolidación de las marcas líderes y por una actividad más agresiva en términos de mercadeo, como respuesta a la recesión económica y en años recientes a la generación de productos con valor agregado.

Sin embargo, la industrialización de alimentos de consumo masivo trae consigo una serie de problemas a resolver, que van desde la producción de materias primas hasta la utilización de los subproductos que se generan durante el proceso, que muchas veces son un factor de impacto ambiental negativo.

Estos factores llevan a la necesidad de un reaprovechamiento integral de las materias primas y de los subproductos que se forman durante un proceso determinado. Un ejemplo se encuentra en la industrialización del arroz, la cual implica un proceso de abrasión, conocido como "molienda", del cual se obtiene como producto principal el arroz blanco o pulido. La cascarilla y el salvado de arroz (SA) son considerados como subproductos. La cascarilla representa cerca del 20% del arroz paddy seco y el

salvado representa aproximadamente el 8% (del arroz paddy seco) dividido así: el 6% de la capa externa y 2% del germen (gráfica 1).



Gráfica 1. Estructura del grano de arroz.

La producción nacional por año de estos dos subproductos es del orden de 400.000 toneladas para la cascarilla y 160.000 toneladas para el SA. Actualmente el uso del SA es para alimentación balanceada en animales con un precio relativamente bajo.

Para mejorar el valor comercial del SA, es necesario llevar a cabo un proceso de estabilización que le permita una vida útil más amplia, posibilitando usos potenciales en diferentes tipos de industrias. Este proyecto de investigación es de gran importancia, ya que Induarroz aspira incrementar para el año 2019 el consumo per cápita de arroz de 38 a 80 kilos.

La Cámara de Induarroz de la ANDI dando cumplimiento a su función de promover el desarrollo del mercado de productos comestibles y no comestibles, desarrolló y cofinanció en asocio con la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano el proyecto titulado “Estabilización y usos potenciales del salvado de arroz colombiano para su aprovechamiento industrial sin afectar su calidad nutricional y funcional”. Así, la presente publicación tiene como fin presentar los resultados obtenidos a nivel de estudio de SA colombiano.

Referencias bibliográficas

<http://www.Fedearroz.com.co/rev.htm>

Observatorio Agro cadenas Colombia, Febrero, 2004 <http://www.agrocadenas.gov.co>

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de los objetivos primordiales del país está la producción suficiente de alimentos básicos de consumo masivo, lo que hace de la industria alimentaria un factor determinante en el aprovechamiento y distribución de los alimentos. Esto lleva a la necesidad de un reaprovechamiento integral de las materias primas y de los subproductos que se generan en un proceso determinado.

En el país se generó en el año 2009 un total aproximado de 189.081 Ton de SA a un precio de venta promedio de 595 pesos/Kg.

El SA es la fracción del arroz de mayor contenido nutricional, ya que contiene de 15 a 20% de aceite comestible de alto valor funcional, de 12 a 16% de proteínas, de 23 a 28% de fibra dietética y de 7 a 10% de cenizas; además presenta un alto contenido de vitaminas del complejo B y E como el alfa-tocoferol, tocotrienoles y gamma-orizanol (Kennedy & Burlingame, 2003; Nicolosi *et al.*, 1993). Investigaciones recientes han concluido que el SA es un depósito de antioxidantes en potencia (120 antioxidantes y cofactores se han identificado), cuenta también con mezclas únicas de carbohidratos junto con todos los aminoácidos esenciales para el metabolismo de las proteínas; además es la solución perfecta en la batalla contra enfermedades crónicas del corazón e intestinales (Nutracea; Jariwalla, 2001), así las cualidades nutraceuticas generan un aporte a la salud humana al ser consumido.

Es importante mencionar que toda la potencialidad de este subproducto está por descubrirse, lo único cierto es que es un alimento que da vida. Lo anterior permite concluir que el SA es un producto alimenticio lleno de propiedades funcionales y con compuestos únicos de muy alto valor, con usos potenciales tanto en la industria de los alimentos funcionales (nutraceuticos), enriquecidos y fortificados, como en la industria cosmética y farmacéutica.

En la industria arrocera se presentan problemas con este subproducto, ya que su valor comercial es bajo, hay pocos compradores (industria de alimentos balanceados para animales), pocos usos conocidos (fibra dietaria), vida útil muy corta debido a la activación de enzimas en el proceso de molienda causando inestabilidad y un rápido deterioro del subproducto, generando la pérdida de toda la funcionalidad ya mencionada, por tal motivo el SA debe ser estabilizado rápidamente a través de algún tipo de proceso.

Dicha inestabilidad se produce por la presencia de lipasas y peroxidasas en el SA, que hidrolizan los glicéridos y oxidan los ácidos grasos libres ocasionando una alteración irreversible del subproducto en pocas horas de almacenamiento (se acidifica y enrancia rápidamente) (Parrado, 2006; Vercet, 2002; Adler-Nissen, 1986).

