

Fermentación *in vitro* de la fracción indigestible de *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*, colectado en el noroeste de México.

L.G. Medrano-Ruiz^{1*}, L.A. Medina-Juárez¹, G. Bravo-Rivera², P. Osorio-Díaz², A. Fujita³, S. Simsek³, y M. Ovando-Martínez^{1*}.

1 Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), Hermosillo, Sonora, México. **2** Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN), Yauatepec, Morelos, México. **3** North Dakota State University, Fargo, ND, USA. *luisgmruiz@outlook.com y maribel.ovando@unison.mx

RESUMEN

Capsicum annuum L. var. *glabriusculum* (chiltepín) representa una fuente de compuestos bioactivos benéficos para el ser humano. Dentro de tales compuestos se encuentran los compuestos fenólicos, cuya bioaccesibilidad no es muy alta, debido a que algunos compuestos se encuentran embebidos en la fracción indigestible del fruto, afectando así su liberación y absorción, por tanto, estos llegan al colon para ser aprovechados por la microbiota durante la fermentación. Durante este proceso se producen ácidos grasos de cadena corta, y se liberan y metabolizan los compuestos fenólicos embebidos en la fracción indigestible del fruto. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue cuantificar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) e identificar los compuestos fenólicos obtenidos del proceso de fermentación colónica *in vitro* de chiltepín colectado en el estado de Sonora (Mazocahui Moctezuma, Nacori Chico y Taunitas). Las cuatro localidades de colecta presentaron un comportamiento similar ante el proceso de fermentación *in vitro*, respecto a la generación de AGCC. En cuanto a los compuestos fenólicos identificados, los chiltepinos de Taunitas y Moctezuma mostraron una liberación de compuestos fenólicos durante la fermentación. Por lo anterior este trabajo, podría ser una base para comparar como influyen las especies de *Capsicum* sobre la microbiota colónica.

Palabras clave: Chiltepín, fermentación, fracción indigestible

ABSTRACT

Capsicum annuum L. var. *glabriusculum* (chiltepín) represents a source of bioactive compounds beneficial for the human being. Among such compounds are the phenolic compounds, which bioaccessibility is not high, due that some compounds are embeded in the indigestible fraction of the fruit affecting its release and absorption, then reaching to the colon to be fermented by the microbiota. During this process short chain fatty acids (SCFA) are produced, as well as phenolic compounds are released from the indigestible fraction and metabolized. The aim of this work was to quantify SCFA and identify phenolic compounds obtained from the *in vitro* colonic fermentation of chiltepín collected from the Sonora state (Mazocahui, Moctezuma, Nacori Chico y Taunitas). All localities showed a similar trend during the *in vitro* colonic fermentation regarding to the SCFA production. Regarding to phenolic compounds chiltepin from Taunitas and Moctezuma showed a phenolic compound release during all the fermentation process. Therefore, this work could be the base to study how the *Capsicum* species have an influence on the colonic microbiota.

Keywords: Chiltepin, fermentation, indigestible fraction

Área: Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

El fruto *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (chiltepín) es una variedad de *Capsicum* que se encuentra distribuida desde México; a lo largo de la costa del pacífico, desde Sonora hasta Chiapas, siendo más común en el norte del territorio, hasta ciertas zonas de Centroamérica (Hayano-Kanashiro y col., 2016). El chiltepín al igual que otros frutos del género *Capsicum* es un alimento fuente de compuestos fenólicos, tanto complejos y simples. Los compuestos fenólicos se clasifican en compuestos flavonoides (caracterizados por una mayor complejidad estructural) y los no flavonoides (conformado por estructuras en su mayoría más simples) (Mercado-Mercado y col., 2013; Gutiérrez-Grijalva y col., 2016). La presencia del grupo fenol y grupos hidroxilo en dichos compuestos otorga propiedades biológicas a la molécula, como su ampliamente conocida actividad antioxidante (Gutiérrez-Grijalva y col., 2016), y el de facilitar una mayor interacción con la matriz alimentaria mediante uniones tipo covalente, éter y éster (Shahidi y Yeo, 2016). Estas interacciones evitan que estos compuestos fenólicos sean totalmente absorbidos durante el proceso de digestión, y que algunos queden embebidos en la fracción indigestible (FI) del fruto (Gutiérrez-Grijalva y col., 2016; Ovando-Martínez y col., 2018). La FI es aquella fracción que no es digerida ni absorbida en el intestino delgado, por tanto, está disponible para su fermentación en el intestino grueso (Saura-Calixto y col., 2000). Dicha fracción está conformada por celulosa, pectina y otros compuestos resistentes al proceso de digestión como compuestos fenólicos, proteínas y compuestos asociados (Holscher, 2017; Saura-Calixto y col., 2000). Los compuestos fenólicos embebidos en la FI pueden resultar benéficos, ya que son susceptibles a presentar actividad prebiótica y antioxidante a nivel colónico. Durante la fermentación, esta interacción puede actuar como metabolito para la microbiota colónica para formar AGCC, así como generar un ambiente antioxidante (Bindels y col., 2015), y una actividad regulatoria en el colon (Parker y col., 2013). Por lo tanto, se considera que el chiltepín es una fuente de compuestos fenólicos asociados a la FI, los cuales al llegar al colon se fermentan y forman metabolitos de interés que generen beneficios en el colon. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar el proceso de fermentación colónica *in vitro* de la FI total (FIT) de chiltepín, y determinar el contenido de AGCC, monitorear el pH, e identificar los compuestos fenólicos liberados en dicho proceso. En este trabajo se analizaron cuatro muestras de chiltepín rojo colectadas en el estado de Sonora (Mazocahui, Moctezuma, Nacori Chico y Taunitas). En general se observó que las muestras no presentaron diferencias significativas en el contenido de FIS, sin embargo, su comportamiento durante el proceso de fermentación mostro una disminución de pH, relacionada con la fermentación de la FIS y la producción de AGCC. En cuanto a estos últimos, se observó que en general el ácido acético se generó de manera principal, y valores equivalentes entre los ácidos butírico y propiónico. Respecto a los compuestos fenólicos durante la fermentación, se detectó la presencia de ácidos fenólicos simples y un compuesto flavonoide conjugado, los cuales podrían estar asociados a la FIT de las muestras del chiltepín.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. El fruto de chiltepín rojo se colecto en cuatro localidades del estado de Sonora: Mazocahui, Taunitas, Moctezuma y Nacori Chico. El fruto se secó a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Una vez seco, se almacenó a -20 °C hasta posteriores análisis.

Para obtener la FI total del fruto se realizó un proceso de digestión *in vitro*, siguiendo la metodología propuesta por Brodkorb y col. (2019). El método consistió en la simulación de las etapas de digestión estomacal e intestinal, con una ligera modificación, la cual consistió en simular un proceso de difusión pasiva mediante diálisis contra agua (absorción *in vitro*) (Ovando-Martínez y col., 2018). De dicho proceso de digestión se determinó la fracción FI soluble (FIS), insoluble (FII) y total (FIT), siguiendo la metodología de Saura-Calixto y col. (2000). Donde, la determinación de la FIS se realizó mediante una determinación de azúcares reductores por DNS (Englyst y Cummings, 1988), y la FII mediante un método gravimétrico. La FIT se determinó como la suma de la FII y FIS. El proceso de fermentación *in vitro* se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Flores-Silva y col. (2017). En dicho proceso de realizaron tomas de muestras durante los tiempos 0,2,4,6,8,12 y 24 h. En cada muestreo se determinó

el pH, AGCC (Martín-Carrón y Goñi, 1998; Menezes y col., 2010), y se extrajeron los compuestos fenólicos para su identificación.

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante una extracción líquido-líquido (Ovando-Martínez y col., 2018). Los extractos se disolvieron en metanol al 70% y se identificaron mediante espectrometría de masas (LC-QTOF-MS), utilizando un volumen de inyección de 10 µL. Para identificar el perfil de tales metabolitos se inyectaron los estándares de ácido 2-hidroxi-fenilacético, ácido gentísico, ácido protocateico, ácido 3,2-dihidroxifenilacético, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido sinápico, ácido fenilacético, quercitrina.

La determinación de FII, FIS, y FIT se realizó por triplicado, mientras que los análisis de fermentación *in vitro* se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA de una vía utilizando el programa estadístico JMP versión 11. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre medias se realizaron con una prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla I muestra el contenido de FII y FIS del fruto de chiltepín, resultante del proceso de digestión *in vitro*. Se observó que chiltepín de Mazocahui presentó el mayor contenido de FII, mientras que el chiltepín de Taunitas mostró el valor más bajo,

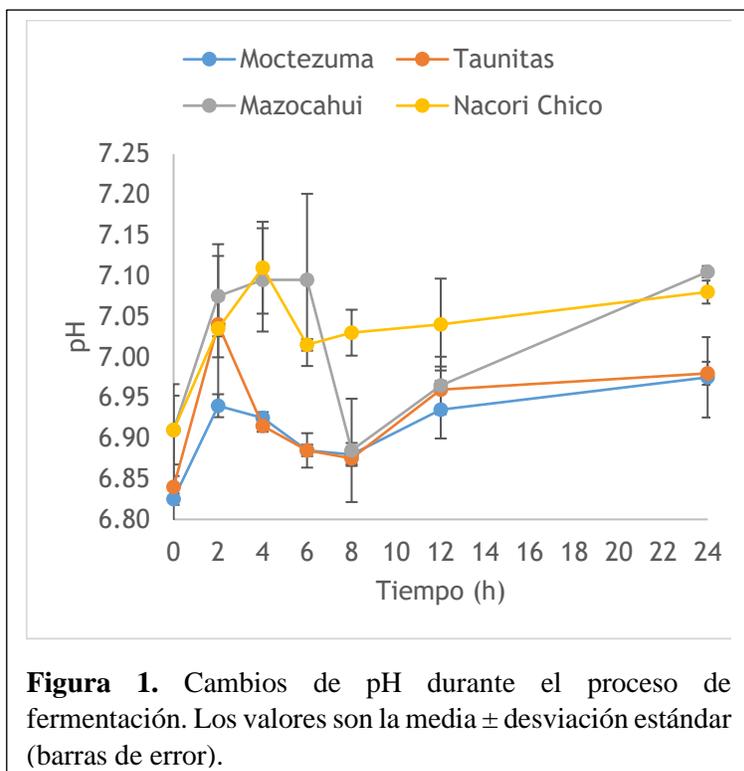
mostrando ambas localidades diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Respecto a la FIS, no se observaron diferencias significativas entre localidades ($p > 0.05$). Estos valores muestran que el fruto de

Tabla I. Contenido de fracción indigestible insoluble (FII), soluble (FIS).

Población	Fracción indigestible (g/100g)	
	FII	FIS
Mazocahui	77.86 ± 13.87 ^a	4.76 ± 2.05 ^a
Moctezuma	33.07 ± 6.43 ^b	6.47 ± 3.24 ^a
Nacori Chico	37.15 ± 13.27 ^b	4.64 ± 1.41 ^a
Taunitas	20.7 ± 1.25 ^b	4.48 ± 1.75 ^a

Media ± desviación estándar, Valores en cada columna con diferente subíndice (a-b) indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), Prueba de Tukey.

chiltepín tiene un alto contenido de FI, la cual llegará al colon, donde podrá mostrar un efecto prebiótico (Ovando-Martínez y col., 2018). Por un lado, el valor de FII en las muestras, se puede relacionar a que esta fracción tiene compuestos fenólicos asociados, que llegarán al colon y podrán ser metabolizados por la microbiota colónica (Shahidi y Yeo, 2016). Del otro lado, es importante considerar



que la FIS será la fracción principal en aportar substratos para la generación de AGCC, alimento para los colonocitos (Flores-Silva y col., 2017). Por tanto, ambas FII y FIS son importantes de considerar en chiltepín para tomar en cuenta a este fruto como un alimento funcional. Una vez determinadas la FII y FIS de las muestras de chiltepín, se aislaron ambas fracciones para posteriormente simular el proceso de fermentación colónica *in vitro*. Durante este proceso de fermentación, se obtuvieron muestras cada cierto tiempo, a las cuales se les midió el pH (Figura 1). Las mediciones de pH mostraron como durante el proceso de fermentación *in vitro*, la FIT es fermentada por la microbiota colónica, generando AGCC. Se observó que, a partir de las 2 h de fermentación, el pH disminuyó, lo cual está relacionado con la

generación de AGCC debido a la fermentación de la FIT. Es importante mencionar, que en este proceso se pueden liberar compuestos que lleguen a influir tanto en el valor de pH como en la composición de la misma microbiota colónica (Holscher, 2017). Para corroborar la fermentación de la FIT de las muestras de chiltepín, se determinó la concentración de AGCC como acético, propiónico y butírico (Tabla II). Los resultados mostraron un incremento gradual respecto al tiempo de fermentación, en la concentración de los ácidos grasos acético, butírico y propiónico. Para confirmar la liberación de compuestos fenólicos asociados a la FI durante el proceso de fermentación *in vitro*, se llevó a cabo la identificación de estos mediante HPLC-QTOF. Los compuestos fenólicos predominantes identificados durante el proceso de fermentación en la mayoría de las muestras fueron el ácido 3,2-dihidroxifenilacético, ácido protocateico, ácido sinápico, el ácido siríngico y la quercitrina. Es importante recalcar que la población de Taunitas mostró presencia del ácido 3,2-dihidroxifenilacético, así como del ácido protocateico y ácido sinápico durante las 24 hrs de estudio. Por otra parte, chiltepín colectado en la población de Moctezuma mostró la presencia de quercitrina en todo el proceso de fermentación. De los compuestos fenólicos detectados es importante reconocer que solo la quercitrina es un compuesto flavonoide conjugado, mientras que los demás compuestos identificados corresponden a los ácidos fenólicos. La presencia de estos ácidos indica que estos son liberados de la FIS o son metabolitos resultantes de una fermentación fenólica. Con estos resultados se concluye que el chiltepín podría ser un alimento funcional, ya que proporciona carbohidratos fermentables capaces de generar AGCC, así como liberar compuestos fenólicos asociados, que una vez liberados en el colon pueden influir en una regulación de la microbiota. A su vez este trabajo puede ser base para analizar como otros compuestos fitoquímicos con menos énfasis de estudio (carbohidratos fermentables, compuestos fenolicos), presentes en las diferentes especies de *Capsicum*, influyen en la microbiota colónica. Esto permitiría promover al género *Capsicum* como alimento funcional.

