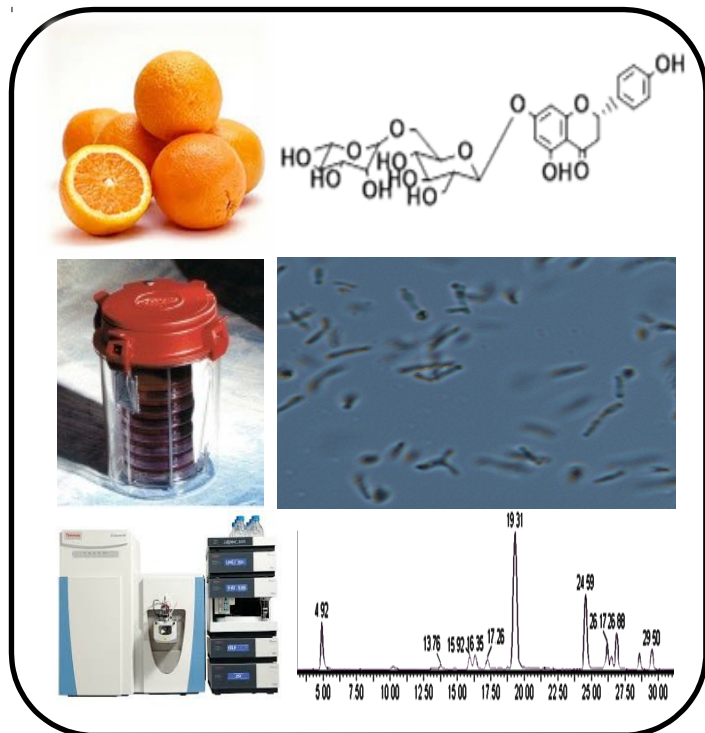


CAPACIDAD DE DOS BACTERIAS PROBIÓTICAS DE METABOLIZAR LOS ANTIOXIDANTES DE LA NARANJA

Andalucía
se mueve con Europa



1. Introducción.

3. Materiales y métodos

4. Resultados.

5. Conclusiones



Unión Europea Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional Fondo Social Europeo



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Capacidad de dos bacterias probióticas de metabolizar los antioxidantes de la naranja ./ [Fernández-Quirós, B.; Pradas-Baena, I; Moreno-Rojas, J.M.; Pereira-Caro, G.]. – Córdoba. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2015. 1-15 p. Formato digital (e-book) - (Tecnología Postcosecha e Industria Agroalimentaria)

Naranja, Antioxidantes, Flavononas, Incubación in vitro, Catabolismo bacteriano, Bifodobacteria longum, Lactobacillus rhamnosus



Este documento está bajo Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-No comercial-Sin obra derivada.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es>

Los autores agradecen la co-financiación del proyecto “Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos. Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional (AVA201301.7)” a IFAPA y los fondos europeos: FSE y FEDER. Gema Pereira Caro agradece a IFAPA y al FSE (Fondo Social Europeo) la financiación de su contrato de investigación.

Capacidad de dos bacterias probióticas de metabolizar los antioxidantes de la naranja

© Edita JUNTA DE ANDALUCÍA. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

Córdoba, Noviembre de 2015.

Autoría:

Begoña Fernández-Quirós ¹

Inmaculada Pradas Baena ¹

José Manuel Moreno-Rojas ¹

Victor Ortiz Somovilla¹

Gema Pereira-Caro ¹

¹ IFAPA, Centro Alameda del Obispo

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

1.- Introducción

Las naranjas y sus derivados, tales como zumos, son considerados unos de los alimentos más populares y apreciados por el consumidor ya que son productos muy nutritivos y con alto valor biológico, destacando por su cantidad de vitaminas y sales minerales, y siendo ricos en antioxidantes, lo que les confiere especiales propiedades beneficiosas para la salud.

Entre las sustancias antioxidantes de las naranjas caben destacar su composición en compuestos fenólicos, siendo las flavanonas, concretamente la hesperidina y la narirutina, los más abundantes.