Existen varias posibilidades para evitar este deterioro que van desde tratamientos térmicos (mecánicos, microondas y óhmicos), químicos (ácidos, bases, antioxidantes), alternativos (proteasas), almacenamiento en atmósferas controladas, almacenamiento

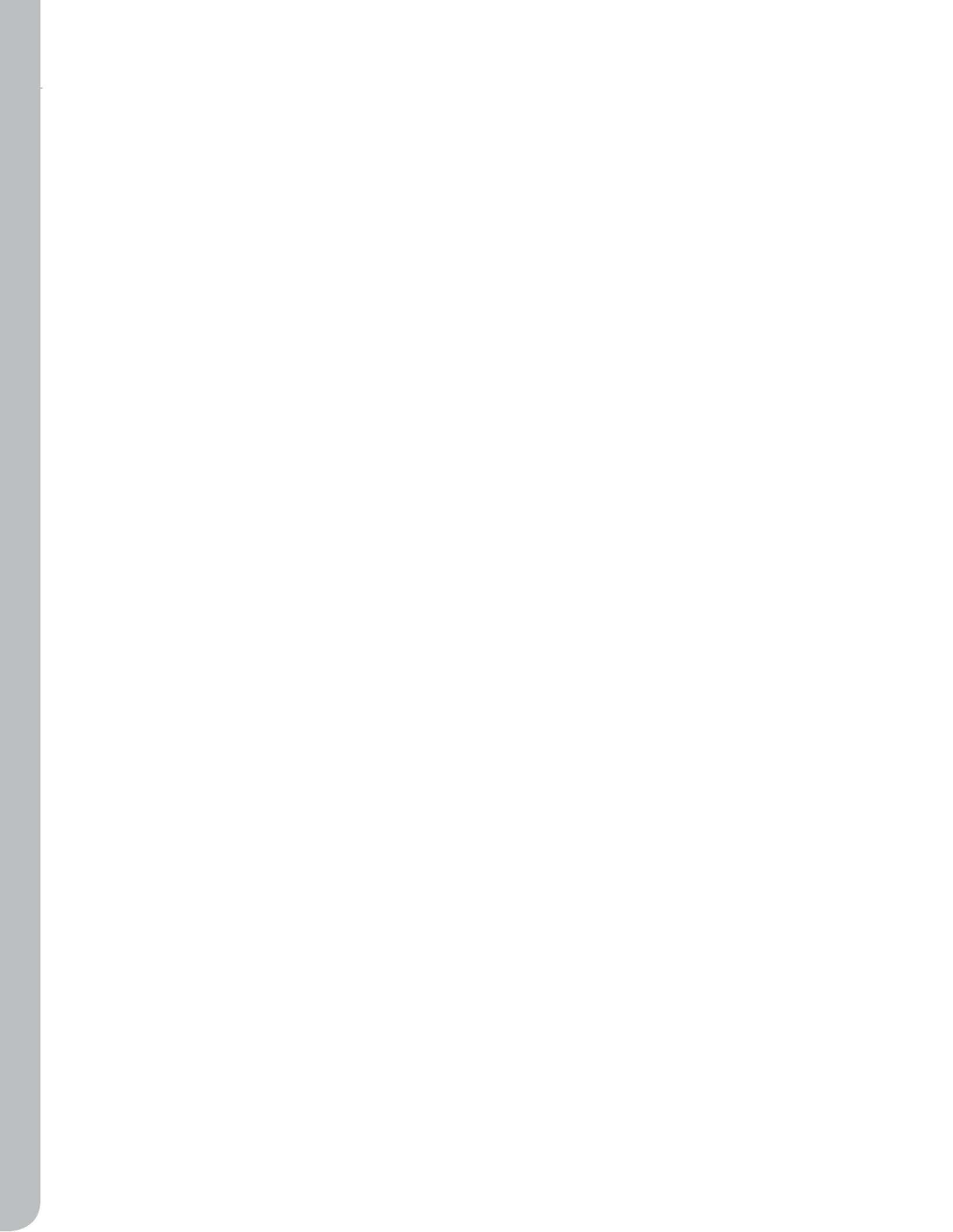
a bajas temperaturas hasta proceso simultáneo de blanqueo y extracción. Tales métodos consisten llanamente en eliminar o reducir la actividad de los constituyentes que provocan tal deterioro (Juliano, 1994; Prakash, 1996; Prakash, 1999; Prakash, 1996). Una técnica de estabilización adecuada es aquella en la que el SA es sometido a un proceso que permita inactivar las enzimas sin afectar el nivel nutricional y funcional del alimento, que es uno de los objetivos que persigue este proyecto; además destruir los inhibidores de crecimiento presentes naturalmente como son la tripsina y las hemaglutininas.

Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J.. ISSPH-The production and properties of an enzymic food protein hydrolysate (pp. 263-313). Enzymic hydrolysis of food proteins. London, New York: Elsevier Applied Science Publisher 1986.
- DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística de Colombia.
- Induarroz, Presentación titulada Mercado de los Subproductos del Arroz frente al TLC. 2007.
- Jariwalla, R. J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Experimental Clinical Research.*, 27, 17-26. 2001.
- Juliano, O. B. (Ed.). *Rice: Chemistry and Technology* (2nd ed.,pp. 17-160). St. Paul, EUA: The American ssociation of Cereal chemists inc., .647-680., 1994.
- Kennedy, G., & Burlingame, B.. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, 80, 589-596,. 2003.
- Da Silva M.A., Cristina Sanches, Edna Regina Amante. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering* 75 487-491., 2006.
- Mercados inteligentes de Proexport. www.proexport.com.co/intelelexport/aplicacion/.
- Nicolosi, R. J., Rogers, E. J., Ausmann, L. M., & Orthoefer, F. T. Rice bran oil and its health benefits. In W. E. Marshall & J. I. Wadsworth (Eds.), *Rice science and technology* (pp. 421- 431). New York: Marcel Dekker 1993.
- Nutracea. www.nutracea.com/
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., Collantes de Terán, L., Bautista, J. 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98, 742-748.
- Prakash, J., & Ramanatham, G. Physico-chemical and nutritional traits of rice bran protein concentrate-base eaning foods. *Journal of Food Science and Technology*, 32(5), 395-399., 1999.

