

## ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE FRUTAS FINAS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ASOCIADA CON UN MÉTODO *IN VITRO* MODIFICADO

Rico, María Noel<sup>AB</sup>

<sup>A</sup>Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL

<sup>B</sup>Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL

**Área:** Ciencias de la Salud

**Sub-Área:** Nutrición

**Grupo:** X

**Palabras clave:** zarzamoras, frutillas, compuestos fenólicos

### INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y representan los antioxidantes más abundantes en la dieta. Comprenden una amplia variedad de compuestos simples o polimerizados formados por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilos (Hannum, 2004).

Las frutas finas (frutillas, arándanos, zarzamoras, etc.) son muy populares debido a su atractivo color y sabor y son reconocidas por ser muy ricas en compuestos fenólicos con propiedades promotoras de la salud (Van de Velde y col., 2016).

Los efectos de los compuestos fenólicos sobre la salud dependen de su bioaccesibilidad, es decir de la cantidad presente en el alimento que llega a la luz intestinal como consecuencia de su liberación de la matriz alimentaria, y que puede ser absorbido para ejercer un efecto sistémico o local (Saura-Calixto y col., 2007). Entonces, además de identificar y cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos de un producto vegetal determinado, se vuelve fundamental conocer la bioaccesibilidad de estos compuestos.

Los métodos de digestión y diálisis *in vitro* pueden simular las condiciones gastrointestinales y permiten el estudio de los cambios en los componentes dietarios durante las fases gástrica e intestinal de forma rápida, reproducible y segura (You y col., 2010). Si bien existen en la bibliografía algunos métodos *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles a nivel de intestino delgado, estas metodologías no consideran la fracción de polifenoles metabolizados por la microflora del colon que pueden ser absorbidos por el intestino grueso, aumentando su bioaccesibilidad.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de digestión y diálisis *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles presentes en frutas finas (frutillas y zarzamoras), simulando tanto la digestión en el intestino delgado, como en el colon, para lo que se incorporó una etapa de fermentación y diálisis que permitirá estimar la fracción de polifenoles que tras ser metabolizada por las enzimas de las bacterias colónicas puede ser absorbida en el intestino grueso. Además, se analizó el porcentaje de capacidad antioxidante remanente en cada porción obtenida luego de la digestión gastrointestinal en relación a la capacidad antioxidante de la fruta sin digerir.

### METODOLOGÍA

Proyecto acreditado en el que se enmarca la investigación: Proyecto I+D PICT-2015-0673 Argentina Innovadora 2020: "Estudio de nuevas tecnologías de conservación postcosecha para extender la vida útil de frutas finas: impacto sobre su calidad general y el aporte de compuestos bioactivos". Director: Franco Van de Velde.

Director del trabajo: Franco Van de Velde. Codirector del trabajo: Silvina Rosa Drago.

## **Material vegetal**

Se emplearon frutillas (*Fragaria ananassa* Duch. variedad 'Camarosa') y zarzamoras (*Rubus fruticosus* variedades 'Jumbo', 'Blacksatin' y 'Dirksen'), provenientes de Coronda (Santa Fe).

## **Análisis de fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y capacidad antioxidante (CA)**

Para el análisis de FT se utilizó el método de Singletón y Rossi (1965). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (AG)/g fruta seca (FS). El análisis de AT se realizó según el método de Heo y Lee (2005). Los resultados se expresaron como mg pelargonin-3-glucósido (frutillas) o cianindin-3-glucósido (zarzamoras)/g FS. La CA se analizó por el método de Brand-Williams y col. (1995). Los resultados se expresaron como mg de butilhidroxitolueno (BHT)/g FS.

## **Modelo gastrointestinal con fermentación colónica *in vitro***

Para simular las condiciones de las fases gástrica e intestinal del proceso digestivo se empleó el método de Drago y col. (2005). Para la etapa gástrica, se utilizó una solución de pepsina 16 % en HCl 0,1 N (pH 2) y se incubó por 2 h a 37 °C en baño con agitación. Para la etapa intestinal, se incorporaron membranas de diálisis (cut-off: 6-8 kDa) conteniendo una solución de NaHCO<sub>3</sub> que permite ajustar el pH a la neutralidad, simulando el pH del duodeno, y se incubó por 50 min. Posteriormente se agregó una solución de bilis-pancreatina en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 N (Bilis 1 %; Pancreatina 0,4 %) y se incubó por 2 h a 37 °C con agitación. Se prepararon blancos de digestión reemplazando el peso de muestra por agua, los cuales fueron sometidos al mismo proceso digestivo.

