



**ESTUDIO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE FLAVONOIDES POR CEPAS
NATIVAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA COLOMBIANA OBTENIDAS
MEDIANTE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE AISLAMIENTO**

GIULIANA CAROLINA DAZA GÓMEZ
0000266999

Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría Diseño y Gestión de Procesos
Modalidad Investigación
Énfasis Bioprocesos
Chía, Colombia
Año 2024

**ESTUDIO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE FLAVONOIDES EN CEPAS NATIVAS
COLOMBIANAS OBTENIDAS MEDIANTE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE AISLAMIENTO**

GIULIANA CAROLINA DAZA GÓMEZ
0000266999

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Maestra en Diseño y Gestión de Procesos

Tutores:

Dr. Alejandro Acosta González
Dra. Gina Paola Rodríguez Castaño

Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría Diseño y Gestión de Procesos
Modalidad Investigación
Énfasis Bioprocesos
Chía, Colombia
Año 2024

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: SIEMPRE EN CONTROL

Agradezco de todo corazón a mis tutores, el Dr. Alejandro Acosta Gonzáles y la Dra. Gina Paola del Carmen Rodríguez Castaño, inicialmente por la confianza, por permitirme trabajar y ser parte de este proyecto de este viaje increíble con la microbiota intestinal humana. Por su apoyo, orientación, sugerencias, palabras de aliento, y sobre todo paciencia. Así mismo, quiero agradecer a la Dr Natalia Conde Martínez con todo el corazón, por todo su apoyo y conocimiento brindado en el desarrollo de este proyecto, especialmente en la técnica de HPLC-PDA, su tiempo, dedicación, disposición y paciencia. A mis compañeros de laboratorio y de la maestría: Kim y Samuel que ahora son familia, Marcelo, Paula, Kath que siempre estuvieron para ayudarme y transmitirme tranquilidad en los momentos más complejos.

A la Universidad de la Sabana, por otorgarme una beca para realizar esta maestría. A Cris a Jorgito por toda su ayuda en el Biocentro, a los pasantes que siempre me ayudaron. AGROSAVIA por permitirme tomarme el tiempo de estudio requerido para este trabajo y permitirme hacer uso de los laboratorios donde realice varios de los experimentos de esta tesis. A mis compañeros de trabajo, por apoyarme siempre, a las operarias del laboratorio por tanta ayuda con el lavado de tubos. Andre, por abrirme las puertas de su casa siempre que lo necesite sin importar la hora de llegada. Pao, Liii, Adri, Fer, José y Gabriel gracias por sus conocimientos, sus consejos, pero sobre todo por el aguante. Salvador y Kevin, por siempre traerme y llevarme sin importar el día o la hora, entre otras muchas cosas. A mis amigos los firmes y resolvedores, por los abrazos y porque siempre creen en mí again again again again. Andres mi vaquero de confianza por recordarme que siempre puedo y las horas largas en nuestra sala de estudio de confianza. Cla por todas las subidas al cerro. Dis Dis por el Giu's Kingdom y todas las tildes. Cata y Franquis porque desde el colegio no dejan de apoyarme y estar.

A mi mamá y George, a mis hermanos: Jeka, Pam y José porque siempre me han alentado hacer lo que amo y nunca dudaron.

En el cielo a mis ángeles que siempre me acompañan mi tato, mi tita, mi papá y Kevin.

Gracias a todos por apoyarme y retenerme, pero sobre todo por creer en mí, sin ustedes nada de esto fuera posible

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	4
Índice de figuras	1
Índice de tablas	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
1 Introducción, estado del arte y justificación	5
1.1 Introducción.....	5
1.2 Marco conceptual	6
1.2.3 Polifenoles del cacao	10
1.2.4 Quercetina.....	10
1.2.4.1 Metabolismo de la quercetina.....	11
1.2.5 Bioactividad de los metabolitos derivados de la biotransformación de flavonoides por acción de la microbiota intestinal.....	12
1.2.6 Microorganismos degradadores de flavonoides de la microbiota intestinal humana	7
1.2.7 Fermentaciones fecales in vitro	8
1.2.8 Técnicas de caracterización de microorganismos aislados de heces fecales humanas ...	9
1.2.9 Consortios microbianos	11
• Clasificación consorcios microbianos.....	11
• Interacciones ecológicas	11
1.3 Descripción de problema – Estado del Arte – Pregunta de Investigación.....	12
1.4 Objetivos	14
2 Capítulo I: Evaluación estrategias de cultivo microorganismostransformadores de quercetina	15
2.1 Metodología	15
2.1.2 Enriquecimiento de microorganismos de la microbiota intestinal humana	15
2.1.3 Estrategias de aislamiento de microorganismos con potencial de biotransformación de quercetina	15
2.1.3.1 Estrategia I: cultivos en medios sólidos con quercetina	15
2.1.3.2 Estrategia II: Cultivos en medios líquidos con diferentes azúcares y quercetina.....	16
2.1.3.3 Estrategia III: Diluciones sucesivas en medio líquido 7N con quercetina.	16
2.1.3.3.1 Crecimiento en medios de cultivo sólido y estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina	17
2.1.3.3.2 Aislamiento de microorganismos en medio sólido.....	17
2.1.3.3.3 Confirmación de la biobiotransformación quercetina.....	17
2.1.3.4 Estrategia IV: cultivos en medio líquido 11 y 11 modificado	17
2.1.3.4.1 Crecimiento en medio de cultivo líquido 11 y 11M.....	17

2.1.3.4.2	Estudio preliminar visual de la biobiotransformación de quercetina	18
2.1.3.4.3	Purificación parcial de microorganismos en medio líquido 11, 11 modificado y estudio preliminar visual de la biobiotransformación de quercetina	18
2.1.3.4.4	Aislamiento de microorganismos mediante técnica Roll Tube y medio sólido.....	18
2.1.4	Estudio de la biobiotransformación visual de quercetina.	18
2.1.5	Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	19
2.1.5.1	Condiciones de cultivo para las cinéticas de crecimiento.....	19
2.1.5.2	Determinación cinética de crecimiento.....	19
2.1.5.2.2	Recuento UFC/mL	19
2.1.6	Identificación molecular de cepas con capacidad de biotransformación de quercetina..	20
2.1.6.1	Extracción de ADN genómico.....	20
2.1.6.2	Amplificación de ADNr 16S.....	20
2.1.6.3	Secuenciación de ADNr 16S	21
2.1	Resultados	22
2.1.2	Evaluación de estrategias de aislamiento de microorganismos de la microbiota intestinal humana con potencial de biotransformación de quercetina.....	22
2.1.2.1	Estrategia I: cultivos en medio sólido con quercetina	22
2.1.2.2	Estrategia II: cultivos en medios líquidos con diferentes azúcares y quercetina	24
2.1.2.3	Estrategia III: diluciones sucesivas en medio líquido 7N con quercetina.....	24
2.1.2.3.1	Crecimiento en medios de cultivo sólido y estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina	25
2.1.2.3.2	Aislamiento de microorganismos en medio sólido	26
2.1.2.3.3	Estudio de la biobiotransformación visual de quercetina	27
2.1.2.4	Estrategia IV: cultivos en medio líquido 11 y 11 modificado con quercetina	28
2.1.2.4.1	Crecimiento en medios de cultivo líquido 11 y 11M.....	28
2.1.2.4.2	Estudio preliminar visual de la biobiotransformación de quercetina	29
2.1.2.4.3	Purificación parcial de microorganismos en medio líquido 11 y 11 modificado	31
2.1.2.4.4	Aislamiento de microorganismos mediante técnica Roll Tube.	32
2.1.2.4.5	Estudio preliminar visual de la biobiotransformación de quercetina	33
2.1.3	Estudio de la biobiotransformación visual de quercetina	34
2.1.4	Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	36
2.1.5	Identificación Molecular	37
2.2	Discusión	38
2.3	Conclusiones	41
3	Capítulo 2: Diseño de un consorcio artificial de microorganismos con capacidad de biotransformación de flavonoides.	42
3.1	Metodología	42

3.1.1.1	Pruebas de actividad antagonismo	42
3.1.1.2	Pruebas de actividad antimicrobiana del extracto de cacao rico en polifenoles	42
3.1.2	Diseño de un consorcio artificial microbiano con capacidad de biotransformación de flavonoides.....	43
3.1.3	Fermentaciones <i>in vitro</i> del consorcio para la evaluación de biotransformación de quercetinay producción de metabolitos	44
3.1.4	Protocolo de extracción	45
3.1.5	Análisis HPLC-PDA y cuantificación de quercetina y metabolitos.....	45
3.2	Resultados	46
3.2.2	Actividad antimicrobiana del extracto de cacao rico en polifenoles.....	46
3.2.3	Análisis por HPLC-PDA para la cuantificación de quercetina y metabolitos producidos dela biotransformación de la quercetina.....	48
3.2.1.3	Evaluación de la capacidad transformadora del consorcio sobre los flavonoides presentes en el extracto ECRP	51
3.3	Discusión	51
3.4	Conclusiones	54
4	Perspectivas y Trabajos futuros.....	55
5	Referencias Bibliográficas.....	56
6.	ANEXOS	70

Índice de figuras

Figura 1-1 Estructura básica Estructura Básica de los flavonoides y su clasificación en subgrupos	3
Figura 1-2 Estructura química de la quercetina en sus formas aglicona, quercetina glicósido y rutinósido.	2
Figura 1-3 Vías metabólicas de biotransformación de quercetina en el intestino delgado y posteriormentepor acción de la microbiota intestinal humana.....	4
Figura 2-1 . Estrategias utilizadas para aislar bacterias anaerobias de la microbiota intestinal humana colombiana, con capacidad de transformar quercetina.	21
Figura 2-2 Fermentaciones <i>in vitro</i> de diferentes muestras en medio mínimo líquido anaerobio 7NQ. días	22
Figura 2-3 Cultivo sólido modificado técnica roll tube Hungate, 1969. En tres medios de cultivo: 11. Trypticase soya y MRS	23
Figura 2-4 Evaluación de la biotransformación de quercetina en medio liquido 11 quercetina. Cepa #1. Cepa #2.....	23
Figura 2-5 Evaluación de la biotransformación de quercetina en diferentes medios líquidos anaerobios conquercetina. I. Medio liquido 7NQ. II. Medio liquido 11 quercetina. III. Medio liquido azucares: fructosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa (10mM) con quercetina	24
Figura 2-6 Diluciones sucesivas entre 48 y 96 horas de 2 muestras fecales humanas en dos niveles de pH: 7.2 y 6.7	25
Figura 2-7 A. Enriquecimiento Medios sólidos 1/10 base 7NQ, en dos niveles de pH: 7.2 y 6.7 y Estudio preliminar de la biotransformación de quercetina a partir de colonias aisladas en medios solidos	27
Figura 2-8 Aislamiento Medio Sólido 1/10 BHI medio base 7NQ Halo de biotransformación	27
Figura 2-9 Primera verificación de biotransformación visual de quercetina a partir de 11 cepas aisladas con potencial de biotransformación de quercetina	28
Figura 2-10 verificación visual de biotransformación de quercetina de 11 cepas aisladas con potencial de biotransformación de quercetina.....	28
Figura 2-11 Muestras seleccionadas con capacidad de biotransformar quercetina en medio liquido anaerobio 7NQ.....	30
Figura 2-12 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina a partir de la segunda purificación en medio liquido 7NQ.....	31
Figura 2-13 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina a partir de la segunda purificación en medio liquido 7NQ.....	31
Figura 2-14 Aislamiento de microorganismos con potencial capacidad de transformar quercetina. Muestra G	32
Figura 2-15 Aislamiento de microorganismos con potencial capacidad de transformar quercetina. Muestra T	32
Figura 2-16 Laminas en fresco Microscopia de contraste (100X). Muestra T y G	33
Figura 2-17 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina en medio liquido 7NQ Muestra T y G.....	33
Figura 2-18 Cinéticas de crecimiento. Cepa A.....	36
Figura 2-19 Cinéticas de crecimiento. Cepa B.....	37
Figura 2-20 Electroforesis en gel de agarosa productos de amplificación para el gen ADNr 16s	38
Figura 3-1 Método difusión disco de agar para determinar actividad antagonismo entre <i>S. flexneri</i> y <i>E.</i> <i>citroniae</i>	46

Figura 3-2 Método difusión disco de agar para determinar actividad antagonismo entre y <i>E. citroniae</i> y <i>S. flexneri</i>	47
Figura 3-3 Método difusión en agar para determinar capacidad inhibitoria de las diferentes concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles frente a <i>E. citroniae</i>	47
Figura 3-4 Método difusión en agar para determinar capacidad inhibitoria de las diferentes concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles frente a <i>S. flexneri</i>	48
Figura 3-5 Curva de calibración para quercetina y metabolitos.	49
Figura 3-6 Cinética de biotransformación de quercetina en medio líquido anaerobio 7NQ. <i>S. flexneri</i> y <i>E. citroniae</i> . Cada punto corresponde a la media del dato y las barras de error \pm desviación estándar.	50

Índice de tablas

Tabla 1-1 Clasificación y representantes de los principales grupos de flavonoides.	1
Tabla 1-2 Estudios de bioactividad de los metabolitos de los flavonoides derivados de la microbiota intestinal humana.....	5
Tabla 1-3 Estudios de bioactividad de los metabolitos Bacterias asociadas al metabolismo de distintos flavonoides, aisladas de los tejidos del tracto digestivo o de las heces humanas.....	7
Tabla 1-4 Modelos de fermentación fecal más representativos.	8
Tabla 1-5 Técnicas de caracterización de microorganismos presentes en heces fecales humanas.	9
Tabla 1-6 clasificación tipo de consorcios microbianos.	10
Tabla 1-7 Interacciones ecológicas dentro de consorcios microbianos.	10
Tabla 2-1 Crecimiento de la microbiota intestinal humana en diferentes medios de cultivo sólido método de tubos Hungate modificado.	23
Tabla 2-2 Crecimiento de la microbiota intestinal humana muestra C y G con potencial de biotransformación de quercetina en diferentes medios de cultivos sólidos (1/10) * a diferente pH (7.2 y 6.7) y verificación visual de biotransformación de quercetina en medio 7NQ, a diferente pH (7.2 y 6.7)	25
Tabla 2-3 Determinación del crecimiento bacteriano de las muestras evaluadas: C, G, M y T, por turbidez en medio líquido 11 y 11M a pH 7.2 y 6.7.....	29
Tabla 2-4 Verificación visual de la biotransformación de quercetina. Diluciones en medio líquido anaerobio 7NQ de las muestras evaluadas: C, G, M y T	30
Tabla 2-5 Verificación visual de la biotransformación de quercetina de las cepas #6, #7, cepa A, cepa B medio líquido anaerobio 7NQ.....	34
Tabla 2-6 Comparación de las diferentes estrategias usadas en el aislamiento de bacterias de la microbiota intestinal humana con capacidad de transformar quercetina.	35
Tabla 3-1 Consorcio artificial preparado variando la proporción del inóculo inicial de las cepas <i>E. citroniae</i> y <i>S. flexneri</i>	44
Tabla 3-2 Curva de calibración para quercetina y metabolitos. Tiempo de retención. Ecuaciones lineales, y coeficiente de correlación de Pearson	49
Tabla 3-3 Concentraciones de metabolitos producidos por <i>S. flexneri</i> y <i>E. citroniae</i> individuales, y en consorcio con las diferentes proporciones iniciales de inóculo evaluadas	51

Resumen

Los flavonoides son compuestos polifenólicos producto del metabolismo secundario de las plantas. Se ha sugerido que su ingesta puede controlar algunos síndromes metabólicos como la diabetes y la obesidad, regular la hipertensión y tener un efecto contra el cáncer de colon. La quercetina es uno de los flavonoides más comunes en la naturaleza y de mayor consumo en la dieta humana, y es reconocida por presentar una amplia gama de actividades biológicas. Estos compuestos polifenólicos no se absorben adecuadamente en el intestino delgado, por eso, cantidades sustanciales se acumulan en el colon, donde la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en su biotransformación a compuestos fenólicos de bajo peso molecular, que pueden tener una bioactividad diferente y aumentar su biodisponibilidad respecto a los compuestos originales. Diferentes estudios en poblaciones de Estados Unidos, Europa y China han permitido identificar bacterias de la microbiota intestinal humana capaces de biotransformar distintos tipos de flavonoides. Sin embargo, el estudio de estos microorganismos en la microbiota intestinal colombiana es prácticamente inexistente. Este trabajo permitió aislar bacterias de la microbiota intestinal humana colombiana, proporcionando nueva información sobre las especies involucradas en el metabolismo de los flavonoides (quercetina, polifenoles presentes en un extracto de cacao rico en polifenoles), así como la capacidad de biotransformación de flavonoides por estas dos cepas individualmente y en consorcio. Los resultados mostraron que el uso de múltiples metodologías es necesario, ya que solo dos cepas, *Enterocloster citroniae* y *Shigella flexneri*, de siete aislamientos evaluados presentaron actividad de biotransformación de quercetina. Estas cepas aisladas no han sido reportadas previamente por su capacidad para transformar quercetina. Además, el estudio estableció que el consorcio microbiano artificial no es más efectivo en la biotransformación de flavonoides, como la quercetina, generando ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido protocatéquico y ácido benzoico, en comparación con la capacidad de las cepas individuales. Finalmente, esta investigación demostró la capacidad de estas dos cepas para transformar otros compuestos polifenólicos presentes en un extracto de cacao rico en polifenoles.

Abstract

Flavonoids are polyphenolic compounds resulting from the secondary metabolism of plants. Their consumption has been suggested to control certain metabolic syndromes such as diabetes and obesity, regulate hypertension, and exhibit anticancer effects on colon cancer. Quercetin, one of the most common flavonoids in nature and widely consumed in the human diet, is recognized for its diverse biological activities. These polyphenolic compounds are not adequately absorbed in the small intestine; hence, substantial amounts accumulate in the colon, where the intestinal microbiota plays a fundamental role in their biotransformation into low molecular weight phenolic compounds. These transformed compounds may have greater bioavailability and exhibit different bioactivities compared to the original compounds. While various studies in populations from the United States, Europe, and China have identified human intestinal microbiota bacteria capable of biotransforming different types of flavonoids, research on these microorganisms in the Colombian intestinal microbiota is practically nonexistent. This study aimed to isolate bacteria from the Colombian human intestinal microbiota, providing new insights into the species involved in flavonoid metabolism (quercetin and polyphenols present in a polyphenol-rich cocoa extract), as well as information on the transformation capacity of flavonoids by these two strains individually and in consortia. The results showed that the use of multiple methodologies is necessary, as only two strains, *Enterocloster citroniae*, and *Shigella flexneri*, out of seven evaluated isolates with quercetin biotransformation activity. These isolated strains have not been previously reported for their ability to transform quercetin. Additionally, the study established that the artificial microbial consortia is not more effective in flavonoid biotransformation, such as quercetin, generating 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), protocatechuic acid, and benzoic acid, when compared to the capacity of individual strains. Furthermore, this investigation demonstrated the ability of these two strains to transform other polyphenolic compounds present in a polyphenol-rich cocoa extract.

1 Introducción, estado del arte y justificación

1.1 Introducción

La microbiota intestinal humana consiste en una compleja comunidad de microorganismos que reside en el intestino e incluye un amplio espectro de especies de bacterias, que influyen en la fisiología y metabolismo del huésped mediante diferentes procesos como la activación y mantenimiento del sistema inmunitario, colonización frente a patógenos y la metabolización de carbohidratos no fermentables (fibra dietaria) (Braune & Blaut, 2016; Etxeberria et al., 2013; Mithul Aravind et al., 20219). La fibra dietaria adsorbe compuestos dietéticos como los flavonoides, grupo de compuestos polifenólicos bioactivos presentes en una gran variedad de alimentos de origen vegetal (Braune & Blaut, 2016; Riva et al., 2020), estos metabolitos secundarios se biosintetizan por las vías del acetato/malonato, y se almacenan como glucósidos en diferentes partes de las plantas como las raíces, los tallos, las hojas, las flores y la pulpa (Shabbir et al., 2021). Los compuestos polifenólicos incluyen alrededor de 8000 moléculas, las cuales se producen del benceno con uno o más grupos hidroxilos asociados al anillo fenólico (Cianciosi et al., 2022). Su clasificación se basa principalmente en las diferencias de la estructura del anillo fenólico C, clasificándose sistemáticamente en subgrupos que incluyen flavonoles, isoflavonas, flavonas, flavanonas, chalconas, antocianinas (Feng et al., 2018) y Flavanoles (Abreu Y Abreu et al., 2021).

Por otro lado, la quercetina 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi cromina-4-ona (D'Andrea, 2015), es uno de los flavonoides más abundantes en la naturaleza y en el consumo humano, encontrándose principalmente en el té verde, la lechuga, los arándanos, las manzanas, la cebolla, el cilantro y en el apio (Sankaranarayanan et al., 2021), y es reconocida por presentar una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se resaltan la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antiobesidad y antidepressiva, además de presentar actividad contra el cáncer de colon, la diabetes, el asma, la hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Fukushima et al., 2002; Sato & Mukai, 2020; Shabbir et al., 2021).

Se ha demostrado en diferentes estudios preclínicos, tanto de intervención como epidemiológicos, que los compuestos polifenólicos presentan diferentes bioactividades que son responsables de numerosos efectos sobre la salud humana (Ozdal et al., 2016) ayudando a prevenir algunas enfermedades crónicas (Mithul Aravind et al., 2021). Así mismo, se ha establecido que las propiedades funcionales de estos compuestos polifenólicos dependen en gran medida de su biodisponibilidad y bioaccesibilidad en el sistema digestivo (Chait et al., 2020), donde los estudios farmacocinéticos han demostrado que la biodisponibilidad es baja (Feng et al., 2018). Como consecuencia, la gran mayoría de estos compuestos llegan al colon, donde son liberados de la matriz alimentaria y biotransformados por acción de la microbiota intestinal, generando metabolitos, que en algunos casos han demostrado ser más activos biológicamente que sus precursores (L. Zhang et al., 2023).

Recientemente, se han realizado varios estudios que han permitido identificar bacterias de la microbiota intestinal humana capaces de biotransformar distintos tipos de flavonoides, lo cual no solo amplía la comprensión sobre la interacción bidireccional entre estas bacterias y los polifenoles, sino que también abre nuevas perspectivas para explorar su potencial generando impacto beneficioso en la salud humana. (Pede et al., 2020; Racova et al., 2020; Riva et al., 2020; Rodríguez-Castaño et al., 2019; Sankaranarayanan et al., 2021; Z. Zhang et al., 2014). Por ejemplo, una investigación realizada por Kwon et al., (2018) permitió demostrar que cepas bacterianas aisladas de muestras fecales humanas,

pertenecientes a los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*, tienen la capacidad de transformar isoflavonas, generando distintos metabolitos como dihidrodiadzeína y equol. Por su parte, Braune et al., (2001) expusieron la capacidad de *Eubacterium ramulus*, aislado de una muestra fecal humana, de producir ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) durante incubación fecal in vitro con quercetina. Los estudios citados anteriormente, se han realizado en poblaciones de Estados Unidos, Europa y China. Sin embargo, en Colombia aún no se conocen estudios sobre microorganismos transformadores de flavonoides. Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue caracterizar la capacidad de metabolización de flavonoides por parte de comunidades artificiales biotransformadoras, aisladas de la microbiota intestinal humana colombiana.

1.2 Marco conceptual

1.2.1 Microbiota intestinal humana

La microbiota intestinal humana es un ecosistema heterogéneo y complejo formado por diversos microorganismos, como bacterias, hongos, levaduras y virus, que comprende alrededor de 3,3 millones de genes (Woźniak et al., 2021). Los filos dominantes que habitan el intestino humano son los Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias, Proteobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia, siendo los Firmicutes y Bacteroidetes el 90% de la microbiota humana (Arumugam et al., 2011; Rinninella et al., 2019). El filo Firmicutes está compuesto por más de 200 géneros diferentes, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* y *Ruminococcus*. Los Bacteroidetes están formados por géneros predominantes como *Bacteroides* y *Prevotella*. El filo Actinobacteria es proporcionalmente menos abundante y está representado principalmente por el género *Bifidobacterium* (Arumugam et al., 2011). Se estima que la microbiota humana se compone de aproximadamente 10^{13} - 10^{14} células microbianas, con una relación de aproximadamente 1:1 entre células microbianas y células humanas. Estas cifras se derivan del total de células bacterianas en el colon ($3,8 \times 10^{13}$ bacterias), el órgano en el que se encuentra el mayor número de microorganismos (Sender et al., 2016). Como se describió anteriormente, la composición microbiana intestinal incluye un amplio espectro de especies de bacterias altamente activas (Mithul Aravind et al., 2021), las cuales interactúan con los sistemas del huésped cumpliendo importantes funciones como la preparación y la formación del sistema inmunitario (Ashaolu, 2020), la resistencia a la colonización de patógenos y la fermentación de carbohidratos no digeribles, como la fibra dietaria (Braune & Blaut, 2016).

1.2.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos bioactivos presentes en una gran variedad de alimentos de origen vegetal, como verduras y frutas, además de encontrarse en bebidas como el té, el vino, el café (Braune & Blaut, 2016; Ma & Chen, 2020a; Riva et al., 2020). En la actualidad, se han descrito más de 8.000 flavonoides diferentes (Braune & Blaut, 2016; Cianciosi et al., 2022; Feng et al., 2018) (Braune & Blaut, 2016; Cianciosi et al., 2022; Feng et al., 2018), los cuales se biosintetizan a partir del metabolismo secundario de las plantas (Chiu et al., 2021; Cianciosi et al., 2022), por las vías del acetato/malonato, almacenándose como glucósidos en las raíces, los tallos, las hojas, las flores y la pulpa de las plantas (Shabbir et al., 2021). Los estudios sugieren que la ingestión de polifenoles vegetales puede ser útil para mejorar algunos síndromes metabólicos que pueden contribuir a la prevención de varios trastornos crónicos como la diabetes, la obesidad, la hipertensión, el cáncer de

colon (Shabbir et al., 2021), enfermedades cardíacas, infecciones virales, úlcera estomacal y duodenal e inflamación, y otras actividades biológicas, en las que se resaltan la actividad antioxidante, antibacteriana, hepatoprotectora y actividad anticancerígena (Kumar et al., 2013).

Estos compuestos polifenólicos están formados por dos anillos fenólicos, el anillo A y el anillo B, conectados por una unidad de tres carbonos que, junto con un átomo de oxígeno, forman el anillo heterocíclico C (Cianciosi et al., 2022; Keranmu et al., 2022; Vazhappilly et al., 2021). Basándose en las diferencias de la estructura del anillo C al que se une el anillo B, y en función del grado de oxidación e instauración del anillo C, se clasifican sistemáticamente en siete subgrupos, flavanoles, isoflavonas, flavonas, flavanonas, chalconas, antocianinas y flavanoles (Cianciosi et al., 2022; Feng et al., 2018; Martin & Ramos, 2021), como se muestra en la Figura 1-1 Sus características generales y representantes principales se describen en la Tabla 1-1

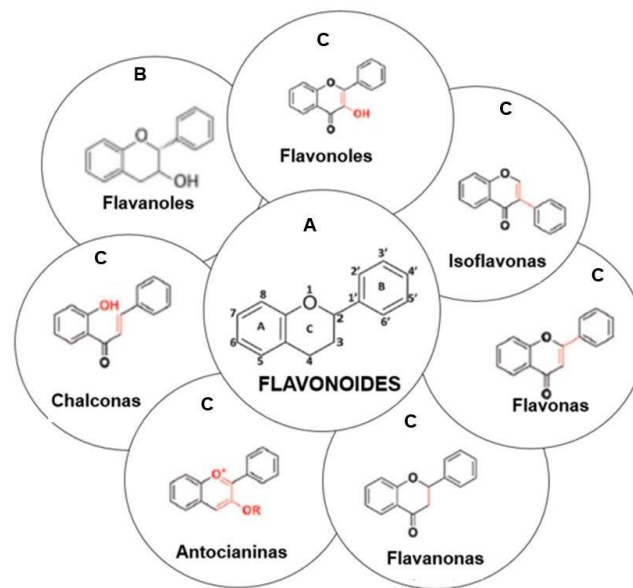
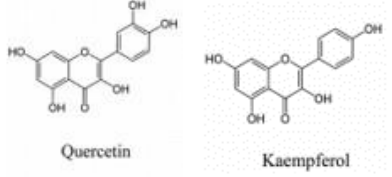
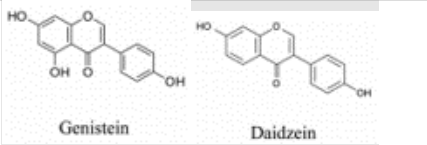
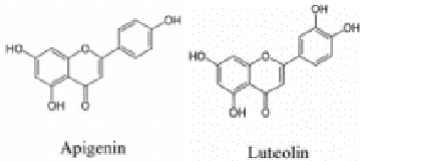
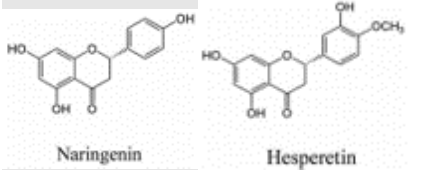


Figura 1-1 Estructura básica Estructura Básica de los flavonoides y su clasificación en subgrupos

Fuente: adaptado de Cianciosi et al., (2022). A.(Vazhappilly et al., 2021). B.(Martin & Ramos, 2021). C. (Feng et al., 2018)

Estos polifenoles se encuentran en gran variedad de alimentos incluyendo especias y bebidas, entre los que se destacan el licopeno, que se encuentra predominantemente en los tomates, el té verde (*Camellia sinensis*) el cual contiene catequinas como la EGCG (galato de epigalocatequina), el principal polifenol del té verde (representa más del 50% del total de polifenoles), isoflavonas de la soja (*Glycine max*), la quercetina, la genisteína, la cúrcuma (*Curcuma longa*), sulforafano, 3,3'-diindolilmetano e indol-3-carbinol del brócoli (*Brassica oleracea*), la piel de la uva o del centinodia japonés (*Polygonum cuspidatum*), extracto de granada (*Punica granatum*) (POMx), silimarina (cardo mariano, *Silybum marianum*) y varios tipos de setas (*reishi*; *Ganoderma lucidum*, cola de pavo; *Coriolus/Trametes*, shiitake; *Lentinula edodes*) (Diaz-Gerevini et al., 2016; Nam et al., 2016; Venigalla et al., 2016), así como en el cacao y sus derivados (polvo de cacao, licor de cacao y chocolates) que son reconocidos por sus compuestos polifenólicos, los cuales poseen diferentes niveles de potencial antioxidante (Cádiz-Gurrea et al., 2014; Lee et al., 2003).

Tabla 1-1 Clasificación y representantes de los principales grupos de flavonoides.

	DESCRIPCIÓN	PRINCIPALES REPRESENTANTES
Flavonoles	Se caracterizan por tener un grupo cetónico y ser muy diversos, debido a la metilación, la hidroxilación y los diferentes patrones de glicosilación, formando el subgrupo más común y grande de los flavonoides (Verma et al., 2019). Están presentes en abundancia en una amplia gama de frutas como cerezas, bayas, uvas, manzanas, mango y plátano (Georgiev et al., 2014; Gündüz, 2015; Hollands et al., 2017; Pan et al., 2018; Passo Tsamo et al., 2015; Pierson et al., 2014) y en verduras como el brócoli, los tomates, las cebollas (Albishi et al., 2013; Kwak et al., 2017; Neugart et al., 2018; Silva-Beltrán et al., 2015) (Albishi et al., 2013; Kwak et al., 2017; Neugart et al., 2018; Silva-Beltrán et al., 2015)	 <p>Quercetin Kaempferol</p>
Isoflavonas	son producidas principalmente por los miembros de la familia <i>Fabaceae</i> (<i>Leguminosae</i>) y se encuentran en la soja y otras plantas leguminosas. La genistina, la diadzina y la glicetina son conjugados glucósidos de las isoflavonas y sus formas agliconas son la genisteína, la diadzeína y la glicetina (He & Chen, 2013).	 <p>Genistein Daidzein</p>
Flavonas	En sus formas nativas, se encuentran como 7-O-glicósidos y también pueden tener restos de acetilo o malonilo; son objeto de un interés creciente debido a sus actividades biológicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Hostetler et al., 2017). Los glucósidos C de las flavonas se detectan más comúnmente como glucósidos 6-C y 8-C. Se diferencian de otros flavonoides en que tienen un doble enlace entre C2 y C3 en el esqueleto del flavonoide, no hay sustitución en la posición C3 y están oxidados en la posición C4 (Martens & Mithöfer, 2005). Se encuentran en una gran variedad de frutas, verduras y bebidas como el kiwi, la espinaca, perejil, apio, alcachofa y aceitunas negras entre otras (Bhagwat et al., 2013)	 <p>Apigenin Luteolin</p>
Flavanonas	También conocidas como dihidroflavonas, hesperetina, naringenina, eriodictiol. Sus respectivos glucósidos son las principales flavanonas que se encuentran en las especies vegetales (Verma et al., 2019) (Verma et al., 2019). Están presentes en los cítricos, como las naranjas, los limones, los pomelos, las uvas, los tomates (Lü et al., 2016; Ninomiya & Koketsu, 2013; Russo et al., 2014). La hesperetina y la naringenina se encuentran principalmente en los cítricos (Patel et al., 2018). La hesperetina y sus derivados son flavanonas características de la naranja dulce, el tangelo, el limón y la lima, mientras que la naringina está presente en los pomelos y las naranjas, la neohesperidina en las naranjas ácidas (Khan et al., 2014). Estos compuestos son los responsables del sabor amargo del zumo y la piel de los cítricos (Verma et al., 2019).	 <p>Naringenin Hesperetin</p>

Fuente: (Kamiloglu et al., 2020)(Kamiloglu et al., 2020))

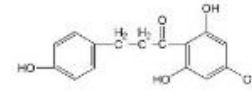
Fuente: (Kamiloglu et al., 2020) (Guzmán-Ortiz et al., 2017; Lazo-Vélez et al., 2018)

Fuente: (Kamiloglu et al., 2020) (Guzmán-Ortiz et al., 2017; Lazo-Vélez et al., 2018)

Fuente: (Kamiloglu et al., 2020)

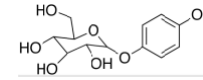
Chalcoonas

Las chalcoonas son 1,3-difenil-2-propeno-1-ona en las que dos anillos aromáticos están unidos por un sistema carbonilo insaturado de tres carbonos. Esta subclase de flavonoides se caracteriza por la ausencia del "anillo C" en la estructura básica del esqueleto del flavonoide, por lo que se denominan flavonoides de cadena abierta (Verma et al., 2019). Algunos ejemplos de chalcoonas son la floretina, arbutina, equinatina, licocalcón A, y liquiritigenina, se encuentran en cantidades significativas en tomates, peras, manzanas y fresas principalmente (Han et al., 2017; L. Wang et al., 2015; B. Yang et al., 2018)



Floretina

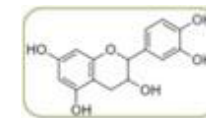
Fuente: nfextract.com.



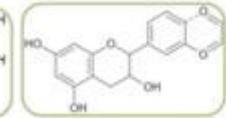
Arbutina

Fuente: <https://uniquim.iquimica.unam.m>**Flavanoles**

El anillo C se encuentra saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C₃. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros: Catequinas, como dímeros condensados entre sí y como oligómeros procianidinas. Pueden presentarse también como polímeros: proantocianidinas o taninos condensados (Arts et al., 2000). Siendo la Epicatequina y catequina los compuestos mayoritarios en frutas y en los polifenoles del cacao (Allgrove & Davison, 2018).



Catequina

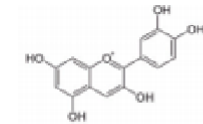


Epicatequina

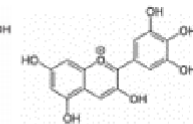
Fuente: .(Cinar et al., 2021)

Antiocianinas

Las antocianinas son los pigmentos coloreados solubles en agua ampliamente distribuidos en las plantas terrestres. Son responsables de la coloración roja, azul y púrpura de muchas flores, hojas, verduras y frutas (Burton-Freeman et al., 2016). El color y la estabilidad de estos pigmentos se ven influenciado por el pH, la luz, la temperatura y el tiempo. En condiciones ácidas, las antocianinas aparecen como rojas, pero se tornan azules cuando el pH aumenta (Santos-Buelga & Gonzá Lez-Paramá, 2018). Las bayas, las grosellas, las uvas, las verduras de hoja de color rojo a azul violáceo, las cebollas, los cereales, las raíces y los tubérculos tienen un alto nivel de antocianinas (Corell et al., 2018; Kammerer, 2016; Neugart et al., 2018; M. Shi et al., 2017). La cianidina-3-glucósido es la principal antocianina que se encuentra en la mayoría de las plantas (Khoo et al., 2017).