Tabla II. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) generados durante el proceso de fermentación <i>in vitro</i>								
Localidad	Ácido graso	Tiempo (h)						
		0	2	4	6	8	12	24
Mazocahui	Acético	0 ^a	0 ^b	0.70 ^b	2.72 ^{b c}	4.09 ^b	38.53 ^a	10.43 ^a
	Butírico	0 ^a	0 ^b	0.41 ^{b c}	0.56 ^b	0.43 ^a	0.49 ^b	0.71 ^b
	Propiónico	0 ^a	0.23 ^a	0.78 ^a	1.48 ^{a b}	1.21 ^b	2.88 ^a	3.69 ^a
Moctezuma	Acético	1.7 ^a	0.1 ^a	2.1 ^a	3.6 ^{a b}	4.6 ^{a b}	5.3 ^b	5.1 ^b
	Butírico	0.4 ^a	0.5 ^{a b}	0.9 ^a	1.3 ^a	1.5 ^a	1.7 ^a	2.1 ^a
	Propiónico	1.7 ^a	0.1 ^a	0.9 ^a	1.2 ^b	2.2 ^a	2.2 ^a	3.7 ^a
Nacori chico	Acético	0 ^a	0 ^b	0.19 ^b	2.15 ^c	4.26 ^{a b}	4.87 ^b	5.87 ^b
	Butírico	0 ^a	0 ^b	0.39 ^c	0.55 ^b	1.40 ^a	1.11 ^{a b}	1.41 ^b
	Propiónico	0 ^a	0.17 ^a	0.71 ^a	1.55 ^a	0.98 ^b	2.72 ^a	3.19 ^a
Taunitas	Acético	3.86 ^a	0.53 ^a	1.04 ^{a b}	3.97 ^a	5.47 ^a	4.38 ^b	6.90 ^b
	Butírico	1.46 ^a	0.44 ^a	0.51 ^b	1.12 ^a	1.27 ^a	1.43 ^a	1.89 ^a
	Propiónico	1.06 ^a	0.20 ^a	0.57 ^a	1.63 ^a	2.25 ^a	2.53 ^a	3.85 ^a

Valores en cada columna con diferente subíndice (a-c), para cada ácido graso, indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), Prueba de Tukey. Valores reportados en $\mu\text{Mol/mL}$

BIBLIOGRAFÍA

- Hayano-Kanashiro C, Gamez-Meza N, Medina-Juarez LA. 2016. Wild pepper *Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic, diversity, genoma secuencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1.
- Mercado-Mercado G., Rosa Carrillo L D L., Wall-Medrano A., López Díaz J A., & Álvarez-Parrilla E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36-46.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., & Heredia, J. B. 2016. dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(2).
- Shahidi F, Yeo J. 2016. Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.
- Holscher H. 2017. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172-184.
- Saura-Calixto F, Garcia-Alonso A, Goni I, Bravo L. 2000. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: An alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.
- Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 303-310.
- Parkar SG, Trower TM, Stevenson DE. 2013. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12-19.
- Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, . . . Recio I. 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014.
- Englyst H.N., Cummings J.H. 1988. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J Association Off Analytical Chemists* 71(4), 808-814.

- Molina-Quijada D, Medina-Juárez L, González-Aguilar G, Robles-Sánchez R et al. 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *CyTA J Food* 8(1), 57-63.
- Flores-Silva PC, Bello-Pérez LA, Rodríguez-Ambríz SL, Osorio-Díaz P. 2017. *In vitro* colonic fermentation and glycemic response of high fiber gluten-free snacks in rats. *Journal of Functional Foods*, 28, 59-63.
- Martín-Carrón N, Goñi I. 1998. Prior exposure of cecal microflora to grape pomaces does not inhibit *in vitro* fermentation of pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1064-1070.
- Menezes EW, Dan MCT, Cardenette GHL, Goñi I, Bello-Pérez LA, Lajolo FM. 2010. *In vitro* colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(4), 379-385.
- Ovando-Martínez M, Gámez-Meza N, Molina-Domínguez CC, Hayano-Kanashiro, C, Medina-Juárez LA. 2018. Simulated gastrointestinal digestion, bioaccessibility and antioxidant capacity of polyphenols from red chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) grown in northwest Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 116-121.