Existen estudios que muestran los efectos positivos del consumo de naranjas o zumos sobre enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares y cáncer, propiedades fundamentalmente atribuidas al consumo de estos compuestos bioactivos.

No obstante, para que los compuestos fenólicos ejerzan su efecto protector, éstos deben ser absorbidos y asimilados por el organismo. Existen evidencias científicas que demuestran que la flora microbiana juega un papel importantísimo en la absorción y asimilación de los compuestos fenólicos, influyendo enormemente en los potenciales efectos beneficiosos atribuidos a estos compuestos.

Centrándonos en los antioxidantes de la naranja, hasta ahora se pensaba que se absorbían poco (alrededor del 5-10% de la cantidad ingerida). Nos obstante, estudios de intervención han mostrado que alrededor del 70% de los antioxidantes ingeridos alcanzan el colon en donde van a ser transformados por la acción de la microbiota del colon y metabolizados a otros compuestos de estructura química menos compleja, para que posteriormente sean absorbidos y pasen al torrente sanguíneo y siendo distribuidos por el organismo.

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

1.- Introducción

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos” que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso a la salud del hospedador. El éxito de estas sustancias se debe a los efectos positivos que desarrollan en la flora microbiana del tracto digestivo. Se utilizan como probiótico especies de bifidobacterias y lactobacilos, que se encuentran en el intestino humano, y aparecen en muchos productos alimenticios y suplementos dietéticos comerciales debido a que tienen diferentes efectos positivos para la salud (Figura 1).



Figura. 1. Efectos positivos del consumo de probióticos en salud

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

1.- Introducción

Recientemente se ha publicado un estudio de intervención en voluntarios sanos que demuestra que la ingesta prolongada durante cuatro semanas de un gramo de un probiótico microencapsulado (*Bifidobacterium longum*) mejora la absorción y la metabolización de los antioxidantes del zumo de naranja, y por tanto, sus potenciales efectos beneficiosos en salud ¹. Concretamente se ha observado un aumento significativo en la excreción en orina de los metabolitos procedentes de los antioxidantes del zumo.

No obstante, no está claro el mecanismo a través del cual esta bacteria *B. longum* influye en el aumento de la absorción, ya que ni el perfil de bacterias en las heces, ni la textura, pH ni los niveles de ácidos grasos de cadena corta de éstas difieren tras la ingesta de este probiótico. Por ello, en esta investigación se planteó el estudio in vitro de la capacidad de dos bacterias probióticas (*Bifidobacteria longum* y *Lactobacillus rhamnosus*), bacterias comúnmente presentes en el tracto intestinal y que adicionalmente son empleadas como suplementos alimentarios, de transformar o metabolizar los compuestos fenólicos mayoritarios de la naranja, concretamente la narirutina, hesperidina, naringenina y hesperetina, a otros compuestos los cuales van a ser los responsables de los efectos beneficiosos atribuidos al consumo de esta fruta o de sus zumos, y por tanto, para dar respuesta a los resultados obtenidos en el estudio in vivo.

¹ Pereira-Caro, G., Oliver, C.M., Weerakkody, R., Singh, T., Conlon, M., Borges, G., Sanguansri, L., Lockett, T., Roberts, S.A., Crozier, A., Augustin, M.A. **Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans.** Free Radical Biology and Medicine, 2015, 84, 206-214.

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

2.- Material y Métodos

En este trabajo las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* fueron mantenidas a 37°C en condiciones de anaerobiosis en caldo de cultivo adecuado para su crecimiento (Man, Rogosa y Sharpe, MRS) suplementadas con un 4% de glucosa.