Cyanidin



Delphinidin

Fuente: (Kamiloglu et al., 2020)

1.2.3 Polifenoles del cacao

Theobroma cacao L., conocido como cacao, es una planta nativa de los bosques tropicales de Sudamérica (Motamayor et al., 2008), en Colombia, la superficie cultivada reportada en 2014 fue de 160,276 hectáreas produciendo alrededor de 47,732 toneladas de granos de cacao al año; ubicándose como el décimo país productor y superficie cosechada a nivel mundial; así como el tercero en Sudamérica por debajo de Brasil y Ecuador (Osorio-Guarín et al., 2017). Sus granos, se componen de lípidos, fibras, minerales, carbohidratos, proteínas y compuestos bioactivos en los que se incluyen las metilxantinas y los polifenoles (Katz et al., 2011), ricos especialmente en flavonoides y suponen alrededor del 12-18% del peso seco del grano entero. Están constituidos predominantemente por flavanoles, también conocidos como flavan-3-oles, incluyendo: (-)- epicatequina con hasta un 35%, (+)-catequina y sus oligómeros reconocidos como procianidinas (Allgrove & Davison, 2018; Katz et al., 2011; Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Adicionalmente a estos se han detectado otros polifenoles presentes en el cacao como la procianidina B2, el ácido protocatéquico, y la quercetina que han sido evaluados por sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (Cinar et al., 2021). Adicionalmente, se ha considerado que el chocolate, es estable frente al deterioro oxidativo debido a la presencia de compuestos polifenólicos como la epicatequina y la quercetina (Sanbongi et al., 1998).

1.2.4 Quercetina

La quercetina 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi cromina-4-ona (D'Andrea, 2015) es uno de los flavonoides más abundantes en la naturaleza y de mayor consumo en la dieta humana, se encuentra principalmente en el té verde, la lechuga, las nueces, las aceitunas, los arándanos, las manzanas, la cebolla, el cilantro y en el apio (Dhanya, 2022; Sankaranarayanan et al., 2021; Ulusoy & Sanlier, 2020), y suele encontrarse en las plantas, en forma de éteres, ácidos fenólicos o glicósidos/agliconas, con o sin azúcares enlazados (Luca et al., 2020), como glicósido de quercetina, glucurónido de quercetina y rutinósido de quercetina principalmente (Dhanya, 2022). Como se muestra en la Figura 1-2.

La quercetina es reconocida por presentar una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se resaltan la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiobesidad, antidepresiva, antiviral, en la que se destaca su acción frente al Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SAR-S-CoV-2) (Colunga Biancatelli et al., 2020), además de presentar actividad contra el cáncer de colon, la diabetes, el asma, la hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Keranmu et al., 2022; Sato & Mukai, 2020; Shabbir et al., 2021; T. Shi et al., 2020). Sin embargo, una limitante asociada al consumo de quercetina es su escasa biodisponibilidad oral, debido a su baja solubilidad acuosa, su escasa estabilidad química y metabólica, y presentar permeabilidad restringida en las membranas (Luca et al., 2020).

Estos compuestos polifenólicos pueden ser biotransformados por algunas especies bacterianas de la microbiota intestinal humana, en compuestos fenólicos de bajo peso molecular que pueden tener una actividad diferente y ser potencialmente más activos y mejor absorbidos que sus compuestos parentales (Cardona et al., 2013; Murota et al., 2018).

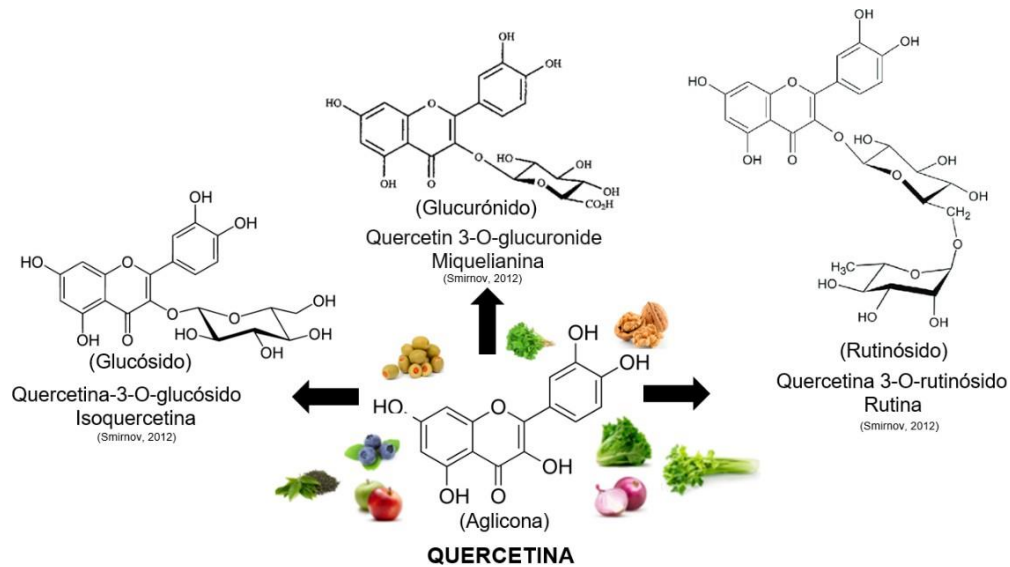


Figura 1-2 Estructura química de la quercetina en sus formas aglicona, quercetina glucósido y rutinósido.

1.2.4.1 Metabolismo de la quercetina

1.2.4.1.1 Transformaciones en el Intestino delgado

En general, la absorción de los polifenoles en el tracto digestivo comienza en el íleon, donde las estructuras más complejas (ésteres glucósidos o polímeros) que no pueden ser absorbidos en su forma nativa son hidrolizadas por las enzimas intestinales y posteriormente por la microbiota colónica (Manach et al., 2004). En el cuerpo humano los flavonoides ingeridos se someten a transformaciones de fase I y fase II. Las transformaciones de fase I consisten en la oxidación, reducción e hidrólisis, que se producen con menor frecuencia. Las biotransformaciones de fase II que tienen lugar en el hígado y en el intestino se forman con mayor intensidad (Kamiloglu et al., 2020). Estas transformaciones de fase II comprenden reacciones de conjugación en las que se forman diferentes metabolitos, derivados metílicos, glucurónicos y sulfatos (Grootaert et al., 2015). No solo metabolitos de la fase I y II, sino también los productos derivados del metabolismo microbiano se encuentran en el plasma, mientras que las moléculas parentales suelen estar ausentes o alcanzan niveles muy bajos que no pueden proporcionar concentraciones celulares efectivas (Luca et al., 2020). Como se describe en la primera parte (1) de la Figura 1-3. Los compuestos que no se hidrolizan llegan al colon, y son metabolizados por la microbiota intestinal.

1.2.4.1.2 Transformaciones en el colon por la microbiota intestinal humana

Si se consume rutina, ésta es hidrolizada por la b-glucosidasa derivada de la microbiota intestinal a quercetina que puede ser absorbida posteriormente. La quercetina que no fue absorbida intestinalmente será metabolizada por la microbiota del colon. La quercetina actúa como sustrato para varias bacterias intestinales como: *E. ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Butyrovibrio* spp. que pueden producir fisiones del anillo C y deshidroxilaciones, dando lugar a compuestos fenólicos de

bajo peso molecular que pueden ser fácilmente absorbidos (Chiou et al., 2014). Se han reportado sustancias como el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el ácido 3-hidroxifenilacético (3-OPAC) y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (PCA) que se generan por la escisión del anillo B. Mientras que el ácido 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol), el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico y el ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico se forman a partir de la escisión del anillo A. Otros metabolitos fenólicos como el 3- metoxi-4-hidroxibenzoico (ácido vanílico), el ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, el 3,4-dihidroxitolueno (DHT), el ácido 4-hidroxifenilacético (4-OPAC), el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (ácido homovanílico, HVA), también han sido reportados (Luca et al., 2020). El proceso de metabolización de la quercetina por parte de estas bacterias se describe en la segunda parte (2) de la Figura 1-3.

Se estima que del 5-10% de la ingesta total de flavonoides, sobre todo los de estructura monomérica y dimérica, pueden ser absorbidos en el intestino delgado, a menudo después de reacciones de desconjugación como la deglicosilación. Los restantes llegan al colon, donde se metabolizan en compuestos con diferente bioactividad por la acción enzimática del microbiota intestinal (Grootaert et al., 2015; Mithul Aravind et al., 2021; Valdés et al., 2015) como se describió anteriormente.

1.2.5 Bioactividad de los metabolitos derivados de la biotransformación de flavonoides por acción de la microbiota intestinal

La interacción de los polifenoles con la microbiota intestinal da lugar a una interacción bidireccional en la que los polifenoles modulan la composición de la microbiota intestinal, y a su vez la microbiota intestinal metaboliza los polifenoles ingeridos. El tipo y la cantidad de los metabolitos de polifenoles que se generan en el tracto gastrointestinal de los seres humanos dependen de la composición y la función de la microbiota intestinal (Espín et al., 2017). En la *Tabla 1-2* se muestran algunos de los estudios de bioactividad de los metabolitos de los flavonoides derivados de la microbiota intestinal humana.

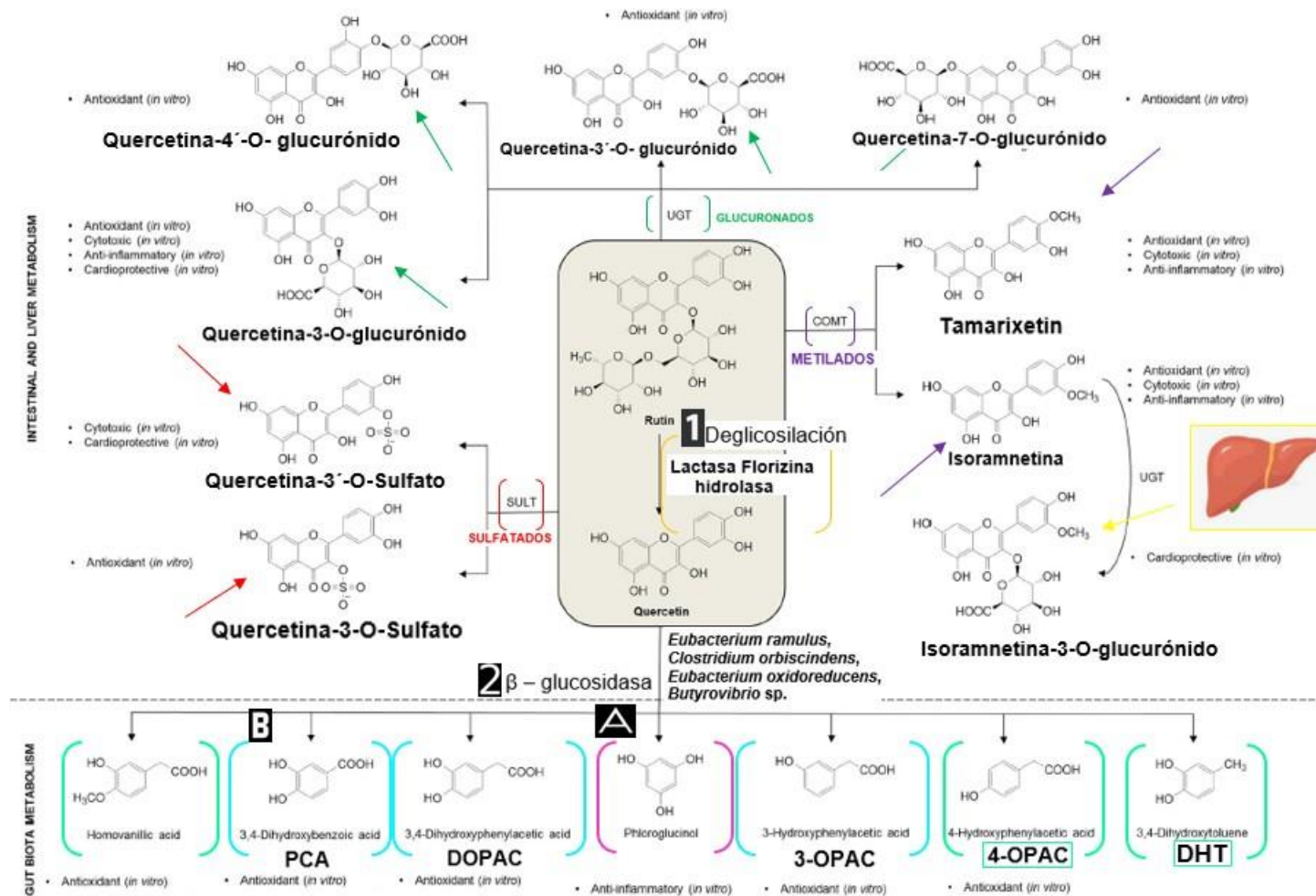



Figura 1-3 Vías metabólicas de biotransformación de quercetina en el intestino delgado y posteriormente por acción de la microbiota intestinal humana. (SULT - sulfotransferasa, UGT - uridina 5'-difosfo-glucuroniltransferasa, COMT - catecol-O-metiltransferasa). Fuente: adaptado de Luca et al., (2020)

Tabla 1-2 Estudios de bioactividad de los metabolitos de los flavonoides derivados de la microbiota intestinal humana. Fuente: adaptado de (Feng et al., 2018)

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	MODELO EXPERIMENTAL	METABOLITOS COLÓNICOS	RESULTADOS	REFERENCIAS
ANTIOXIDANTE	Ensayo in vitro de captación de radicales DPPH	Rutina, quercetina, 3,4-DHPAA, 3,4-DHT, 4-HPAA, 3-HPAA, ácido hipúrico y HVA	Todos los compuestos ensayados ejercieron actividad antioxidante	(Gläßer G E. et al., 2002).
	Ensayo de MDA producido por hepatocitos de rata cultivados expuestos a t-BHP	Rutina, quercetina, 3,4-DHPAA, 3,4-DHT, 4-HPAA, 3-HPAA, ácido hipúrico y HVA	La quercetina y el 3,4-DHT inhibieron la producción de MDA mientras que otros metabolitos fueron ineficaces	(Gläßer G E. et al., 2002).
	Producción de radicales de oxígeno por PMN humanos estimulados por: FMLP o zymosan opsonizado	Quercetina, 3,4-DHPAA, 3-HPAA y ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico	Todos los compuestos ensayados mostraron una actividad secuestradora de radicales al inhibir la producción de radicales de oxígeno y el 3,4-DHPAA fue el más potente.	(Merfort et al., 1996)
	Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno in vitro y oxidación de lipoproteínas de baja densidad	Dihydrodaidzeína, Equol O-DMA	La dihidrodaidzeína y la O-DMA mostraron una potencia antioxidante igual o ligeramente inferior, mientras que el Equol mostró una mayor actividad antioxidante en comparación con la daidzeína y el genisteína	(Rüfer & Kulling, 2006)
	Actividad y expresión de enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa SOD total) en células tejido hepático HepG2	O-DMA, equol, daidzeína y daidzina	Todos los compuestos estimularon la actividad de la catalasa y de la SOD total, así como la expresión del ARNm y de las proteínas	(Choi & Kim, 2014)
	Producción de citocinas proinflamatorias, es decir, TNF- α , IL-1 β e IL-6, en PBMC (Células mononucleares de sangre periférica) estimuladas por LPS (Lipopolisacárido) de humanos sanos	3,4-DHPPA, 3-HPPA, 3,4-DHPAA, 3-HPAA, ácido 4-hidroxi-3,4-dihidroquinóico	El 3,4-DHPPA y el 3,4-DHPAA redujeron significativamente la secreción de TNF. El 3,4-DHPPA y el 3,4-DHPAA inhibieron significativamente la secreción de IL-1 e IL-6	(Monagas et al., 2009)
	Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada por LPS (Lipopolisacárido) modo inflamatorio	3,4-DHT	El 3,4-DHT mostró una actividad antiinflamatoria al afectar a la señalización I β -NF- κ B en los macrófagos. Además, el 3,4-DHT suprimió significativamente la producción de óxido nítrico (NO), iNOS y COX-2 inducida por el LPS en una forma dependiente de la dosis y también redujo la generación de TNF- α	(Su et al., 2014)
Torsión en ratones inducida por ácido acético y pruebas de presión en las patas de las ratas	3,4-DHPPA, Ácido hidroferúlico	El número de retorcimientos se redujo en un 27, 35 y 40% con el ácido hidroferúlico, 3,4-DHPPA respectivamente. Todos los compuestos de prueba aumentaron significativamente la tolerancia a la presión aplicada en la pata inflamada	(Larrosa et al., 2009)	
ANTIINFLAMATORIO	 Modelo de colitis en ratas inducido por sulfato sódico de dextrano (DSS)	3,4-DHPPA	El tratamiento con 3,4-DHPPA disminuyó la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-8 y TNF- α , redujo los niveles de MDA y el daño oxidativo del ADN en la mucosa del colon distal.	(Larrosa et al., 2009)
	Una línea de células beta pancreáticas (células INS-1E) e islotes de rata aislados	3,4-DHPAA, 2,3-DHBA 3-HPPA	El 3,4-DHPAA y el 3-HPPA potenciaron la secreción de insulina estimulada por la glucosa en las células INS-1E y en los islotes pancreáticos de rata, y mejoraron la supervivencia y la función de las células pancreáticas. Estos efectos beneficiosos sobre las células beta parecen estar mediados por su capacidad para activar las ERK y la vía PKC.	(Fernández-Millán et al., 2014)
ANTIDIABÉTICA				

	Células beta pancreáticas Min6	3,4-DHPAA	El 3,4-DHPAA aumentó la translocación de Nrf2 al núcleo y protegió a las células pancreáticas contra el deterioro de la secreción de insulina inducido por el colesterol al prevenir el estrés oxidativo, la apoptosis y la disfunción mitocondrial.	(Carrasco-Pozo et al., 2015)
NEUROPROTECTORA	Modelos de estrés oxidativo in vitro en células PC12 diferenciadas inducidas por tres estresores diferentes (t-BHP, H ₂ O ₂ y FeSO ₄)	Luteolina, Quercetina, 3,4-DHPAA, 3,4-DHT	Todos los compuestos probados muestran efectos neuroprotectores significativos. El 3,4-DHT fue más potente que el 3,4-DHPAA	(Pavlica & Gebhardt, 2010)
	Neurotoxicidad inducida por el modo MPTP en ratones	Ácido protocatéquico	El ácido protocatéquico inhibió la reducción de los periodos de latencia en una prueba rotarod, el contenido de dopamina y sus metabolitos en el estriado. También ameló la patología en el SN y la disminución de la expresión de la tirosina-hidroxilasa en el SN de ratones C57BL/6J inducida por el MPTP	(H. N. Zhang et al., 2010)
CONTRA EL CÁNCER DE COLON	Proliferación, citotoxicidad y apoptosis de las células Caco-2	El ácido gálico, el ácido 3-O-metilgálico, el ácido siríngico, el ácido protocatéquico, el ácido vanílico y el 2,4,6-trihidroxibenzaldehído.	El ácido gálico, el ácido 3-O-metilgálico y el 2,4,6-trihidroxibenzaldehído redujeron la proliferación celular en las células Caco-2 de forma más significativa	(Forester et al., 2014; Forester & Waterhouse, 2010)
	Células de cáncer de colon HT-29 Prueba de Annexin V/PI (apoptosis)	Ácido siríngico, ácido vanílico, ácido hidroxifenilacético, tirosol, 4-HPAA, ácido 4 hidroxibenzoico.	El ácido 4-HPAA mostró efectos apoptóticos en las células de colon HT-29	(López De Las Hazas et al., 2017)
	Carcinogénesis de colon en ratones inducida por 1, 2-dimetilhidrazina	Taxifolina.	La Taxifolina indujo la vía de respuesta antioxidante e inhibió la señalización NF-κB y Wnt mediante la regulación a los bajos niveles de metabolitos reguladores como el TNF-α, la COX-2, la β-catenina y la cyc-lin-D1.	(Manigandan et al., 2015)

Abreviaciones: DPPH: radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. **3,4-DHPAA:** ácido 3,4-dihidroxifenilacético. **3,4-DHT:** 3,4 dihidroxituoleno. **4-HPAA:** ácido 4-hidroxifenilacético. **3-HPAA:** ácido 3-hidroxifenilacético. **HVA:** ácido homovanílico. **MDA:** malondialdehído (biomarcador de estrés oxidativo). **T-BHP:** Hidroperóxido de terc-butilo. **PMN:** neutrófilos polimorfonucleares. **FMLP:** el péptido quimiotáctico N-formil-leucil-metionil fenilalanina. **O-DMA:** O-Desmetilangolensina. **Equol:** (7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-cromo). **2,3-DHBA:** ácido 2,3-dihidroxibenzoico. **H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno. **FeSO₄:** Sulfato de hierro. **MPTP:** (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). **SN:** Sistema Nervioso.

Adicionalmente, a las bioactividades mencionadas anteriormente, también se ha informado de otros efectos de los metabolitos de flavonoides de origen microbiano, como el efecto protector contra la lesión hepática inducida por el acetaminofén (Xue et al., 2016), la inhibición de la actividad de la histona deacetilasa, que podría ser utilizada para el tratamiento del cáncer (Waldecker et al., 2008), la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I para reducir la presión arterial (Takagaki & Nanjo, 2015) y propiedades antitrombóticas (Rechner et al., 2004).

1.2.6 Microorganismos degradadores de flavonoides de la microbiota intestinal humana

La comunidad microbiana del colon es compleja, pueden hacer parte de ella alrededor de 1800 géneros y entre 15.000 a 36.000 especies bacterianas (Thursby & Juge, 2017), y algunas especies se han identificado son las responsables de la extensa descomposición de las estructuras originales de los flavonoides. En la *Tabla 1-3* se muestran algunas bacterias intestinales que han sido aisladas del tracto digestivo o heces fecales humanas y están asociadas al metabolismo de diferentes flavonoides.

Tabla 1-3 Estudios de bioactividad de los metabolitos Bacterias asociadas al metabolismo de distintos flavonoides, aisladas de los tejidos del tracto digestivo o de las heces humanas. Fuente: adaptado de (Feng et al., 2018)

MICROORGANISMOS INTESTINALES	FUENTE	SUBSTRATOS	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
<i>Clostridium orbiscindens</i> sp nov.		Quercetina	Metaboliza Quercetina a 3,4-DHPAA y floroglucinol	(Winter et al., 1991)
<i>Eubacterium ramulus</i>		Quercetina-3-glucósido (Q3G)	<i>Eubacterium ramulus:</i> metaboliza la Quercetina en butirato, acetato, 3,4-DHPAA y etanol.	(Schneider Heiko et al., 1999)
<i>Lactobacillus</i> sp. Niu-16 <i>Eggerthella</i> sp. Julong 732	Humano	Daidzeína	<i>Lactobacillus</i> sp. Niu-16: metaboliza la Daidzeína a DHD <i>Eggerthella</i> sp. Julong 732 metaboliza la DHD a Equol	(X. L. Wang et al., 2007)
<i>Slackia</i> sp HE8		Daidzeína	Equol	(Matthies et al., 2009)
<i>Clostridium perfringens</i> . <i>Bacteroides fragilis</i>		Quercetina	DOPAC	(X. Peng et al., 2014)
<i>Enterococcus avium</i> EFEL009		Rutina	La Rutina metaboliza en Isoquercetina y la Isoquercetina en Quercetina	(Shin et al., 2016)

Se ha demostrado que diferentes bacterias aisladas e identificadas de la microbiota intestinal humana, presentan la capacidad de biotransformar distintos compuesto polifenólicos debido a que tienen estructuras muy similares (G. Yang et al., 2021). Por ejemplo, *E. ramulus* tiene la capacidad de biotransformar distintos compuestos polifenólicos pertenecientes a los flavones, como la quercetina y las flavonas como la luteolina, subclases de los flavonoides que presentan estructuras similares, en DOPAC y ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico, respectivamente. (Braune et al., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que *Flavonifractor plautii*, originalmente asignado como *Clostridium orbiscindens*,

posee la enzima FLR (flavona reductasa) que cataliza específicamente la hidrogenación del doble enlace C2-C3 de dos de los grupos que abarcan el mayor número de flavonoides (flavonas y flavonoles), permitiendo iniciar la metabolización de estos compuestos (G. Yang et al., 2021). Así mismo, se ha descrito la capacidad de esta bacteria para transformar varios flavonoides como la quercetina, taxifolina, luteolina, eriodictiol, apigenina, nargenina y floretina (Schoefer et al., 2003).

Para realizar el seguimiento de estos microorganismos presentes en la microbiota intestinal humana, se usan técnicas como las fermentaciones fecales *in vitro* (Thuenemann et al., 2015).

1.2.7 Fermentaciones fecales *in vitro*

Las fermentaciones fecales *in vitro* son una herramienta que permiten realizar el monitoreo de diferentes microorganismos y evaluar cómo son alterados los diferentes entornos gastrointestinales, así como también las poblaciones de la microbiota intestinal humana (Thuenemann et al., 2015). Estos modelos, pueden variar desde incubaciones bajo condiciones anaeróbicas de una microbiota fecal densa hasta modelos continuos más complejos representando diferentes partes del colon humano (Venema & van den Abbeele, 2013) 2013). En la Tabla 1-4 se describen los modelos de fermentación fecal más representativos.

Tabla 1-4 Modelos de fermentación fecal más representativos. Fuente: adaptado de Kleiveland et al., (2015)

MODELO	CARACTERÍSTICAS
Fermentación por lotes	<p>Son modelos que van desde botellas cerradas utilizadas para cultivar cepas bacterianas definidas (simples o mixtas) hasta reactores controlados inoculados con suspensiones de microbiota fecal. Estos modelos suelen funcionar en condiciones anaeróbicas y se desarrollan en períodos de corta duración. Se utilizan para estudiar los efectos de los sustratos en la fisiología y la biodiversidad de los microorganismos intestinales y viceversa. El impacto en la microbiota se evalúa mediante técnicas moleculares cuantitativas y cualitativas y el impacto en la actividad metabólica se evalúa mediante la formación de ácidos grasos de cadena corta u otros metabolitos de interés. Estos modelos son adecuados para comprobar la variabilidad interindividual en la respuesta a un bioactivo o agente concreto o para comparar las consecuencias de la exposición a diferentes fuentes o dosis de compuestos. Además, proporcionan una primera evaluación de los tipos de metabolismo microbianos que se generan y ayudan a dilucidar vías implicadas. La mayor desventaja que presentan estos modelos es el agotamiento del sustrato y la acumulación de productos finales del metabolismo microbiano que alteran las condiciones alejándose del punto de partida, afectando así a la relevancia <i>in vivo</i> en simulaciones más largas y complejas (Kleiveland et al., 2015)</p>
Dinámicos de fermentación	<p>Los modelos de fermentación dinámica tienen como propósito establecer <i>in vitro</i> un ecosistema microbiano relativamente estable en condiciones de colon fisiológicamente relevantes.</p> <p>Modelos continuos de fermentación múltiple y única: son útiles para experimentos a largo plazo necesarios para evaluar la adaptación espacial y temporal de la microbiota colónica a los compuestos de la dieta y el metabolismo microbiano de los ingredientes alimentarios. Se basan en el modelo descrito por (Gibson et al., 1988) el cual consiste en tres recipientes de tamaño creciente, alineados en serie en la cual se genera una alimentación secuencial del medio de crecimiento, imitando las condiciones del colon proximal, transversal y distal. El primero recipiente tiene una alta disponibilidad de sustrato, lo que representa una rápida tasa de crecimiento bacteriano con un pH ácido, similar a lo que ocurre en el colon proximal. Mientras que en el último recipiente la tasa de proliferación bacteriana es lenta, el pH neutro, y una baja concentración de sustrato que es característico de las regiones más distales (Kleiveland et al., 2015)</p> <p>Modelos de fermentación continua de una sola etapa: tienen como objetivo simular las condiciones del colon proximal y reproducir su actividad metabólica. El modelo dinámico más sofisticado está representado por el sistema continuo de componentes múltiples TIM-2 (Minekus et al., 1999), el cual reproduce la mezcla peristáltica del contenido luminal del colon proximal, así como la absorción del agua y productos de fermentación. Los desarrollos recientes están en busca de la construcción de modelos de una sola etapa que simulen la microbiota del íleon (Venema & van den Abbeele, 2013).</p>

Inoculación de fermentación intestinal	En estos modelos, los fermentadores suelen inocularse con una suspensión fecal líquida de un individuo o con una mezcla. En este último caso, las muestras fecales se utilizan para inocular un fermentador de lote alimentado para producir un inóculo estandarizado que es almacenado en congelación (Kleiveland et al., 2015a). Por ejemplo, un proceso desarrollado por (Cinquin et al., 2004) consistió en la inmovilización en perlas de gel para atrapar microbiota fecal con una alta densidad celular manteniendo la diversidad de la microbiota durante fermentaciones colónicas continuas de larga duración. Por otro lado, está el modelo PolyFermS, en el que es posible cultivar de forma estable y reproducible comunidades intestinales complejas en diferentes reactores, lo que permite estudiar en paralelo el impacto de distintos tratamientos teniendo un reactor de control (Payne et al., 2012)
Fermentación intestinal	Estos modelos permiten estudiar la interacción entre el huésped y la microbiota intestinal. La combinación de modelos de fermentación y cultivos de células intestinales representa un enfoque común para reproducir <i>in vitro</i> las respuestas del huésped. Estos estudios se realizan normalmente con cultivos de células epiteliales de colon y/o células inmunitarias para evaluar la adherencia, la producción de citoquinas y la expresión génica, entre otros (Venema & van den Abbeele, 2013). Otras herramientas adicionales que han mejorado el modelado de las condiciones fisiológicas del colon son la incorporación en los reactores de un entorno mucoso capaz de diferenciar entre la microbiota luminal y las biopelículas microbianas adheridas al epitelio colónico (Macfarlane et al., 2005).

El objetivo común de estos modelos de fermentación intestinal *in vitro* es cultivar una microbiota intestinal compleja en condiciones ambientales controladas que permitan realizar diferentes estudios de modulación microbiana y metabolismo (Thuenemann et al., 2015). Una vez cultivadas las comunidades fecales, se pueden estudiar y caracterizar mediante diferentes técnicas moleculares.

1.2.8 Técnicas de caracterización de microorganismos aislados de heces fecales humanas

A continuación, en la *Tabla 1-5* se describen las características de algunas de las técnicas usadas para la identificación de bacterias presentes en heces fecales humanas.

Tabla 1-5 Técnicas de caracterización de microorganismos presentes en heces fecales humanas.

TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
Secuenciación Gen ADNr 16s	<p>El RNA ribosómico (rRNA) 16s es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Es un polirribonucleótido codificado por el gen <i>rrs</i>, también denominado DNA ribosomal 16S (rDNA 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. (Del et al., 2004)</p> <p>El gen 16S rRNA está compuesto por regiones altamente conservadas intercaladas con regiones más variables, lo que permite diseñar primero con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) complementarios a las regiones universalmente conservadas que flanquean las regiones variables. La amplificación, la secuenciación y la comparación con las bases de datos permiten identificar los linajes bacterianos y sus proporciones en una comunidad determinada (Ludwig et al., 2004; Q. Wang et al., 2007). Esta es una de las técnicas más usadas para determinar la diversidad y abundancia del microbioma, además al ser explorada con otras técnicas como la PCR y secuenciación metagenómica se pueden lograr caracterizar diferentes cepas bacterianas (Nelson et al., 2010).</p>
TECNOLOGÍAS ÓMICAS	<p>Los nuevos métodos globales de medir familias de moléculas celulares, como el ARN, las proteínas y los metabolitos intermedios son conocidas como tecnologías ómicas, por su capacidad de caracterizar a todos, o a la mayoría de los miembros de una familia de moléculas en un único análisis. Estas nuevas técnicas, permiten obtener evaluaciones completas de la actividad funcional de las vías bioquímicas, y de las diferencias estructurales genéticas (secuencia) entre individuos y especies. Dentro de ellas se incluyen la genómica, la transcriptómica (perfil de expresión génica), la proteómica y la metabolómica (Debnath et al., 2005).</p> <p>CULTURÓMICA: método que permite identificar especies bacterianas mediante el uso de cultivos de alto rendimiento y la espectrometría de masas MALDI-TOF. Existen más de un 80% de especies bacterianas del intestino humano que no se pueden identificar con herramientas y técnicas moleculares, ya que estas no son capaces de detectar poblaciones minoritarias de bacterias. Este método permite realizar cultivos de estas bacterias no cultivables, identificando nuevas especies bacterianas (Kaeberlein et al., 2002). La identificación de bacterias en la culturómica se realiza mediante MALDI-TOF-MS, es una técnica de ionización, en la cual se utiliza una matriz para la identificación de las colonias bacterianas, lo cual permite un rápido screening de un gran número de colonias. Los datos espectrales producidos por MALDI-TOF se comparan con los datos presentes en distintas bases de datos disponibles (Clark et al., 2013). Para la identificación de una bacteria a nivel de especie, la puntuación de identificación debe ser >2, y si la puntuación de identificación es <1,7, entonces no es posible identificar la bacteria, en este caso se debe realizar secuenciación del DNAr 16S para su identificación (Dalal et al., 2020).</p> <p>GENÓMICA: ciencia multidisciplinar que permite comprender la estructura, la función y la evolución de los genes y sus interacciones mediante la identificación, caracterización molecular y clonación de genomas completos con el objetivo final de comprender la fenómica de los organismos. Incluye la secuenciación de genomas, la determinación del conjunto completo de genes, el análisis de los transcritos y proteínas codificadas por un organismo, sus interacciones y la comprensión de las vías metabólicas. Se puede dividir en: Genómica estructural: tiene como objetivo, la construcción de un mapa genético y físico de alta resolución y determinación de la secuencia completa del genoma o del conjunto completo de transcripciones producidas por un organismo. Genómica funcional: caracteriza todos los genes presentes en el genoma de una sola vez. La genómica funcional a nivel de expresión de los genes se denomina transcriptómica y a nivel de caracterización de las proteínas se denomina proteómica. Incluye, además, las interacciones entre los genes, proteínas y otras moléculas (Solanke et al., 2015).</p> <p>METAGENÓMICA: es el estudio de una comunidad microbiana. Los estudios metagenómicos ponderan el material genético de una comunidad de organismos. Se trata de una caracterización a nivel del genoma, independiente del cultivo, de comunidades microbianas. Permite descubrir las comunidades microbianas en entornos naturales complejos como la microbiota intestinal, mediante la secuenciación del metagenoma tipo shotgun, los taxones bacterianos se identifican a nivel de especie. La identificación de especies depende del uso de bases de datos de referencia que tienen un gran número de secuencias genéticas conocidas (Dalal et al., 2020).</p>

Usando una combinación de análisis bioinformáticos, bioquímicos y genéticos, se ha podido obtener más información sobre las rutas metabólicas de la degradación de flavonoides a partir de la microbiota intestinal humana. Por ejemplo, se describió y caracterizó funcionalmente a partir de *F. plautii*, una flavona reductasa (FLR), la cual cataliza específicamente la hidrogenación del doble enlace C2-C3 en dos grupos de flavonoides, las flavonas y flavonoles, como paso clave para la metabolización de estos compuestos polifenólicos (G. Yang et al., 2021).

Si es posible el aislamiento de las bacterias degradadoras de flavonoides de la microbiota intestinal humana, se puede estudiar el comportamiento de la interacción microbiana entre éstas y diseñar un consorcio artificial que permita una mayor capacidad de degradación de los compuestos polifenólicos.

1.2.9 Consorcios microbianos

Los consorcios microbianos son sistemas biológicos que se crean artificialmente mediante el co-cultivo de especies microbianas seleccionadas (dos o muchas) las cuales coexisten y crecen con cierto grado de contacto entre ellas dentro de un medio de cultivo bien definido (Grandel et al., 2021; Großkopf & Soyer, 2014; Padmaperuma et al., 2018).

- **Clasificación consorcios microbianos**

Los consorcios microbianos pueden clasificarse en cuatro grupos como se describe a continuación en la Tabla 1-6.



Tabla 1-6 clasificación tipo de consorcios microbianos.





Tipo de Consorcio	Descripción	Fuente
Naturales	Se generan a partir del co-cultivo de microorganismos aislados de entornos naturales, como el suelo, el agua o los lodos y se caracterizan porque los miembros de dicha comunidad no se encuentran caracterizados.	(Eng & Borenstein, 2019; Ibrahim et al., 2021)
Artificiales	Se generan a partir del co-cultivo de microorganismos aislados que no necesariamente coexisten en el mismo entorno natural, basándose en una capacidad o actividad específica, sin ser modificados mediante ingeniería genética.	(Ibrahim et al., 2021; Ibrahim et al., 2021)
Semi- sintético	Se genera a partir del co-cultivo de microorganismos silvestres y microorganismos que han sido modificados mediante ingeniería genética para lograr un objetivo en común	(Bhatia et al., 2018)
Sintéticos	Se generan a partir del co-cultivo de microorganismos modificados mediante ingeniería genética haciendo que los microorganismos de esta comunidad evolucionen logrando aumentar el rendimiento y la eficacia del proceso.	(Brahim et al., 2021)

- **Interacciones ecológicas**

Dentro de las comunidades microbianas se presentan diferentes interacciones ecológicas que determinan la estabilidad y la función de los consorcios como se describe en la Tabla 1-7.