Prakash, J.. Rice bran proteins: properties and food uses. *Critical Review of Food Science Nutrition*, 36(6), 537-552., 1996.

Vercet, A., Oria, R., Crelier, S., & Lopez-Buesa, P. Selective inactivation of phospholipase A2 in complex protein mixtures. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 271-277,. 2002.



CAPÍTULO 1

METODOLOGÍAS ESTANDARIZADAS PARA CARACTERIZAR EL SALVADO DE ARROZ EN CADA ETAPA DE PULIDO DE ARROZ (MOLINO INDUSTRIAL)

Metodologías estandarizadas para la extracción del aceite crudo de salvado de arroz; separación y cuantificación cromatográfica de tocoferoles, tocotrienoles, γ -orizanol y ácidos grasos insaturados totales (oléico, linoléico y linolénico).

Autores

Rubén Danilo Bourdon
Ivonne Alejandra González



INTRODUCCIÓN

Debido a que este estudio es pionero en el país, se presentó la necesidad de adaptar algunas de las metodologías empleadas a nivel internacional para la extracción de aceite de salvado de arroz colombiano y sus compuestos funcionales. Para la caracterización funcional se estudió y se cuantificaron los ácidos grasos libres insaturados (omega 9, omega 6 y omega 3) por método HPLC (Implementado en la Universidad); caracterización y cuantificación de tocoferoles, tocotrienoles y gamma-orizanol por método de HPLC (implementado en la Universidad).

A continuación se presentan las metodologías estandarizadas para:

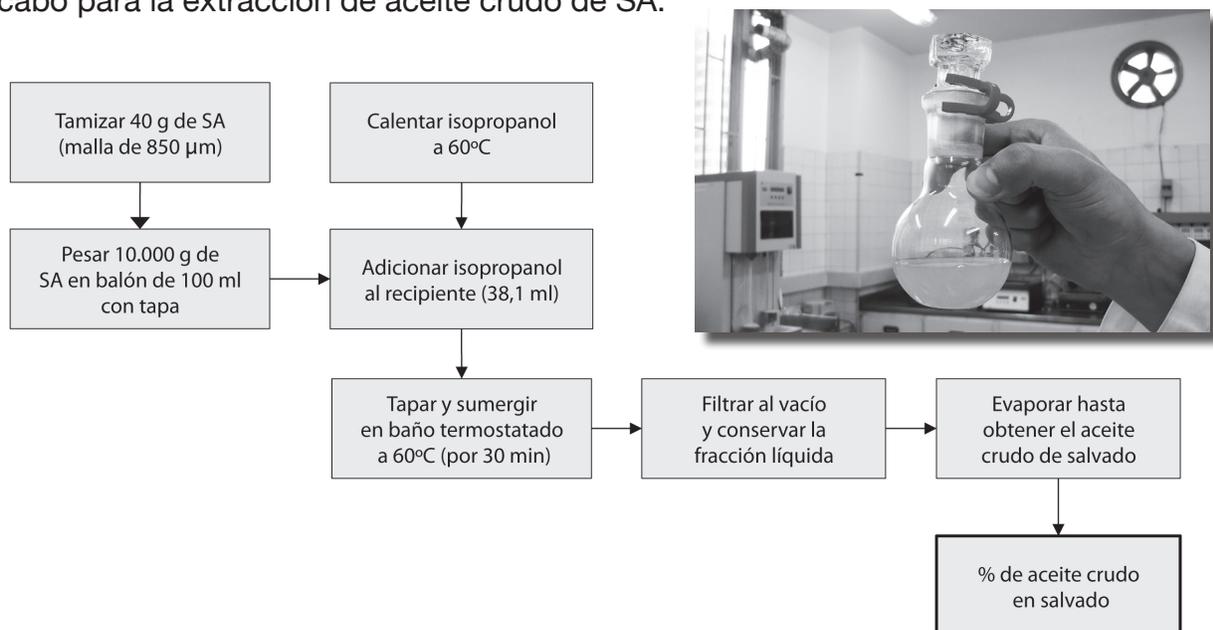
- Extracción del aceite crudo del salvado de arroz colombiano.
- Separación de tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanol.
- Separación de ácidos grasos insaturados totales y libres (oléico, linoléico y linolénico).
- Curvas de calibración y condiciones para la cuantificación mediante HPLC.

METODOLOGÍAS Y MATERIALES

A continuación se presentan las metodologías y materiales empleados a lo largo de las investigaciones realizadas.

Extracción de aceite crudo de salvado de arroz

En el siguiente diagrama (gráfica 2) se encuentra explicada la metodología llevada a cabo para la extracción de aceite crudo de SA.



Gráfica 2. Metodología para extracción del aceite crudo de SA.

Materiales y reactivos para un ensayo (3 muestras)

- 1 balanza analítica (mínimo 3 decimales)
- 1 malla de 850 μm (tamizador automático)
- 1 baño termostatado a 60 °C
- 1 bomba de vacío con trampa
- 1 evaporador rotatorio
- 1 probeta de 50 mL (unidad mínima 0,1 mL)
- 3 balones fondo redondo de 100 mL con boca ES 29/32, con tapa y clip
- 1 balón de 250 mL fondo redondo con boca ES 29/32 con tapa y clip (para isopropanol)
- 4 pinzas para refrigerante con nuez
- 1 erlenmeyer de 250 mL con desprendimiento (kitasato)
- 1 embudo büchner
- 3 tubos para centrífuga de 50 mL
- 3 viales ambar de 1,5 mL con tapa y septa de teflón
- 3 papel filtro N° 1 (Whatman)
- 1 micro espátula
- 1 espátula
- Salvado de arroz 40 g
- Isopropanol (2-propanol) HPLC o R.A. 200 mL

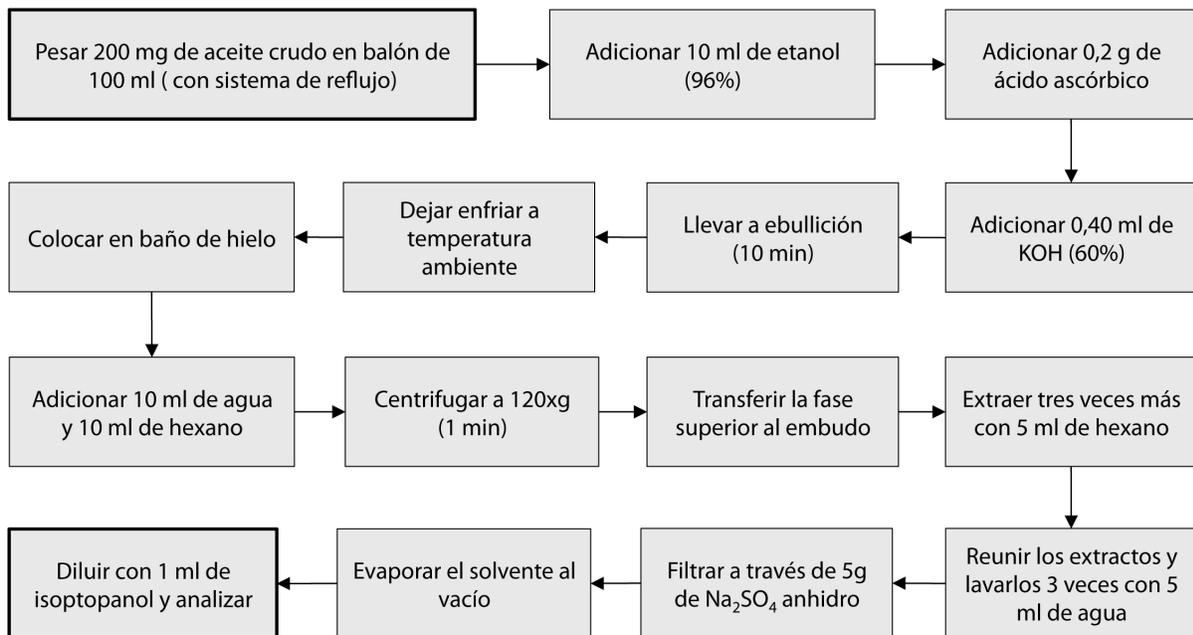
Separación de tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanol desde aceite crudo de SA

La separación de tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanol desde aceite crudo de SA se presenta a continuación en la gráfica 3.

Materiales y reactivos para un ensayo (3 muestras)

- 1 balanza analítica (mínimo 3 decimales)
- 1 evaporador rotatorio
- 1 plancha de calentamiento
- 1 centrífuga
- 1 probeta de 10 mL
- 3 balones fondo redondo de 100 mL con boca ES 29/32, con tapa y clip
- 3 embudos de separación de 100 mL
- 3 condensadores (para reflujo)
- 3 pinzas para refrigerante con nuez
- 2 buretas de 50 mL (hexano, agua desionizada)

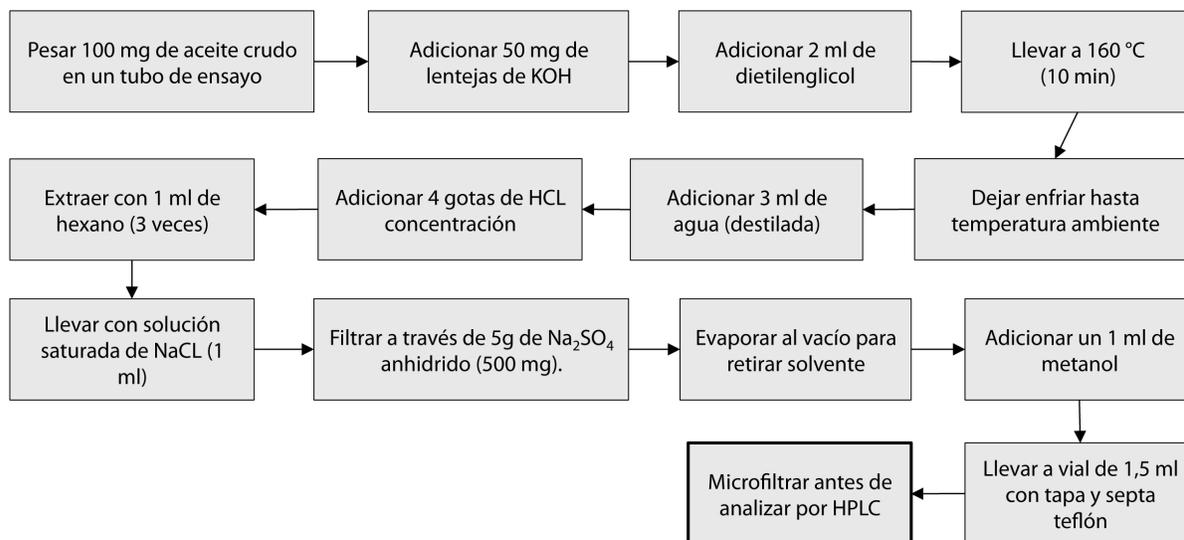
- 3 vasos de precipitados de 50 mL
- 3 tubos para centrifuga de 50 mL
- 3 pipetas pasteur o serológicas
- 3 viales ámbar de 1,5 mL con tapa y septa de teflón
- 3 embudos pequeños con vástago
- 1 cubeta de plástico (recipiente para baño de hielo)
- 3 láminas de papel aluminio de 6 x 6 cm
- 1 micropipeta de 1000 μ L con 3 tips
- 1 microespátula
- Aceite crudo de SA 1 g
- Etanol al 96% R.A. 50 mL
- Ácido ascórbico 1 g
- KOH al 60% 2 mL
- Hielo 500 g
- Hexano R.A. 100 mL
- Agua desionizada 100 mL
- Sulfato de sodio anhidro R.A. 20 g
- Lana extraída con hexano 4 g
- Isopropanol (2-propanol) HPLC o R.A. 5 mL



Gráfica 3. Metodología de separación de tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanól desde aceite crudo de arroz.

Separación de ácidos grasos insaturados totales desde aceite crudo de arroz

En el siguiente diagrama se muestra la metodología para la separación de ácidos grasos insaturados totales desde aceite crudo de arroz (gráfica 4).



Gráfica 4. Metodología de separación de ácidos grasos insaturados totales (oléico, linoléico y linolénico) desde aceite crudo de arroz.

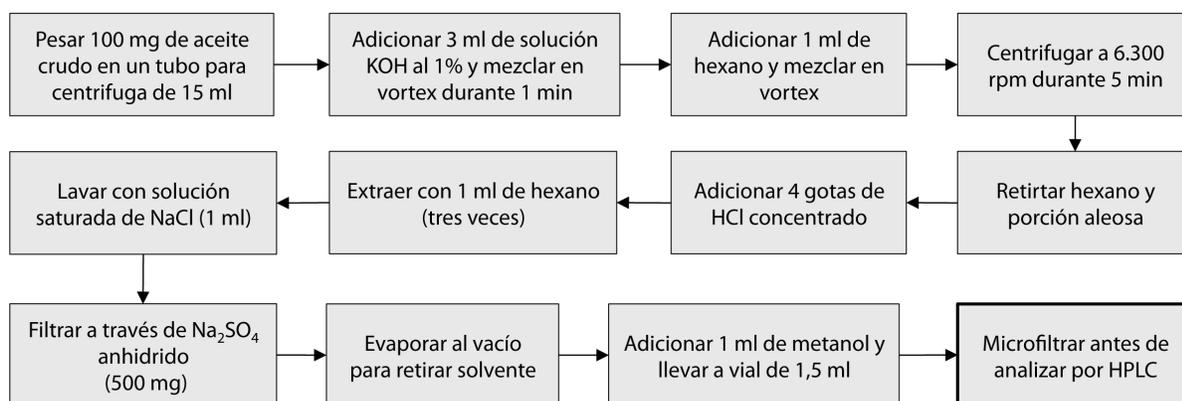
Materiales y reactivos para un ensayo (3 muestras)

- 1 balanza analítica (mínimo 3 decimales)
- 1 Aparato de digestión o calentamiento controlado
- 1 evaporador rotatorio
- 1 probeta de 10 mL
- 3 embudos de separación de 100 mL
- 3 balones fondo redondo de 100 mL con boca ES 29/32, con tapa y clip
- 6 tubos de ensayo 16x250
- 3 pinzas para refrigerante con nuez
- 1 microfiltro de 0,22 μm con jeringa
- 3 embudos pequeños con vástago largo
- 4 vasos de precipitados de 50 mL
- 3 viales ámbar de 1,5 mL con tapa y septa de teflón
- 3 pipetas pasteur (o serológicas)
- 1 micropipeta de 1000 - 5000 μL y 5 tips
- 1 gradilla (bien estable)
- 1 microespátula

- Aceite crudo de SA 500 mg
- KOH R.A. en lentejas 200 mg
- Dietilenglicol R.A. 10 mL
- Agua destilada 12 mL
- HCl concentrado R.A. 10 mL
- Hexano R.A. 5 mL
- Solución saturada de NaCl 5 mL
- Sulfato de sodio anhidro R.A. 3 g
- Lana extraída con hexano 2 g
- Metanol HPLC 10 mL

Separación de ácidos grasos insaturados libres desde aceite crudo de arroz

La siguiente gráfica muestra la metodología para la separación de ácidos grasos insaturados libres desde aceite crudo de arroz (gráfica 5).



Gráfica 5. Metodología de separación de ácidos grasos insaturados libres (oléico, linoléico y linolénico) desde aceite crudo de arroz.

Materiales y reactivos para un ensayo (3 muestras)

- 1 balanza analítica (mínimo 3 decimales)
- 1 equipo de centrifugación
- 1 evaporador rotatorio
- 1 mezclador de contacto (vortex)
- 3 embudos de separación de 100 mL
- 3 balones fondo redondo de 100 mL con boca ES 29/32, con tapa y clip
- 3 tubos para centrifuga de 15 mL con tapa

- 3 tubos para centrífuga de 50 mL
- 3 tubos de ensayo 16x250
- 3 pinzas para refrigerante con nuez
- 1 microfiltro de 0,22 μm con jeringa
- 4 vasos de precipitados de 50 mL
- 3 embudos pequeños con vástago largo
- 3 viales ámbar de 1,5 mL con tapa y septa de teflón
- 3 pipetas pasteur (o serológicas)
- 1 micropipeta de 1000 μL y 5 tips
- 1 gradilla (bien estable)
- 1 microespátula
- Aceite crudo de SA 500 mg
- KOH al 1% 12 mL
- HCl concentrado R.A. 10 mL
- Hexano R.A. 10 mL
- Solución saturada de NaCl 5 mL
- Sulfato de sódio anhidro R.A. 3 g
- Lana extraída con hexano 2 g
- Metanol HPLC 10 mL

Condiciones cromatográficas I para cuantificación de tocoferoles, tocotrienoles y γ - orizanol

1. Método de separación: cromatografía líquida de alta eficiencia - HPLC
 - a) Bomba cuaternaria con desgasificación LaChrom L – 7100 de Merck – Hitachi.
 - b) Horno de columna MetaTherm de Varian, programado a 35 °C.
 - c) Columna cromatográfica, RP C – 18, 150 x 4,6 mm, tamaño 5 μm .
 - d) Flujo de 1 mL/min. Gradiente de elución (tabla 1).

Tabla 1. Gradiente de elución para la cuantificación de antioxidantes.

TIEMPO (min)	% METANOL	% ACETONITRILO
0	50	50
5	50	50
6	100	0
15	100	0
17	50	50
30	50	50

2. Detección:

- a) Tocoferoles y tocotrienoles por fluorescencia, con excitación a 296 nm, emisión a 330 nm y tiempo de encendido del detector de 20 minutos. Detector Agilent 1100 series.
- b) γ - orizanol por U.V. a 325 nm. Detector LaChrom L – 7400 de Merck – Hitachi.

3. Adquisición de datos:

- a) Software Galaxie versión 1.9.302.530 con módulo interfase Star 800 de Varian.

4. Cantidad de muestra 20 μ L, tiempo de análisis 30 minutos.

Condiciones cromatográficas II para cuantificación de tocoferoles, tocotrienoles y γ - orizanol

1. Método de separación: cromatografía líquida de alta eficiencia – HPLC

- a) Bomba cuaternaria con desgasificación LaChrom L – 7100 de Merck – Hitachi.
- b) Horno de columna MetaTherm de Varian, programado a 35 °C.
- c) Columna cromatográfica, CHROMOLITH C18e performance monolítica, 150 x 4,6 mm, tamaño 2 μ m.
- d) Flujo de 1 mL/min. Gradiente de elución (tabla 2).

Tabla 2. Gradiente de elución para la cuantificación de antioxidantes.

TIEMPO (min)	% METANOL	% ACETONITRILO	% AGUA
0	17	76	7
6	17	76	7
7	95	5	0
16	95	5	0
17	17	76	7
20	17	76	7

2. Detección:

- a) Tocoferoles y tocotrienoles por fluorescencia, con excitación a 296 nm, emisión a 330 nm y tiempo de encendido del detector de 15 minutos. Detector Agilent 1100 series.
- b) γ - orizanol por U.V. a 325 nm. Detector LaChrom L – 7400 de Merck – Hitachi.

3. Adquisición de datos:
 - a) Software Galaxie versión 1.9.302.530 con módulo interfase Star 800 de Varian.
4. Cantidad de muestra 20 μ L, tiempo de análisis 20 minutos.

Condiciones cromatográficas I para cuantificación de ácidos grasos insaturados (oléico, linoléico y linolénico) libres y totales

1. Método de separación: cromatografía líquida de alta eficiencia - HPLC
 - a) Bomba cuaternaria con desgasificación LaChrom L – 7100 de Merck – Hitachi.
 - b) Horno de columna MetaTherm de Varian, programado a 35 °C.
 - c) Columna cromatográfica, RP C – 18, 150 x 4,6 mm, tamaño 5 μ m.
 - d) Flujo de 1 mL/min. Elusión isocrática con mezcla Acetonitrilo – Ácido Acético* (98:2)
*La concentración del ácido acético es del 1% en agua
2. Detección:
 - a) Detector LaChrom L – 7400 de Merck – Hitachi y Longitud de onda 201 nm (U.V.).
3. Adquisición de datos:
 - a) Software Galaxie versión 1.9.302.530 con módulo interfase Star 800 de Varian.
4. Cantidad de muestra 20 μ L, tiempo de análisis 15 minutos.

Condiciones cromatográficas II para cuantificación de ácidos grasos insaturados (oléico, linoléico y linolénico) libres y totales

1. Método de separación: cromatografía líquida de alta eficiencia - HPLC
 - a) Bomba cuaternaria con desgasificación LaChrom L – 7100 de Merck – Hitachi.
 - b) Horno de columna MetaTherm de Varian, programado a 35 °C.
 - c) Columna cromatográfica, CHROMOLITH C18e performance monolítica, 150 x 4,6 mm, tamaño 2 μ m.
 - d) Flujo de 1 mL/min. Elusión isocrática con mezcla Acetonitrilo – Agua – Ácido Acético* (90:4:6).

*La concentración del ácido acético es del 1% en agua.

2. Detección:

- a) Detector LaChrom L – 7400 de Merck – Hitachi y Longitud de onda 201 nm (U.V.).

3. Adquisición de datos:

- a) Software Galaxie versión 1.9.302.530 con módulo interfase Star 800 de Varian.

4. Cantidad de muestra 20 µL, tiempo de análisis 10 minutos.



Cromatógrafo HPLC. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

Curvas de calibración para tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanol

Abreviaturas

Conc.: concentración.

FD: factor de dilución.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia.

N: nivel.

V: volumen.

1. Curva de calibración tocoferol y tocotrienoles.

- a) Concentraciones propuestas para los niveles de la curva de calibración de tocoferol y tocotrienoles (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de los niveles en la curva de calibración.

Patrón	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	N5	N4	N3	N2	N1
δ -tocotrienol	16,8	8,4	4,2	2,1	1,3
α -tocotrienol	30,3	15,2	7,6	3,8	2,4
α -tocoferol	23,3	11,7	5,8	2,9	1,9

b) Preparación curva de calibración.

- ✓ Preparar una solución stock de concentración 20 mg/L de Tocomin, disuelto en isopropanol HPLC. Agitar hasta disolver. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ A partir de la solución stock, preparar los niveles de las diferentes concentraciones de la siguiente manera (gráfica 6):

N5→Tomar 12 μL de la solución stock de Tocomin (preparada por Ruben) y añadir 288 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 300 μL).

N4→Tomar 100 μL de la solución N5 y añadir 100 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μL).

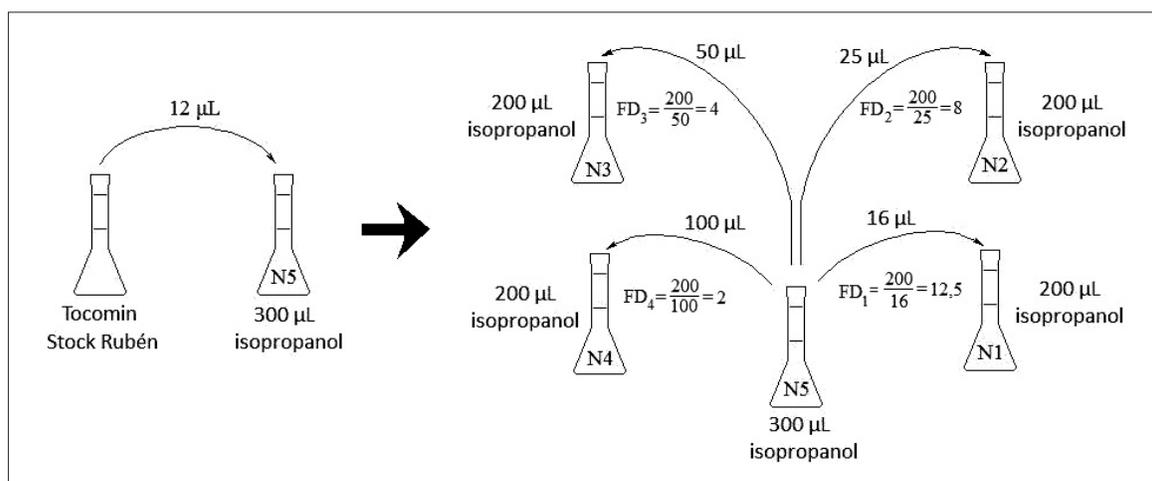
N3→Tomar 50 μL de la solución N5 y añadir 150 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μL).

N2→Tomar 25 μL de la solución N5 y añadir 175 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μL).

N1→Tomar 16 μL de la solución N5 y añadir 184 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μL).

Todos los niveles se preparan con isopropanol HPLC.

En la siguiente gráfica se ejemplifica la preparación de los niveles mencionados (gráfica 6).

**Gráfica 6.** Preparación curva de calibración tocoferol y tocotrienoles.

- ✓ Recalcular la concentración de δ -tocotrienol, α -tocotrienol y α -tocoferol en N5 preparado, como se muestra a continuación para cada una de los compuestos:

$$\text{Conc. } \delta \text{ - tocotrienol } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Área N5}}{15708}$$

$$\text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Área N5}}{4629,4}$$

$$\text{Conc. } \alpha \text{ - tocoferol } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Área N5}}{8128,4}$$

- ✓ A partir de la concentración de los compuestos en el N5, calcular el contenido de δ -tocotrienol, α -tocotrienol y α -tocoferol en cada uno de los niveles como se muestra a continuación:

$$\text{N4} \left\{ \begin{array}{l} \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N4 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc.N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_4} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N4 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_4} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocoferol N4 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_4} \end{array} \right.$$

$$\text{N3} \left\{ \begin{array}{l} \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N3 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc.N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_3} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N3 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_3} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocoferol N3 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_3} \end{array} \right.$$

$$\text{N2} \left\{ \begin{array}{l} \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N2 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc.N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_2} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N2 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_2} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocoferol N2 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_2} \end{array} \right.$$

$$\text{N1} \left\{ \begin{array}{l} \text{Conc. } \alpha \text{ - tocotrienol N1 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc.N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_1} \\ \text{Conc. } \alpha \text{-tocotrienol N3 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_1} \\ \text{Conc. } \alpha \text{ - tocoferol N1 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5 } (\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_1} \end{array} \right.$$

Los valores de los factores de dilución (FD) para cada uno de los niveles se encuentran en la Gráfica 6.