Para llevar a cabo las incubaciones de estas bacterias con los antioxidantes de la naranja (narirutina, hesperedina, naringenina y hesperitina), las bacterias, a una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonias (valor de la absorbancia con una densidad óptica (OD) a 0,3) se pusieron en contacto con una concentración de antioxidantes conocida (ver Tabla 1) durante 48 h a 37 °C en atmósfera anaerobia. De las distintas incubaciones se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 36 y 48 h y se analizaron mediante cromatografía de líquidos acoplada a un espectrofotómetro de masas con el fin de identificar y cuantificar los productos de transformación. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. De forma resumida, el procedimiento seguido en la incubación de bacterias con los antioxidantes se indica las Figuras 2 a 5.

Compuesto	Cantidad total en nanomoles (nmoles)
Narirutina	430 ± 20
Hesperedina	410 ± 20
Naringenina	920 ± 20
Hesperitina	820 ± 14

Tabla 1. Cantidad total de antioxidantes (narirutina, hesperedina, naringenina y hesperetina) puesta en contacto con las bacterias y expresada en nanomoles.

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

2.- Material y Métodos

Inoculación de *L. rhamnosus* o *B. longum* en medio MRS a 37°

Normalización del Cultivo a OD de 0,3 a 620nm mediante dilución en medio MRS

Placas de petri con solución diluida bacteriana y flavononas

Tomar una alícuota de la placa en intervalos de tiempo entre 0 y 48h, se centrifuga y el sobrenadante se pasa a un vial y se guarda a -80°C

Análisis en HPLC-HR-MS



Figura 3. Incubador de bacterias anaerobio



Figura 4. Incubador de bacterias con placas petri.



Figura 5. Cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrofotómetro de masas.

Figura. 2. Procedimiento seguido en la incubación de bacterias con los antioxidantes

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

3.- Resultados

3.1 Transformación de los antioxidantes hesperetina y naringenina por las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*

La Tabla 2 muestra la cantidad de compuesto sin transformar así como la cantidad de productos de transformación producidos tras la incubación de ambas bacterias con los antioxidantes de la naranja a distintos tiempos de incubación. Según los resultados obtenidos, ambas bacterias son capaces de transformar o metabolizar los antioxidantes naringenina y hesperetina a otros compuestos bioactivos. A partir de estos resultados podemos establecer la ruta de transformación sufrida por los antioxidantes a partir del compuesto inicial.

Tabla 2. Contenido en los diferentes metabolitos derivados de la hesperitina y la naringenina tras su exposición a ambas bacterias, al inicio, a las 24, 36 y 48 horas. Los resultados están expresados en nanomoles \pm la desviación estándar (n=3).

Compuestos	Compuesto sin transformar y sus metabolitos	0 h	24 h	36 h	48 h
<i>Bifidobacterium longum</i>					
Hesperitina	Hesperetina	820 \pm 14	740 \pm 10	610 \pm 10	510 \pm 10
	Ácido 3-(3'-Hidroxifenil)propiónico	0	2.0 \pm 0.3	6.0 \pm 0.1	4.0 \pm 0.3
	Ácido 3-(3',4'-Dihidroxifenil)propiónico	0	15 \pm 1	29 \pm 1	39 \pm 3
	Ácido 3-(3'-Hidroxifenil)propiónico	0	35 \pm 3	91 \pm 2	184 \pm 8
	Ácido 3-(Fenil)propiónico	0	13 \pm 11	63 \pm 9	81 \pm 5
Naringenina	Naringenina	920 \pm 20	860 \pm 60	770 \pm 40	690 \pm 50
	Ácido 3-(4'-Hidroxifenil)propiónico	0	11 \pm 1	94 \pm 3	112 \pm 5
	3-(Fenil)propiónico	0	3 \pm 1	45 \pm 1	10 \pm 1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>					
Hesperitina	Hesperetina	820 \pm 10	810 \pm 10	700 \pm 10	590 \pm 50
	Ácido 3-(3'-Hidroxifenil)propiónico	0	0	0	0
	Ácido 3-(3',4'-Dihidroxifenil)propiónico	0	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2
	Ácido 3-(3'-Hidroxifenil)propiónico	0	0	66 \pm 5	92 \pm 6
	Ácido 3-(Fenil)propiónico	0	0	34 \pm 14	74 \pm 10
Naringenina	Naringenina	920 \pm 20	640 \pm 30	600 \pm 10	610 \pm 60
	Ácido 3-(4'-Hidroxifenil)propiónico	0	93 \pm 1	80 \pm 2	84 \pm 2
	3-(Fenil)propiónico	0	35 \pm 5	43 \pm 4	67 \pm 8