Tabla 1-7 Interacciones ecológicas dentro de consorcios microbianos. Fuente: adaptado de Che & Men, (2019; Ibrahim et al., (2021)

MODELO	EFEECTO	INTERACCIÓN	DESCRIPCION GRAFICA
Mutualismo	Positivo – Positivo	Bidireccional: amabas especies se ven beneficiadas.	
Comensalismo	Positivo – Neutral	Unidireccional: solo una especie se ve beneficiada.	

Parasitismo o depredación	Positivo – Negativo	Bidireccional: una especie se ve beneficiada y la otra especie es afectada.	
Competición	Negativo – Negativo	Bidireccional: ambas especies se ven afectadas.	
Amensalismo	Negativo- Neutral	Unidireccional: solo una especie se ve afectada	
Neutralismo	Neutral- Neutral	No hay efecto	

Descripción gráfica: Las flechas rojas indican un efecto negativo. Las flechas azules indican efecto positivo.

A partir de estas comunidades microbianas se han realizado diferentes estudios *in vitro* que han permitido solucionar diferentes problemáticas, en diferentes campos, como, por ejemplo: el tratamiento de aguas residuales, el desarrollo de nuevos medicamentos, la biorremediación en suelos y la producción de biocombustibles, entre otros (Goers et al., 2014; Magdouli et al., 2016; Rasouli et al., 2018; Zaccaria et al., 2020).

En el caso de los flavonoides, es posible que el diseño de un consorcio de microorganismos pueda biotransformar una gama de flavonoides más amplia y con mayor eficiencia. Por ejemplo, se ha observado que *F. plautii* es capaz de romper el anillo C de la quercetina, transformando la estructura aglicona de este flavonoide, sin embargo no es capaz de transformar los compuestos monoconjugados (quercetina-3,4'-di-O-glucósido y la quercetina-4'-O-monoglucósido), por lo cual, depende de otras bacterias transformadoras de flavonoides como *E. ramulus* que sí transforma este flavonoide en sus estados glucósidos, aprovechando los restos de azúcar, dejando libre la aglicona y de esta forma *F. plautii* puede finalizar la biotransformación de la quercetina en su forma aglicona a compuestos fenólicos de bajo peso molecular como el DOPAC y floriglucinol (Ulbrich et al., 2015).

1.3 Descripción de problema – Estado del Arte – Pregunta de Investigación

Como se mencionó anteriormente, existe una asociación beneficiosa entre el consumo de flavonoides y la salud humana, sin embargo también se ha demostrado que la biodisponibilidad de los flavonoides en el intestino delgado es baja (Feng et al., 2018), por lo cual cantidades sustanciales llegan al colon donde la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la biotransformación de estos compuestos polifenólicos en metabolitos fenólicos de bajo peso molecular (Cardona et al., 2013; Grootaert et al., 2015; Valdés et al., 2015), que pueden presentar una bioactividad diferente, propiedades mejoradas y ser potencialmente más activos que sus compuestos parentales (Chiou et al., 2014; Murota et al., 2018; L. Zhang et al., 2023)(2023). Debido a lo anterior, recientemente se han realizado diversos estudios de biotransformación de flavonoides en modelos de fermentaciones fecales *in vitro* (Murota et al., 2018; X. Peng et al., 2014; Rodríguez-Castaño et al., 2020), los cuales tienen como objetivo cultivar una

microbiota intestinal compleja en condiciones ambientales controladas que permita realizar diferentes estudios de modulación microbiana y monitoreo de su metabolismo (Thuenemann et al., 2015). La mayoría de estos estudios, se han realizado evaluando las cepas de forma individual o con materia fecal. Recientemente, se han realizado varios estudios que han permitido identificar bacterias de la microbiota intestinal humana capaces de transformar distintos tipos de flavonoides en monocultivos, provenientes de individuos de diferentes poblaciones del mundo.

Por ejemplo, un estudio realizado por Z. Zhang et al., (2014) en China, permitió aislar e identificar dos bacterias a partir de heces fecales humanas: *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis*, con capacidad de transformar quercetina, encontrando además que existen diferencias en la metabolización de este flavonoide. Posteriormente, Peng et al., (2014), a partir de las cepas identificadas anteriormente por Z. Zhang et al., (2014), determinaron que *C. perfringens* y *B. fragilis* transformaron la quercetina produciendo el mismo metabolito: DOPAC

Por otro lado, Racova et al., (2020) en República Checa, realizaron un estudio que tenía como objetivo investigar el metabolismo intestinal de polifenoles (quercetina) y polifenolglucósidos dietéticos (cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-galactósido y delphinidina-3-O-galactósido), en éste identificaron cinco cepas de bacterias anaerobias facultativas: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumonia*. Encontrando que las vías de formación de metabolitos se dan por diferentes procesos metabólicos, ya que a partir de la quercetina se lograron identificar siete metabolitos diferentes: el ácido (E)5-oxohex-2-enedioico, el ácido (Z)5-oxohex-2-enedioico, el ácido 4-hidroxibenzoico y otros dos metabolitos desconocidos por procesos de descomposición; el 3'-O-metildihidroquercetina se obtuvo por procesos de hidrogenación y metilación, y finalmente por procesos de desaturación el 2-(3-hidroxi-4-oxofenilo)-5-hidroxicromono-3,4,7-triona.

Finalmente, en un estudio realizado por Sankaranarayanan et al., (2021) en Estados Unidos, en el cual se analizaron 94 especies bacterianas aisladas del intestino humano con el fin de comprobar la capacidad de biotransformar la quercetina en diferentes metabolitos, encontraron que, de las bacterias estudiadas, cinco cepas eran capaces de degradar la quercetina: *Bacillus glycinifermentans*, *Flavonifractor plautii*, *Bacteroides eggertii*, *Olsenella scatoligenes* y *Eubacterium eligens*. Demostrando que *B. glycinifermentans* podía generar 2,4,6-THBA (ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico) y 3,4-DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), mientras que *F. plautii* genera DOPAC. Además de las diferencias en los metabolitos producidos, también concluyeron que la cinética de degradación de la quercetina era diferente entre *B. glycinifermentans* y *F. plautii*, lo que sugiere que las vías de degradación son probablemente diferentes entre estas cepas.

Sin embargo, poco se ha estudiado el potencial de diseñar consorcios de microorganismos a partir de cepas con capacidad de biotransformación de flavonoides (Sankaranarayanan et al., 2021). Los consorcios microbianos presentan varias ventajas frente a los monocultivos, entre las cuales se incluye mejorar la eficiencia metabólica a partir de la complementación del trabajo metabólico o la posibilidad de alimentación cruzada de sustratos que permite mejorar la eficiencia de las vías metabólicas (P. Xu et al., 2020), así como también presentar mayor resistencia a cambios ambientales en comparación con los monocultivos (Che & Men, 2019).

Por ejemplo, un estudio realizado por Ulbrich et al., (2015), en Alemania, aunque no se realizó en cocultivo, tenía como objetivo investigar la transformación de los principales glucósidos de quercetina en la cebolla, usando un modelo de fermentación *in vitro*, de dos especies bacterianas aisladas de la microbiota intestinal humana: *E. ramulus* y *F. plautii*. Demuestra que *F. plautii* depende de otras bacterias transformadoras de flavonoides como *E. ramulus*, para la deglucosilación de la quercetina-4'-O-

glucósido y quercetina-3,4'-di-O-glucósido., aprovechando los grupos de azúcar liberando el aglicón, que queda disponible para *F. plautii* y finalmente se genere DOPAC y floroglucinol. Sugiriendo que los mecanismos de alimentación cruzada pueden respaldar la diversificación de la microbiota intestinal.

Por otro lado, el estudio realizado por Rodríguez-Castaño et al., (2019), que permitió demostrar que el co-cultivo de transformadores de fibra dietaria como *Bacteroides thetaiotaomicron* y transformadores de flavonoides como *Eubacterium ramulus* permite modular la biotransformación de estos compuestos polifenólicos como la quercetina generando DOPAC y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a partir del almidón, lo que puede determinar su biodisponibilidad y bioactividad, generando posibles efectos beneficiosos en la salud humana.

En Colombia aún no se conocen estudios sobre microorganismos transformadores de flavonoides, lo cual hace que la microbiota intestinal de esta población sea de gran interés, ya que además se ha determinado que la microbiota intestinal de esta población es significativamente diferente a la de los estadounidenses, europeos y asiáticos (Escobar et al., 2015). Por lo cual, el estudio de estas poblaciones microbianas en individuos de esta región permitiría ampliar la información sobre las especies/cepas que pueden participar en el metabolismo de los flavonoides. Por lo tanto, este trabajo pretende caracterizar por primera vez microorganismos transformadores de flavonoides aislados de la microbiota intestinal humana colombiana, y diseñar un consorcio artificial, que pueda potencialmente presentar una mayor capacidad de degradación de flavonoides.

Debido a lo anterior, este trabajo busca responder las siguientes **preguntas de investigación**:

¿Cuál es la capacidad de metabolizar flavonoides y la producción de metabolitos en cepas nativas aisladas de la microbiota intestinal humana colombiana? y ¿Cómo es el desempeño de estas cepas para biotransformar flavonoides en un consorcio artificial?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Caracterizar la capacidad de metabolización de flavonoides por parte de comunidades artificiales transformadoras, aisladas de la microbiota intestinal humana colombiana.

1.4.2 Objetivos Específicos

1.4.2.1 Evaluar la efectividad de diferentes estrategias de cultivo en el aislamiento de microorganismos transformadores de flavonoides de la microbiota intestinal humana colombiana.

1.4.2.2 Determinar la eficiencia de un consorcio artificial microbiano para la transformación de flavonoides comparado con la capacidad de las cepas de forma individual.

2 Capítulo I: Evaluación estrategias de cultivo microorganismos transformadores de quercetina

2.1 Metodología

2.1.1 Recolección de muestras de heces fecales

Se recogieron muestras fecales frescas de cinco personas sanas (C, G, J, M, T), que no presentaban síntomas de alguna enfermedad gastrointestinal, y que no hubieran consumido antibióticos en los últimos seis meses (Riva et al., 2020). Los participantes seguían una dieta vegana, que permitiera aumentar la probabilidad de aislar microorganismos biotransformadores de flavonoides. Los participantes recogieron las muestras de heces directamente en recipientes estériles, las cuales se mantuvieron a 4°C aproximadamente, hasta su llegada al laboratorio, donde fueron procesadas dentro de las 24 horas siguientes a la recogida. Se solicitó la firma de un consentimiento informado por escrito de todos los participantes. El estudio se llevó a cabo según las pautas de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de La Sabana bajo el proyecto de investigación "Diseño de un consorcio probiótico a partir de microbiota intestinal colombiana con capacidad de reducción de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles". La recopilación y el estudio utilizados en esta investigación fueron autorizados por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia a la Universidad de La Sabana, a través del contrato para el acceso a recursos genéticos "Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados" N° 325-2021 (RGE0382).

2.1.2 Enriquecimiento de microorganismos de la microbiota intestinal humana

Para aislar los microorganismos transformadores de quercetina presentes en las heces fecales humanas se re suspendieron entre 50 mg y 150 mg aproximadamente de cada una de las muestras de forma independiente, en 10 mL de solución salina tamponada (PBS) (OXOID, Reino Unido) anaerobia en tubos Hungate. Posteriormente, se transfirió 1 mL de la suspensión fecal a un frasco que contenía 10 mL de medio mínimo 7N anaerobio, descrito por Rodríguez-Castaño et al., (2019) (**Anexo A**). El medio se esterilizó con filtro 0,22 µm (Millipore) y finalmente se adicionó quercetina 97% p/p (AlfaAesar, EE. UU) estéril a una concentración final de 0,25 mg/mL. Las suspensiones fecales se incubaron a 37°C y se realizó seguimiento visual de la desaparición de la quercetina (pérdida del color amarillo) en el fondo del frasco, durante siete días.

2.1.3 Estrategias de aislamiento de microorganismos con potencial de biotransformación de quercetina

Se realizaron cuatro estrategias de cultivo para aislar bacterias con potencial de biotransformación de quercetina a partir de las suspensiones fecales *in vitro* de las cinco muestras de heces fecales identificadas como: C, G, J, M y T. La detección de la biotransformación de quercetina se basó en la desaparición del color amarillo insoluble en el fondo del frasco.

2.1.3.1 Estrategia I: cultivos en medios sólidos con quercetina

Se sembró un 1 mL de cada una de las suspensiones fecales (C y J), en tres medios de cultivo diferentes: Agar MRS (OXOID, Reino Unido), Agar tripticosa soya (Becton Dickinson, EE. UU) y medio 11 (**Anexo A**). A todos los medios de cultivo preparados anteriormente se les adicionó 0,25 mg/mL de quercetina y

L-Cisteína 5%. Se prepararon 15 mL de cada medio en frascos schott de 100 mL con tapas anaeróbicas, se gasearon y se esterilizaron en autoclave. El medio 11 se esterilizó por separado, y, el extracto de levadura (OXOID, Reino Unido), extracto de carne (HiMedia, India) y triptona (OXOID, Reino Unido), se adicionaron posteriormente en condiciones de esterilidad al resto de los componentes del medio previamente filtrados con membrana de 0.22 μ m. Tras esterilización, los medios se mantuvieron a 55°C para evitar solidificación. Se utilizó la técnica de cultivo sólido modificada de roll tube de Hungate (Hungate, 1969), agregando 1 mL de las suspensiones fecales seleccionadas a cada medio preparado, distribuyendo el agar en una fina capa sobre la superficie interna de los frascos en condiciones anaeróbicas. Todos los medios inoculados se incubaron a 37°C durante 7 días en condiciones de anaerobiosis.

Se seleccionaron colonias de los medios sólidos con o sin halo de biotransformación de quercetina y se inocularon en medio líquido del que provenían con quercetina. Tras la incubación a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 7 días. Las muestras donde se observó la desaparición de quercetina se purificaron mediante dos siembras por agotamiento en el mismo medio. Las colonias purificadas se evaluaron nuevamente para determinar la biotransformación de quercetina en medio 11. Para esto, se prepararon tubos Hungate con 2 mL de medio líquido anaeróbico 11 con quercetina y se inoculó con una colonia aislada. Se incluyó un control abiótico con quercetina sin inoculación bacteriana. Tras la incubación a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 7 días, se monitoreó visualmente la desaparición de la quercetina (color amarillo) en el fondo del tubo.

2.1.3.2 Estrategia II: Cultivos en medios líquidos con diferentes azúcares y quercetina

Se transfirieron 500 μ L de cada una de las suspensiones fecales (C y G), en 5 mL de diferentes medios líquidos de cultivo: 7N, medio 11 y medio de azúcares, compuestos por: fructosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa 10 mM. A todos los medios líquidos preparados anteriormente se les adiciono quercetina (0,25 mg/mL) y 5% de L-Cisteína. Posteriormente se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis, y se realizó seguimiento visual de desaparición de la quercetina en el fondo del tubo, durante 7 días. Adicionalmente, se prepararon controles abióticos de quercetina en los tres medios evaluados, los cuales contenían 5 mL de medio líquido: 7N, 11 y azúcares, con quercetina (0,25 mg/mL) sin inoculación bacteriana.

Las muestras en las que se observó la desaparición de la quercetina se sembraron en medio sólido, adicionándole agar bacteriológico (OXOID, Reino Unido) 1,5% p/v (3X). Se realizaron diluciones seriadas en base 10, hasta 10^{-1} , en PBS anaeróbico. Posteriormente los medios de cultivo se incubaron a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis y se seleccionaron las colonias que presentaran halos de biotransformación de quercetina.

2.1.3.3 Estrategia III: Diluciones sucesivas en medio líquido 7N con quercetina.

Se transfirieron 1 mL a 10 mL de medio líquido anaerobio 7N con quercetina (0,25 mg/mL) (7NQ), a partir de las dos suspensiones fecales (C y G), y se prepararon dos sets de muestras, ajustando el pH a 7.2 y 6.7. Las nuevas suspensiones fecales se incubaron a 37°C y se realizó seguimiento visual de biotransformación de la quercetina, durante 7 días. Una vez se visualizó la desaparición de la quercetina de las suspensiones fecales a diferente pH, se realizaron diluciones sucesivas transfiriendo 10% de la suspensión fecal anterior (500 μ L) a 5 mL de medio líquido anaerobio nuevo 7NQ. Se incubaron a 37°C, y se realizó seguimiento visual durante 48 y 96 horas, para evidenciar la desaparición del color amarillo. Este procedimiento se repitió hasta que alguno de los pases sucesivos realizados no presentó el cambio de color amarillo a transparente. El pase anterior que sí presentó desaparición del color amarillo característico de la quercetina se utilizó como inóculo para evaluar el crecimiento en diferentes medios de cultivo y verificar la biotransformación de forma visual de la quercetina. Adicionalmente se preparó

un control abiótico de quercetina que contenía 5 mL de medio líquido anaerobio 7NQ inoculación bacteriana.

2.1.3.3.1 Crecimiento en medios de cultivo sólido y estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

Se realizaron siembras en gota de cada una de las suspensiones seleccionadas por muestra usando jeringas de 1 mL en la cámara de anaerobiosis, en 2 mL de diferentes medios de cultivo (por duplicado): agar Plate Count (PC) (Becton Dickinson, EE. UU), Nutritivo (N) (Becton Dickinson, EE. UU), Trypticase Soya (TS) (Becton Dickinson, EE. UU), Infusión Cerebro Corazón (BHI) (PanReac, España), OatMeal (OM) (Merck, Alemania), Extracto de Malta (EM) (Merck, Alemania) y Luria-Bertani (LB) (Merck, Alemania), diluidos 1/10, usando como medio base 7NQ. Un pozo de medio de cultivo de cada tipo por medio como control (placas de 24 pozos). Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 7 días. Posteriormente, se preparó medio líquido anaerobio 7NQ a pH 6.7 y 7.2 dispensando 500 uL en una placa de 24 pozos, se preparó control abiótico en pH 6.7 y 7.2. Se sembraron aquellos pozos que presentaron crecimiento de colonias anteriormente en medio sólido-sólido y se incubó a 37°C por 7 días en condiciones de anaerobiosis. Donde se evidenció biotransformación de la quercetina, se pasaron a medio líquido-líquido anaerobio 7NQ y se incubaron a 37°C por 7 días. Los tubos de crecimiento positivo se usaron como inóculo para realizar una segunda verificación visual de la biotransformación de quercetina.

2.1.3.3.2 Aislamiento de microorganismos en medio sólido

Se prepararon medios de cultivo sólido usando el mismo medio de cultivo del cual provenían las bacterias donde se observó biotransformación de quercetina, usando como medio base 7NQ anaerobio (1X), L-Cisteína líquida al 5% y agar (3X). Se seleccionaron los morfotipos que presentaran o no halos de biotransformación de quercetina, posteriormente se realizaron dos purificaciones mediante la técnica desiembrar por agotamiento, se realizó descripción microscópica a partir de coloración de Gram.

2.1.3.3.3 Confirmación de la biotransformación quercetina

De los aislados seleccionados anteriormente por presentar capacidad de biotransformación de quercetina se tomaron los tubos conservados en glicerol anaeróbico al 20% y se reactivaron en medio líquido anaerobio del que provenían, se incubaron a 37°C por 72 horas en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se confirmó la biotransformación de quercetina, en tubos Hungate con 2 mL medio líquido anaerobio 7NQ y en condiciones de anaerobiosis se inocularon con 200 uL de cada uno de los aislados reactivados anteriormente. Adicionalmente se preparó un control abiótico de quercetina. Los tubos se incubaron a 37°C por 7 días en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación, se seleccionaron las cepas de los tubos en los cuales se observó la desaparición de la quercetina. Este ensayo se realizó dos veces de forma independiente.

2.1.3.4 Estrategia IV: cultivos en medio líquido 11 y 11 modificado

A partir de cuatro suspensiones fecales: C, G, M y T se evaluó el crecimiento en medio de cultivo líquido 11 y 11 modificado (11M), (**Anexo A**) con dos niveles de pH 6.7 y 7.2, para posteriormente verificar de forma visual la capacidad de biotransformación de quercetina.

2.1.3.4.1 Crecimiento en medio de cultivo líquido 11 y 11M

Se preparó medio líquido anaerobio 11 y 11M a dos pH diferentes: 6.7 y 7.2., en tubos Hungate. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-12} , de las cuatro muestras a evaluar, en los dos medios preparados a los pH establecidos y se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis para determinar su crecimiento por turbidez.

2.1.3.4.2 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

Posteriormente, se prepararon tubos con 2 mL medio mínimo 7NQ líquido anaerobio a pH 6.7 y pH 7.2 y se inocularon con 200 uL de las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por triplicado, para cada una de las muestras evaluadas. Adicionalmente se preparó un control abiótico de quercetina. Se incubó a 37°C por 72 horas. Los tubos en los que se evidenció biotransformación de quercetina se seleccionaron para realizar dos purificaciones en medio líquido.

2.1.3.4.3 Purificación parcial de microorganismos en medio líquido 11, 11 modificado y estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

Se realizó purificación parcial mediante diluciones sucesivas en medio líquido 11 y 11M. Para esto, se tomaron las muestras seleccionadas anteriormente por presentar capacidad para biotransformar quercetina, y se realizaron diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-12} en el respectivo medio anaerobio 11 y 11 M, en pH 6.7 y 7.2 del que provenían. Se incubó a 37°C por 48 horas, se seleccionaron las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por turbidez. Posteriormente, se realizó el estudio preliminar visual de la biotransformación de la quercetina, preparando tubos Hungate con 2 mL medio mínimo 7NQ líquido anaerobio con el pH con el cual provenían las muestras seleccionadas y se inocularon con 200 uL de las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por turbidez, por triplicado. Adicionalmente se preparó un control abiótico de quercetina, y se incubó a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis. Se seleccionaron aquellos tubos donde se evidenció la biotransformación visual de la quercetina y se realizó una segunda purificación en medio líquido 11 y 11M de la misma forma en la que se describió anteriormente. A partir de las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por turbidez, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la confirmación preliminar de la biotransformación de quercetina, donde se evidenció biotransformación de quercetina se realizaron aislamiento de colonias mediante la técnica roll tube y en medio sólido.

2.1.3.4.4 Aislamiento de microorganismos mediante técnica Roll Tube y medio sólido

Las últimas muestras purificadas en las que se comprobó visualmente la biotransformación de quercetina se usaron como inóculo para realizar aislamiento mediante la técnica roll tube, preparando tubos de agar anaerobio con medio de cultivo 11 y 11M con quercetina (0,25 mg/mL), los cuales fueron inoculados con 1 mL de cada una de las muestras seleccionadas e incubados a 37 °C por 72 horas. Tras incubación se realizó aislamiento en medio sólido para los diferentes morfotipos de colonias seleccionadas en el medio de cultivo del cual provenían. Posteriormente, se prepararon tubos con 2 mL de medio mínimo 7NQ y se inocularon con 200 uL de las últimas dos diluciones donde se observó biotransformación de quercetina. Adicionalmente se preparó un control abiótico de quercetina. Se incubó a 37°C por 7 días, hasta observar la desaparición de la quercetina en el fondo del tubo.

Las colonias seleccionadas con potencial de biotransformación de quercetina de las cuatro estrategias de aislamiento evaluadas se purificaron mediante técnica de siembra por agotamiento (Z. Zhang et al., 2014) y posteriormente se conservaron en glicerol anaeróbico al 20% -20°C y se crioconservaron a - 80°C (Rodríguez, 2011) hasta su posterior uso.

2.1.4 Estudio de la biotransformación visual de quercetina.

Para confirmar la biotransformación de quercetina, de las cepas seleccionadas anteriormente, se tomaron los viales que se encontraban conservados en glicerol anaeróbico al 20% y se reactivaron en medio líquido anaerobio del que provenían con quercetina (0,25mg/mL), se incubaron a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, se prepararon tubos Hungate con 2 mL medio líquido anaerobio 7NQ. En condiciones de anaerobiosis se inocularon con 200 uL de cada uno de los aislados

reactivados anteriormente. Adicionalmente se preparó un control abiótico de quercetina. Los tubos se incubaron a 37°C por 7 día en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación, se seleccionaron las cepas de los tubos en los cuales se observó la desaparición de la quercetina. Este ensayo se realizó dos veces de forma independiente por triplicado, para confirmar la capacidad de biotransformación de quercetina por acción bacteriana.

2.1.5 Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas anteriormente por su capacidad de biotransformación de quercetina para determinar en qué periodo de tiempo se alcanzaba una alta densidad celular (fase exponencial): 3×10^7 - 3×10^8 UFC/mL (Jiménez et al., 2014), y de esta forma, poder realizar las posteriores metodologías de cuantificación y comparación de biotransformación de quercetina y producción de metabolitos, por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA).

2.1.5.1 Condiciones de cultivo para las cinéticas de crecimiento

Para obtener el pre-inóculo de las cepas, se tomó una colonia de cada aislado, previamente reactivado, las cuales se inocularon en 5 mL de caldo del que provenían, se incubaron a 37° C a 200 rpm durante 16 horas aproximadamente en condiciones de anaerobiosis en tubos Hungate. Tras incubación se determinó la absorbancia del pre-inóculo y se preparó un inóculo de concentración final 0,1% en 5 mL de caldo, para un periodo de 24 horas (0 – 24 horas). Durante este periodo se determinó concentración bacteriana a partir de la densidad óptica (DO) y recuento de UFC/mL. Se realizaron dos ensayos independientes para la determinación de DO y UFC/mL.

2.1.5.2 Determinación cinética de crecimiento

2.1.5.2.1 Densidad óptica (DO)

Para la determinación de DO, se realizaron mediciones por triplicado de los inóculos preparados al 0.1% para cada una de las cepas, los cuales se mantuvieron a 37°C a 200 rpm durante 24 horas. Como blanco se usaron el medio líquido anaerobio del cual provenía cada cepa. se tomaron mediciones durante 24 horas. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20) a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600nm}). Las gráficas de la cinéticas se elaboraron con en el software OriginPro 2023b (learning edition).

2.1.5.2.2 Recuento UFC/mL

Para la determinación de UFC/mL, se realizaron diluciones seriadas en base 10 en PBS anaerobio hasta la dilución 3×10^{-8} . Realizando siembra en agar anaeróbico de las diluciones 3×10^{-5} , 3×10^{-6} y 3×10^{-7} , por duplicado, para las primeras 6 horas, y posteriormente 3×10^{-6} , 3×10^{-7} y 3×10^{-8} por duplicado hasta la hora 24. Se incubó a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 48 horas. Posterior a la incubación se realizó el recuento de UFC/mL de cada una de las diluciones sembradas en placa. El recuento de UFC/mL, durante 24 horas. El ensayo se realizó en cámara anaeróbica. Las gráficas de las cinéticas se elaboraron con en el software OriginPro 2023b (learning edition).

2.1.6 Identificación molecular de cepas con capacidad de biotransformación de quercetina.

2.1.6.1 Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas seleccionadas por presentar capacidad de biotransformación de quercetina. Para esto se tomaron los respectivos viales que se encontraban conservados a -20°C en glicerol anaeróbico al 20% de cada una de las cepas transfiriendo 500 μL a 5 mL de medio líquido BHI anaeróbico y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación constante a 200 rpm. Posteriormente se llevó a cabo el procedimiento descrito por Acosta-González et al., (2013). Se centrifugaron las muestras durante 5 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 1 mL de solución salina EDTA más 3,3 μL de lisozima (300 mg/mL) (AMRESCO, EE. UU), 10 μL de proteinasa K (10 mg/mL) (BIOLINE, Inglaterra) y se mezcló con vortex. Se incubó entre 15 a 45 minutos a 37°C hasta que las muestras presentaron un aspecto viscoso, se les añadió 80 μL de SDS y se mezclaron con vortex. Se incubó por 10 min a 65°C en baño seco y posteriormente se adicionó 250 μL de NaCl 5 M y mezclaron por inversión. Cada una de las muestras se dividió en dos, distribuyendo el volumen en partes iguales (600 μL por tubo aproximadamente). Posteriormente se adicionó un volumen de 600 μL de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se invirtieron los tubos varias veces para mezclar. Se centrifugó durante 6 minutos a 13000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes de las muestras evitando aspirar el fenol-cloroformo. Se repitió este lavado con una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente se realizó la precipitación del ADN, añadiendo una relación 1/9 del volumen de acetato de sodio 3 M (pH 7.0) y 0.6 de isopropanol. Se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a -20°C para completar el proceso de precipitación de ADN. Finalmente se centrifugaron los microtubos con el ADN precipitado por 30 minutos a 13000 rpm desechando el sobrenadante. Se lavó con etanol al 70%, añadiendo 500 μL de esta solución, agitando suavemente y centrifugando durante 10 minutos a 13000 rpm, se dejaron secar los pellets y se re suspendieron en agua ultrapura Milli-Q (AMRESCO, EE. UU) almacenando los microtubos con ADN a -20°C hasta su uso para posterior amplificación y secuenciación.

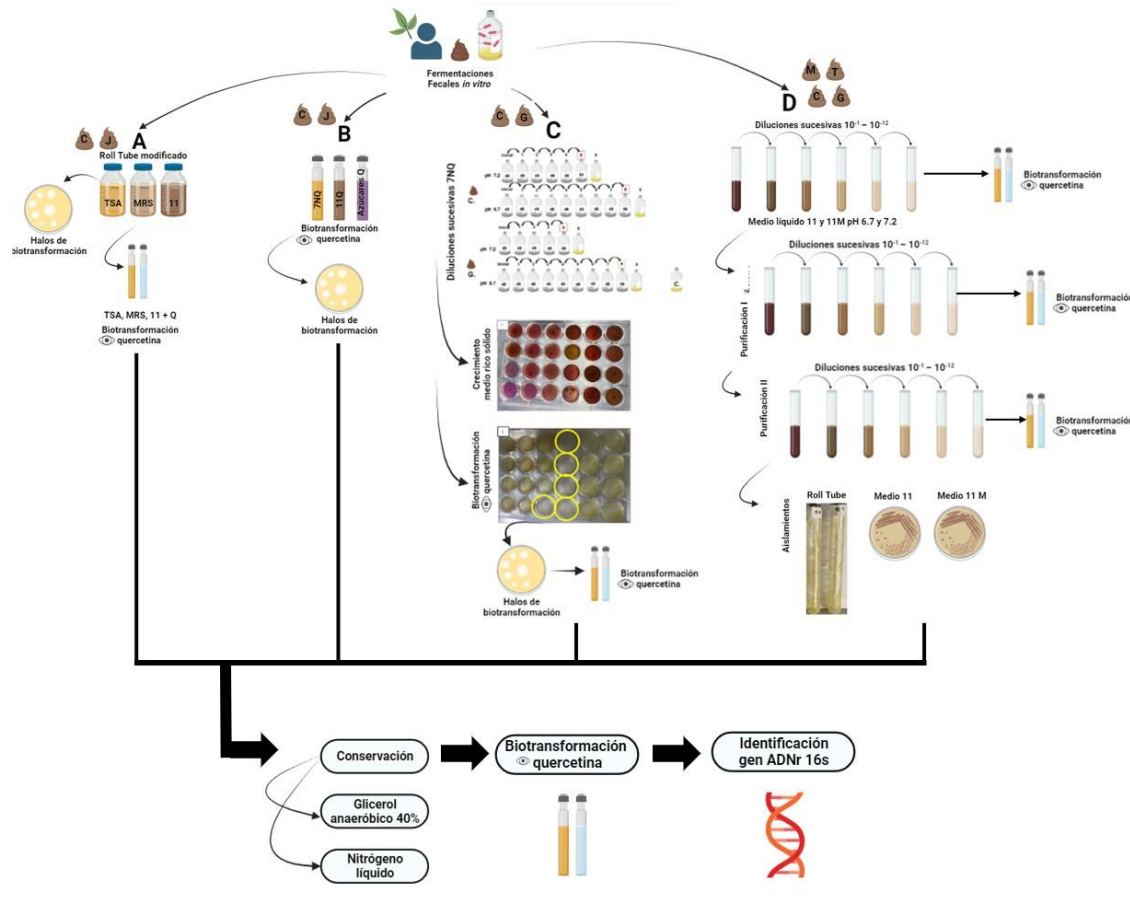
2.1.6.2 Amplificación de ADNr 16S

El fragmento de ADNr 16s de cada aislamiento se amplificó mediante *PCR* (*Polimerasa Chain Reaction*), para ello se utilizaron los primers universales 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). Se realizó la amplificación usando, OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB. EE. UU). El programa utilizado para la PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 50°C durante 30 segundos, una extensión inicial a 72°C durante 1:30 minutos. Se realizó una extensión final a 72°C durante 5 min. La visualización de los productos de *PCR* se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (p/v), teñidos con SYBR safe (Sigma Aldrich, Alemania). Los productos de *PCR* se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (p/v), teñidos con SYBR safe (Sigma Aldrich, Alemania) durante 45 minutos y 90 voltios. Se usó Buffer de carga 6X DNA (Thermo Scientific, EE. UU) y como marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Invitrogen, EE. UU). La visualización del gel se realizó en foto documentador (BIO-RAD). Los productos de *PCR* fueron purificados utilizando las perlas magnéticas Agencourt® Ampure® XP siguiendo las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter, EE. UU). Se utilizó como control negativo de la reacción agua grado molecular, como control positivo ADN genómico de *Azospirillum* sp.

2.1.6.3 Secuenciación de ADNr 16S

Los productos de *PCR* de cada cepa fueron secuenciados por metodología Sanger, realizado por el servicio de secuenciación del Laboratorio Azenta (EE. UU). Las secuencias obtenidas en formato ab1 fueron procesadas en el programa Bioedit para ensamblar las secuencias forward y reverse. Se generaron nuevos archivos en formato FASTA y a partir de las secuencias forward y reverse se realizó un alineamiento y se generó una secuencia consenso, realizando un alineamiento por muestra en la base de datos del NCBI y EzBioCloud, para determinar la identidad de las bacterias aisladas.

En la Figura se describe en forma resumida las diferentes estrategias evaluadas, para el aislamiento de bacterias de la microbiota intestinal humana colombiana con capacidad de transformar flavonoides.



Condiciones generales: Todos los experimentos se realizaron y se mantuvieron bajo condiciones de anaerobiosis. Las condiciones de incubación fueron a 37°C, el tiempo de incubación se determinó según el tipo de ensayo realizado. Como control abiótico en todos los ensayos se usó medio mínimo líquido anaerobio 7NQ sin inoculación bacteriana. La concentración de quercetina usada en los medios de cultivo tanto líquido como sólido fue de 0,25 mg/mL. La **Evaluación de la biotransformación de la quercetina fue determinado por:** (I) formación de halos alrededor de las colonias en medio sólido con quercetina. (II) seguimiento visual de la desaparición de la quercetina (color amarillo) insoluble en el fondo del tubo, en medio líquido 7NQ. **Purificación en medio líquido:** a partir de diluciones sucesivas 10^{-1} - 10^{-12} , seleccionando las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por turbidez. **Medios de cultivo:** (7NQ) 7N con quercetina. (PC) Plate Count, (N) Nutritivo, (TSA) Triptona-Soja, (BHI) infusión cerebro corazón, (OM) avena, (EM) Extracto de Malta. (11M) 11 Modificado.

Figura 39. Estrategias utilizadas para aislar bacterias anaerobias de la microbiota intestinal humana, a partir de 5 muestras fecales identificadas como: C, G, J, M y T. Previo al aislamiento, todas las muestras fecales fueron enriquecidas utilizando medio líquido 7NQ anaeróbico durante 7 días, posteriormente las muestras fueron usadas como inóculo para ensayar diferentes estrategias de aislamiento. Estrategias evaluadas: **(A)** cultivos en medios sólidos definidos suplementados con quercetina: Se sembraron las muestras C y J en los medios sólidos definidos TSA, MRS, y 11 suplementados con quercetina, mediante roll tube modificado. Las colonias obtenidas fueron evaluadas en su capacidad de biotransformación inicialmente en medio sólido y finalmente en medio líquido. **(B)** Cultivos en medios líquidos con quercetina. Se sembraron las muestras C y J en medio líquido 7NQ, 11Q y Medio que contenía distintos azúcares (fructosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa 10mM), los tubos que presentaron biotransformación de quercetina fueron evaluados posteriormente en medio sólido. **(C)** Diluciones sucesivas en medio líquido 7NQ: Las muestras C y G fueron sometidas a pases sucesivos utilizando medio líquido 7NQ con dos pH 7.2 y 6.7, en cada caso se seleccionó el último pase donde se evidenció la biotransformación de quercetina. Posteriormente, se realizaron siembras utilizando una placa de 24 pozos con medios definidos suplementados con quercetina. PC, N, TSA, BHI, OM y EM diluidos 1/10 usando como medio base 7N, aquellos pozos en los que se obtuvo crecimiento fueron verificados en medio líquido. Aquellas muestras que presentaron capacidad de transformar quercetina se aislaron por agotamiento en el medio rico del que provenían con quercetina y se evaluó el potencial de transformar quercetina en medio sólido y posteriormente en medio líquido. **(D)** Cultivo en medio líquido 11 y 11M: se sembraron las muestras C, G, M y T en medio líquido 11 y 11M en pH 6.7 y 7.2 y se realizaron diluciones sucesivas 10^{-1} - 10^{-12} , seleccionando las últimas dos diluciones donde se observó crecimiento por turbidez, y se realizó un estudio preliminar de la biotransformación de la quercetina en medio líquido. Aquellas muestras que mostraron potencial para transformar quercetina se sometieron a un primer y segundo proceso de purificación en medio líquido, en cada paso se verificó su capacidad de biotransformar quercetina en medio líquido. Las muestras seleccionadas se aislaron mediante las técnicas de roll tube y por agotamiento en medio sólido 11 y 11M. Todos los aislados seleccionados se conservaron en glicerol anaeróbico al 40% a -20°C y se criopreservaron en nitrógeno líquido, posterior a su conservación se realizó curaduría de las cepas verificando su viabilidad y capacidad de biotransformación de quercetina. Adicionalmente, las cepas fueron **identificadas** mediante secuenciación del gen ADNr 16s

Figura 2-1 . Estrategias utilizadas para aislar bacterias anaerobias de la microbiota intestinal humana colombiana, con capacidad de transformar quercetina.