2. Curva de calibración γ -orizanol

- a) Concentraciones propuestas para los niveles de la curva de calibración de γ -orizanol (tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de los niveles en la curva de calibración.

Patrón	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	Stock	N5	N4	N3	N2	N1
γ -orizanol	2790	1395	698	349	174	87

- b) Preparación curva de calibración.

- ✓ Preparar una solución stock de concentración 2790 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de γ -orizanol, de la siguiente manera:

Pesar 0,0279 gramos del estándar de γ -orizanol, y disolver en 10 mL de isopropanol HPLC. Agitar hasta disolver todo el sólido. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- ✓ Recalcular la concentración de la solución stock de γ -orizanol preparada con el peso obtenido:

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{\text{Peso } \gamma \text{ - orizanol (g)}}{\text{Volumen solución (mL)}} * \frac{1000(\text{mg})}{1(\text{g})} * \frac{1000(\mu\text{g})}{1(\text{mg})}$$

- ✓ A partir de la solución stock, preparar los niveles de las diferentes concentraciones, como se describe a continuación (gráfica 7):

N5→Tomar 100 μl de la solución stock de γ -orizanol y añadir 100 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μl).

N4→Tomar 100 μl de la solución N5 de γ -orizanol y añadir 100 μL de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μl).

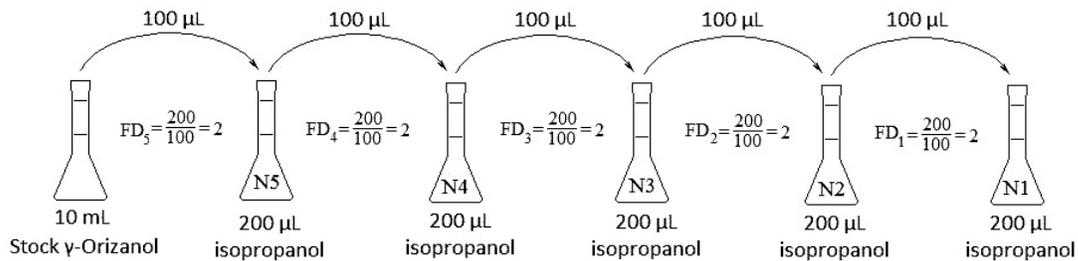
N3→Tomar 100 μl de la solución N4 de γ -orizanol y añadir 100 μl de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μl).

N2→Tomar 100 μl de la solución N3 de γ -orizanol y añadir 100 μl de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μl).

N1→Tomar 100 μl de la solución N2 de γ -orizanol y añadir 100 μl de isopropanol HPLC (Volumen total 200 μl).

Todos los niveles se preparan con isopropanol HPLC.

A continuación se ejemplifica la preparación de los niveles para la curva de calibración del γ -orizanol (gráfica 7).



Gráfica 7. Esquema de preparación de la curva de calibración γ -orizanol.

Recalcular la concentración de todos los niveles preparados de γ -orizanol:

Los valores de los factores de dilución (FD) para cada uno de los niveles se encuentran en la gráfica 7.

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol N5 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. Stock}(\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_5}$$

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol N4 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N5}(\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_4}$$

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol N3 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N4}(\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_3}$$

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol N2 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N3}(\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_2}$$

$$\text{Conc. } \gamma \text{ - orizanol N1 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Conc. N2}(\mu\text{g/mL})}{\text{FD}_1}$$

CONCLUSIONES

Se logró separar y cuantificar los antioxidantes y ácidos grasos de interés, utilizando metodologías por HPLC.

Referencias bibliográficas

- Chen, M-H.; Bergman, C.J. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -orizanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis* (2005), 18, 139-151.
- Fang, N.; Yu, S.; Badger, T.M. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2003), 51, 3260-3267.
- FAO/OMS. Consulta FAO/OMS de expertos sobre grasas y aceites en la nutrición humana. FAO, Roma, 1997, p. 124.
- Hu, W.; Wells, J.H.; Shin, T-S.; Godber, S. Comparison of isopropanol and hexane from extraction of vitamin E and orizanol from stabilized rice bran. *Journal of American Oils Chemists' Society*, (1996), 73, 1653-1656.
- Parks, E.; Traber, M.G. Mechanisms of vitamin E regulation: Research over the past decade and focus on the future. *Antioxidants & Redox Signaling* (2000), 3, 405-412.
- Pollack R, Morse D. Radicales libres y antioxidantes: correlacion con las enfermedades cronicas y el envejecimiento. *International J of Psychosomatic* 1990; 35: 1-4.
- Shin, T-S.; Godber, S. Changes of endogenous antioxidants and fatty acid composition in irradiated rice bran during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1996), 44, 567- 573.
- Yu, S.; Nehus, Z.T.; Badger, T.M.; Fang, N. Quantification of vitamin E and γ orizanol components in rice germ and bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2007), 55, 7308-7313.



www.utadeo.edu.co