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

3.- Resultados

3.2 Transformación de los antioxidantes narirutina y hesperidina por las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*

En la Tabla 3 se muestra la cantidad de compuestos antioxidantes que quedan sin transformar y los productos formados tras la incubación de la narirutina y la hesperidina con las bacterias *L. rhamnosus*. Las bacterias *B. longum* fueron incapaces de transformar estos compuestos, por lo que no se indica en la Tabla 3. Asimismo, a partir de estos resultados podemos establecer la ruta de transformación sufrida por los antioxidantes a partir del compuesto inicial por estas bacterias.

Compuestos	Compuesto sin transformar y sus metabolitos	0h	24 h	36 h	48 h
Hesperidina	Hesperidina	410 ± 20	300 ± 10	290 ± 10	290 ± 10
	Hesperetina	0	35 ± 5	37 ± 2	19 ± 4
	Ácido 3-(3',4'-Dihidroxifenil)propiónico	0	3.7 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.7 ± 0.2
	Ácido 3-(3'-Hidroxifenil)propiónico	0	63 ± 12	77 ± 4	88 ± 12
	Ácido 3-(Fenil)propiónico	0	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.3
Narirutina	Narirutina	430 ± 20	360 ± 60	350 ± 30	280 ± 30
	Naringenina	0	13 ± 2	14 ± 2	20 ± 2
	Ácido 3-(4'Hidroxifenil)propiónico	0	45 ± 6	63 ± 14	103 ± 9
	Ácido 3-(Fenil)propiónico	0	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1

Tabla 3. Contenido en los diferentes metabolitos derivados de la hesperidina y la narirutina tras su exposición a *Lactobacillus rhamnosus*, al inicio, a las 24, 36 y 48 horas. Los resultados están expresados en nanomoles ± la desviación estandar (n=3).

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

3.- Resultados

3.3. Rutas de transformación bacteriana propuesta para la hesperidina y hesperitina

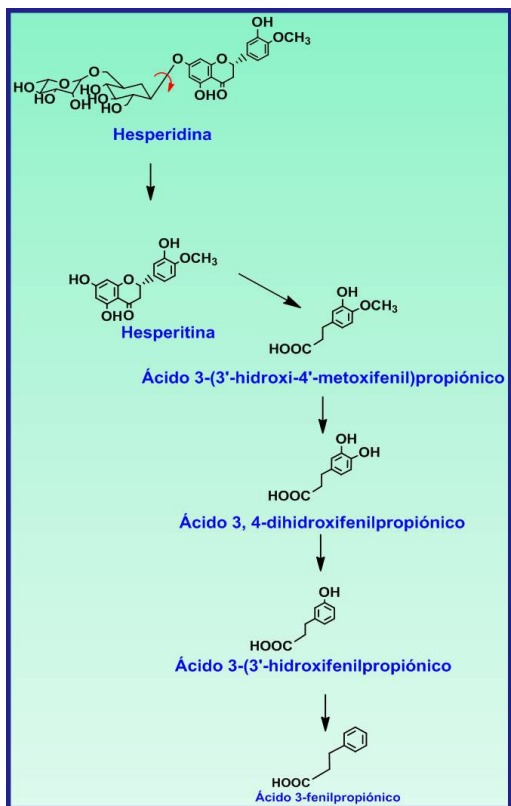


Figura 6. Ruta de transformación de la hesperidina y hesperitina por acción de las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-HR-MS) de las muestras permitió identificar los productos de transformación de la hesperetina y hesperidina en presencia de las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*.