2.1 Resultados

2.1.1 Selección de microorganismos transformadores de quercetina

Se realizó el seguimiento visual de las fermentaciones *in vitro* de las cinco muestras de heces fecales, provenientes de individuos colombianos que seguían una dieta vegana, identificadas con las letras **C**, **G**, **J**, **M** y **T.**, hasta que se evidenció la biotransformación de la quercetina, por el cambio de color en el frasco de amarillo a transparente como se muestra en la Figura 2-2. Las cuales fueron usadas como inóculos para evaluar las diferentes estrategias de aislamiento.

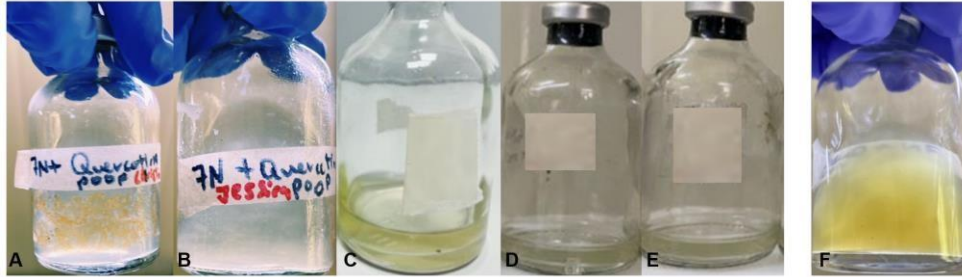


Figura 2-2 Fermentaciones *in vitro* en medio mínimo líquido anaerobio 7N con quercetina (0,25 mg/mL). A. Muestra C. B. Muestra J. D. Muestra G. E. Muestra M. E. Muestra T. F. Control abiótico: medio 7NQ. Incubado a 37°C por 7 días

2.1.2 Evaluación de estrategias de aislamiento de microorganismos de la microbiota intestinal humana con potencial de biotransformación de quercetina

Se evaluaron cuatro técnicas diferentes: cultivos en medio sólido con quercetina (2.2.2.1), cultivos en medio líquido 7N con diferentes azúcares y quercetina (2.2.2.2), diluciones sucesivas en medio líquido 7N con quercetina (2.2.2.3.) y diluciones sucesivas en medio líquido 11 y 11M (2.2.2.4).

2.1.2.1 Estrategia I: cultivos en medio sólido con quercetina

Para el aislamiento de microorganismos anaerobios con potencial de biotransformación de quercetina en esta primera estrategia se usó el método de tubos de ensayo de Hungate (Hungate, 1969) modificado en frascos schott de 100 mL con diferentes medios de cultivo con quercetina Figura 2-3., en la Tabla 2-1., se muestran los resultados obtenidos tras incubación, para las dos suspensiones fecales evaluadas.

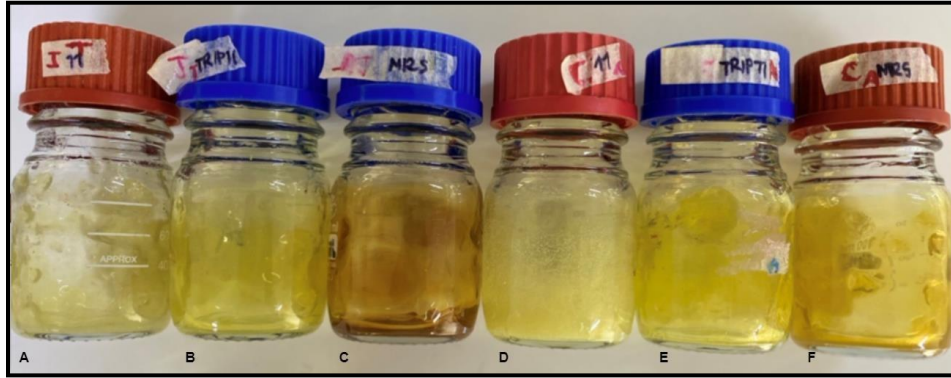


Figura 2-3 Cultivo sólido modificado técnica roll tube (Hungate, 1969). Muestra suspensión fecal J en tres medios de cultivo: A. 11. B. Tripticasa soya. C. MRS. Muestra suspensión fecal con biotransformación de quercetina C en tres medios de cultivo: D. 11. E. Tripticasa soya. F. MRS. Incubado a 37°C por 7 días en condiciones de anaerobiosis.

Tabla 2-1 Crecimiento de la microbiota intestinal humana en diferentes medios de cultivo sólido método de tubos Hungate modificado.

Muestras	Medio Sólido con quercetina (0,25%)					
	MRS	Halo*	TS	Halo*	11	Halo*
J	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

Halo*: Se refiere a un halo visible alrededor de las colonias que presentan capacidad de biotransformación de la quercetina. (+): Presencia de colonias. (-): Ausencia de colonias. **MRS:** desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe. **TS:** Tripticasa de soya.

Para la muestra J, no se obtuvo crecimiento de bacterias con potencial de biotransformación de quercetina en ninguno de los tres medios evaluados. Para la muestra C, se observó crecimiento en MRS y medio 11, con diferentes morfotipos. En el agar MRS, se aislaron colonias blancas uniformes y cremosas, mientras que en el medio 11 se aislaron colonias blancas puntiformes más pequeñas. Adicionalmente, No se observaron halos alrededor de las colonias en ninguno de los dos casos, indicando la ausencia de biotransformación de quercetina, al comparar los aislados con el halo descrito en el **Anexo B**.

Las colonias aisladas en ambos medios se inocularon en medios líquidos MRS y 11 con quercetina, observando de manera visual la biotransformación de quercetina solo en el medio líquido 11. Posteriormente, se realizaron dos pases de purificación, lo que permitió aislar la cepa #1 con colonias blancas cremosas grandes y la cepa #2 con colonias pequeñas puntiformes. Sin embargo, las pruebas de biotransformación de quercetina demostraron que ninguna de las dos cepas transformó quercetina como se observa Figura 2-4 (B) y (C), donde se observó la precipitación de quercetina en el fondo de los tubos, por lo cual se descartaron.

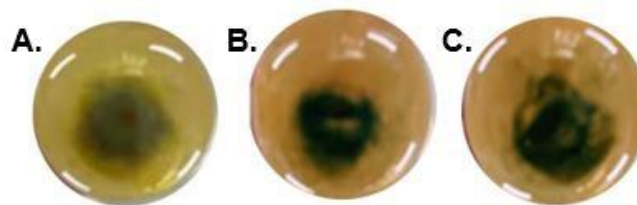


Figura 2-4 Evaluación de la biotransformación de quercetina en medio líquido 11 con quercetina 0,25%. 7 días de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. A. Control abiótico de quercetina. B. Cepa #1. C. Cepa #2.

2.1.2.2 Estrategia II: cultivos en medios líquidos con diferentes azúcares y quercetina

Como segunda estrategia, para el aislamiento de microorganismos anaerobios con potencial de biotransformación de quercetina a partir de las muestras C y J se probaron diferentes medios líquidos anaerobios con quercetina: medio mínimo 7N, medio 11, y un medio con diferentes azúcares (fructosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa 10mM).

Para el medio líquido 7NQ, se seleccionaron los tubos de la suspensión fecal inoculados con la muestra J y C, en donde se evidenció el potencial de biotransformación de la quercetina, Figura 2-5 I. (B.) y (C.). Para el medio 11 con quercetina, las muestras J y C, no presentaron capacidad de transformar quercetina, Figura 2-5 II. (B.) y (C.). Para el medio con diferentes azúcares solo se seleccionó el tubo de la suspensión fecal inoculado con la muestra C, en donde se evidenció el potencial de biotransformación de la quercetina, Figura 2-5 III. (C.) Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10, 10^0 y 10^{-1} , en los medios de cultivo de donde provenían las muestras, sin embargo, las colonias que se aislaron no mostraron halos asociados a la biotransformación de quercetina por lo cual fueron descartados

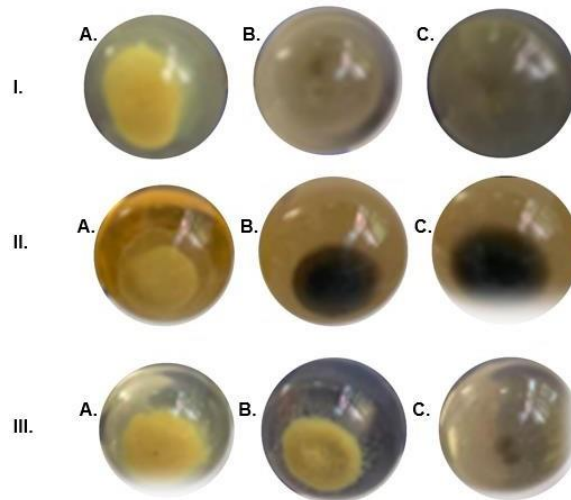


Figura 2-5 Evaluación de la biotransformación de quercetina en diferentes medios líquidos anaerobios con quercetina por las muestras J y C. I. Medio líquido 7NQ. II. Medio líquido 11 con quercetina. III. Medio líquido azúcares: fructosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa (10mM) con quercetina. A. Controles abióticos de los distintos medios. B. hace referencia a las muestras inoculadas con la suspensión fecal de J. C. hace referencia a las muestras inoculadas con la suspensión fecal de C.

2.1.2.3 Estrategia III: diluciones sucesivas en medio líquido 7N con quercetina

Como tercera estrategia, para el aislamiento de microorganismos anaerobios con potencial de biotransformación de quercetina se realizaron diluciones sucesivas en medio líquido anaerobio 7NQ a pH 7.2 y 6.7 a partir de dos muestras C y G. Los resultados obtenidos se describen en la Figura 2-6.

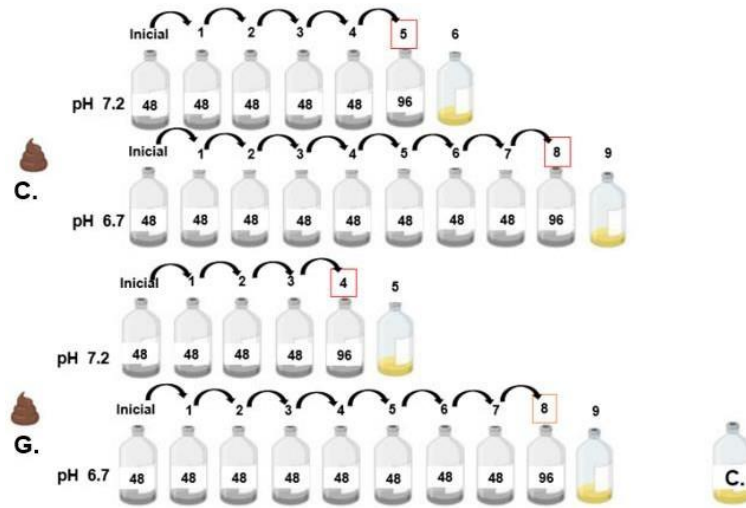


Figura 2-6 Diluciones sucesivas entre 48 y 96 horas de 2 muestras fecales humanas: C. y G. en dos niveles de pH: 7.2 y 6.7 tras fermentación por la microbiota intestinal humana. C. Control abiótico de quercetina. Frasco gris: Perdida de color = Biotransformación de quercetina. Frasco amarillo: sin Perdida de color = sin biotransformación de quercetina

Para la muestra C se seleccionaron las suspensiones fecales del frasco 5 con pH 7.2 y el frasco 8 con pH 6.7. Para la muestra G se seleccionaron el frasco 4 con pH 7.2 y el frasco 8 con pH 6.7, por ser los últimos pases sucesivos en los que se obtuvo biotransformación de quercetina como se describe en la Figura 2-6. Los frascos seleccionados por cada muestra fueron usados como inóculos para evaluar el crecimiento en diferentes medios de cultivo.

2.1.2.3.1 Crecimiento en medios de cultivo sólido y estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

A partir de las suspensiones fecales seleccionadas anteriormente se realizaron cultivos en diferentes medios sólidos diluidos 1/10, usando como medio base 7NQ. Se obtuvo crecimiento en todos los aislados de la muestra G y C como se describe en la Tabla 2-2 y Figura 2-7(A). El estudio preliminar visual de la biotransformación de la quercetina Figura 2-7 (B) permitió seleccionar para la muestra C a pH 6.7 los medios Nutritivo, Oat MEal, Extracto Malta y Luria Bertani. Para la muestra G, se evidenció biotransformación a pH 7,2 en los medios Infusión cerebro corazón y Oat Meal, y a pH 6,7 en los medios Nutritivo, Infusión cerebro corazón, Oat Meal y Luria Bertani Tabla 2-2 y Figura 2-7. Se llevó a cabo un segundo ensayo preliminar visual para verificar la capacidad de biotransformación de quercetina, para la muestra C, se determinó la capacidad de biotransformación en el medio Luria Bertani a pH 6.7. y para la muestra G, en los medios Infusión cerebro corazón a pH 6.7 y 7.2. Posteriormente se realizaron aislamientos en medio sólido.

Tabla 2-2 Crecimiento de la microbiota intestinal humana muestra C y G con potencial de biotransformación de quercetina en diferentes medios de cultivos sólidos (1/10) * a diferente pH (7.2 y 6.7) y verificación visual de biotransformación de quercetina en medio líquido mínimo anaerobio 7NQ, a diferente pH (7.2 y 6.7).

Muestra	Medio cultivo*	Medio Sólido		Medio líquido	
		C pH 7.2	C pH 6.7	BioQ pH 7.2	BioQ pH 6.7
C	Plate Count	+	+	-	-
	Nutritivo	+	+	-	+

	Tripticasa Soya	+	+	-	-
	BHI	+	+	-	-
	Oatmeal	+	+	-	+
	Extracto Malta	+	+	-	+
	LB	+	+	-	+
	Plate Count	+	+	-	-
	Nutritivo	+	+	-	+
G	Tripticasa Soya	+	+	-	-
	BHI	+	+	+	+
	Oatmeal	+	+	+	+
	Extracto Malta	+	+	-	-
	LB	+	+	-	+

Abreviaciones: C: Crecimiento **BioQ:** Biotransformación de Quercetina. (+): Biotransformación. (-): Sin Biotransformación. **Q:** Quercetina. (*) Medio cultivo diluido 1/10.

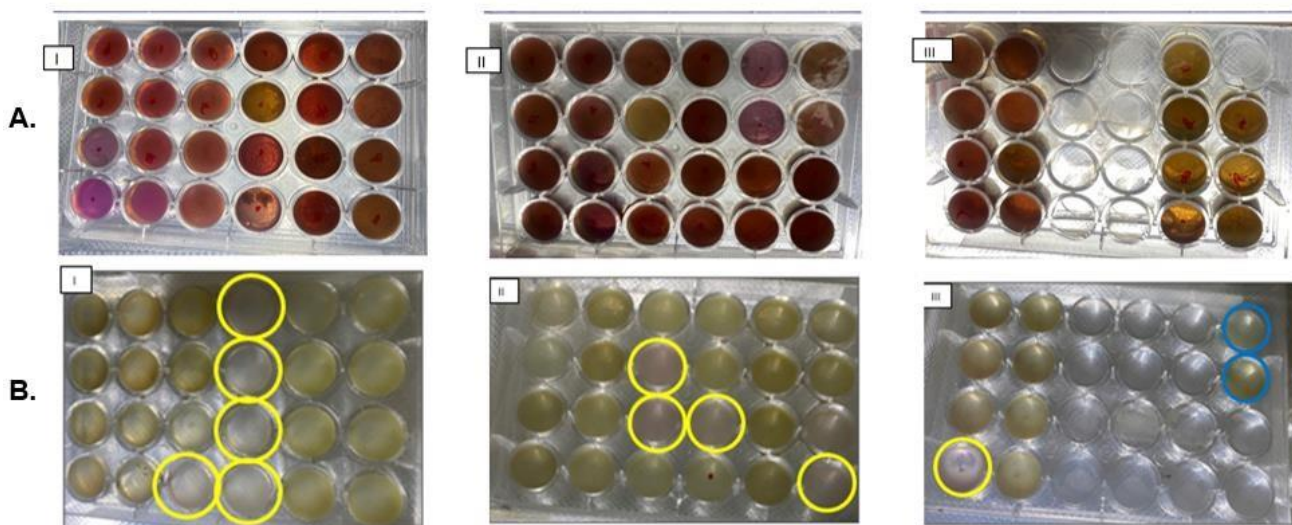


Figura 2-7 A. Enriquecimiento Medios sólidos 1/10 base 7NQ, a partir de Muestras: C. y G. en dos niveles de pH: 7.2 y 6.7 Incubados a 37°C por 7 días en condiciones de anaerobiosis. B. Estudio preliminar de la biotransformación de quercetina a partir de colonias aisladas en medios solidos de las fermentaciones de las muestras C. y G. en dos niveles de pH: 7.2 y 6.7. círculo amarillo: Pérdida de color = Biotransformación de quercetina. Círculo azul: control abiótico de quercetina en pH 7.2 y 6.7

2.1.2.3.2 Aislamiento de microorganismos en medio sólido

Se realizaron aislamientos en los medios de cultivo sólido con quercetina, del cual provenían las muestras con potencial de biotransformación de quercetina. Sólo el que provenía de la muestra G en pH 6.7 en medio Infusión cerebro corazón con quercetina presentó halos asociados a la biotransformación (Figura 2-8). De los demás aislamientos realizados se lograron recuperar 11

morfotipos diferentes a loscuales se les realizó coloración de Gram, las características microscópicas se encuentran descritas en el **Anexo C**. Los aislados se conservaron en glicerol anaeróbico al 20% en -20°C. Adicionalmente se crioconservaron en nitrógeno líquido. Se realizó una segunda comprobación de biotransformación de quercetina. Para la muestra C, se determinó la capacidad de biotransformación de la muestra en el medio Luria Bertani a pH 6.7. Para la muestra G se determinó la capacidad de biotransformación en el medio Infusión cerebro corazón en pH 6.7.

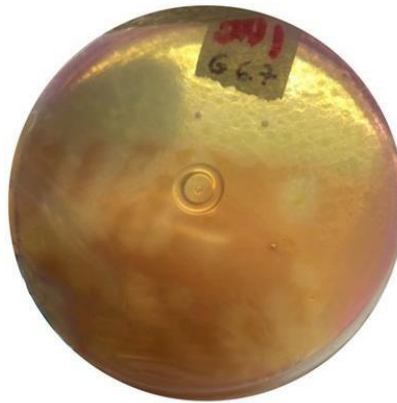


Figura 2-8 Aislamiento muestra G Medio Sólido 1/10 BHI medio base 7NQ.

2.1.2.3.3 Estudio de la biotransformación visual de quercetina

Para comprobar la capacidad de biotransformación de quercetina de las diferentes cepas aisladas se realizaron dos ensayos independientes de biotransformación visual de quercetina. En el primero se seleccionaron las cepas BTQ06III y BTQ07III(Figura 2-9) por su capacidad de transformar quercetina, lo cual se corroboró en el segundo ensayo, donde la cepa BTQ06III y BTQ07III, mostraron capacidad de biotransformación de quercetina (Figura 2-10), no se observó el precipitado amarillo característico de la quercetina en el fondo del tubo.

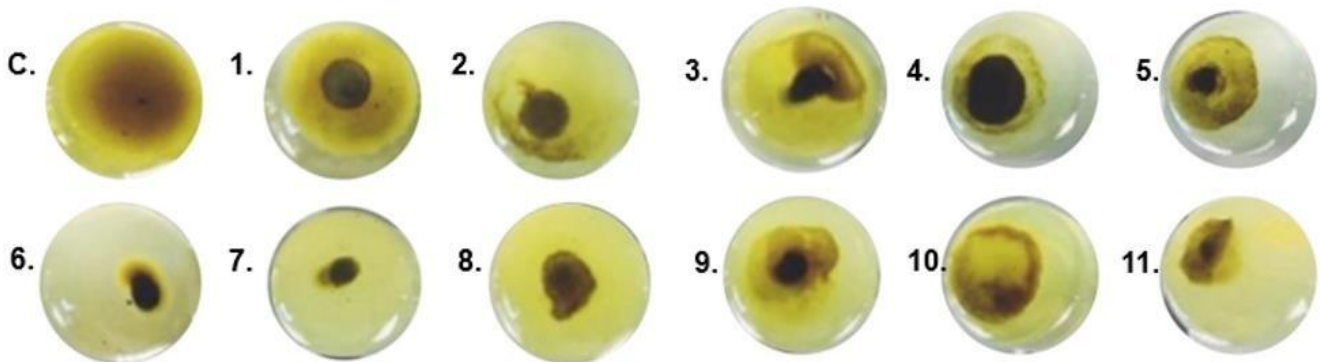


Figura 2-9 Primera verificación de biotransformación visual de quercetina a partir de las 11 cepas aisladas con potencial de biotransformación de quercetina. 1. cepa #1. 2 cepa #2. 3. cepa #3. 4. cepa #4. 5. cepa #5. 6. BTQ06III. 7. BTQ07III. 8. cepa #8. 9. Cepa#9. 10. Cepa #10. 11. Cepa #11. C. control abiótico de quercetina. Medio líquido anaerobio 7NQ, incubadas a 37°C por 72 horas.

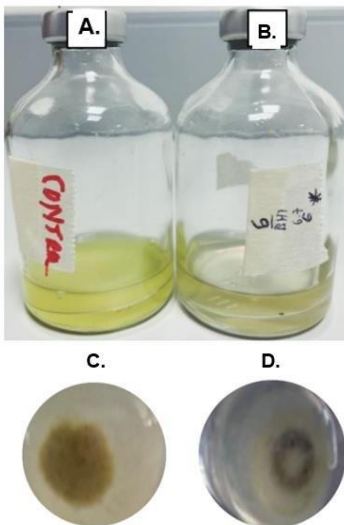


Figura 2-10 verificación visual de biotransformación de quercetina de las 11 cepas aisladas con potencial de biotransformación de quercetina. A y C. Controles abióticos medio 7N con quercetina. B. BTQ06III. D. BTQ07III. Fermentaciones fecales en medio líquido anaerobio 7N con quercetina, incubado a 37°C por 7 días.

2.1.2.4 Estrategia IV: cultivos en medio líquido 11 y 11 modificado con quercetina

Como última estrategia, para el aislamiento de microorganismos anaerobios con potencial de biotransformar quercetina se usó medio líquido anaerobio 11 y 11M a pH 7.2 y 6.7 que permitieran aislar bacterias anaerobias con capacidad de biotransformar quercetina a partir de cuatro muestras fecales identificadas como: C, G, M y T.

2.1.2.4.1 Crecimiento en medios de cultivo líquido 11 y 11M

Como resultado del crecimiento en el medio líquido 11 y 11M, se seleccionaron las últimas dos diluciones consecutivas, donde se observó crecimiento bacteriano por turbidez para cada una de las muestras evaluadas, como se describe en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3 Determinación del crecimiento bacteriano de las muestras evaluadas: C, G, M y T, por turbidez en medio líquido 11 y 11M a pH 7.2 y 6.7. Incubado a 37°C por 72 horas.

Medio Líquido	Id Muestra	pH	CRECIMIENTO BACTERIANO TURBIDEZ MEDIO DE CULTIVO											
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
11	C	6.7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	G	6.7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	M	6.7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	T	6.7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11 MODIFICADO	C	6.7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	G	6.7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	M	6.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	T	6.7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		7.2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Abreviaciones. Id: Identificación de la muestra. (+): Turbidez = crecimiento. (-) Sin turbidez = sin crecimiento.

2.1.2.4.2 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

De las últimas dos diluciones seleccionadas para cada una de las muestras evaluadas se realizó un estudio preliminar visual de la biotransformación de la quercetina, que permitió seleccionar de la muestra **G** en medio 11M la dilución 10⁻⁴ con pH 7.2, y de la muestra **T** en medio 11 para la dilución 10⁻⁶ con pH 7.2, como se muestra en la Tabla 2-4, debido a que fueron las únicas muestras en las que se logró evidenciar visualmente la desaparición de la quercetina (Figura 2-11).

Tabla 2-4 Verificación visual de la biotransformación de quercetina. Diluciones en medio líquido anaerobio 7NQ de las muestras evaluadas: C, G, M y T por triplicado en los medios: 11 y 11M a pH 6.7 y 7.2. Incubado a 37°C por 72 horas.

Medio líquido	Id Muestra	pH	VERIFICACIÓN VISUAL DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE QUERCETINA MEDIO LÍQUIDO 7NQ								
			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹			
11	C	6.7				-	-	-	-	-	
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G	6.7				-	-	-	-	-	
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M	6.7		-	-	-	-	-	-	-	
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T	6.7				+	+	+	-	-	-
		7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11 MODIFICADO	C	6.7				-	-	-	-	-
			7.2	-	-	-	-	-	-	-	-
		G	6.7		-	-	-	-	-	-	-
			7.2	+	+	+	-	-	-	-	-
M		6.7						-	-	-	-
		7.2						-	-	-	-
T		6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7.2						-	-	-	-

Abreviaciones: Id: identificación de la muestra. (+): Biotransformación de quercetina. (-): Sin Biotransformación quercetina.

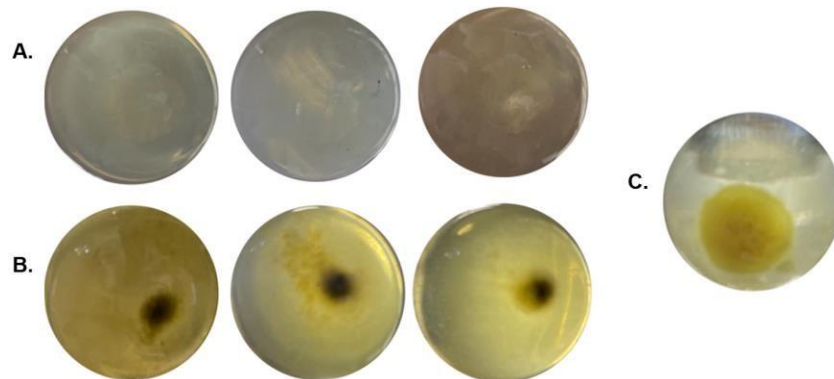


Figura 2-11 Muestras seleccionadas con capacidad de biotransformar quercetina en medio líquido anaerobio 7NQ. A. Muestra G en medio 11M dilución 10⁻⁴ con pH 7.2. por triplicado. B. Muestra T en medio 11 dilución 10⁻⁶ con pH 7.2. por triplicado. C. Control abiótico medio líquido anaerobio 7NQ, incubado a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis.

2.1.2.4.3 Purificación parcial de microorganismos en medio líquido 11 y 11 modificado

Como resultado de la primera purificación de microorganismos en medio líquido 11 y 11M a pH 7.2 y 6,7 se seleccionaron las dos últimas diluciones donde se obtuvo crecimiento bacteriano por turbidez. Para la muestra T en medio 11 con pH 6.7 se seleccionaron las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y para la muestra G en medio 11M en pH 7.2 las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} . A estas diluciones seleccionadas, se les realizó un estudio preliminar visual de la biotransformación de la quercetina, que permitió seleccionar para la muestra T las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y para la muestra G, se seleccionó únicamente la dilución 10^{-7} . Posteriormente se realizó una segunda purificación de las muestras seleccionadas anteriormente en medio líquido 11 y 11M a pH 7.2 y 6,7 seleccionando las dos últimas diluciones donde se obtuvo crecimiento bacteriano por turbidez. Para la muestra T en medio 11 con pH 6.7 y para la muestra G en medio 11M en pH 7.2 se seleccionaron las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} . Estas diluciones seleccionadas se les realizó un estudio preliminar visual de la biotransformación de la quercetina, que permitió seleccionar tanto para la muestra T (Figura 2-12) como G (Figura 2-13) las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} por su capacidad detransformar quercetina.

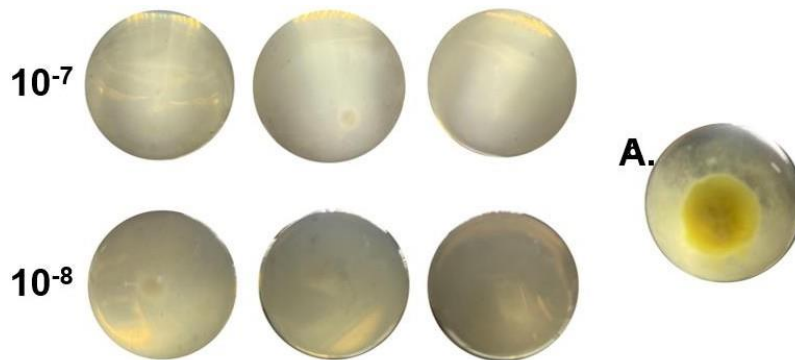


Figura 2-12 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina a partir de la segunda purificación en medio líquido 7NQ para la Muestra T. Dilución 10^{-7} con pH 6.7 por triplicado. Dilución 10^{-8} con pH 6.7 por triplicado. A. Control abiótico de medio 7NQ. Incubado a 37°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

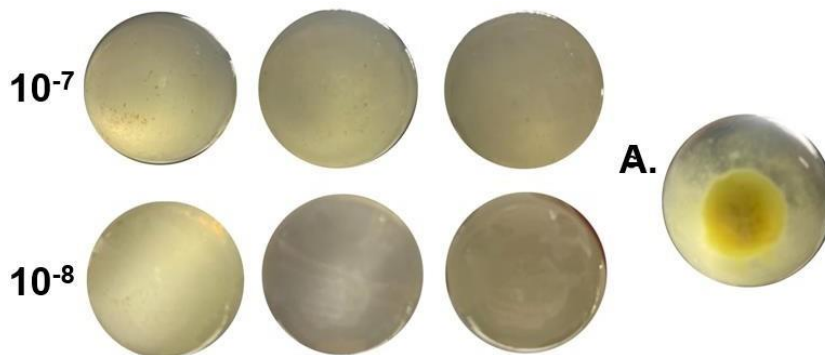


Figura 2-13 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina a partir de la segunda purificación en medio líquido 7NQ para la Muestra G. Dilución 10^{-7} con pH 6.7 por triplicado. Dilución 10^{-8} con pH 6.7 por triplicado. A. Control abiótico de medio 7NQ. Incubado a 37°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

2.1.2.4.4 Aislamiento de microorganismos mediante técnica Roll Tube.

De las últimas dos diluciones seleccionadas para las dos muestras evaluadas, se realizó aislamiento en medio sólido, mediante la técnica roll tube. Para la muestra G en dilución 10^{-8} se pudieron diferenciar 3 morfotipos diferentes, los cuales se aislaron por siembra por agotamiento en medio 11M con quercetina, hasta que se obtuvieron dos tipos de colonias aisladas identificadas como: 11M G 8.1.1 Figura 2-14 (A), y 11M G 8.1.2 Figura 2-14 (B), a las cuales se les realizó coloración de Gram, observando bacilos Gram positivos Figura 2-14 (C) y bacilos Gram negativos Figura 2-14 (D) respectivamente.

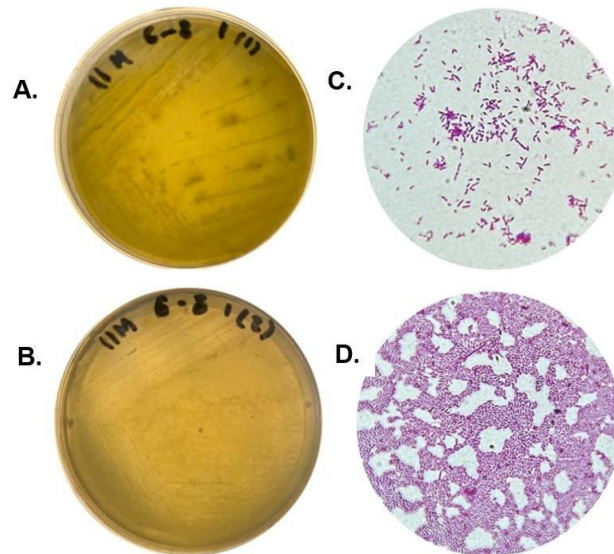


Figura 2-14 Aislamiento de microorganismos con potencial capacidad de transformar quercetina. Muestra G en medio 11M sólido con quercetina para la dilución 10^{-8} . A. Colonia aislada 11M G 8.1.1. B. Colonia aislada 11M G 8.1.2. Microscopia (100x) tinción de Gram: C. Aislado 11MG 8.1.1: Bacilos Gram positivos. D. 11M G 8.1.2: Bacilos Gram Negativos. Incubado a 37°C por 72 horas en anaerobiosis.

Para la muestra T no se observaron colonias ni turbidez en ninguna de las dos diluciones evaluadas, por lo cual se tomó con jeringa estéril de 1 mL muestra de la última dilución obtenida del estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina (segunda purificación en medio líquido dilución 10^{-8}) y se sembró por agotamiento en medio sólido 11 con quercetina, se realizaron siembras por agotamiento en medio 11M con quercetina, hasta que se obtuvo una colonia aislada identificada como: T11BTQ Figura 2-15 (A) a la cual se le realizó coloración de Gram, observando bacilos Gram negativos Figura 2-15 (B)

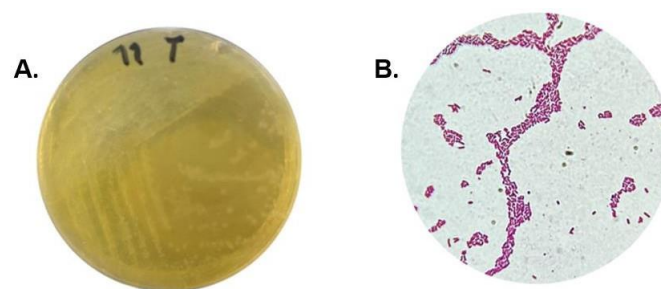


Figura 2-15 Aislamiento de microorganismos con potencial capacidad de transformar quercetina. Muestra T en medio 11 sólido con quercetina para la dilución 10^{-8} . A. Colonia aislada T11BTQ. Microscopia (100x) tinción de Gram. B. Aislado T11BTQ: Bacilos Gram negativos Incubado a 37°C por 72 horas en anaerobiosis.

2.1.2.4.5 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina

A partir de las cepas seleccionadas anteriormente, se tomó una colonia aislada de cada una y se inoculó en medio líquido 11 para los morfotipos de la muestra T, y medio líquido 11M para los diferentes morfotipos aislados de la cepa G. Se incubaron a 37°C por 48 horas, posteriormente se realizaron laminas en fresco observando Bacilos con diferentes morfologías como se muestra en la Figura 2-16. Para la cepa aislada a partir de la muestra T: T11BTQ Figura 2-16 (A) Bacilos cortos y pequeños. Para las cepas aisladas de la muestra G. 8.1.1: Bacilos cortos delgados Figura 2-16 (B). 8.1.2: Bacilos cortos gruesos Figura 2-16 (C).

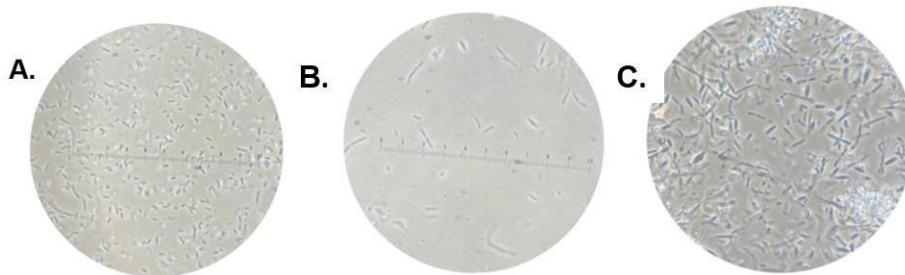


Figura 2-16 Laminas en fresco Microscopia de contraste (100X). Muestra T: A. T11BTQ: Bacilos cortos y pequeños. Muestra G. B. 8.1.1: Bacilos cortos delgados. C. 8.1.2: Bacilos cortos gruesos

Posterior a la incubación, se tomaron 200 uL de cada una de las cepas crecidas de forma individual y se realizó un estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina para las tres cepas seleccionadas anteriormente. Se prepararon tubos Hungate con 2 mL de medio mínimo líquido anaeróbico 7NQ y se preparó un control abiótico de quercetina. Se incubó a 37°C por 72 horas y como se observa en la Figura 2-17, se logró determinar la capacidad de biotransformación de quercetina para BTQ11IV Figura 2-17 (A) y BTQ8.1.2IV Figura 2-17 (C), al observar la desaparición del color amarillo, característico de la quercetina, insoluble en el fondo de los tubos, comparado con el control abiótico del medio 7NQ (Figura 2-17 B y D)

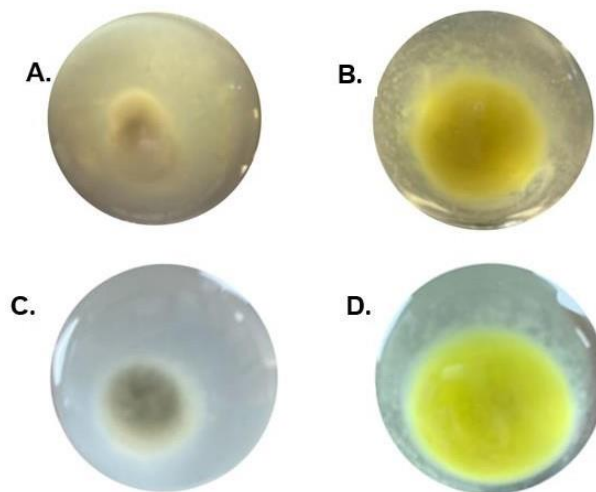


Figura 2-17 Estudio preliminar visual de la biotransformación de quercetina en medio líquido 7NQ. A. Cepa T11BQI B. Control abiótico medio 7NQ. C. Cepa 8.1.2. D. Control abiótico medio 7NQ. Incubado a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis

2.1.3 Estudio de la biotransformación visual de quercetina

De las diferentes estrategias evaluadas fue posible aislar y seleccionar cuatro cepas por presentar potencial capacidad de transformar quercetina, las cepas: BTQ06III, BTQ07III, BTQ11IV y BTQ8.1.2.IV. Se conservaron 5 viales de cada una en glicerol anaerobio al 20% a -20°C, y en nitrógeno líquido. Las cepas se salvaguardaron en el laboratorio de investigación del Biocentro de la Universidad de la Sabana. A partir de los dos ensayos realizados para determinar la capacidad de biotransformación de quercetina, se seleccionaron la BTQ11IV y BTQ8.1.2.IV por su capacidad de biotransformación de quercetina (Tabla 2-5).

Tabla 2-5 Verificación visual de la biotransformación de quercetina de las cepas seleccionadas: #6, #7, cepa A, cepa B I en medio líquido anaerobio 7NQ. Incubado a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis.

Id Cepa	Verificación visual Biotransformación de quercetina medio líquido 7NQ					
	Ensayo I			Ensayo II		
BTQ06III	-	-	-	-	-	-
BTQ07III	-	-	-	-	-	-
BTQ11IV	+	+	+	+	+	+
BTQ8.1.2IV	+	+	+	+	+	+

Abreviaciones: Id: identificación de la muestra. (+): Biotransformación de quercetina. (-): Sin Biotransformación quercetina.

Debido a los resultados obtenidos en las diferentes estrategias evaluadas, las cepas BTQ11IV y BTQ8.1.2.IV fueron seleccionadas para determinar parámetros cinéticos e identificación molecular mediante gen ADNr 16S.

Tabla 2-6 Comparación de las diferentes estrategias usadas en el aislamiento de bacterias de la microbiota intestinal humana con capacidad de transformar quercetina.

Estrategias aislamiento bacterias anaerobias microbiota intestinal humana				
	I	II	III	IV
Metodología	Cultivo en medios sólidos	Cultivos en medio líquido	Diluciones sucesivas hasta extinción	Crecimiento en medio rico líquido
Medios de cultivo	MRSQ 11Q	7NQ 11Q	7NQ	11 11 M
Crecimiento en medios ricos	No	No	Si - diluidos 1/10 7NQ Plate count, Nutritivo, Tripticasa Soya, Infusión Cerebro Corazón, OatMeal, Extracto de Malta, Luria-Bertani	Si líquido con pH 6.7 y 7.2
Verificación de transformación quercetina en medio sólido	Si pH 7.2	Si pH 7.2	Si con pH 6.7 y 7.2	Si con pH 6.7 y 7.2
Número de Aislados	0	0	10	2
Aislamiento en medio sólido	No Aplica	No Aplica	1	No Aplica
Verificación preliminar de biotransformación quercetina en medio líquido	No Aplica	SI	Si con pH 6.7 y 7.2	No Aplica
Número de Aislados	No Aplica	2	3	2
Purificación medio líquido I	No Aplica	No Aplica	No Aplica	Si con pH 6.7 y 7.2
Verificación preliminar de biotransformación quercetina en medio líquido	No Aplica	No Aplica	No Aplica	si con pH 6.7 y 7.2
Número de Aislados	No Aplica	No Aplica	No Aplica	3
Purificación medio líquido II	No Aplica	No Aplica	No Aplica	Si con pH 6.7 y 7.2
Verificación preliminar de biotransformación quercetina en medio líquido	No Aplica	No Aplica	No Aplica	Si con pH 6.7 y 7.2
Número de Aislados	No Aplica	No Aplica	No Aplica	4
Aislamiento Roll Tube	No Aplica	No Aplica	No Aplica	si
No de Aislados	No Aplica	No Aplica	No Aplica	3 Roll Tube
Verificación biotransformación quercetina en medio líquido	No Aplica	0	2	2
Total, Cepas transformadoras quercetina aislados	0	0	0	2

2.1.4 Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas

Según los datos obtenidos de OD y UFC/mL, se determinaron las cinéticas crecimiento para la cepa BTQ11IV Figura 2-18 y cepa BTQ8.1.2.IV Figura 2-19., a partir de las cuales se seleccionó el tiempo requerido para alcanzarla fase exponencial para cada una de las cepas. Posteriormente se estimaron los parámetros de crecimiento microbiano y se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), según la ecuación 1 (Muloiwa et al., 2020), donde X_1 y X_2 son concentración de biomasa, y $t_2 - t_1$ intervalo de tiempo utilizado para medir la biomasa. Una vez determinada la velocidad de crecimiento específica se estimó el tiempo de generación (g), el cual se puede definir como el tiempo que tarda en duplicarse la población calculado a partir de la ecuación 2. (Begot et al., 1996).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{(t_2 - t_1)}$$

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento (μ).

$$g = 0,693/\mu$$

Ecuación 2. tiempo de generación

Determinando, una velocidad específica de crecimiento, $\mu = 0,51 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de generación de $1,36 \text{ h}^{-1}$ para la cepa BTQ11IV y una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de generación de $4,62 \text{ h}^{-1}$ para la cepa BTQ8.1.2.IV.

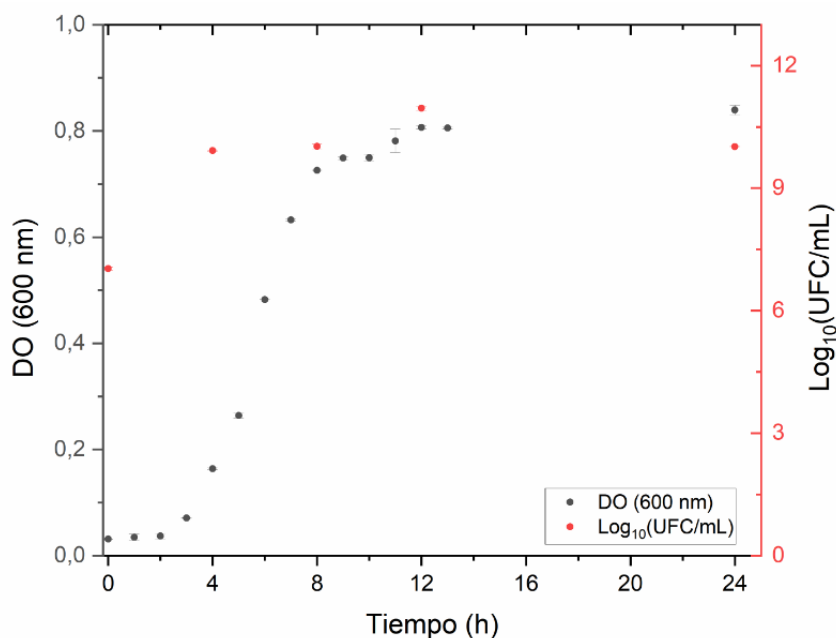


Figura 2-18 Cinéticas de crecimiento. A. Cepa BTQ11IV fase exponencial (2-8 horas). Fase estacionaria (8-24 horas). Cada punto corresponde a la media de tres mediciones del dato y las barras de error \pm desviación estándar.

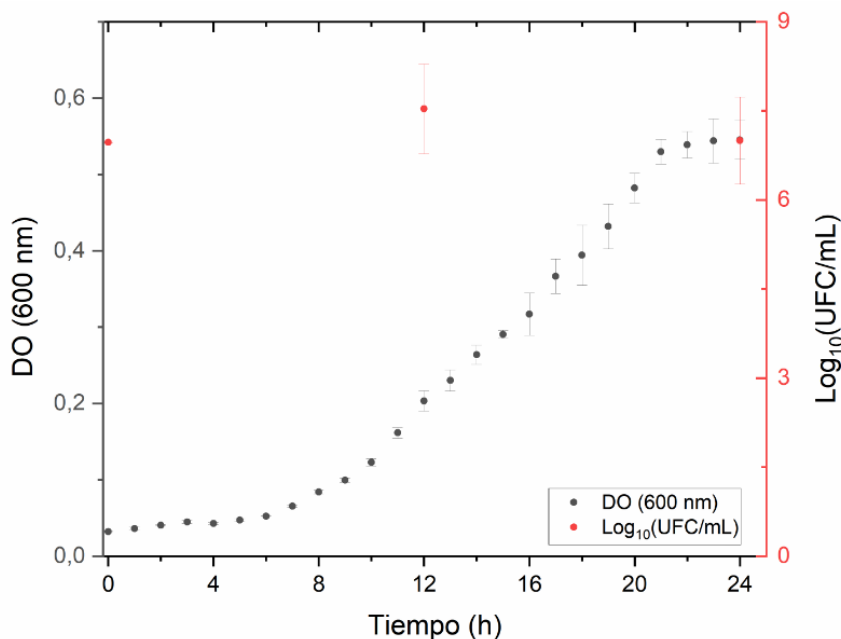


Figura 2-19 Cinéticas de crecimiento. BTQ8.1.2.IV., fase exponencial (7-21 horas). Fase estacionaria (21 -24 horas). Cada punto corresponde a la media de tres mediciones del dato y las barras de error \pm desviación estándar.

2.1.5 Identificación Molecular

Se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas BTQ11IV y BTQ8.1.2.IV y posteriormente se realizó la amplificación mediante *PCR*. Obteniendo fragmentos de ADN de aproximadamente 1400 pb. Figura 2-20 Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar en el servicio de secuenciación del Laboratorio Azenta (EE.UU), y posteriormente se verificó la identidad de las secuencias obtenidas utilizando NCBI Blastn (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>), con un 100% de identidad con *Shigella flexneri* para la cepa A., y con un 99% de identidad con *Enterocloster citroniae* para la cepa B.

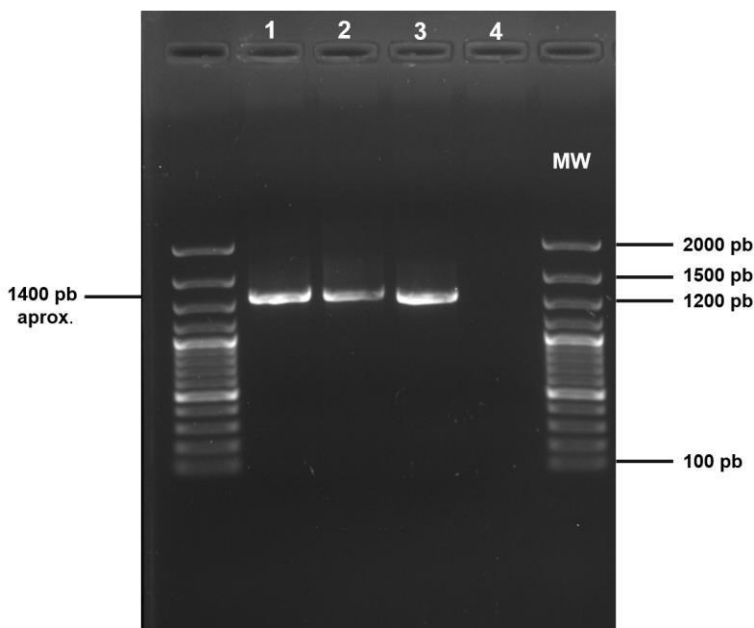


Figura 2-20 Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de amplificación para el gen ADNr 16s. Carril #1: cepa T11BQII. Carril #2: cepa 8.1.2. Carril #3: Control positivo – ADN *Azospirillum* sp. Carril #4: control negativo.

2.2 Discusión

Este estudio utilizó muestras fecales de individuos colombianos que seguían una dieta vegana para aumentar las probabilidades de aislar microorganismos capaces de transformar flavonoides. Investigaciones previas han demostrado que la dieta desempeña un papel fundamental en la configuración de la composición de la microbiota intestinal (Rinninella et al., 2019; Singh et al., 2017). Las dietas basadas en plantas, como las veganas y vegetarianas, modifican la microbiota intestinal humana debido a su alto contenido de fibra (carbohidratos no digeribles de origen vegetal) y compuestos polifenólicos, que se encuentran en abundancia en una amplia variedad de frutas y verduras (Al-Ishaq et al., 2021; Braune & Blaut, 2016; Duda-Chodak et al., 2015; Riva et al., 2020; Sankaranarayanan et al., 2021), y sirven como sustratos para la microbiota intestinal. Adicionalmente, La quercetina fue elegida para este estudio debido a su prevalencia en la dieta humana como uno de los flavonoides más consumidos (Dhanya, 2022). Además, su forma aglicona es amarilla, lo que facilita la verificación visual durante la fermentación *in vitro*, el metabolismo bacteriano provoca la desaparición de su color amarillo característico en el fondo del tubo (Rodríguez-Castaño et al., 2019). Así mismo, la forma aglicona de la quercetina elimina la posibilidad de enriquecer la microbiota acompañante a través de la escisión de enlaces glucosídicos y la utilización de azúcares, evitando así el enriquecimiento de microbiota no deseada.

Uno de los desafíos en el aislamiento de bacterias anaeróbicas capaces de biotransformar flavonoides es que estos compuestos polifenólicos no pueden ser utilizados como la única fuente de carbono o nitrógeno, lo que dificulta la aplicación de presión selectiva al usarlos como únicos componentes en el medio de cultivo. Por lo tanto, se debieron diseñar diversas estrategias de cultivo para aislar bacterias anaeróbicas de la microbiota intestinal humana capaces de biotransformar quercetina. (Tabla 2-6).

Inicialmente, se evaluó una modificación de la técnica de roll tube de Hungate, la cual es reconocida por ser una de las técnicas más utilizadas para obtener cultivos puros de microorganismos anaerobios. Esta técnica se fundamenta en la formación de una fina capa de agar inoculado, el cual se adhiere a las paredes del tubo, donde la fase gaseosa es anaerobia y durante el crecimiento, las colonias se hacen visibles en el agar, y posteriormente se colectan y se cultivan (Hungate, 1969). Para este estudio en particular, el procedimiento permitió recuperar diferentes tipos de colonias de bacterias anaerobias, sin embargo, al probar su capacidad de biotransformar este flavonoide en medio sólido, no se evidenciaron halos asociados a la biotransformación. Debido a este resultado, se exploraron otras alternativas.

La segunda estrategia consistió en usar un medio líquido mínimo con quercetina y diferentes azúcares en baja concentración (10 mM), que inicialmente permitieran el desarrollo de las bacterias presentes en la muestra y posteriormente exponer la capacidad de biotransformación de estas frente a la quercetina. Para esta estrategia se evaluó la biotransformación de este flavonoide de la misma manera que se realizó para la primera estrategia (Tabla 2-6), usando medio sólido con quercetina, pero tampoco se observaron halos asociados a la biotransformación. La aparente ausencia de halos asociados a la biotransformación podría atribuirse al desafío inherente del uso de medios sólidos para aislar y evaluar procesos metabólicos de microorganismos estrictamente anaerobios. Una de las dificultades principales radica en la lenta tasa de crecimiento de estos microorganismos y la complejidad de mantener una atmósfera anaeróbica adecuada, ya que las placas no son lo suficientemente herméticas y el agar puede secarse rápidamente afectando el crecimiento óptimo de los microorganismos (Hanišáková et al., 2022).

Por lo anterior, para la tercera y cuarta estrategia, se optó por realizar los cultivos en medios líquidos (Tabla 2-6). Estos por un lado facilitan el acceso de los microorganismos a los nutrientes en comparación a los medios sólidos (Bonnet et al., 2020). Además, permiten el uso de recipientes de cultivo con sellado hermético, asegurando una atmósfera libre de oxígeno. Esta elección se respalda en estudios previos que han demostrado que estas condiciones son propicias para aislar microorganismos anaerobios estrictos (Wagner et al., 2019). Este cambio estratégico buscaba superar las limitaciones observadas en las estrategias anteriores.

Para la estrategia III se realizó el método de dilución hasta extinción en medio líquido mínimo 7NQ, lo que permitió la eliminación selectiva de la microbiota acompañante en la muestra, hasta que los microorganismos deseados fueran los únicos presentes (Hanišáková et al., 2022), como lo expusieron Kita et al., (2016), quienes usaron un método de diluciones sucesivas, hasta cuatro pases, que les permitió aislar y caracterizar un metanógeno acetoclástico halotolerante. En contraste, para la estrategia IV se realizaron diluciones en medios ricos 11 y 11M, sin realizar pases sucesivos, lo que pudo contribuir a la proliferación y por ende abundancia de bacterias con la capacidad deseada de transformar quercetina en la muestra.

Adicionalmente, a la aplicación del método de dilución hasta extinción en medios líquidos, y diluciones en medio rico sin pases sucesivos, se empleó el pH como otro criterio de selección en estas estrategias. Dos niveles de pH, 6.7 y 7.2, fueron utilizados con el objetivo de simular las condiciones lumbales y de la mucosa del colon, cuyos valores en personas sanas han sido establecidos entre 5.5 – 7.5 (Nugent et al., 2001) Además, se reconoce el papel crítico del pH del colon según los resultados de estudios como los de Firrman et al., (2022); y Yamamura et al., (2023), que destacan su influencia selectiva sobre la microbiota intestinal.

Las dos últimas estrategias evaluadas permitieron aislar bacterias con potencial de biotransformación de quercetina. Sin embargo, tras el proceso de conservación, y posterior verificación de la capacidad de biotransformar quercetina, las cepas aisladas en la estrategia III no presentaron esta capacidad, lo cual podría atribuirse a condiciones específicas durante el proceso de conservación, donde la baja cantidad inicial de microorganismos podrían haber afectado la viabilidad y por ende la capacidad de recuperación de las cepas. En contraste, en la IV estrategia, los microorganismos biotransformadores fueron más abundantes, al provenir de medios ricos, lo que les pudo permitir una mayor capacidad de recuperación después del proceso de conservación (Tedeschi & De Paoli, 2011). Esta observación destaca la importancia de realizar un enriquecimiento inicial antes de la conservación de estas bacterias anaerobias.

La combinación de estos criterios de selección usados en la estrategia IV, permitió el aislamiento de dos bacterias capaces de biotransformar quercetina, a las cuales inicialmente, se le determinó las cinéticas de crecimiento y posteriormente se realizó la comparación de las secuencias del gen ADNr 16s de cada una de las cepas, demostrando que la cepa BTQ11IV pertenece a *Shigella flexneri* (100% de similitud con la cepa *S. flexneri* ATCC 29903), y la cepa BTQ8.1.2.IV a *Enterocloster citroniae* (99% de similitud con la cepa *E. citroniae* RMA 16102).

E. citroniae se encuentra clasificado en el filo Firmicutes dentro de la familia *Lachnospiraceae*, antes conocida como el grupo *Clostridium coccoides* o *Clostridium* cluster XIVa, el cual fue clasificado recientemente como *Enterocloster* gen. nov., y la especie, como *Enterocloster citroniae* comb. nov (Haas & Blanchard, 2020). Aunque no se encontraron reportes en la literatura sobre su capacidad para biotransformar quercetina, un estudio realizado por Iglesias-Aguirre et al., (2023) aisló con éxito una nueva bacteria de las heces de una mujer, identificada como *Enterocloster bolteae*. Este estudio demostró la capacidad de esta nueva cepa y sus parientes más cercanos, *Enterocloster asparagiformis* DSM 15670T y *E. citroniae* DSM 19261T, para producir metabolitos bioactivos urolitina A y urolitina B. Estos compuestos se derivan del metabolismo de un intermediario, urolitina M5, de Ácido elálgico: un compuesto polifenólico que se encuentra en una variedad de frutas y nueces, como fresas, arándanos, nueces y pistachos. Estas observaciones, combinadas con información conocida sobre algunas especies de la familia *Lachnospiraceae*, como *Butyrivibrio* spp., capaces de transformar la quercetina escindiendo el anillo C de este flavonoide (Cortés-Martín et al., 2020; Luca et al., 2020) , y *Blautia* spp., que pueden metabolizar flavonoides del grupo de los flavonol mediante reacciones de desmetilación, produciendo compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Cortés-Martín et al., 2020; Zhao et al., 2022), sugieren la capacidad potencial de *E. citroniae* para biotransformar distintos flavonoides.

Shigella flexneri se encuentra clasificada en el filo Proteobacteria dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Ortega-Madueño et al., 2022)., aunque los reportes sobre el potencial de *S. flexneri* para metabolizar quercetina u otros tipos de flavonoides es limitada, un estudio de Riva et al. (2020) proporcionó evidencia de que la familia *Enterobacteriaceae* puede biotransformar la rutina (quercetina-3-O-rutinósido), la forma glicosilada de la quercetina, en quercetina-3- glucósido. Además, un estudio de Z. Zhang et al., (2014) aisló bacterias de heces humanas capaces de transformar la quercetina; una cepa de *E. coli* transformó el 6,19% de quercetina presente en el medio evaluado. Dado que *E. coli* y *Shigella* spp. son especies bacterianas estrechamente relacionadas (Fukushima et al., 2002), *S. flexneri* puede compartir esta capacidad de biotransformación.

El aislamiento e identificación de estas dos cepas bacterianas sugiere que el proceso de biotransformación de quercetina por la microbiota intestinal humana no se limita exclusivamente a las especies clásicas reportadas en la literatura, como *E. ramulus* y *F. plautii* (Blaut et al., 2003; Braune et

al., 2001; Ulbrich et al., 2015) sino que existen otros microorganismos importantes, que aún no han sido estudiados.

2.3 Conclusiones

Este estudio evidenció la complejidad de aislar bacterias anaerobias capaces de biotransformar flavonoides. A pesar de implementar cuatro estrategias de aislamiento distintas, solo se logró obtener dos cepas con actividad biotransformadora de flavonoides. Además, estas estrategias permitieron aislar por primera vez especies bacterianas con capacidad de biotransformar quercetina, capacidad que no había sido reportada hasta la fecha y según nuestro conocimiento. Estos hallazgos aportan nueva información sobre la diversidad de las bacterias de la microbiota intestinal humana colombiana y su metabolismo, abriendo nuevas posibilidades para futuras investigaciones en el campo de la biotransformación de compuestos polifenólicos.

3 Capítulo 2: Diseño de un consorcio artificial de microorganismos con capacidad de biotransformación de flavonoides.

3.1 Metodología

3.1.1 Prueba de antagonismo de las cepas seleccionadas para el diseño del consorcio artificial con capacidad de biotransformación de quercetina y otros flavonoides

Para el diseño del consorcio microbiano con capacidad de biotransformación de quercetina, se establecieron inicialmente pruebas de actividad biológica para evaluar que no existiera inhibición entre las cepas mediante prueba de antagonismo. Para ello, se tomó un vial de cada una de las cepas a evaluar, que se encontraban conservadas en glicerol anaerobio 20% a -20°C, y con una jeringa estéril se tomaron 300 uL de cada una de las cepas, se inocularon en 3 mL de medio líquido 11M para *E. citroniae* y 11 para *S. flexneri*, se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones anaerobiosis.

Los cultivos de 48 horas preparados anteriormente de la cepa *E. citroniae* y *S. flexneri* se centrifugaron a 14.000 g por 15 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se recogieron las células, las cuales se lavaron dos veces con 3 mL de PBS anaeróbico estéril y posteriormente se ajustó al tubo 0.5 de la escala de McFarland, a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL (Balouiri et al., 2016; Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008). Este proceso se realizó para cada una de las cepas, y fue usado como inóculo en cada uno de los ensayos realizados para determinar: I) la actividad antagonista entre *E. citroniae* y *S. flexneri*, y II) la actividad antimicrobiana de un extracto de cacao rico en polifenoles frente a *E.citroniae* y *S. flexneri*.

3.1.1.1 Pruebas de actividad antagonismo

Se realizó el método de difusión de disco de agar propuesto por Balouiri et al., 2016, como prueba de antagonismo entre *E. citroniae* y *S. flexneri*. Para esto se tomó el inóculo de cada una de las cepas preparado anteriormente, adicionando 50 uL en medio sólido 11M y 11 para *E. citroniae* y *S. flexneri* respectivamente, y con un hisopo estéril se homogenizó la muestra, para obtener un crecimiento masivo de cada una de las cepas a evaluar, se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación, en condiciones de anaerobiosis y asépticamente, se cortaron discos de agar de 4 mm de diámetro, tanto para *E. citroniae* como para *S. flexneri*. Los discos de agar de *E. citroniae* se depositaron sobre la superficie de una caja con agar 11 inoculada previamente con 50 uL del inóculo de *S. flexneri*. Y los discos de agar de la cepa *S. flexneri* se depositaron sobre la superficie de una caja con agar 11M inoculada previamente con 50 uL del inóculo de la cepa *E. citroniae*. Todas las cajas se incubaron a 37°C por 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis. La actividad antagónica de las cepas se evaluó por la aparición de una zona de inhibición alrededor del disco de agar (Bnfaga et al., 2023; Pagliarulo et al., 2016; Sierra-Zapata et al., 2020). Se realizaron dos ensayos independientes cada uno por triplicado.

3.1.1.2 Pruebas de actividad antimicrobiana del extracto de cacao rico en polifenoles

Para evaluar el efecto inhibitor del extracto de cacao rico en polifenoles, se llevó a cabo el método de difusión en agar, propuesto por Bauer et al., (1966). A partir de un liofilizado de un extracto de cacao

rico en polifenoles (250 mg/g), donado por Samuel Quiroz et al., (2024 sometido), en el cual se identificaron diferentes polifenoles entre los que se incluyen quercetina en su forma aglicona y formas glucosadas (isoquercetina, quercetina 3-galactósido, quercetina-3-O-pentosilo, quercetina-3-O-xilosa), (-)-epicatequina, (+)-catequina, así como sus formas oligoméricas y poliméricas, las procianidina B1 y C1 (**Anexo D**). Para esto se pesó 1,0 g extracto de cacao rico en polifenoles y se llevó a un volumen final de 20 mL con agua destilada estéril en balón aforado, para obtener una concentración final de 50 mg/mL. Se dejó en agitación constante en frasco ámbar. Hasta su homogenización, se esterilizó por autoclave a 121°C por 20 minutos y se dejó en agitación constante hasta enfriar. Posteriormente se prepararon diferentes concentraciones: 5, 10, 15 y 20 mg/mL, y se impregnaron 20 uL de cada una de las concentraciones preparadas del extracto de cacao rico en polifenoles en discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman estéril (Vambe et al., 2018), obteniendo concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg/disco, los cuales se dejaron secar durante 24 horas a 28°C en condiciones estériles antes de su uso.

Posteriormente, se tomó el inóculo de cada una de las cepas preparado anteriormente, adicionando 50 uL en medio sólido 11M y 11 para *E. citroniae* y *S. flexneri* respectivamente, y con hisopo estéril se homogenizó la muestra, para obtener un crecimiento masivo de cada una de las cepas a evaluar. En condiciones de anaerobiosis y asépticamente, usando pinzas estériles, se extendieron sobre la superficie de agar 11 y 11M inoculados con *E. citroniae* y *S. flexneri* respectivamente, los discos impregnados con 20 uL de cada una de las concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles preparadas anteriormente, para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto sobre las cepas. Se utilizó agua destilada estéril (20 uL/disco) como control negativo. Las cajas se incubaron a 37°C por 48 - 72 horas bajo condiciones de anaerobiosis. La actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles se evaluó por la aparición de una zona de inhibición alrededor del papel filtro (Pagliarulo et al., 2016). Se realizaron dos ensayos independientes cada uno por triplicado.

3.1.2 Diseño de un consorcio artificial microbiano con capacidad de biotransformación de flavonoides

Para el diseño del consorcio artificial microbiano con capacidad de biotransformación de flavonoides, se tuvieron en cuenta las condiciones de cinética de crecimiento determinadas anteriormente, que no existiera interacción antagónica entre *E. citroniae* y *S. flexneri*, ni presentaran inhibición frente al extracto de cacao rico en polifenoles y se realizaron dos ensayos independientes: I.) Se usó medio líquido anaerobio 7NQ (0.25 mg/mL) para determinar la biotransformación de quercetina y la producción de metabolitos. II.) Se usó medio líquido 7N con extracto de cacao rico en polifenoles (7NECRP) (0,5 mg/mL) para evaluar la biotransformación de otros flavonoides presentes en el extracto de cacao rico en polifenoles, el cual se realizó de forma cualitativa.

Para esto, se preparó un consorcio variando la proporción del inóculo inicial, de *E. citroniae* y *S. flexneri* a partir de inóculos preparados al 0,1% ($DO_{600\text{ nm}}$) aproximadamente $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, para cada cepa. Las mezclas se realizaron en tubos Hungate con 2 mL de medio líquido anaerobio 7NQ para el ensayo I) y 7NERPC para el ensayo II.), como se describe en la Tabla 3-1. Todo el proceso se llevó a cabo en cámara de anaerobiosis. Las muestras se incubaron a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación se homogenizaron las muestras con agitador *vortex* por aproximadamente 10 segundos y se tomaron 500 uL de cada una de las muestras a las 72 horas. En cada tiempo de medición se fueron descartando los tubos de forma independiente para cada mezcla del consorcio evaluado y las cepas individuales. Adicionalmente, se prepararon diferentes controles para los ensayos. Control abiótico: medio anaerobio 7NQ sin inoculación bacteriana para el ensayo I) y medio anaerobio

7NERPC sin inoculación bacteriana para el ensayo II); control del medio de cultivo: medio anaerobio 7N sin quercetina ni extracto de cacao rico en polifenoles y adicionalmente se preparó medio 7N sin quercetina ni extracto de cacao rico en polifenoles inoculado con cada una de las cepas evaluadas (*E. citroniae* y *S. flexneri*). Estos controles fueron incubados bajo las mismas condiciones, y tras incubación, se tomaron 500 uL a las 0 y 72 horas. En cada tiempo de medición se fueron descartando los tubos de forma independiente para cada control.

Las muestras obtenidas después de la fermentación *in vitro*, y las muestras de los controles para los dos ensayos, se sometieron a un proceso previo de extracción como se describe en el numeral 3.1.4. para su posterior análisis por HPLC-PDA.

Tabla 3-1 Consorcio artificial preparado variando la proporción del inóculo inicial de las cepas *E. citroniae* y *S. flexneri* (7 Log₁₀ UFC/mL). En 2 mL de medio líquido anaerobio 7NQ (0,25mg/mL) y 2 mL de medio

Proporción inicial de inóculo Consortio artificial	Identificación	Volumen Inoculado (µL)	
		<i>S. flexneri</i>	<i>E. citroniae</i>
<i>S. flexneri</i> 100%	<i>S. flexneri</i>	200	0
<i>E. citroniae</i> 100%	<i>E. citroniae</i>	200	0
<i>S. flexneri</i> 25% - <i>E. citroniae</i> 75%	Consortio 1	50	150
<i>S. flexneri</i> 75% - <i>E. citroniae</i> 25%	Consortio 2	150	50
<i>S. flexneri</i> 50% - <i>E. citroniae</i> 50%	Consortio 3	100	100

3.1.3 Fermentaciones *in vitro* del consorcio para la evaluación de biotransformación de quercetina y producción de metabolitos

Se tomó un vial de cada una de las cepas bacterianas, *E. citroniae* y *S. flexneri*, conservadas en glicerol anaerobio al 20%, y con una jeringa estéril se tomaron 300 uL de cada una de las cepas y se inocularon en 3 mL de medio líquido 11M y 11 en tubos Hungate para *E. citroniae* y *S. flexneri* respectivamente. Se incubó a 37°C por 16 horas en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación se determinó la absorbancia por triplicado del pre-inóculo y se preparó un inóculo con una concentración final de 0,1% en un volumen de 5 mL en medio líquido 11M y 11 para *E. citroniae* y *S. flexneri* respectivamente, obteniendo una concentración inicial aproximada de 7 log₁₀ (UFC/mL) para cada una de las cepas. Se inocularon 200 uL con jeringa estéril de cada uno de los inóculos preparados anteriormente en tubos Hungate con 2 mL de medio líquido anaerobio 7NQ. Se incubó a 37°C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis. Tras incubación se homogenizó la muestra con agitador *vortex* por aproximadamente 10 segundos y con jeringa estéril se tomaron 500 uL del sobrenadante de los tubos Hungate preparados anteriormente de manera independiente, a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas para cada una de las cepas. Como controles del ensayo se preparó un control abiótico: medio anaerobio 7NQ sin inoculación bacteriana, control del medio de cultivo: medio anaerobio 7N sin quercetina y adicionalmente se preparó medio 7N sin quercetina inoculado con cada una de las cepas evaluadas. Se incubaron en las mismas condiciones, y se tomaron 500 uL con jeringa estéril en tubos independientes a las 0 y 72 horas para cada control. Se realizaron dos ensayos independientes cada uno por triplicado. Las muestras obtenidas de los sobrenadantes tras fermentación *in vitro* y los controles del ensayo se sometieron a un proceso de extracción (sección 3.1.4) para su posterior análisis por HPLC-PDA.

3.1.4 Protocolo de extracción

El proceso de extracción que se describe a continuación se realizó para todas las muestras obtenidas, para cada estándar de las curvas de calibración de quercetina y de los metabolitos evaluados, y para los controles del ensayo. Esta extracción se realizó a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas posterior al proceso de fermentación *in vitro* a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas en medio mínimo líquido 7NQ anaerobio para la cepa *E. citroniae* y *S. flexneri*.

Se llevó a cabo el procedimiento descrito por Sankaranarayanan et al., (2021), tomando 500 uL de las muestras, controles del ensayo y estándares de la curva de calibración, en un microtubo de 1,5 mL y se adicionó 1 mL de acetato de etilo (PanReac, EE. UU). Se homogenizó cada muestra con *vortex* por aproximadamente 10 segundos y se dejó en reposo por 10 minutos. Posteriormente se visualizó la formación de dos fases. Se tomó la fase orgánica, la cual se pasó a un microtubo nuevo de 1,5 mL para evaporar el solvente en concentrador de vacío de velocidad (Vacufugue plus Eppendorf) a una temperatura de 30°C por 25 minutos. Este proceso se realizó tres veces para todas las muestras. Finalmente, las muestras secas, se re suspendieron en 400 uL de la fase móvil en una relación 40:60, 240 uL ácido acético 0,5% (PanReac, EE. UU) y 160 uL acetonitrilo (PanReac, EE. UU), se homogenizaron con *vortex* por aproximadamente 10 segundos y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos, se tomaron los sobrenadantes, se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (CNW, PAÍS) para el análisis por HPLC-PDA.

3.1.5 Análisis HPLC-PDA y cuantificación de quercetina y metabolitos

Se realizó análisis HPLC-PDA para determinar la biotransformación de quercetina y la producción de metabolitos en los sobrenadantes de las muestras, tras la fermentación *in vitro* en medio mínimo 7NQ. Para esto, se realizó una curva de calibración a partir de un estándar mixto con quercetina (LGC, EE. UU) y los metabolitos (LGC, EE. UU) evaluados: ácido 3,4-dihydroxibenzoico (ácido protocatéquico), ácido Benzoico, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 3,4-dihydroxifenilacético (DOPAC) y el ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico.

La curva de calibración para la quercetina y los metabolitos evaluados se determinó en un rango de concentración de 0,05 – 0,50 mg/mL. Se preparó inicialmente una solución estándar mixta pesando 10 mg de quercetina y de cada uno de los metabolitos en microbalanza (Mettler Toledo XP6), llevándolos a un volumen final de 5 mL con metanol (Merck, Alemania) en balón aforado, para obtener una concentración final de 2 mg/mL. Posteriormente se prepararon 6 concentraciones: 0,05, 0,10, 0,15, 0,25, 0,40, 0,50 mg/mL, tomando volúmenes específicos de la solución estándar mixta, llevándolos a un volumen final de 2 mL con medio mínimo 7N en balón aforado. Se realizó el proceso de extracción de las muestras para posterior análisis por HPLC-PDA (sección 3.1.4). Se evaluó la linealidad del método trazando la concentración (mg/mL) contra la respuesta del detector. Se inyectaron 10 uL de cada estándar mixto por triplicado, para cada uno de los puntos evaluados. Las curvas de calibración y las ecuaciones lineales se realizaron con el software OriginPro 2023b (learning edition).

Todas las muestras fueron analizadas en un equipo DIONEX UltiMate 3000 Photodiode Array Detector (PDA) – Thermo Scientific del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de la Sabana. El método cromatográfico utilizado fue el descrito por Sankaranarayanan et al., (2021) en donde se siguió un método isocrático para eluir los compuestos utilizando una columna Agilent ZORBAX (5µm, 4,6×150 mm) a 30 °C. La fase móvil binaria consistió en agua HPLC (PanReac, España) con ácido acético 0,5% y acetonitrilo (95:5), con un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 µL y el tiempo de corrida 40 minutos. La quercetina y los metabolitos se detectaron a una longitud de onda de 280 nm. La

cuantificación de la quercetina residual y de los metabolitos generados en las fermentaciones *in vitro*, se realizó a partir de las curvas de calibración con estándares de concentraciones conocidas de quercetina y de cada uno de los metabolitos mencionada anteriormente. Los cromatogramas se analizaron en el Software Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925. Las gráficas de las cinéticas se elaboraron con el software OriginPro 2023b (learning edition). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el Software R v4.0. Para los ensayos de las cepas individuales se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para los ensayos del consorcio se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significancia establecido fue $p < 0,05$ para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se realizaron comparaciones post hoc por pares mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

3.2 Resultados

3.2.1 Prueba de antagonismo

En este caso específico, se pudo determinar que no existe actividad inhibitoria entre las dos cepas evaluadas, ya que no se observaron halos de inhibición alrededor de los discos de agar como se puede observar en la Figura 3-1 para *E. citroniae* y en la Figura 3-2 para *S. flexneri*.

3.2.2 Actividad antimicrobiana del extracto de cacao rico en polifenoles

Se evaluó el uso de un extracto de cacao rico en polifenoles que permitiera evidenciar la capacidad de las cepas aisladas para la biotransformación de otros flavonoides, determinando que no existe actividad inhibitoria entre las diferentes concentraciones evaluadas (5,10,15 y 20 mg/disco) frente a *E. citroniae* y *S. flexneri*, ya que no se observaron halos de inhibición alrededor de los discos de papel como se puede observar en la Figura 3-3 para *E. citroniae* y Figura 3-4 para *S. flexneri*.

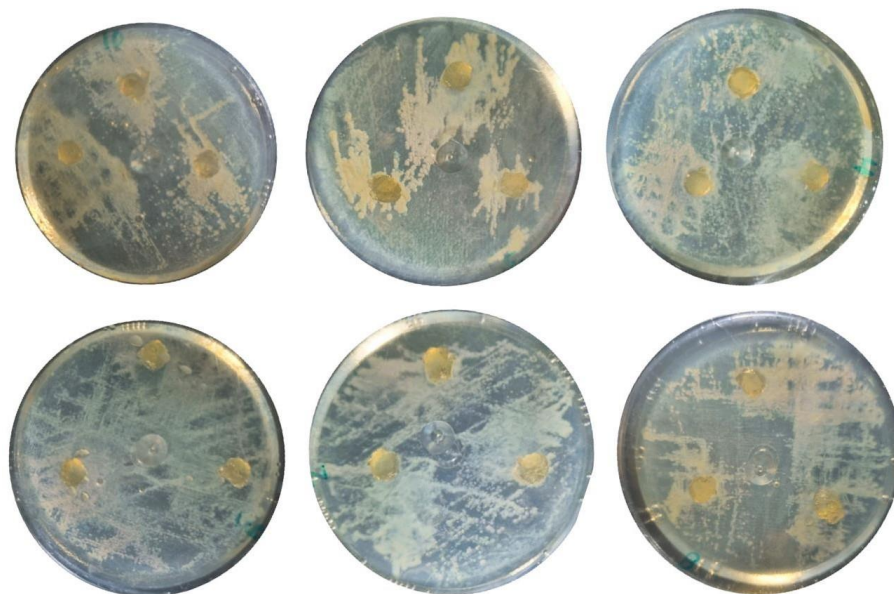


Figura 3-1 Método difusión disco de agar para determinar actividad antagonismo entre *S. flexneri* y *Enterocloster citroniae*, en medio anaerobio sólido 11 modificado inoculado con 50 μ L de *E. citroniae*, discos de agar *S. flexneri*. Dos ensayos independientes cada uno por triplicado.

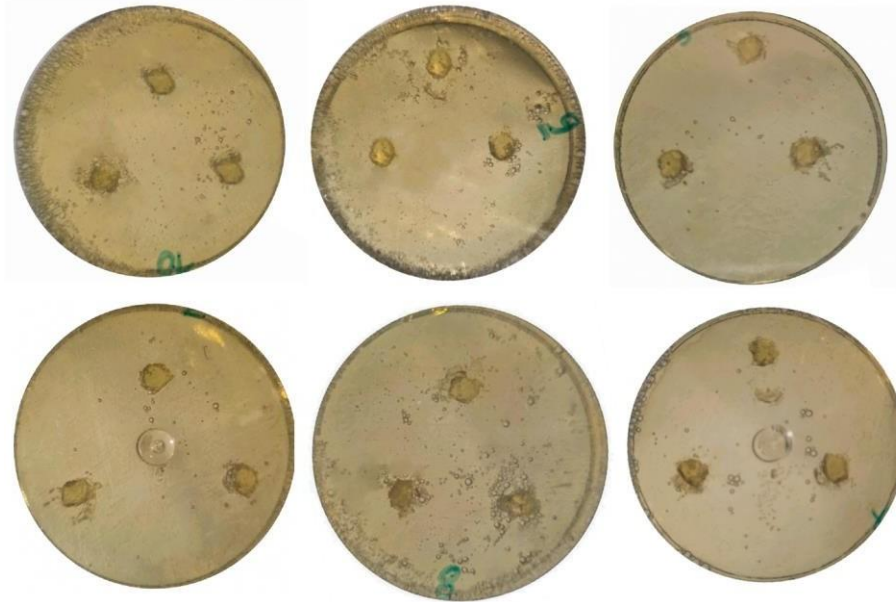


Figura 3-2 Método difusión disco de agar para determinar actividad antagonismo entre *E. citroniae* y *S. flexneri*, en medio anaerobio sólido 11 inoculado con 50 μ L de *Shigella flexneri*, discos de agar *Enterocloster citroniae*. Dos ensayos independientes cada uno por triplicado.

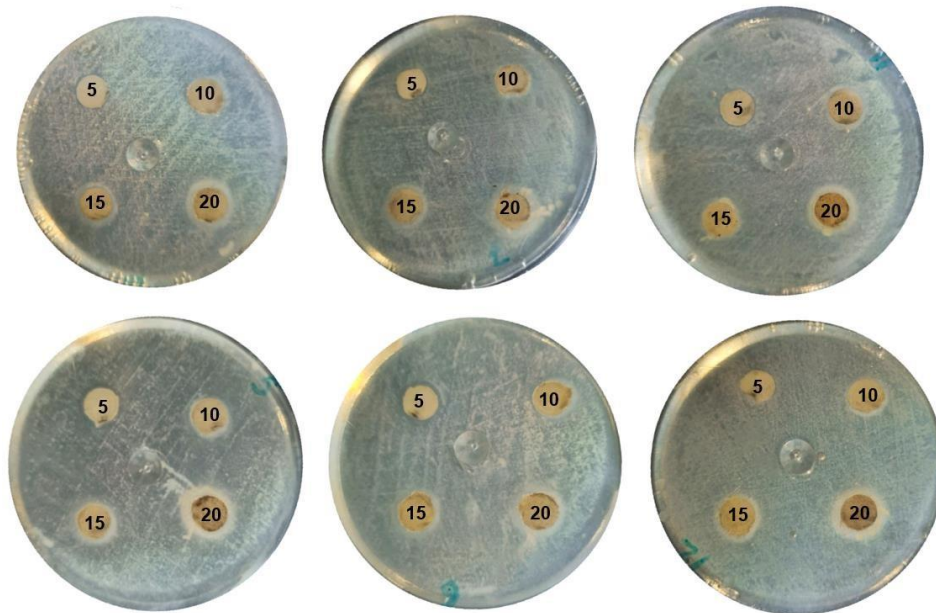


Figura 3-3 Método difusión en agar para determinar capacidad inhibitoria de las diferentes concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles: 5, 10, 15 y 20 mg/disco frente a *E. citroniae*, en medio anaerobio sólido 11M. Dos ensayos independientes cada uno por triplicado

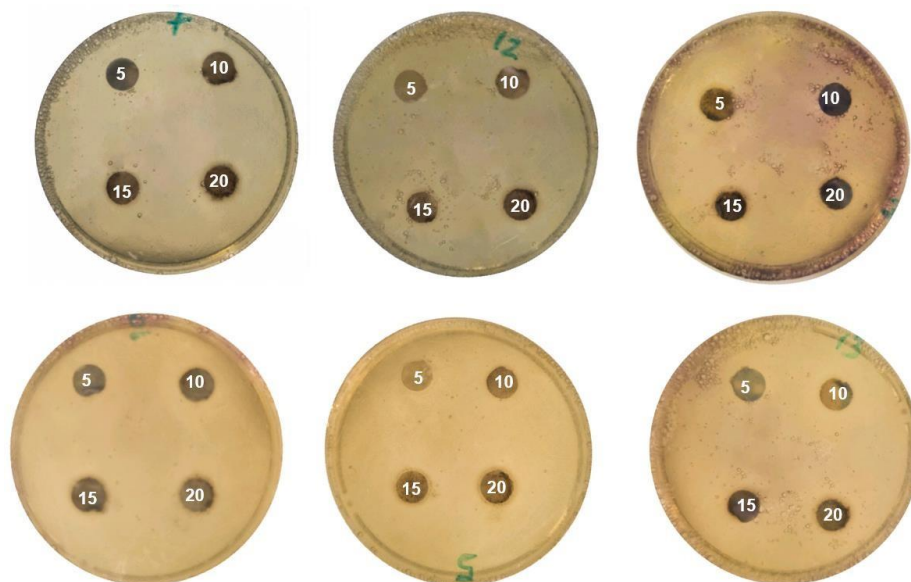


Figura 3-4 Método difusión en agar para determinar capacidad inhibitoria de las diferentes concentraciones del extracto de cacao rico en polifenoles: 5, 10, 15 y 20 mg/disco frente a *S. flexneri* en medio anaerobio sólido 11. Dos ensayos independientes cada uno por triplicado

3.2.3 Análisis por HPLC-PDA para la cuantificación de quercetina y metabolitos producidos de la biotransformación de la quercetina

3.2.1.1 Curva de calibración quercetina y metabolitos

A partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración Figura 3-5, se calcularon las concentraciones de quercetina y de los diferentes metabolitos, expresadas en mg/mL. El coeficiente de correlación de Pearson fue superior a 0,98 (Tabla 3-2), probando una fuerte correlación lineal (Schober & Schwarte, 2018). Los perfiles resultantes, obtenidos mediante análisis HPLC-PDA para la quercetina y los metabolitos, junto con sus respectivas estructuras químicas se describen en el **Anexo E**.

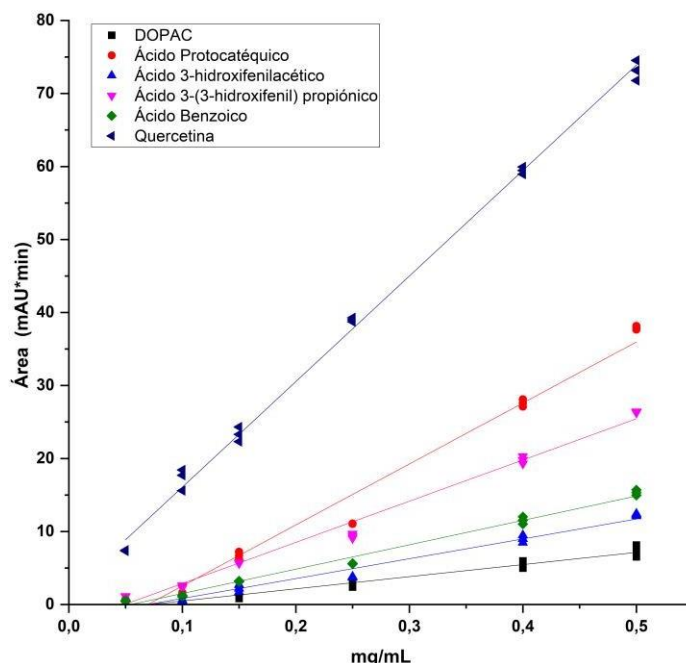


Figura 3-5 Curva de calibración para quercetina y metabolitos. Cada punto se midió por triplicado.

Tabla 3-2 Curva de calibración para quercetina y metabolitos. Tiempo de retención. Ecuaciones lineales, y coeficiente de correlación de Pearson

Compuesto	Tiempo retención (minutos)	Ecuación lineal	Pearson's r
Quercetina	28,9	$y=144,52x+1,636$	0,99805
Ácido Protocatéquico	7,10	$y= 83,53x - 5,8069$	0,98543
Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico	20,0	$y= 56,406x - 2,7664$	0,99265
Ácido Benzoico	22,6	$y= 33,366x - 1,8231$	0,99363
Ácido 3-hidroxifenilacético	15,9	$y= 27,174x - 1,8814$	0,98733
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)	9,40	$y=16,627x -1,1738$	0,98402

3.2.1.2 Cuantificación de quercetina y metabolitos producidos por las cepas de forma individual y en consorcio

Analizando los resultados obtenidos mediante HPLC-PDA, se observó inicialmente que la concentración de quercetina al comienzo de los experimentos no coincidía con la concentración prevista inicialmente de 0,25 mg/mL. Esta diferencia podría atribuirse a la limitada solubilidad de la quercetina en agua, lo que podría resultar en pérdidas al adherirse a las paredes de los tubos usados en el ensayo. Sin embargo, fue posible detectar diferentes metabolitos, DOPAC, ácido protocatéquico y ácido benzoico a partir de la biotransformación de quercetina por las cepas aisladas, *E. citroniae* y *S. flexneri*, de forma individual y en consorcio. Se determinó la cinética de biotransformación de quercetina y la producción de metabolitos para estas dos cepas como se observa en la Figura 3-6. En las cuales se puede observar la biotransformación completa de quercetina a las 24 horas por parte de estas dos cepas, *S. flexneri* (A) y *E. citroniae* (B), resaltando que existen diferencias estadísticamente significativas en la producción de los diferentes metabolitos por estas cepas en los 4 tiempos evaluados según la prueba de Mann-Whitney con comparaciones por pares mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Anexo F). Sólo para el metabolito DOPAC a las 72 horas la concentración producida por las dos cepas no presentó

diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente en el **Anexo G** se muestran los perfiles resultantes de los metabolitos por la biotransformación de la quercetina obtenidos mediante análisis HPLC-PAD para las dos cepas evaluadas.

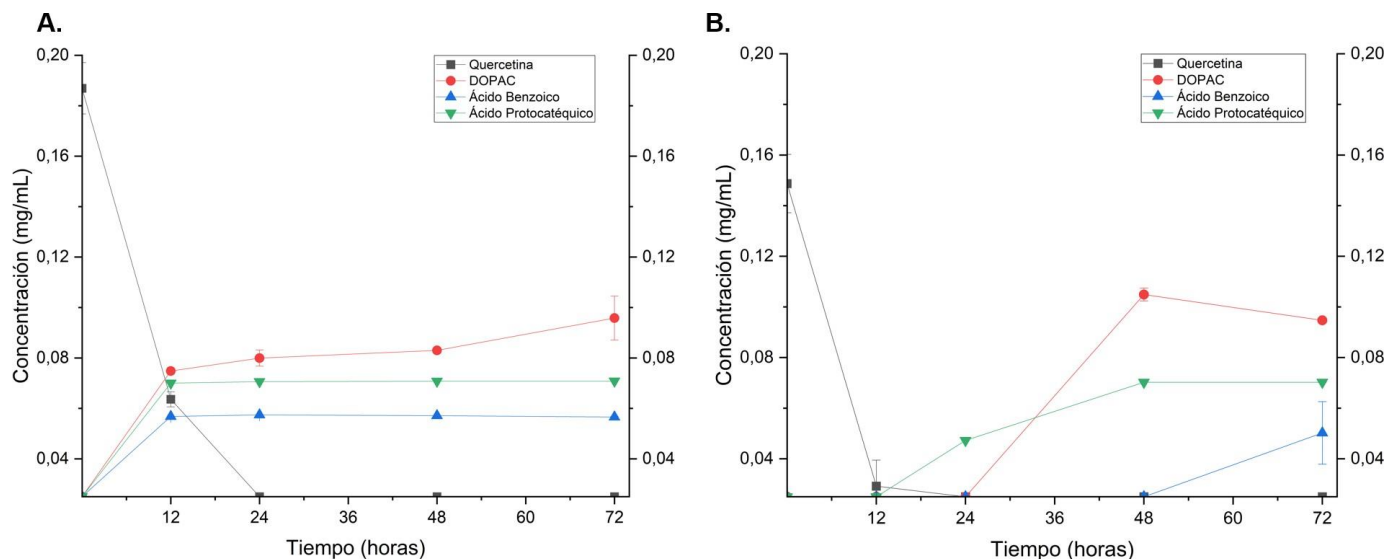


Figura 3-6 Cinética de biotransformación de quercetina en medio líquido anaerobio 7NQ durante 72 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. A. *S. flexneri*. B. *E. citroniae*. Cada punto corresponde a la media del dato y las barras de error \pm desviación estándar.

Para *S. flexneri*, se obtuvo que la producción de los diferentes metabolitos se empieza a detectar a la hora 12, generando 0,075 mg/mL de DOPAC, el cual alcanza su concentración máxima a las 72 horas con 0,096 mg/mL, mientras que el ácido benzoico y el ácido protocatéquico se mantienen en 0,057 mg/mL y 0,070 mg/mL respectivamente durante todo el proceso de fermentación.

Para el caso de *E. citroniae*, el primer metabolito detectado a las 24 horas fue el ácido protocatéquico, generando 0,047 mg/mL, el cual alcanzó su concentración máxima a las 48 horas con 0,070 mg/mL, y se mantuvo constante durante el resto del tiempo de fermentación. Posteriormente a las 48 horas, se detectó DOPAC, con una concentración máxima de 0,100 mg/mL, mientras que el ácido benzoico se detectó al final de la fermentación a las 72 horas, generando 0,050 mg/mL.

Por otro lado, no fue posible detectar la presencia del ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y ácido 3-hidroxifenilacético, por la técnica de HPLC-PDA empleados en este estudio.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los metabolitos producidos por *S. flexneri* y *E. citroniae* individuales, y en consorcio con las diferentes proporciones iniciales de inóculo se muestran en la Tabla 3-3. A partir de los resultados obtenidos de la prueba Kruskal-Wallis con comparaciones por pares mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (**Anexo H**), se logró determinar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales y los diferentes consorcios según las proporciones de inóculo inicial evaluadas en la producción de los tres metabolitos (DOPAC, ácido benzoico, ácido protocatéquico) a las 72 horas de fermentación como se describe en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3 Concentraciones de metabolitos producidos por *S. flexneri* y *E. citroniae* individuales, y en consorcio con las diferentes proporciones iniciales de inóculo evaluadas: consorcio 1: *S. flexneri* 25% - *E. citroniae* 75%), consorcio 2: *S. flexneri* 75% - *E. citroniae* 25% y consorcio 3: *S. flexneri* 50%- *E. citroniae* 50%. Tras 72 horas de fermentación en medio mínimo líquido 7NQ.

Cepa/Consortio	DOPAC (mg/mL)	Ácido Protocatéutico (mg/mL)	Ácido Benzoico (mg/mL)
<i>S. flexneri</i>	0,10 ^a	0,11 ^a	0,06
<i>E. citroniae</i>	0,09 ^a	0,06 ^b	0,05
Consortio 1 (<i>S. flexneri</i> 25% - <i>E. citroniae</i> 75%)	0,06 ^b	0,025 ^{*b}	0,025 [*]
Consortio 2 (<i>S. flexneri</i> 75% - <i>E. citroniae</i> 25%)	0,08 ^a	0,025 ^{*b}	0,05
Consortio 3 (<i>S. flexneri</i> 50%- <i>E. citroniae</i> 50%)	0,07 ^a	0,05 ^b	0,05

Valores promedio de los dos ensayos independientes cada uno por triplicado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas individuales y los diferentes consorcios evaluadas con $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis y comparaciones post hoc por pares mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. (*) 0,025 valores por debajo del límite de detección para la técnica empleada de HPLC-PDA.

Para el caso del metabolito DOPAC, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre *S. flexneri* y el consorcio 1, y *E. citroniae* con el consorcios 1. Para el caso del ácido protocatéutico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las cepas individuales *S. flexneri* y *E. citroniae*, y entre *S. flexneri* y los consorcios 1, 2 y 3. *E. citroniae* no mostro diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con los consorcios 1, 2 y 3. Finalmente para el ácido benzoico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Cabe resaltar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la producción de estos tres metabolitos para los tres consorcios evaluadas como se evidencia en la Tabla 3-3.

3.2.1.3 Evaluación de la capacidad transformadora del consorcio sobre los flavonoides presentes en el extracto ECRP

Por otro lado, los resultados obtenidos de los ensayos con el extracto de cacao rico en polifenoles a partir de la técnica empleada de HPLC-PDA, mostró de forma cualitativa, que las cepas *E. citroniae* y *S. flexneri* de forma individual, y en los diferentes consorcios según las proporciones de inóculo inicial, presentaron capacidad de transformar otros compuestos polifenólicos presentes en el ERPC, ya que al comparar los cromatogramas obtenidos tras la fermentación *in vitro* del tiempo 0 horas, con el tiempo de las 72 horas, se observaron diferencias entre las alturas de los picos de los compuestos detectados en el tiempo 0, disminución, así como aparición de nuevos picos, que permiten sugerir la producción de nuevos compuestos fenólicos de bajo peso molecular, por acción del metabolismo de estas bacterias al metabolizar el extracto de cacao rico en polifenoles. Los resultados se encuentran descritos en el **Anexo I**. Adicionalmente al comparar los cromatogramas entre las cepas de forma individual y en consorcio se lograron identificar diferencias en la biotransformación de compuestos polifenólicos.

3.3 Discusión

Considerando que el éxito de un consorcio entre diferentes microorganismos depende de la capacidad individual de cada uno de estos y de sus interacciones mutuas (Bhatia et al., 2018), se inició evaluando la presencia de actividad inhibitoria entre las dos cepas aisladas. Para ello, se implementó el método de difusión de disco de agar, una técnica ampliamente utilizada para descartar el antagonismo entre dos microorganismos (Balouiri et al., 2016) el cual ha sido reportado anteriormente, como un método eficiente para la selección de cepas bacterianas candidatas para diseñar consorcios artificiales (Mahmoud et al., 2022). Este método permite determinar si alguno de los microorganismos secreta moléculas que se difunden desde el disco de agar hacia el medio. La actividad antimicrobiana, en casode existir, se

evidenciaría por la aparición de zonas de inhibición alrededor del disco de agar (Balouiri et al., 2016). Por lo cual, al no obtener resultados negativos de interacción antagónica entre las cepas se condujo a su selección para el diseño de un consorcio artificial con capacidad de transformar flavonoides.

Por otro lado, mediante la técnica empleada de HPLC-PDA, se lograron identificar DOPAC, ácido protocatequico y ácido benzoico, resultantes de la biotransformación de la quercetina tanto por las cepas *S. flexneri* y *E. citroniae* de forma individual y en los diferentes consorcios evaluados, lo cual coincide con reportes en literatura, sobre la biotransformación de quercetina por diferentes bacterias, en donde el DOPAC es uno de los metabolitos más generados, junto con el ácido protocatequico y el ácido benzoico (Tralma et al., 2017; Makarewicz et al., 2021; Uyanga et al., 2021). Sin embargo, no fue posible detectar el ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y el ácido 3-hidroxifenilacético, lo cual se puede deber a que las cepas carecen de la capacidad metabólica para producir estos compuestos, o que los niveles producidos estaban por debajo del límite de detección de la técnica HPLC-PDA empleada en este estudio.

Adicionalmente, se determinaron las cinéticas de biotransformación de quercetina y la producción de metabolitos para estas dos cepas, como se expuso previamente. Cabe destacar que, en condiciones de cultivo, se observó un mayor crecimiento de *S. flexneri* en comparación con *E. citroniae*, tal como se evidencia en la Figura 2-18 y Figura 2-19. Sin embargo, *E. Citroniae*, fue capaz de biotransformar la quercetina mucho más rápido, tomándole 12 horas, mientras que *S. flexneri* requirió de 24 horas. Lo cual, permiten inferir que las rutas de biotransformación de la quercetina de las dos cepas aisladas puedan ser similares, ya que se generan los mismos metabolitos, pero puedan existir algunas modificaciones debido a que se generan en tiempos diferentes (**Anexo J**). Lo anterior coincide con un estudio realizado por Sankaranarayanan et al., (2021), en el cual se evaluó la capacidad de biotransformación de quercetina por dos bacterias en forma individual, *Bacillus glycinifermentans* y *F. plautii*, reportando que *B. glycinifermentans* completó la biotransformación total de quercetina a las 48 horas, generando ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico; en contraste, *F. plautii* logró biotransformar la totalidad de la quercetina a las 12 horas, generando DOPAC.

El estudio anteriormente mencionado, reportó la producción de 0,20 mg/mL de DOPAC a partir de una concentración de quercetina de 75 ug/mL, a las 12 horas, lo que equivale a 0,27 mg DOPAC producidos por 1 mg quercetina, cantidad cercana a la obtenida en este estudio para *S. flexneri* a las 12 horas de fermentación, que fue de 0,28 mg DOPAC producidos por 1 mg de quercetina y a las 72 horas una concentración final de 0,4mg DOPAC por 1 mg de quercetina. Para el caso de *E. citroniae* este metabolito se empezó a detectar a las 48 horas con una producción final de 0,4 mg DOPAC por 1 mg de quercetina a las 72 horas. Respecto a los consorcios, solo el consorcio 1 produjo una menor cantidad de DOPAC, con 0,24 mg de DOPAC por 1 mg de quercetina, en comparación con lo reportado por Sankaranarayanan et al., (2021), los Consorcios 2 y 3 produjeron 0,32 mg y 0,28 mg de DOPAC por 1 mg de quercetina, respectivamente, demostrando la eficacia de las cepas individualmente y en un consorcio para la producción de DOPAC a partir de la biotransformación de quercetina.

Este estudio consideró la proporción de inóculo inicial en el diseño del consorcio artificial microbiano, debido a que es una variable crucial en el desarrollo de consorcios microbianos, evita el agotamiento de las fuentes de energía y previene la dominancia de un microorganismo sobre otro (Bhatia et al., 2018). Por ejemplo, un estudio realizado por Gao et al., (2021) investigó el impacto de la proporción de inoculación inicial en consorcios artificiales con *E. coli* y *Pseudomonas putida*, mostrando que proporciones de 1:1 y 1000:1 exhibieron una mayor capacidad sinérgica para metabolizar fuentes de carbono en comparación con la proporción de 1:1000.

Aunque se esperaba que en alguna de las proporciones evaluadas se viera un efecto sinérgico, se sabe que las interacciones entre especies microbianas son diversas y dinámicas (Gao et al., 2021). La relación

entre estas dos cepas podría ser más compleja y no reflejarse completamente en los tiempos evaluados durante este estudio. Por lo cual Sería pertinente realizar evaluaciones a intervalos temporales más reducidos, como por ejemplo adicionar la hora 6, con el fin de determinar los eventos que ocurren en las primeras 12 horas de fermentación, empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) para determinar la presencia de posibles intermediarios no detectados por la técnica empleada de HPLC-PDA utilizada en este estudio. Se ha descrito que la colaboración entre organismos puede aumentar la productividad, ya que permite que las reacciones metabólicas con varios pasos se realicen de manera más eficiente que si fueran llevadas a cabo por un solo organismo (Bhatia et al., 2018), por lo cual podría estarse consumiendo la quercetina más rápido, y esto sumado a la activación de vías metabólicas silenciosas que no se expresan en monocultivos (Netzker et al., 2018), pueden producir otros metabolitos intermediarios de la biotransformación de la quercetina.

No obstante, al no encontrar diferencias significativas en la producción de metabolitos a las 72 horas entre las proporciones de inóculo inicial, también puede deberse a que las condiciones empleadas favorecieron un equilibrio entre las dos cepas, permitiendo obtener un rendimiento similar en las tres mezclas analizadas.

Hasta donde sabemos, esta es el primer estudio de un consorcio artificial microbiano con capacidad de biotransformar flavonoides, a partir del co-cultivo de dos cepas que demostraron capacidad de transformar quercetina (*E. citroniae* y *S. flexneri*), teniendo en cuenta el efecto de las proporciones iniciales de inóculo, ya que los reportes que se encuentran en la literatura sobre la biotransformación de quercetina en co-cultivos, se han realizado a partir del co-cultivo de transformadores de fibra dietaria *Bacteroides thetaiotaomicron* y transformador de flavonoides *E. ramulus*, a partir de una suspensión celular con número equivalentes para ambos microorganismos (Rodríguez-Castaño et al., 2019) generando DOPAC y AGCC.

Posteriormente, se evaluó el uso de un extracto de cacao rico en polifenoles que permitiera evidenciar la capacidad de las cepas aisladas para transformar otros tipos de flavonoides, ya que se ha comprobado que diversas bacterias de la microbiota intestinal humana pueden degradar distintos compuestos polifenólicos debido a sus estructuras similares (G. Yang et al., 2021). Un ejemplo es *E. ramulus* que puede descomponer flavonoles como quercetina y flavonas como la luteolina (Braune et al., 2001), y otro caso es el de *F. plautii* que es reconocida por transformar varios flavonoides, como quercetina, taxifolina y luteolina (Schoefer et al., 2003). Para esto, se usó el método de difusión en agar que permitió asegurar que el extracto de cacao rico en polifenoles no presentara actividad antimicrobiana frente a las cepas evaluadas. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han demostrado que los polifenoles del cacao tienen un efecto positivo al mejorar el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras reducen especies patógenas como *Clostridium perfringens* (Ma & Chen, 2020b). Lo que también coincide con un estudio realizado por M. Peng et al., (2015), donde se evidenció el efecto prebiótico al usar un polvo de cacao (3%) en condiciones *in vitro* el cual estimuló el crecimiento de microorganismos como *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum*. Teniendo como referencia estos resultados, se seleccionó el extracto de cacao rico en polifenoles como sustrato para el diseño de un consorcio artificial con capacidad para transformar diversos compuestos polifenólicos. Se evaluó la capacidad de las dos cepas aisladas, *E. citroniae* y *S. flexneri*, de forma individual y en consorcio para transformar otros compuestos polifenólicos presentes en un extracto de cacao rico en polifenoles, encontrando, de manera cualitativa, que estas dos cepas de manera individual y en consorcio artificial tienen la capacidad de transformar otros compuestos polifenólicos distintos a la quercetina (**Anexo I**). Sin embargo, para poder determinar específicamente que compuesto polifenólico de los presentes en el extracto de cacao rico en polifenoles está siendo biotransformado, y en que compuesto fenólico de bajo peso molecular se está convirtiendo se requiere realizar un análisis de LC-

MS que permita identificar y cuantifica los diferentes compuestos fenólicos de bajo peso molecular que no pudieron ser detectados por la técnica empleada de HPLC-PDA.

3.4 Conclusiones

Las cinéticas de crecimiento y la producción de metabolitos en diferentes tiempos por parte de *E. citroniae* y *S. flexneri*, permite sugerir que existe algunas modificaciones en las vías metabólicas asociadas a la biotransformación de quercetina por parte de estos dos microorganismos.

En este estudio se logró establecer que el consorcio artificial microbiano no es más efectivo en la biotransformación de flavonoides al compararlo con la capacidad de las cepas de forma individuales. Adicionalmente la variación en las proporciones iniciales del inóculo utilizadas en este estudio para el consorcio artificial microbiano no fue una variable que influyera en la eficiencia del proceso de biotransformación de flavonoides.

El uso del extracto de cacao rico en polifenoles como sustrato de flavonoides, permitió comprobar la capacidad de las cepas aisladas *E. citroniae* y *S. flexneri* para biotransformar otro tipo de compuestos polifenólicos distintos a la quercetina.

4 Perspectivas y Trabajos futuros

Este estudio proporcionó información valiosa sobre el aislamiento y la identificación de dos cepas de la microbiota intestinal humana colombiana, con capacidad de biotransformar distintos flavonoides, que permitirían realizar futuros estudios para ampliar la información no solo sobre las rutas de degradación anaeróbica, sino también los intermediarios y las enzimas involucradas en este proceso de metabolización de compuestos polifenólicos.

Adicionalmente, la identificación de diferentes compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como resultado de la biotransformación de quercetina y otros polifenoles presentes en el extracto de cacao rico en polifenoles, ofrece nuevas perspectivas para su estudio. Futuras investigaciones permitirían evaluar el potencial de estos metabolitos, sobre condiciones específicas, y determinar si presentan efectos mejorados en comparación con el compuesto original. Esta área de investigación permitiría abrir nuevas oportunidades para desarrollar estrategias más eficientes en el tratamiento de diversas afecciones sobre la salud humana, aprovechando las propiedades beneficiosas de los polifenoles biotransformados.

Finalmente, se podrían realizar estudios complementarios basados en las cuatro estrategias de aislamiento desarrolladas durante este estudio, para investigar la capacidad de biotransformar flavonoides a partir de microorganismos aislados de dietas veganas y no veganas. Estos estudios podrían permitir determinar si la dieta influye directamente en el aislamiento de este tipo de microorganismos, proporcionando una comprensión más profunda de las relaciones entre la alimentación y la biotransformación de flavonoides.

5 Referencias Bibliográficas

- Abreu Y Abreu, A. T., Milke-García, M. P., Argüello-Arévalo, G. A., Calderón-De La Barca, A. M., Carmona-Sánchez, R. I., Consuelo-Sánchez, A., Coss-Adame, E., García-Cedillo, M. F., Hernández-Rosiles, V., Icaza-Chávez, M. E., Martínez-Medina, J. N., Morán-Ramos, S., Ochoa-Ortiz, E., Reyes-Apodaca, M., Rivera-Flores, R. L., Zamarripa-Dorsey, F., Zárate-Mondragón, F., & Vázquez-Frias, R. (2021). Dietary fiber and the microbiota: A narrative review by a group of experts from the Asociación Mexicana de Gastroenterología. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 86). www.elsevier.es/rgmx
- Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., & Marqués, S. (2013). Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: Aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, *15*(1), 77–92. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02782.x>
- Albishi, T., John, J. A., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2013). Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*, *5*(3), 1191–1203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.002>
- Al-Ishaq, R. K., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2021). Enzymatic metabolism of flavonoids by gut microbiota and its impact on gastrointestinal cancer. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13163934>
- Allgrove, J. E., & Davison, G. (2018). Chocolate/cocoa polyphenols and oxidative stress. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 207–219). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00016-7>
- Arts, I. C. W., Van De Putte, B., & Hollman, P. C. H. (2000). *Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk*. <https://doi.org/10.1021/jf000026>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Zeller, G. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Ashaolu, T. J. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 130). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110625>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Issue 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. D. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4), 493–496. https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/45/4_ts/493/4821085
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., & Lebert, A. (1996). Methods Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. In *Journal of Microbiological ELSEVIER Journal of Microbiological Methods* (Vol. 25).
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2013). *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3.1*.

- Bhatia, S. K., Bhatia, R. K., Choi, Y. K., Kan, E., Kim, Y. G., & Yang, Y. H. (2018). Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 8, pp. 1209–1229). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471445>
- Blaut, M., Schoefer, L., & Braune, A. (2003). Transformation of Flavonoids by Intestinal Microorganisms. In *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (Vol. 73, Issue 2).
- Bnfaga, A. A., Lee, K. W., Than, L. T. L., & Amin-Nordin, S. (2023). Antimicrobial and immunoregulatory effects of *Lactobacillus delbrueckii* 45E against genitourinary pathogens. *Journal of Biomedical Science*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00913-7>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. In *New Microbes and New Infections* (Vol. 34). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. In *Gut Microbes* (Vol. 7, Issue 3, pp. 216–234). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Braune, A., Gütschow, M., Engst, W., & Blaut, M. (2001). Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5558–5567. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5558-5567.2001>
- Burton-Freeman, B., Sandhu, A., & Edirisinghe, I. (2016). Anthocyanins. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (pp. 489–500). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00035-8>
- Cádiz-Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gámez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 24, Issue 8, pp. 1415–1422). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L., & Chen, C. (2015). 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Experimental Cell Research*, 334(2), 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.021>
- Chait, Y. A., Gunenc, A., Bendali, F., & Hosseinian, F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *LWT*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108623>
- Che, S., & Men, Y. (2019). Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9–10), 1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02211-4>
- Chiou, Y. S., Wu, J. C., Huang, Q., Shahidi, F., Wang, Y. J., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2014). Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 3–25. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.006>
- Chiu, H. F., Venkatakrishnan, K., Golovinskaia, O., & Wang, C. K. (2021). Gastroprotective effects of polyphenols against various gastro-intestinal disorders: A mini-review with special focus on clinical evidence. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26072090>
- Choi, E. J., & Kim, G. H. (2014). The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 9(1), 328–332. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1752>

- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Regolo, L., Alvarez-Suarez, J. M., Navarro-Hortal, M. D., Xiao, J., Quiles, J. L., Battino, M., & Giampieri, F. (2022). The reciprocal interaction between polyphenols and other dietary compounds: Impact on bioavailability, antioxidant capacity and other physico-chemical and nutritional parameters. *Food Chemistry*, 375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131904>
- Cinar, Z. Ö., Atanassova, M., Tumer, T. B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., Sharifi-Rad, J., & Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. In *Journal of Food Composition and Analysis* (Vol. 103). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an *in vitro* colonic fermentation model. *Microbial Ecology*, 48(1), 128–138. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2022-7>
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Colunga Biancatelli, R. M. L., Berrill, M., Catravas, J. D., & Marik, P. E. (2020). Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451>
- Corell, L., Armenta, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2018). Flavonoid determination in onion, chili and leek by hard cap espresso extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Microchemical Journal*, 140, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.014>
- Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Tomás-Barberán, F. A., González-Sarrías, A., & Espín, J. C. (2020). Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 64, Issue 9). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900952>
- Dalal, N., Jalandra, R., Sharma, M., Prakash, H., Makharia, G. K., Solanki, P. R., Singh, R., & Kumar, A. (2020). Omicstechnologies for improved diagnosis and treatment of colorectal cancer: Technical advancement and major perspectives. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 131). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110648>
- D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? In *Fitoterapia* (Vol. 106, pp. 256–271). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2005). Molecular diagnostics: Promises and possibilities. In *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4>
- Del, M., Rodicio, R., & Mendoza, C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 22, Issue 4).
- Dhanya, R. (2022). Quercetin for managing type 2 diabetes and its complications, an insight into multitarget therapy. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 146). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112560>
- Diaz-Gerevini, G. T., Reposi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., & Eynard, A. R. (2016). Beneficial action of resveratrol: How and why? In *Nutrition* (Vol. 32, Issue 2, pp. 174–178). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.017>
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. In *European Journal of Nutrition* (Vol. 54, Issue 3, pp. 325–341). Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0852->

- Eng, A., & Borenstein, E. (2019). Microbial community design: methods, applications, and opportunities. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 58, pp. 117–128). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.002>
- Escobar, J. S., Klotz, B., Valdes, B. E., & Agudelo, G. M. (2015). The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0311-6>
- Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 139, pp. 82–93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>
- Etcheberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F. I., Aguirre, L., Martínez, J. A., & Portillo, M. P. (2013). Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 61, Issue 40, pp. 9517–9533). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf402506c>
- Feng, X., Li, Y., Brobbey Oppong, M., & Qiu, F. (2018). Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 50, Issue 3, pp. 343–356). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1485691>
- Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., & Martín, M. Á. (2014). Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food and Chemical Toxicology*, *66*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.044>
- Firman, J., Liu, L. S., Mahalak, K., Tanes, C., Bittinger, K., Tu, V., Bobokalonov, J., Mattei, L., Zhang, H., & Van Den Abbeele, P. (2022). The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production. *FEMS Microbiology Ecology*, *98*(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac038>
- Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., & Oteiza, P. I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*, *53*(6), 432–439. <https://doi.org/10.1002/mc.21974>
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5320–5327. <https://doi.org/10.1021/jf9040172>
- Fukushima, M., Kakinuma, K., & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the gyrB gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(8), 2779–2785. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002>
- Gao, C. H., Cao, H., Cai, P., & Sørensen, S. J. (2021). The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *ISME Journal*, *15*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00751>
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoleva, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, *6*(1), 391–415. <https://doi.org/10.3390/nu6010391>
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1988). Use of a Three-Stage Continuous Culture System To Study the Effect of Mucin on Dissimilatory Sulfate Reduction and Methanogenesis by Mixed Populations of Human Gut Bacteria. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 54, Issue 11).
- Gläßer G E., Graefe E U, Struck F., Veit M, & Gebhardt R. (2002). *Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites.*
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 11, Issue 96). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>

- Goris, T., Cuadrat, R. R. C., & Braune, A. (2021). Flavonoid-modifying capabilities of the human gut microbiome—an insilico study. *Nutrients*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nu13082688>
- Grandel, N. E., Reyes Gamas, K., & Bennett, M. R. (2021). Control of synthetic microbial consortia in time, space, and composition. In *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.04.001>
- Grootaert, C., Kamiloglu, S., Capanoglu, E., & van Camp, J. (2015). Cell systems to investigate the impact of polyphenols on cardiovascular health. In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 11, pp. 9229–9255). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu7115462>
- Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 72–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
- Gündüz, K. (2015). Strawberry: Phytochemical Composition of Strawberry (*Fragaria ananassa*). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 733–752). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00030-1>
- Guzmán-Ortiz, F. A., San Martín-Martínez, E., Valverde, M. E., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J. D. J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Análisis del perfil y correlación de compuestos fenólicos, isoflavonas y capacidad antioxidante durante la germinación de soya (*Glycine max* L.). *CYTA - Journal of Food*, 15(4), 516–524. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1302995>
- Haas, K. N., & Blanchard, J. L. (2020). Reclassification of the *clostridium clostridioforme* and *clostridium sphenoides* clades as enterocloster gen. nov. and lacrimispora gen. nov., including reclassification of 15 taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 23–34. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003698>
- Han, L., Fang, C., Zhu, R., Peng, Q., Li, D., & Wang, M. (2017). Inhibitory effect of phloretin on α -glucosidase: Kinetics, interaction mechanism and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.089>
- Hanišáková, N., Vítězová, M., & Rittmann, S. K. M. R. (2022). The Historical Development of Cultivation Techniques for Methanogens and Other Strict Anaerobes and Their Application in Modern Microbiology. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020412>
- He, F. J., & Chen, J. Q. (2013). Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 2, Issues 3–4, pp. 146–161). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.002>
- Hollands, W. J., Voorspoels, S., Jacobs, G., Aaby, K., Meisland, A., Garcia-Villalba, R., Tomas-Barberan, F., Piskula, M. K., Mawson, D., Vovk, I., Needs, P. W., & Kroon, P. A. (2017). Development, validation and evaluation of an analytical method for the determination of monomeric and oligomeric procyanidins in apple extracts. *Journal of Chromatography A*, 1495, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.030>
- Hostetler, G. L., Ralston, R. A., & Schwartz, S. J. (2017). Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. In *Advances in Nutrition* (Vol. 8, Issue 3, pp. 423–435). American Society for Nutrition. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>
- Hungate, R. E. (1969). *A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes*.
- Ibrahim, M., Raajaraam, L., & Raman, K. (2021). Modelling microbial communities: Harnessing consortia for biotechnological applications. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 3892–3907). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.048>
- Iglesias-Aguirre, C. E., García-Villalba, R., Beltrán, D., Frutos-Lisón, M. D., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Selma, M. V. (2023). Gut Bacteria Involved in Ellagic Acid Metabolism To Yield Human Urolithin Metabotypes Revealed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(9), 4029–4035. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08889>

- Jaganath, I. B., Mullen, W., Edwards, C. A., & Crozier, A. (2006). The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*, 40(10), 1035–1046. <https://doi.org/10.1080/10715760600771400>
- Jiménez, D. J., Dini-Andreote, F., & Dirk van Elsas, J. (2014). Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. In *Biotechnology for Biofuels* (Vol. 7).
- Kaeberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2002). *Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment*.
- Kamiloglu, S., Tomas, M., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Effect of food matrix on the content and bioavailability of flavonoids. In *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.030>
- Kammerer, D. R. (2016). Anthocyanins. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color* (pp. 61–80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00003-8>
- Katz, D. L., Doughty, K., & Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 15, Issue 10, pp. 2779–2811). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>
- Keranmu, A., Pan, L. bin, Yu, H., Fu, J., Liu, Y. F., Amuti, S., Han, P., Ma, S. R., Xu, H., Zhang, Z. W., Chen, D., Yang, F. Y., Wang, M. S., Wang, Y., Xing, N. Z., & Jiang, J. D. (2022). The potential biological effects of quercetin based on pharmacokinetics and multi-targeted mechanism in vivo. In *Journal of Asian Natural Products Research* (Vol. 24, Issue 5, pp. 403–431). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10286020.2022.2045965>
- Khan, M. K., Zill-E-Huma, & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. In *Journal of Food Composition and Analysis* (Vol. 33, Issue 1, pp. 85–104). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. In *Food and Nutrition Research* (Vol. 61). Swedish Nutrition Foundation. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kita, A., Suehira, K., Miura, T., Okamura, Y., Aki, T., Matsumura, Y., Tajima, T., Nishio, N., & Nakashimada, Y. (2016). Characterization of a halotolerant acetoclastic methanogen highly enriched from marine sediment and its application in removal of acetate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.018>
- Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). *Kitty Verhoeckx · Paul Cotter Iván López-Expósito The Impact of Food Bioactives on Health In Vitro and Ex Vivo Models*.
- Kwak, J. H., Seo, J. M., Kim, N. H., Arasu, M. V., Kim, S., Yoon, M. K., & Kim, S. J. (2017). Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1387–1391. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.014>
- Kwon, J. E., Lim, J., Kim, I., Kim, D., & Kang, S. C. (2018). Isolation and identification of new bacterial stains producing equol from *pueraria lobata* extract fermentation. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192490>
- Langa, S., Ruiz de la Bastida, A., Peirotén, Á., Curiel, J. A., & Landete, J. M. (2022). Development of the first fermented soy beverages enriched in equol and 5-hydroxy-equol. *LWT*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113899>
- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., & Dolaro, P. (2009). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(8), 1044–1054. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800446>

- Lazo-Vélez, M. A., Guardado-Félix, D., Avilés-González, J., Romo-López, I., & Serna-Saldívar, S. O. (2018). Effect of germination with sodium selenite on the isoflavones and cellular antioxidant activity of soybean (*Glycine max*). *LWT*, 93, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.060>
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7292–7295. <https://doi.org/10.1021/jf0344385>
- Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2008). A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. In *Walailak J Sci & Tech* (Vol. 5, Issue 2).
- López De Las Hazas, M. C., Mosele, J. I., Macià, A., Ludwig, I. A., & Motilva, M. J. (2017). Exploring the Colonic Metabolism of Grape and Strawberry Anthocyanins and Their in Vitro Apoptotic Effects in HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6477–6487. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04096>
- Lü, Z., Zhang, Z., Wu, H., Zhou, Z., & Yu, J. (2016). Phenolic Composition and Antioxidant Capacities of Chinese Local Pummelo Cultivars' Peel. *Horticultural Plant Journal*, 2(3), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.05.001>
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoae, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 4, pp. 626–659). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, A., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jacob, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., ... Schleifer, K. H. (2004). ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1363–1371. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh293>
- Ma, G., & Chen, Y. (2020a). Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103829>
- Ma, G., & Chen, Y. (2020b). Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103829>
- Macfarlane, S., Woodmansey, E. J., & Macfarlane, G. T. (2005). Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7483–7492. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7483-7492.2005>
- Magdoui, S., Brar, S. K., & Blais, J. F. (2016). Co-culture for lipid production: Advances and challenges. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 92, pp. 20–30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.003>
- Mahmoud, H. H. A., Kalaba, M. H., El-Sherbiny, G. M. E., Mostafa, A. E. A., Ouf, M. E. A., & Tawhed, W. M. F. (2022). Sustainable repairing and improvement of concrete properties using artificial bacterial consortium. *Journal of Sustainable Cement-Based Materials*, 11(6), 465–478. <https://doi.org/10.1080/21650373.2021.2003908>
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 1–70. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. In *Am J Clin Nutr* (Vol. 79).

- Manigandan, K., Manimaran, D., Jayaraj, R. L., Elangovan, N., Dhivya, V., & Kaphle, A. (2015). Taxifolin curbs NF- κ B-mediated Wnt/ β -catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis. *Biochimie*, 119, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.014>
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Martens, S., & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. In *Phytochemistry* (Vol. 66, Issue 20, pp. 2399–2407). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>
- Martin, M. Á., & Ramos, S. (2021). Impact of cocoa flavanols on human health. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112121>
- Matthies, A., Blaut, M., & Braune, A. (2009). Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1740–1744. <https://doi.org/10.1128/AEM.01795-08>
- Mayo, B., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2019). Equol: A bacterial metabolite from the Daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11092231>
- Merfort, L., Heilmann, J., Weiss, M., Pietta, P., & Gardana, C. (1996). Chemiluminescence assay with PMNs. In *Planta Med* (Vol. 62).
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G., & Huis In't Veld, J. H. J. (1999). *A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products.*
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. In *Food Research International* (Vol. 142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Monagas, M., Khan, N., Andrés-Lacueva, C., Urpí-Sardá, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2009). Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition*, 102(2), 201–206. <https://doi.org/10.1017/S0007114508162110>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., & Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. In *South African Journal of Chemical Engineering* (Vol. 33, pp. 141–150). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- Murota, K., Nakamura, Y., & Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 82, Issue 4, pp. 600–610). Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>
- Nam, J. S., Sharma, A. R., Nguyen, L. T., Chakraborty, C., Sharma, G., & Lee, S. S. (2016). Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules21010108>
- Nelson, K. E., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Worley, K. C., Creasy, H. H., Wortman, J. R., Rusch, D. B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A. T., Feldgarden, M., Gevers, D., Haas, B. J., Madupu, R., Ward, D. V., Birren, B. W., Gibbs, R. A., Methe, B., Petrosino, J. F., Zhu, D. (2010). A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science*, 328(5981), 994–999. <https://doi.org/10.1126/science.1183605>

- Netzker, T., Flak, M., Krespach, M. K., Stroe, M. C., Weber, J., Schroeckh, V., & Brakhage, A. A. (2018). Microbial interactions trigger the production of antibiotics. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 45, pp. 117–123). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>
- Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., & Schreiner, M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 460–478. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.038>
- Ninomiya, M., & Koketsu, M. (2013). Minor flavonoids (chalcones, flavanones, dihydrochalcones, and aurones). In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1867–1900). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_62
- Nugent, S. G., Kumar, D., Rampton, D. S., & Evans, D. F. (2001). Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: Possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. In *Gut* (Vol. 48, Issue 4, pp. 571–577). <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.571>
- Ortega-Madueño, I., Modrego, J., Gómez-Gordo, R., Ortega-Hernández, A., Pérez de Isla, L., Muñoz, J. C., Nieto, M. L., & Gómez-Garre, D. (2022). Relationship between the coronary artery calcium quantification and gut microbiota composition in subjects without previous cardiovascular disease: A pilot study. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 34(4), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2021.11.008>
- Osorio-Guarín, J. A., Berdugo-Cely, J., Coronado, R. A., Zapata, Y. P., Quintero, C., Gallego-Sánchez, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of theobroma cacao l. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01994>
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- Padmaperuma, G., Kapoore, R. V., Gilmour, D. J., & Vaidyanathan, S. (2018). Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 5, pp. 690–703). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1390728>
- Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., & Volpe, M. G. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 190, 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.028>
- Pan, J., Yi, X., Zhang, S., Cheng, J., Wang, Y., Liu, C., & He, X. (2018). Bioactive phenolics from mango leaves (*Mangifera indica L.*). *Industrial Crops and Products*, 111, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.057>
- Passo Tsamo, C. V., Herent, M. F., Tomekpe, K., Happi Emaga, T., Quetin-Leclercq, J., Rogez, H., Larondelle, Y., & Andre, C. M. (2015). Effect of boiling on phenolic profiles determined using HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS, physico-chemical parameters of six plantain banana cultivars (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.012>
- Patel, K., Kumar, V., Rahman, M., Verma, A., & Patel, D. K. (2018). New insights into the medicinal importance, physiological functions and bioanalytical aspects of an important bioactive compound of foods 'Hyperin': Health benefits of the past, the present, the future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.05.009>
- Pavlica, S., & Gebhardt, R. (2010). Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sciences*, 86(3–4), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.017>

- Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 17–25). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>
- Pede, G. Di, Bresciani, L., Calani, L., Petrangolini, G., Riva, A., Allegrini, P., Del Rio, D., & Mena, P. (2020). The human microbial metabolism of quercetin in different formulations: An *in vitro* evaluation. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081121>
- Peng, M., Aryal, U., Cooper, B., & Biswas, D. (2015). Metabolites produced during the growth of probiotics in cocoa supplementation and the limited role of cocoa in host-enteric bacterial pathogen interactions. *Food Control*, 53, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.014>
- Peng, X., Zhang, Z., Zhang, N., Liu, L., Li, S., & Wei, H. (2014). In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food and Nutrition Research*, 58. <https://doi.org/10.3402/fnr.v58.23406>
- Pierson, J. T., Monteith, G. R., Roberts-Thomson, S. J., Dietzgen, R. G., Gidley, M. J., & Shaw, P. N. (2014). Phytochemical extraction, characterisation and comparative distribution across four mango (*Mangifera indica* L.) fruit varieties. *Food Chemistry*, 149, 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.108>
- Racova, Z., Anzenbacherova, E., Papouskova, B., Poschner, S., Kucova, P., Gausterer, J. C., Gabor, F., Kolar, M., & Anzenbacher, P. (2020). Metabolite profiling of natural substances in human: *in vitro* study from fecal bacteria to colon carcinoma cells (Caco-2). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108482>
- Rasouli, Z., Valverde-Pérez, B., D'Este, M., De Francisci, D., & Angelidaki, I. (2018). Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs. *Biochemical Engineering Journal*, 134, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.010>
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srail, S. K. S., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Riva, A., Kolimár, D., Spittler, A., Wisgrill, L., Herbold, C. W., Abrankó, L., & Berry, D. (2020). Conversion of Rutin, a Prevalent Dietary Flavonol, by the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585428>
- Rodriguez, F. (2011). *Manual de laboratorio para el estudio de microorganismos anaerobios obligados*. Corpoica.
- Rodriguez-Castaño, G. P., Dorris, M. R., Liu, X., Bolling, B. W., Acosta-Gonzalez, A., & Rey, F. E. (2019). *Bacteroides thetaiotaomicron* starch utilization promotes quercetin degradation and butyrate production by *Eubacterium ramulus*. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01145>
- Rodriguez-Castaño, G. P., Rey, F. E., Caro-Quintero, A., & Acosta-González, A. (2020). Gut-derived *Flavonifractor* species variants are differentially enriched during in vitro incubation with quercetin. *PLoS ONE*, 15(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227724>
- Rüfer, C. E., & Kulling, S. E. (2006). Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2926–2931. <https://doi.org/10.1021/jf053112o>
- Russo, M., Bonaccorsi, I., Torre, G., Sarò, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2014). Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: Availability in lemon's by-products. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.004>

- Sakkas, H., Bozidis, P., Touzios, C., Kolios, D., Athanasiou, G., Athanasopoulou, E., Gerou, I., & Gartzonika, C. (2020). Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 56, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina56020088>
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998). *Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma cacao*.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). In *Journal of Mass Spectrometry* (Vol. 38, Issue 1, pp. 35–42). <https://doi.org/10.1002/jms.395>
- Sankaranarayanan, R., Sekhon, P. K., Ambat, A., Nelson, J., Jose, D., Bhat, G. J., & Scaria, J. (2021). Screening of Human Gut Bacterial Culture Collection Identifies Species That Biotransform Quercetin into Metabolites with Anticancer Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7045. <https://doi.org/10.3390/ijms22137045>
- Santos-Buelga, C., & Gonzá Lez-Paramá, A. M. (2018). Anthocyanins. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21609-0>
- Sato, S., & Mukai, Y. (2020). Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity. In *Journal of Inflammation Research* (Vol. 13, pp. 421–431). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/JIR.S228361>
- Schneider Heiko, Schwirtz Andreas, Collins Matthew David, & Blaut Michael. (1999). Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside. *Archives of Microbiology*, 171, 81–91.
- Schober, P., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Schoefer, L., Mohan, R., Schwirtz, A., Braune, A., & Blaut, M. (2003). Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5849–5854. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5849-5854.2003>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shabbir, U., Rubab, M., Daliri, E. B. M., Chelliah, R., Javed, A., & Oh, D. H. (2021). Curcumin, quercetin, catechins and metabolic diseases: The role of gut microbiota. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 1, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu13010206>
- Shi, M., Loftus, H., McAinch, A. J., & Su, X. Q. (2017). Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 30, pp. 16–29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.036>
- Shi, T., Bian, X., Yao, Z., Wang, Y., Gao, W., & Guo, C. (2020). Quercetin improves gut dysbiosis in antibiotic-treated mice. *Food and Function*, 11(9), 8003–8013. <https://doi.org/10.1039/d0fo01439g>
- Shin, N. R., Moon, J. S., Shin, S. Y., Li, L., Lee, Y. B., Kim, T. J., & Han, N. S. (2016). Isolation and characterization of human intestinal *Enterococcus avium* EFEL009 converting rutin to quercetin. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1), 68–74. <https://doi.org/10.1111/lam.12512>
- Sierra-Zapata, L., Álvarez, J. C., Romero-Tabarez, M., Silby, M. W., Traxler, M. F., Behie, S. W., Pessotti, R. de C., & Villegas-Escobar, V. (2020). Inducible Antibacterial Activity in the Bacillales by Triphenyl Tetrazolium Chloride. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62236-z>

- Silva-Beltrán, N. P., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ornelas-Paz, J. D. J., López-Mata, M. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Ayala-Zavala, J. F., & Márquez-Ríos, E. (2015). Total Phenolic, Flavonoid, Tomatine, and Tomatidine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/284071>
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
- Solanke, A., Tribhuvan, K., & Kanika. (2015). *Genomics: An Integrative Approach for Molecular Biology Genomics of Cotton Boll and Fibre Development View project Regulation of quality of tomato fruits View project*.
- Stähli, B. E., Scharl, M., & Matter, C. M. (2023). A roadmap for gut microbiome-derived aromatic amino acids for improved cardiovascular risk stratification. In *European Heart Journal* (Vol. 44, Issue 32, pp. 3097–3099). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad367>
- Su, K.-Y., Yuan Yu, C., Chen, Y.-P., Hua, K.-F., & Sophia Chen, Y.-L. (2014). 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling.
- Takagaki, A., & Nanjo, F. (2015). Effects of Metabolites Produced from (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Intestinal Bacteria on Angiotensin I-Converting Enzyme Activity and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8262–8266. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03676>
- Tedeschi, R., & De Paoli, P. (2011). Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 675, pp. 313–326). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-423-0_18
- Thuenemann, E. C., Giuseppina, G. M., Rich, G. T., & Faulks, R. M. (2015). Dynamic gastric model (DGM). In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 47–59). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_6
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. In *Biochemical Journal* (Vol. 474, Issue 11, pp. 1823–1836). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tomova, A., Bukovsky, I., Rembert, E., Yonas, W., Alwarith, J., Barnard, N. D., & Kahleova, H. (2019). The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>
- Tralma, K., Gotteland, M., & Carrasco-Pozo, C. (2017). 3,4-Dihydroxyphenyl Acetic Acid, A Microbial Metabolite of Quercetin, Protects Intestinal and Pancreatic Beta Cell Lines from the Cytotoxicity Induced by Rotenone. In *SL Nutr Metab* (Vol. 1, Issue 1).
- Ulbrich, K., Reichardt, N., Braune, A., Kroh, L. W., Blaut, M., & Rohn, S. (2015). The microbial degradation of onion flavonol glucosides and their roasting products by the human gut bacteria *Eubacterium ramulus* and *Flavonifractor plautii*. *Food Research International*, 67, 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.051>
- Ulusoy, H. G., & Sanlier, N. (2020). A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 19, pp. 3290–3303). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1683810>
- Uyanga, V. A., Amevor, F. K., Liu, M., Cui, Z., Zhao, X., & Lin, H. (2021). Potential implications of Citrulline and Quercetin on gut functioning of Monogastric animals and humans: A comprehensive review. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13113782>

- Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. In *Food and Function* (Vol. 6, Issue 8, pp. 2424–2439). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5fo00322a>
- Vambe, M., Aremu, A. O., Chukwujekwu, J. C., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2018). Antibacterial screening, synergy studies and phenolic content of seven South African medicinal plants against drug-sensitive and -resistant microbial strains. *South African Journal of Botany*, 114, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.011>
- Vazhappilly, C. G., Amararathna, M., Cyril, A. C., Linger, R., Matar, R., Merheb, M., Ramadan, W. S., Radhakrishnan, R., & Rupasinghe, H. P. V. (2021). Current methodologies to refine bioavailability, delivery, and therapeutic efficacy of plant flavonoids in cancer treatment. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 94). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108623>
- Venema, K., & van den Abbeele, P. (2013). Experimental models of the gut microbiome. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 115–126). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.002>
- Venigalla, M., Sonego, S., Gyengesi, E., Sharman, M. J., & Münch, G. (2016). Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. In *Neurochemistry International* (Vol. 95, pp. 63–74). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.10.011>
- Verma, M. L., Sharma, S., Saini, R., Rani, V., & Kushwaha, R. (2019). Bioflavonoids: Synthesis, functions and biotechnological applications. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 69–105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00003-5>
- Wagner, A. O., Markt, R., Mira Mutschlechner, Nina Lackner, Prem, E. M., Praeg, N., & Illmer, P. (2019). *Medium Preparation for the Cultivation of Microorganisms under Strictly Anaerobic/Anoxic Conditions*. <https://www.jove.com/video/60155/>
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(9), 587–593. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.08.002>
- Wang, L., Yang, R., Yuan, B., Liu, Y., & Liu, C. (2015). The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 5, Issue 4, pp. 310–315). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.005>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, X. L., Kim, H. J., Kang, S. II, Kim, S. II, & Hur, H. G. (2007). Production of phytoestrogen S-equol from daidzein in mixed culture of two anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*, 187(2), 155–160. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0183-8>
- Winter, J., Popoff, M. R., Grimont, P., & Bokkenheuserl, V. D. (1991). *Clostridium orbiscindens* sp. nov. a Human Intestinal Bacterium Capable of Cleaving the Flavonoid C-Ring. In *international journal of systematic bacteriology* (Vol. 41, Issue 3).
- Woźniak, D., Cichy, W., Przysławski, J., & Drzymała-Czyż, S. (2021). The role of microbiota and enteroendocrine cells in maintaining homeostasis in the human digestive tract. In *Advances in Medical Sciences* (Vol. 66, Issue 2, pp. 284–292). Medical University of Białystok. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2021.05.003>
- Wu, G. D., Compher, C., Chen, E. Z., Smith, S. A., Shah, R. D., Bittinger, K., Chehoud, C., Albenberg, L. G., Nessel, L., Gilroy, E., Star, J., Weljie, A. M., Flint, H. J., Metz, D. C., Bennett, M. J., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D.

- (2016). Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, *65*(1), 63–72. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308209>
- Xu, P., Marsafari, M., Zha, J., & Koffas, M. (2020). Microbial Coculture for Flavonoid Synthesis. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 7, pp. 686–688). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.008>
- Xue, H., Xie, W., Jiang, Z., Wang, M., Wang, J., Zhao, H., & Zhang, X. (2016). 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, attenuates acetaminophen (APAP)-induced liver injury through activation of Nrf-2. *Xenobiotica*, *46*(10), 931–939. <https://doi.org/10.3109/00498254.2016.1140847>
- Yamamura, R., Inoue, K. Y., Nishino, K., & Yamasaki, S. (2023). Intestinal and fecal pH in human health. *Frontiers in Microbiomes*, *2*. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2023.1192316>
- Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., & Jiang, Y. (2018). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 79, pp. 116–124). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>
- Yang, G., Hong, S., Yang, P., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, P., Jiang, W., & Gu, Y. (2021). Discovery of an ene-reductase for initiating flavone and flavonol catabolism in gut bacteria. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20974-2>
- Zaccaria, M., Dawson, W., Cristiglio, V., Reverberi, M., Ratcliff, L. E., Nakajima, T., Genovese, L., & Momeni, B. (2020). Designing a bioremediator: mechanistic models guide cellular and molecular specialization. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 62, pp. 98–105). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.006>
- Zhang, H. N., An, C. N., Zhang, H. N., & Pu, X. P. (2010). Protocatechuic acid inhibits neurotoxicity induced by MPTP in vivo. *Neuroscience Letters*, *474*(2), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.016>
- Zhang, L., Wu, T., Zhang, Y., Chen, Y., Ge, X., Sui, W., Zhu, Q., Geng, J., & Zhang, M. (2023). Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation in vitro. *Food Chemistry*, *402*, 134111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134111>
- Zhang, Z., Peng, X., Li, S., Zhang, N., Wang, Y., & Wei, H. (2014). Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090531>
- Zhao, Y., Zhong, X., Yan, J., Sun, C., Zhao, X., & Wang, X. (2022). Potential roles of gut microbes in biotransformation of natural products: An overview. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.956378>

6 ANEXOS

Anexo A. Medios de cultivo y soluciones.

- **Medio Líquido 7N (2X) 500mL.**

Adicionar todos los reactivos en 450 mL agua destilada

REACTIVO	REFERENCIA	CANTIDAD
MOPS Acido	SIGMA M1254-250G	10,5 g
Hidróxido de potasio	MERCK-105033.0500	1,7 g
Resazurina sodium salt●	SIGMA-R7017-1G	2 mL
Trisina	SIGMA-T0377-25G	0,36 g
Tween 80 ●	-	1 mL
Acetato de sodio $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	MERCK 106268.0250	1,64 g
Cloruro de sodio NaCl	MERCK 106404.1000	1,2 g
Cloruro de amonio NH_4Cl	MERCK 101145.1000	0,75 g
Sulfato de potasio K_2SO_4 TA	-	0,5 mL
Cloruro de magnesio $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ TA	-	0,5 mL
Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ TA	-	0,5 mL
Carbonato de sodio NaHCO_3	LOBA Chemie 05810	1,68 g
Fosfato dipotásico K_2HPO_4	Panreac 131509.1211	0,14 g
Vitamina K3 ●	-	0,1 mL
Histidina-Hematina●	-	0,5 mL
Ajustar pH 7.2	-	-
Solución Sulfato de hierro II $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ●	-	2 mL
Mix de vitaminas ●	-	10 mL
L-Cisteina Liquida 5% TA	CDH 037218	20 ml

● : Refrigeración. TA: Temperatura Ambiente.

Aforar a 500 mL y Filtrar.

Nota: Para Filtrar hacer uso de un filtro de 0.22 μm en un embudo de filtración. Todo el sistema (embudo y filtro) debe esterilizarse previamente a 121°C x 20 minutos en autoclave.

- **Medio líquido 11 (2X) 500mL.**

Adicionar todos los reactivos en 450 mL agua destilada

REACTIVO	REFERENCIA	CANTIDAD
MOPS Acido	SIGMA M1254-250G	10,5 g
Hidróxido de potasio	MERCK-105033.0500	1,7 g
Resazurina sodium salt●	SIGMA-R7017-1G	2 mL
Trisina	SIGMA-T0377-25G	0,36 g
Tween 80●	-	1 mL
Acetato de sodio $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	MERCK 106268.0250	1,64 g
Cloruro de sodio NaCl	MERCK 106404.1000	1,2 g
Cloruro de amonio NH_4Cl	MERCK 101145.1000	0,75 g
Sulfato de potasio K_2SO_4 TA	-	0,5 mL
Cloruro de magnesio $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ TA	-	0,5 mL
Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ TA	-	0,5 mL

Carbonato de sodio NaHCO ₃	LOBA Chemie 05810	1,68 g
Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄	Panreac 131509.1211	0,14 g
Vitamina K3 ●	-	0,1 mL
Histidina-Hematina ●	-	0,5 mL
Triptona	OXOID	20 g
Extracto de Levadura	OXOID	10 g
Extracto de Carne	HIMEDIA	10 g
Ajustar pH 7.2	-	-
Solución Sulfato de hierro II FeSO ₄ *7H ₂ O ●	-	2 mL
Mix de vitaminas ●	-	10 mL
L-Cisteina Líquida 5% TA	CDH 037218	20 ml

- : Refrigeración. TA: Temperatura Ambiente.

Aforar a 500 mL y Filtrar.

Nota: Para Filtrar hacer uso de un filtro de 0.22 µm en un embudo de filtración. Todo el sistema (embudo y filtro) debe esterilizarse previamente a 121°C x 20 minutos en autoclave.

- **Medio líquido 11M (modificado) (2X) 500mL.**

Adicionar todos los reactivos en 450 mL agua destilada

REACTIVO	REFERENCIA	CANTIDAD
MOPS Acido	SIGMA M1254-250G	10,5 g
Hidróxido de potasio	MERCK-105033.0500	1,7 g
Resazurina sodium salt ●	SIGMA-R7017-1G	2 mL
Trisina	SIGMA-T0377-25G	0,36 g
Tween 80 ●	-	1 mL
Acetato de sodio NaC ₂ H ₃ O ₂ *3H ₂ O	MERCK 106268.0250	1,64 g
Cloruro de sodio NaCL	MERCK 106404.1000	1,2 g
Cloruro de amonio NH ₄ CL	MERCK 101145.1000	0,75 g
Sulfato de potasio K ₂ SO ₄ TA	-	0,5 mL
Cloruro de magnesio MgCl ₂ *6H ₂ O TA	-	0,5 mL
Cloruro de calcio CaCl ₂ *2H ₂ O TA	-	0,5 mL
Carbonato de sodio NaHCO ₃	LOBA Chemie 05810	1,68 g
Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄	Panreac 131509.1211	0,14 g
Vitamina K3 ●	-	0,1 mL
Histidina-Hematina ●	-	0,5 mL
Triptona	OXOID	10 g
Extracto de Levadura	OXOID	5 g
Extracto de Carne	HIMEDIA	5 g
Galactosa	Panreac	10 g
Ajustar pH 7.2	-	-
Solución Sulfato de hierro II FeSO ₄ *7H ₂ O ●	-	2 mL
Mix de vitaminas ●	-	10 mL
L-Cisteina Líquida 5% TA	CDH 037218	20 ml

- : Refrigeración. TA: Temperatura Ambiente.

Aforar a 500 mL y Filtrar.

Nota: Para Filtrar hacer uso de un filtro de 0.22 µm en un embudo de filtración. Todo el sistema (embudo y filtro) debe esterilizarse previamente a 121°C x 20 minutos en autoclave.

- 6.2 Medios de cultivo comercial 1/10
- 6.3 Agar Plate Count (PC)
- 6.4 Agar Nutritivo (N)
- 6.5 Agar Trypticase Soya (TS)
- 6.6 Agar Infusión cerebro corazón (BHI)
- 6.7 Agar OatMeal (OM)
- 6.8 Agar Extracto de Malta (EM)
- 6.9 Agar Luria-Bertani (LB)
- 6.10 Agar Bacteriológico

Para la preparación de los diferentes medios de cultivos comerciales, se deben seguir las especificaciones dadas por el fabricante; y se prepararan en una concentración 1/10 usando como medio base medio mínimo 7N (1X) con quercetina (0,25 mg/mL) y Agar (3X).

Nota:

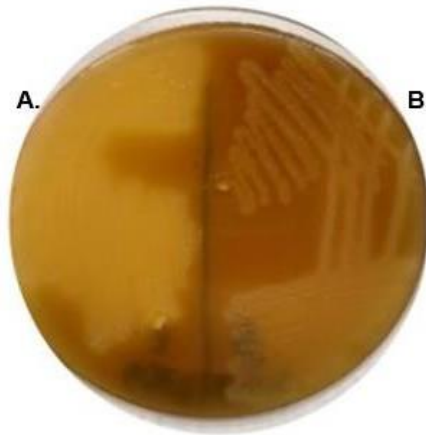
- Esterilizar la quercetina a 121°C x 20 minutos en autoclave.
- El medio mínimo 7N con L-cisteína 5%, se deberá filtrar haciendo uso de un filtro de 0.22 µm en un embudo defiltración. Todo el sistema (embudo y filtro) debe esterilizarse previamente a 121°C por 20 minutos en autoclave.
- Los demás componentes: Agar BHI, agar bacteriológico y agua se esterilizan en autoclave a 121°C por 20 minutos.
- Posterior a la filtración y esterilización se adicionará la cantidad de quercetina estéril respectiva al medio mínimo 7N requerido. Finalmente adicionar la cantidad de medio mínimo 7N más quercetina en el frasco que contiene los demás componentes para el medio de cultivo comercial, mantener en agitación constante con calefacción y dispensar.

Soluciones

- 6.11 **L-Cisteína líquida al 5%:** Pesar 1 g L-Cisteína, 80 uL de resazurina y llevar a un volumen de 20 mL con agua destilada en balón aforado, homogenizar, usando agitador magnético y transferir la solución L-Cisteína 5% a un frasco anaerobio, tapar con tapón de caucho y tapón de aluminio, sellarlo con agrafador y gasear por 2 minutos aproximadamente. Esterilizar en autoclave a 121°C a 20 psi por 20 minutos.
- 6.12 **Quercetina 0,25 mg/mL:** Para preparar una solución stock de 20 mL a una concentración de 2mg/mL, pesar 0,4 mg de quercetina (97%p/p) y llevar a un volumen de 20 mL con agua destilada en balón aforado, homogenizar, usando agitador magnético por aproximadamente 30 minutos y transferir la solución stock de quercetina a un frasco limpio y seco. Esterilizar en autoclave a 121°C a 20 psi por 20 minutos.

Anexo B.

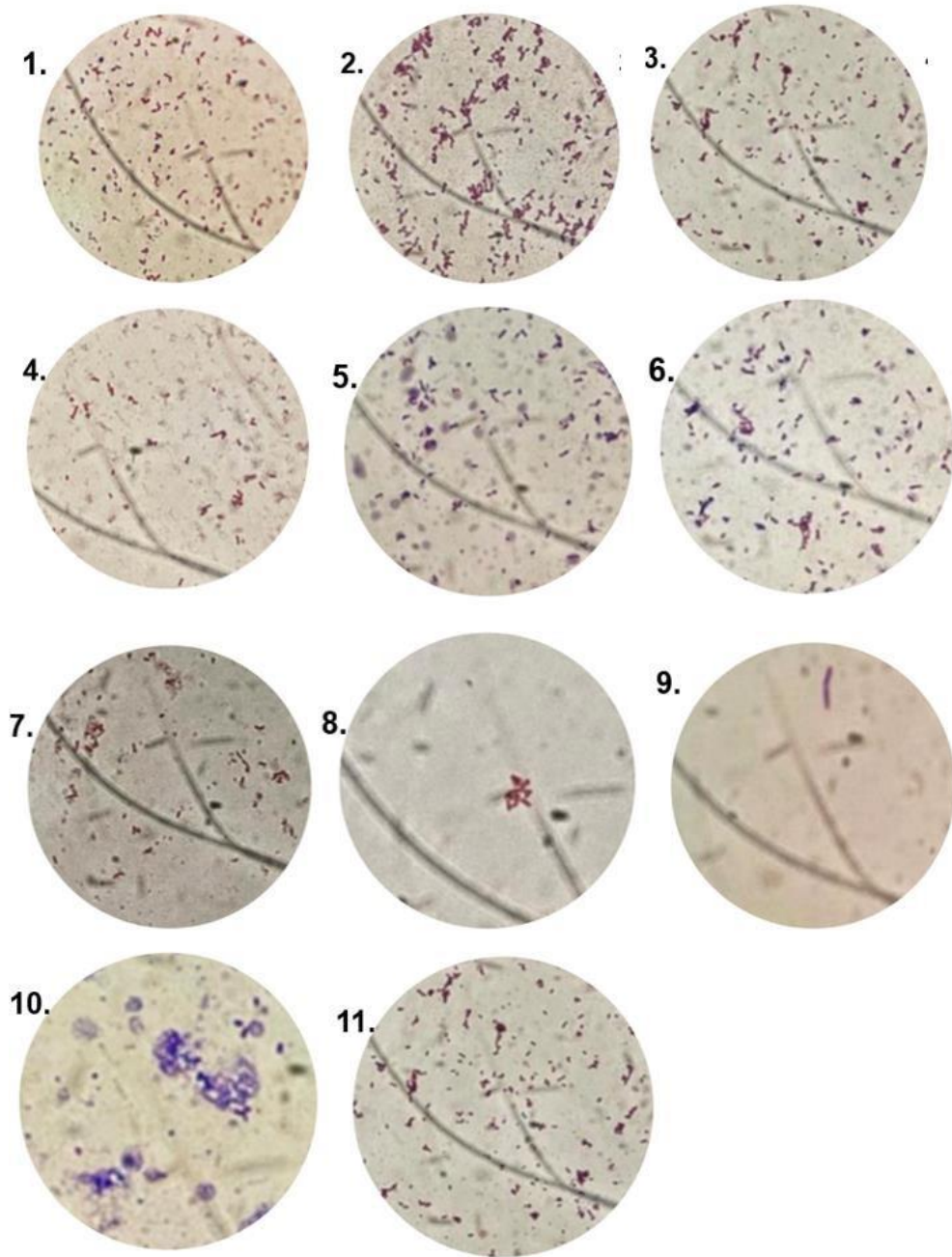
Medio de cultivo 11 con quercetina – Microorganismo transformador vs no transformador de quercetina.



Halo tras la biotransformación de quercetina en medio 11 de **A.** una bacteria que se reconoce por tener la capacidad de transformar quercetina, *F. plautii* versus **B.** una bacteria sin capacidad de transformar este flavonoide. Imagen cedida por Gina Rodríguez Castaño 2020.

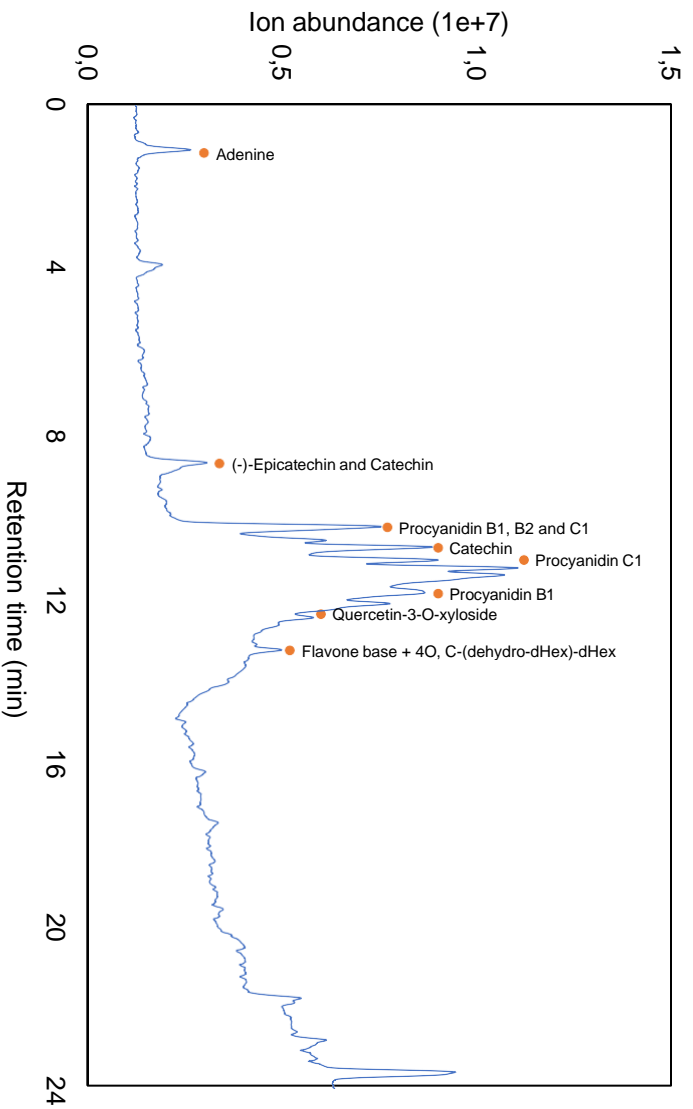
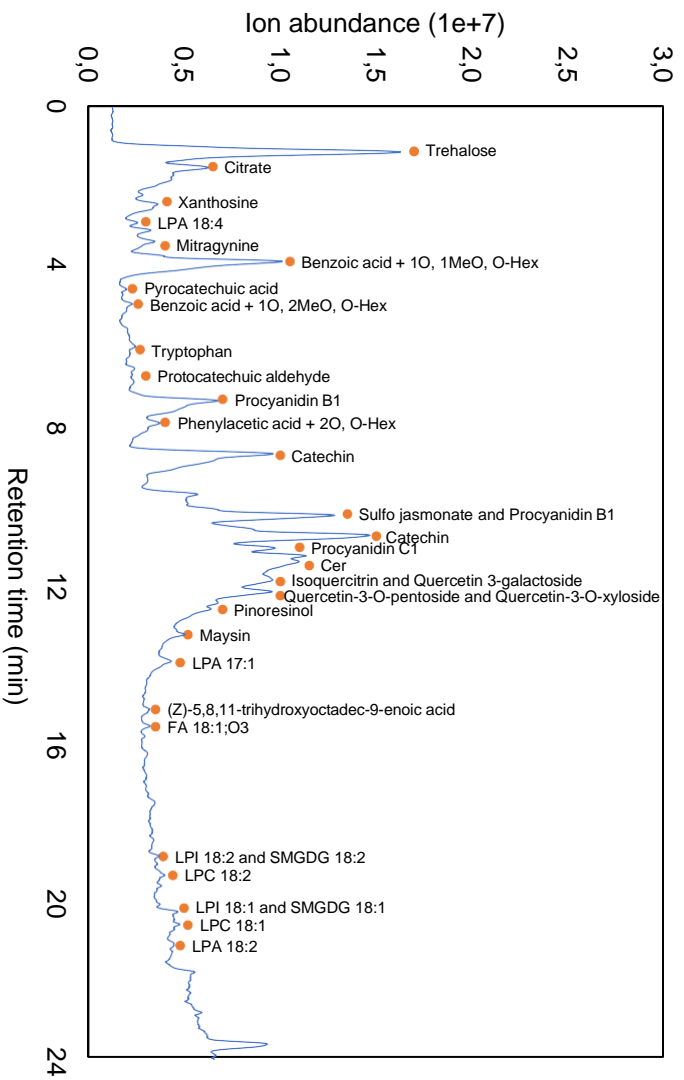
Anexo C.

Descripción microscópica por coloración de Gram de los 11 morfotipos aislados con potencial de biotransformación de quercetina. A partir de las muestras C y G. Estrategia III: Diluciones sucesivas en medio líquido 7NQa partir de la segunda estrategia de aislamiento

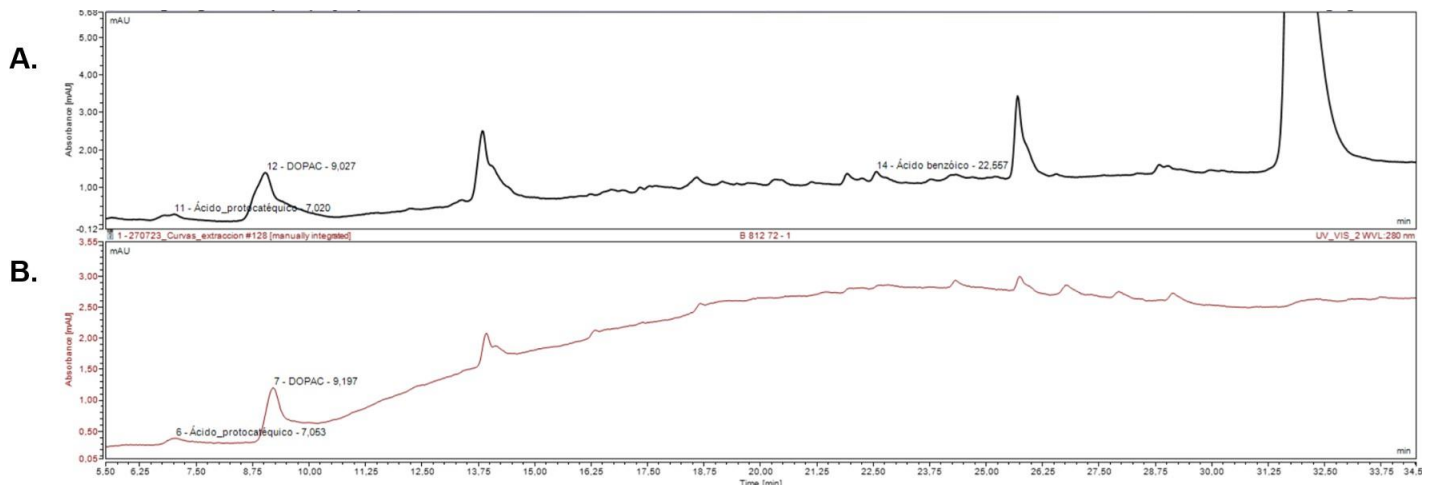


muestras G en caldo BHI (1-6). 1-5: Bacilos Gram positivos cortos y pequeños. 6. Cocobacilos Gram positivos pequeños. Muestra C en caldo LB (7 -11). 7: Bacilos Gram positivos largos pequeños. 8: Bacilos Gram positivos cortos en forma de bloques. 9. Bacilos Gram positivos largos. 10. Coco bacilos Gram positivos cortos. 11. Bacilos Gram positivos cortos gruesos. Fotos tomadas al microscopio en objetivo 100x.

Anexo D. Cromatogramas HPLC del ECRP modo de ionización negativo y positivo, los componentes identificados mediante QTOF-MS/MS se asignan en el pico correspondiente. Quiroz et al., (2024 sometido)



Anexo E. Cromatograma de los perfiles resultantes de los metabolitos por la biotransformación de quercetina, metabolitos y sus estructuras químicas.



Perfil cromatográfico (HPLC-PDA) a 280nm. Metabolitos producidos por biotransformación de quercetina A. *S. flexneri* B. *E. citroniae* y metabolitos: ácido protocatéquico, DOPAC, y ácido Benzoico. Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925

Anexo F. Prueba de Mann-Whitney para la biotransformación de quercetina y producción de metabolitos (DOPAC, ácido benzoico, ácido protocatéquico).

DOPAC

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 12 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.002778
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 24 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.002778
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 48 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 0, p-value = 0.005075
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 72 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 14, p-value = 0.5752
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Tiempo	Estadistico_W	P_valor	Conclusion
12 horas	36	0.002778	Rechazar H0
24 horas	36	0.002778	Rechazar H0
48 horas	0	0.005075	Rechazar H0
72 horas	14	0.575200	No Rechazar H0

Ácido Protocatéquico

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 12 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.002515
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 24 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.004551
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 48 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.004337
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 72 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.004772
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

	Tiempo	Estadistico_W	P_valor	Conclusion
1	12 horas	36	0.002515	Rechazar H0
2	24 horas	36	0.004551	Rechazar H0
3	48 horas	36	0.004337	Rechazar H0
4	72 horas	36	0.004772	Rechazar H0

Ácido Benzoico

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 12 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.003665
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 24 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.003665
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 48 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.002778
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

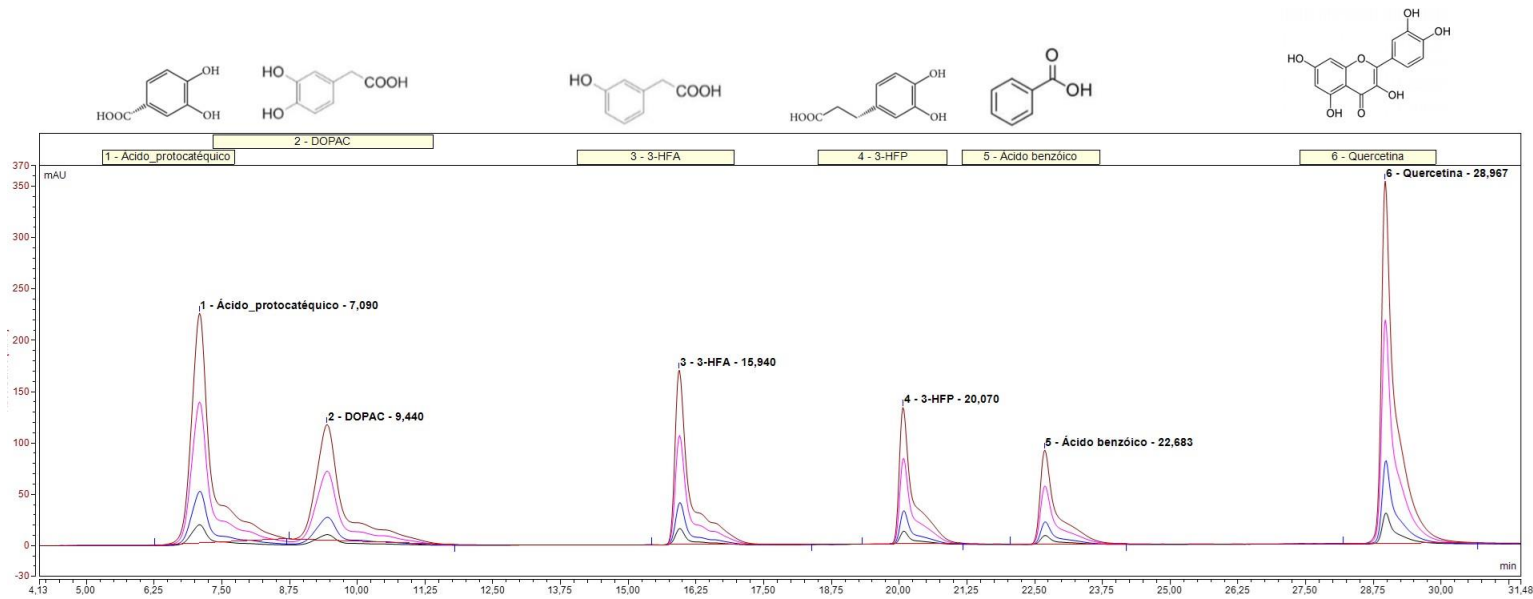
Prueba de Mann-Whitney para el tiempo 72 horas:

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: subset_data\$Cepa_A and subset_data\$Cepa_B
 W = 36, p-value = 0.004998
 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

	Tiempo	Estadistico_W	P_valor	Conclusion
1	12 horas	36	0.003665	Rechazar H0
2	24 horas	36	0.003665	Rechazar H0
3	48 horas	36	0.002778	Rechazar H0
4	72 horas	36	0.004998	Rechazar H0

Anexo G. Cromatograma de los perfiles obtenidos para la quercetina, metabolitos y sus estructuras químicas.



Perfil cromatográfico (HPLC-PDA) a 280nm. Quercetina y metabolitos: ácido protocatéquico, DOPAC, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y ácido Benzoico. Fuente de estructuras químicas de los compuestos: Kamiloglu et al., (2020) Marín et al., (2015). Stähli et al., (2023) Lucaet al., (2020).Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925

Anexo H. Resultados prueba Kruskal-Wallis y comparaciones post hoc por pares mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, para las mezclas del consorcio evaluado (DOPAC, ácido benzoico, ácido protocatéuico).

tt11: *S. flexneri*. **tt12:** *E. citroniae*. **tt13:** *S. flexneri* 25% - *E. citroniae* 75% **tt14:** *S. flexneri* 75% *E. citroniae* 25%
tt15: *S. flexneri* 50% - *E. citroniae* 50%

Metabolito DOPAC

Tratamiento	72 hrs				
	count	mean	sd	median	IQR
tt11	6	0.09580301111	0.0128155396	0.0912160943	0.0103295844108979
tt12	6	0.0946983821	0.0051306361	0.0940728934	0.00469417212966861
tt13	6	0.0581739540	0.0260250881	0.0720995970	0.0353246977807181
tt14	6	0.0763244020	0.0252059557	0.0865850724	0.00386118963132252
tt15	6	0.0672505563	0.0327396056	0.0875804414	0.0477066668671438

```

Kruskal-Wallis rank sum test

data: DOPAC_mgXML by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 16.795, df = 4, p-value = 0.002118

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum exact test

data: pruebaCero$DOPAC_mgXML and pruebaCero$Tratamiento

   tt11 tt12 tt13 tt14
tt12 0.654 -   -   -
tt13 0.023 0.023 -   -
tt14 0.108 0.029 0.085 -
tt15 0.247 0.050 0.273 0.809

P value adjustment method: BH
    
```

Metabolito: ácido benzoico.

Tratamiento	72 hrs				
	count	mean	sd	median	IQR
tt11	6	0.056599532458191	0.0002400196454225	0.0566609722471978	0.000118383983695951
tt12	6	0.050238516254071	0.0123644748001739	0.0552508541629203	3,45E+09
tt13	6	0.03143494375512	0.0157623287235531	0.025	0
tt14	6	0.0463340925892625	0.0165348791968249	0.0565291014805491	0.0242586015704609
tt15	6	0.045800615396911	0.0161134584460902	0.0560330875741773	0.0233879548042918

```

Kruskal-Wallis rank sum test

data: AB_mgXML by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 9.7057, df = 4, p-value = 0.04569

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: pruebaCero$AB_mgXML and pruebaCero$Tratamiento

   tt11 tt12 tt13 tt14
tt12 0.050 -   -   -
tt13 0.186 0.310 -   -
tt14 1.000 0.368 0.368 -
tt15 0.064 0.368 0.368 0.411

P value adjustment method: BH
    
```

Metabolito: ácido protocatéquico

Tratamiento	72 hrs				
	count	mean	sd	median	IQR
tt11	6	0.0708102877209785	0.000138157103446019	0.0708631629354722	0.000187357835508148
tt12	6	0.0702362424677761	0.000206855246880852	0.0702508080929008	0.000290913444271471
tt13	6	0.025		0 0.025	0
tt14	6	0.025		0 0.025	0
tt15	6	0.0477500099764556	0.024921392152816	0.0477358434095534	0.0455022147731354

Kruskal-Wallis rank sum test

data: AP_mgXmL by Tratamiento
 Kruskal-Wallis chi-squared = 23.573, df = 4, p-value = 9.724e-05

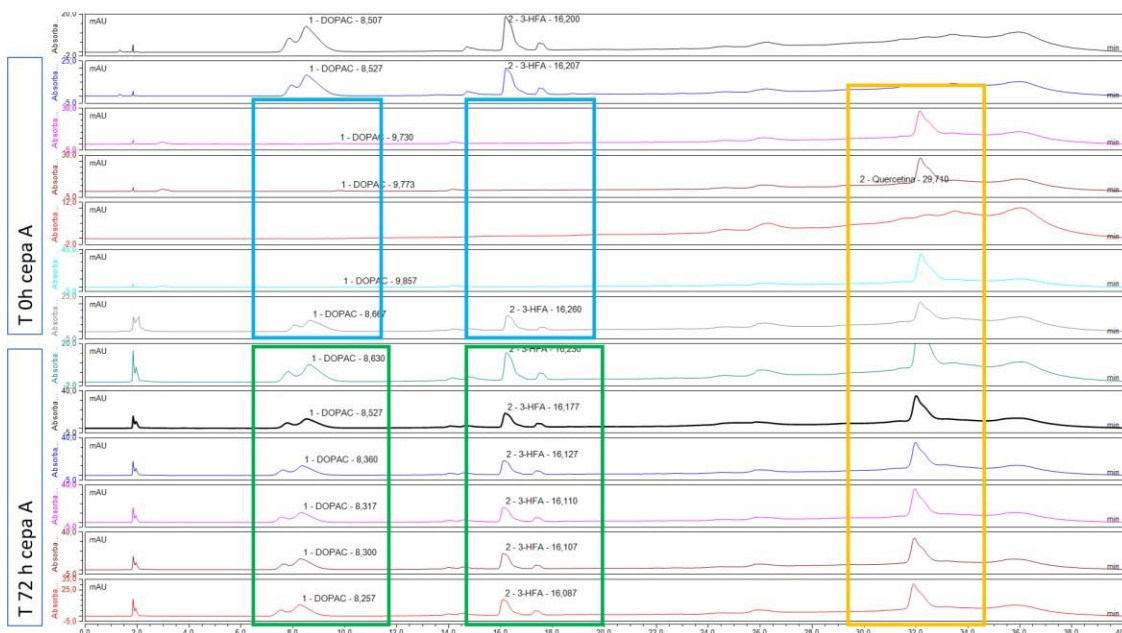
Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum exact test

data: pruebaCero\$AP_mgXmL and pruebaCero\$Tratamiento

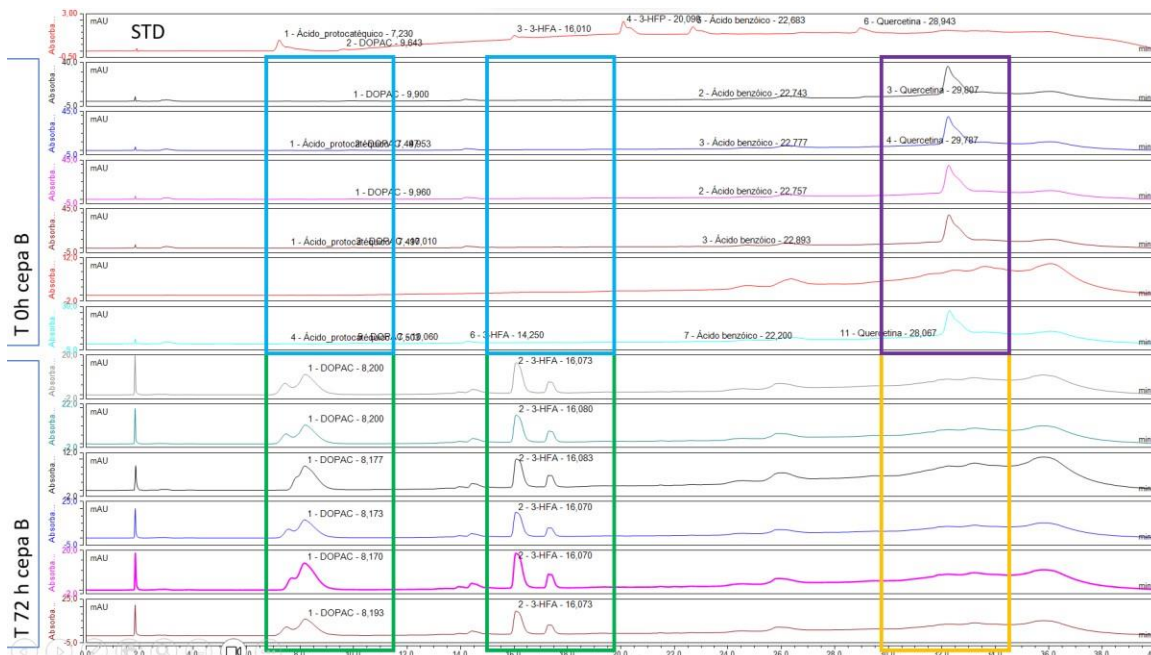
	tt11	tt12	tt13	tt14
tt12	0.0050	-	-	-
tt13	0.0050	0.0050	-	-
tt14	0.0050	0.0050	-	-
tt15	0.0072	0.9357	0.0833	0.0833

P value adjustment method: BH

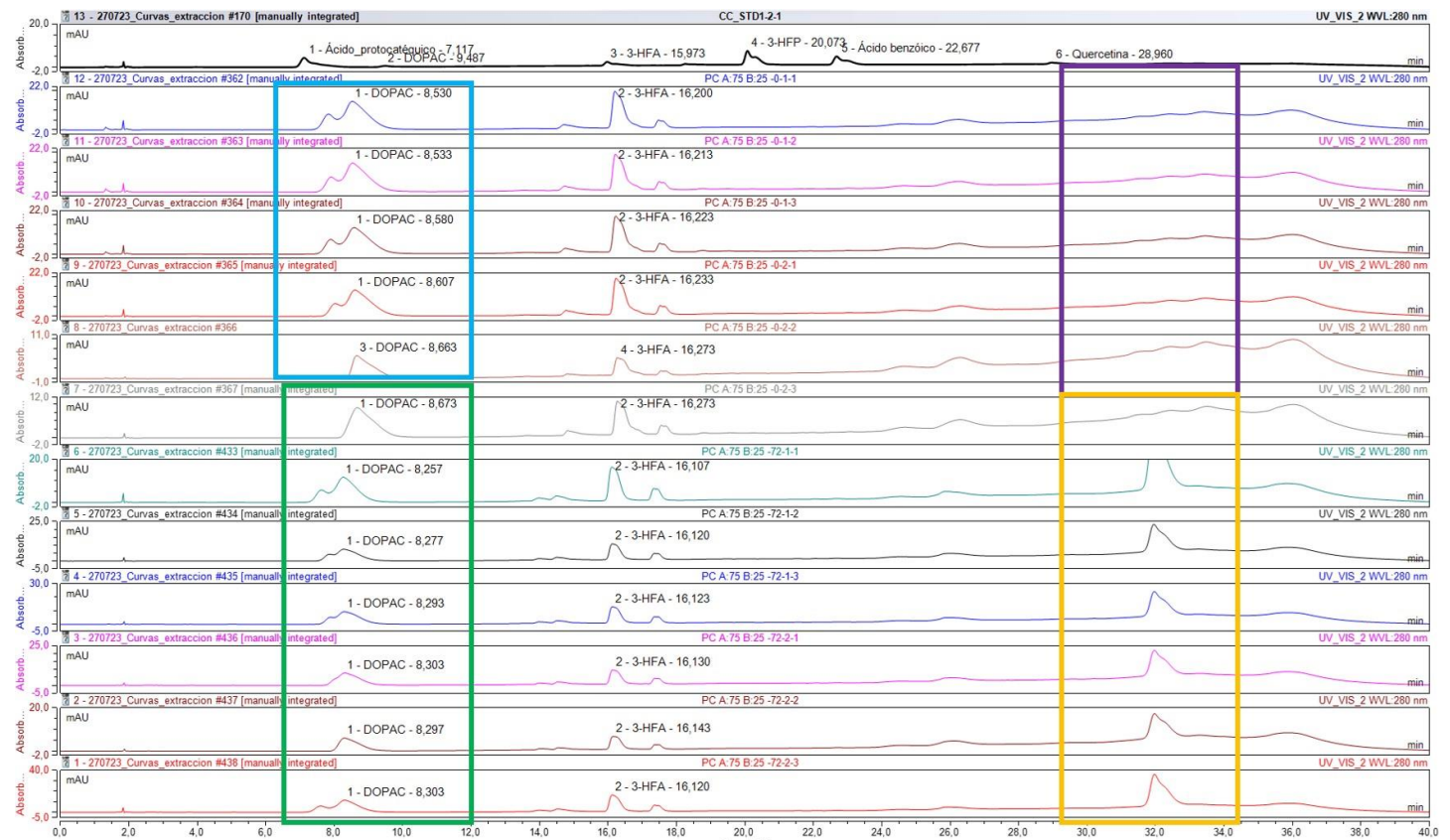
Anexo I. Cromatograma de los perfiles obtenidos en la biotransformación de compuestos polifenólicos presentes en el extracto de cacao rico en polifenoles



Perfil cromatográfico (HPLC-PDA) a 280nm. Extracto cacao rico en polifenoles. Comparación tiempo 0 horas vs 72 horas de fermentación *in vitro* para la Cepa A: *S. flexneri*. Recuadro azul: compuesto no detectado al inicio de la fermentación hora 0. Recuadros verdes: Nuevos compuestos detectados a las 72 horas de fermentación. Recuadro naranja: no se evidencio cambio en el compuesto detectado entre el inicio hora 0 y el final de la fermentación hora 72. Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925

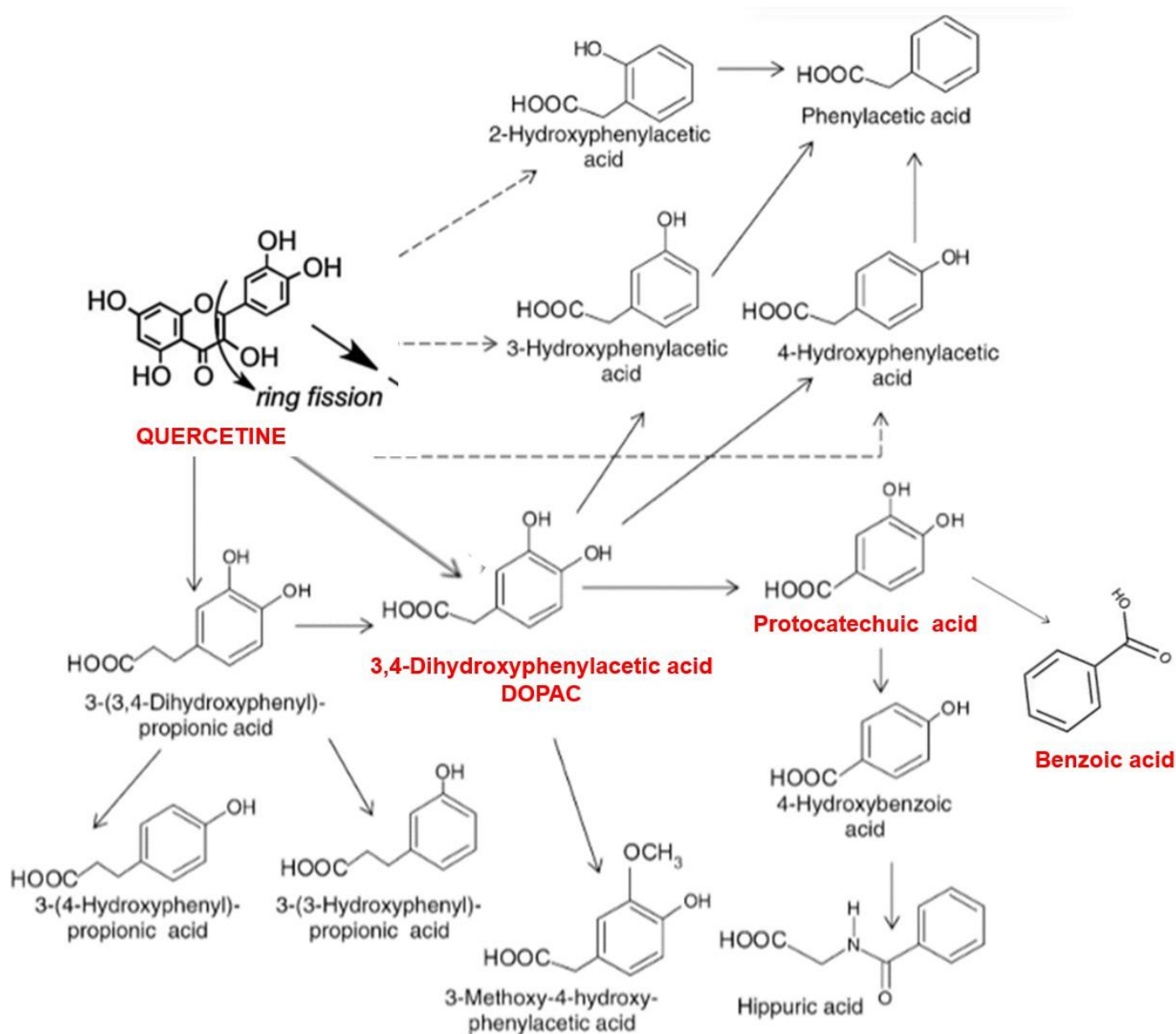


Perfil cromatográfico (HPLC-PDA) a 280nm. Extracto cacao rico en polifenoles. Comparación tiempo 0 horas vs 72 horas de fermentación *in vitro* para la Cepa B: *E. citroniae*. Comparación tiempo 0 horas vs 72 horas de fermentación *in vitro*. Recuadro azul: compuesto no detectado al inicio de la fermentación hora 0. Recuadros verdes: Nuevos compuestos detectados a las 72 horas de fermentación. Recuadro morado: compuesto detectado al inicio de la fermentación hora 0. Recuadro naranja: compuesto no detectado a las 72 horas de fermentación. Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925. Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925.



Perfil cromatográfico (HPLC-PDA) a 280nm. Extracto cacao rico en polifenoles. Comparación tiempo 0 horas vs 72 horas de fermentación *in vitro* para el consorcio artificial microbiano Mezcla 2 (*S. flexneri* 75% - *E. citroniae* 25%) . Recuadro azul: compuesto detectado al inicio de la fermentación hora 0. Recuadros verdes: Compuesto que se va consumiendo observado a las 72 horas de fermentación. Recuadro morado: compuesto no detectado al inicio de la fermentación hora 0. Recuadro naranja: compuesto nuevo detectado al final de la fermentación hora 72. Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925 Chromeleon © Dionex Version 7.2.10.23925.

Anexo J. Posible ruta de biotransformación de quercetina por las cepas aisladas.



Fuente adaptado de: Duda-Chodak et al.,(2015); Jaganath et al., (2006). En rojo se resaltan los metabolitos generados por las cepas aisladas y detectadas por la técnica empleada de HPLC-PDA en este estudio.