Para simular la etapa de fermentación colónica se empleó y modificó la metodología de Saura-Calixto y col., (2007). Se preparó un inóculo (100 g/L) a partir del contenido cecal de ratas macho 'Wistar' en caldo de cultivo para microorganismos anaerobios. Se agregaron membranas de diálisis (6-8 kDa) antes de comenzar la etapa fermentativa y se incubó en anaerobiosis por 24 h a 37 °C en baño con agitación. Se preparó un control positivo con rafinosa, hidrato de carbono totalmente fermentable.

## **Bioaccesibilidad intestinal y colónica y retención de CA**

La bioaccesibilidad intestinal (BI) y colónica (BC) se estimó como la fracción dializable de FT y AT en cada etapa, en relación al contenido total de fenoles o antocianinas de la muestra sin digerir. El porcentaje de retención de CA se estimó como la CA de los dializados intestinales (CA I) y colónicos (CA C), en relación a la CA de la muestra sin digerir.

## **Análisis estadístico**

Todos los análisis se realizaron por triplicado. La comparación de las medias se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA) usando el software STATGRAPHICS Centurion XV 15.2.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EE.UU.). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey al 5% de nivel de significación.

## RESULTADOS

Los contenidos totales de FT, AT y CA de las frutillas y zarzamoras sin digerir se muestran en la **Tabla 1**. El contenido de FT de las zarzamoras ‘Jumbo’ y ‘Black Satin’ no presentó diferencias estadísticamente significativas y fue 19% más alto al contenido registrado en las zarzamoras ‘Dirksen’. Las frutillas ‘Camarosa’ exhibieron un contenido de FT casi 70% menor al contenido hallado en las zarzamoras.

Atributo	Zarzamoras			Frutilla
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camarosa’
<b>FT</b> (mg AG/g FS)	36 ± 3 <sup>c</sup>	37 ± 2 <sup>c</sup>	30 ± 1 <sup>b</sup>	18 ± 2 <sup>a</sup>
<b>AT</b> (mg/g FS)	6.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>CA</b> (mg BHT/g FS)	30.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	29.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	29.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	17.9 ± 0.6 <sup>c</sup>

Letras distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 1:** Fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y capacidad antioxidante (CA) de las frutas analizadas.

El contenido de AT más alto se encontró en las zarzamoras ‘Jumbo’, siendo 12% mayor a aquel de las frutas ‘Dirksen’ y ‘Blacksatin’, cuyo contenido no fue significativamente diferente. Las frutillas mostraron un contenido de AT 69% menor al de las zarzamoras. Por su parte, la CA no mostró diferencias entre los tres cultivos de zarzamoras, siendo 40% mayor a la CA de las frutillas (**Tabla 1**).

La bioaccesibilidad (B) de FT de las zarzamoras y frutillas se muestra en la **Tabla 2**. De acuerdo a los resultados, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de BI para las tres variedades de zarzamoras estudiadas. Sin embargo, las frutillas presentaron una pequeña pero significativa mayor BI a este nivel de absorción.

	Zarzamoras			Frutilla
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camarosa’
<b>% BI</b>	10 ± 2 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>	16 ± 2 <sup>a</sup>
<b>% BC</b>	44 ± 6 <sup>b</sup>	61 ± 7 <sup>c</sup>	48 ± 6 <sup>b</sup>	32 ± 4 <sup>a</sup>
<b>% B Total</b>	53 ± 3 <sup>b</sup>	73 ± 7 <sup>b</sup>	58 ± 4 <sup>b</sup>	48 ± 3 <sup>a</sup>

BI: bioaccesibilidad intestinal, BC: bioaccesibilidad colónica. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 2:** Bioaccesibilidad de fenoles totales (FT) en las frutas estudiadas

Por su parte, la BC de FT resultó mayor para todas las frutas estudiadas en comparación con la BI (**Tabla 2**). Esto es debido a que las bacterias fermentativas del colon provocan la escisión, liberación y/o solubilización de nuevas especies fenólicas desde la matriz de la fruta digerida, lo cual incrementa la diálisis de estas especies hacia el interior de las membranas, lo que se traduciría como un aumento en su absorción. ‘Blacksatin’ exhibió el mayor valor de BC, siendo 25% mayor a los valores observados para ‘Dirksen’ y ‘Black Satin’ y más del 50% del valor hallado para las frutillas ‘Camarosa’. Estas diferencias pueden explicarse por la diferente naturaleza de los compuestos fenólicos y los distintos metabolitos producidos por la fermentación de las bacterias del colon con diferente capacidad de diálisis.

	Zarzamoras			Frutilla
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camarosa’
<b>% BI</b>	6.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	15.3 ± 0.8 <sup>c</sup>

% BC	7 ± 2 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>a</sup>	4 ± 1 <sup>a</sup>	16 ± 3 <sup>b</sup>
% B Total	13 ± 1 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	32 ± 4 <sup>b</sup>

BI: bioaccesibilidad intestinal, BC: bioaccesibilidad colónica. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 3:** Bioaccesibilidad de antocianinas totales (AT) en las frutas estudiadas

La B de AT de las zarzamoras y frutillas se muestra en la **Tabla 3**. Según los resultados, las frutillas exhibieron casi 50% más BI de antocianinas que la observada para las zarzamoras. También las frutillas presentaron mayor BC de AT, casi 70% mayor a la observada en las tres variedades de zarzamoras.

Los porcentajes de retención de CA de los dializados obtenidos con respecto a la CA de la fruta original se muestran en la **Tabla 4**. Los compuestos bioactivos que dializaron a nivel de intestino delgado (CA I) representaron el 10% de la CA original de las zarzamoras y el 6% de las frutillas. El porcentaje de retención de CA C fue más alto que el porcentaje de CA I, en concordancia con los mayores niveles de FT dializados. Las zarzamoras 'Blacksatin' y las frutillas 'Camarosa' mostraron los mayores valores de retención de CA C. En el caso de las frutillas, si bien la cantidad de FT dializados a nivel colónico fue menor en relación al de las zarzamoras, la mayor cantidad de AT dializadas de las frutillas, podría estar relacionada con esta mayor CA.

CA	Zarzamoras			Frutilla
	'Jumbo'	'Blacksatin'	'Dirksen'	'Camarosa'
% CA I	8.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	10 ± 0.8 <sup>b</sup>	9.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	6 ± 1 <sup>c</sup>
% CA C	60 ± 7 <sup>b</sup>	77 ± 9 <sup>c</sup>	42 ± 5 <sup>a</sup>	79 ± 2 <sup>c</sup>
% CA Total	68 ± 8 <sup>b</sup>	87 ± 5 <sup>c</sup>	52 ± 6 <sup>a</sup>	85 ± 8 <sup>c</sup>

BI: bioaccesibilidad intestinal, BC: bioaccesibilidad colónica. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 4:** Porcentaje de retención de CA de los dializados obtenidos en relación a la CA de las frutas sin digerir.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante el desarrollo de este método *in vitro* brindan una estimación novedosa de la bioaccesibilidad de los polifenoles y su capacidad antioxidante tanto a nivel de intestino delgado como colónico. La bioaccesibilidad total de los CF fue del 53-73% para las zarzamoras y del 48% para las frutillas.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.**, 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28, 25-30.

**Drago S.R., Binaghi M.J., Valencia, M.E.**, 2005. Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas. *J Sci Food*. 70 (2), 107-112.

**Hannum S.M.**, 2004. Potential impact of strawberries on human health: A review. *Crc Cr Rev Food Sci*. 44, 1- 17.

**Heo H.J, Lee C.Y**, 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induce apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem*, 53, 1984-1989.

**Saura-Calixto F., Serrano J., Goñi I.**, 2007. Intake and bioavailability of total polyphenols in a

whole diet. Food Chem. 101, 492–501

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

**Van de Velde F., Grace M.H., Esposito D., Pirovani, M.E. Lila, M.A.**, 2016. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. Food Comp Anal. 4, 82-91.

**You L., Zhao M., Regenstein J.M., Ren J.**, 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chem. 120, 810-16.