En la Figura 6 se muestra la ruta de degradación propuesta para la hesperidina cuando este antioxidante, el cual es el que está en mayor concentración en la naranja, permanece en contacto con las bacterias objeto de este estudio.

Estos resultados indican que la hesperidina sufre una transformación a hesperitina, y ésta a su vez es transformada por acción de las bacterias mediante reacciones de demetilación y deshidrogenación dando lugar a distintos ácidos propiónicos, mostrados anteriormente en la Tabla 2 y 3.

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

3.- Resultados

3.4. Rutas de transformación bacteriana propuesta para la narirutina y naringenina

De igual forma, el análisis mediante HPLC-HR-MS de las muestras permitió identificar los productos de transformación de la narirutina y la naringenina procedentes de la incubación de estos antioxidantes con las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*.

La Figura 7 muestra la ruta de degradación propuesta para la narirutina y la naringenina en contacto con las bacterias ensayadas.

Estos resultados demuestran que la narirutina sufre una transformación a naringenina, que a su vez es transformada a otros compuestos por acción de las bacterias.

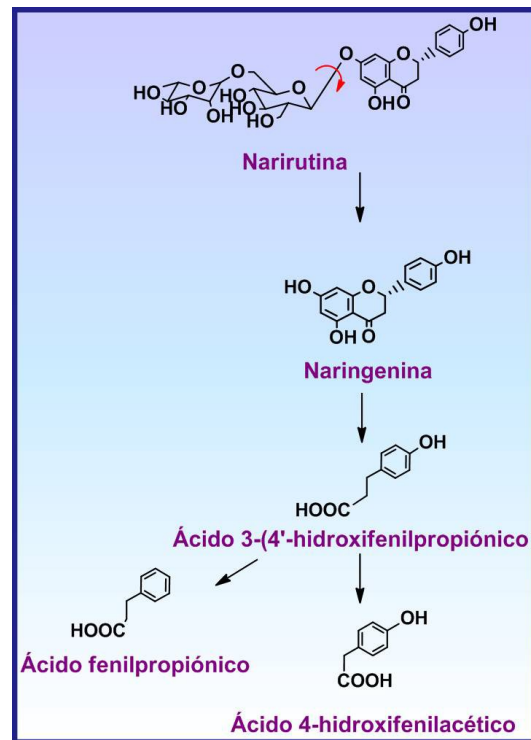


Figura 7. Ruta de transformación de la narirutina y naringenina por acción de las bacterias *L. rhamnosus* y *B. longum*

Capacidad de dos Bacterias Probióticas de Metabolizar los Antioxidantes de la Naranja

4.- Conclusiones

Este estudio demuestra la habilidad de las bacterias *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus* de transformar y metabolizar los compuestos antioxidantes de la naranja, bacterias las cuales estarían involucradas en la absorción y asimilación de los compuestos bioactivos de este fruto.

Esta investigación indica una mayor capacidad de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* en comparación con la cepa *Bifidobacterium longum* de transformar los antioxidantes de la naranja.

Estos resultados son de interés para la industria alimentaria ya que proponen a las cepas *B. longum* y *L. rhamnosus* como potenciales probióticos para la elaboración de alimentos funcionales o para suplementos alimentarios que mejoren las características nutricionales de las naranjas en relación a una mejor absorción de los compuestos fenólicos por el organismo.

CAPACIDAD DE DOS CEPAS PROBIÓTICAS DE METABOLIZAR LOS ANTIOXIDANTES DE LA NARANJA

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

Edificio BLUENET. Avda. Isaac Newton nº 3 Planta 2ª
Parque Científico y Tecnológico Cartuja `93
41092 Sevilla (Sevilla) España
Teléfonos: 954 994 593 / 954 994 666 Fax: 954 994 664
e-mail: webmaster.ifapa@juntadeandalucia.es

www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa



www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



Unión Europea
Fondo Social Europeo



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL