

E bitaminaren gehikuntza urdail-hesteetako *in vitro* digestioan: efektu antioxidatzailea edo prooxidatzailea?

(Addition of vitamin E during *in vitro* gastrointestinal digestion: antioxidant or prooxidant effect?)

*Bárbara Nieva-Echevarría**, Encarnación Goicoechea, María D. Guillén

¹ Elikagaien Teknologia Arloa, Farmazia Fakultatea, Lascaray Ikerguna, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz

* barbara.nieva@ehu.eus

DOI: 10.1387/ekaia.19720

Jasoa: 2018-05-15

Onartua: 2018-06-25

Laburpena: Lan honen helburua liho-olioaren urdail-hesteetako *in vitro* digestioan d,l-alfa-tokoferolaren gehitzeak (200, 2000 eta 20000 ppm) konposatu lipidikoen hidrolisian eta oxidazioan duen efektua aztertzea zen. Horretarako, protoi erresonantzia magnetiko nuklearra (¹H NMR) teknika erabili zen. Jatorri sintetikoko E bitamina honen gehikuntzak ez zuen efekturik izan lipolisian, baina oxidazioa areagotu zuen, dosi-mendeko modu batean. Hau kate poliasegabeen degradazioaren eta oxidazio-konposatuen sorreraren handipenek nabarmendu zuten. Ikerlan honen kondizioetan, alfa-tokoferolaren presentziak aldehidoen eta hidroxido edo keto taldeak dituzten dieno konjugatuen sorreran lagundu zuen.

Hitz gakoak: antioxidatzailea, prooxidatzailea, digestioa, lipolisia, oxidazio-markatzaileak.

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of linseed oil enrichment with d,l-alpha-tocopherol (200, 2000 and 20000 ppm) on the hydrolysis and oxidation undergone by lipidic components during *in vitro* gastrointestinal digestion. Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) was the technique employed. Although the addition of this synthetic form of vitamin E did not affect lipolysis, the advance of oxidation reactions increased in a concentration-dependent manner. This was evidenced by the increase of polyunsaturated chains degradation and of oxidation compounds generation. Under the conditions of this study, the formation of aldehydes and of conjugated dienes having a hydroxy or a keto group was favoured in the presence of alpha-tocopherol.

Keywords: antioxidant; prooxidant; digestion; lipolysis; oxidation markers.

1. SARRERA

Azken hamarkadan, elikagai-industrian modan egon da elikagaiak konposatu antioxidatzailez aberastea, orokorrean onartu delako konposatu horiek lipidoen oxidazioa atzeratzen dutela, bai elikagaietan bai sistema biologikoetan. Konposatu horien artean, E bitamina erabili da asko helburu horretan; izan ere, elikagaietan modu naturalean dagoenez, kontsumitzaileek gehigarri naturalizat eta segurutzat hartzen dute. E bitamina zortzi isomformez osatuta dago: lau tokoferolez (alfa-, beta-, gamma- eta delta-) eta lau tokotrienolez (alfa-, beta-, gamma- eta delta-) [1]. Horien artean, sistema biologikoetan dagoen formarik indartsuena eta ugariena RRR-, d-, 2D,4'D,8'D- edo (+)-alfa-tokoferola da [2]. Sintesi kimiko bidez lortutako alfa-tokoferola (E-307 gehigarri antioxidatzailea) posible diren zortzi estereoisomeroen nahasketa da (RRR, SRR, RRS, SRS, RSR, SSR, RSS eta SSS) eta *all-rac*-alfa-tokoferola edo d,l-alfa-tokoferola izena du. Estereoisomeroen *in vivo* aktibitatea desberdina izan daitekeela kontuan hartuta, horiek elkarrengandik bereiztea ez da gauza hutsala [3].

Ikerketa batzuek, hala ere, alfa-tokoferolaren kontsumoa osasunerako kaltegarriak diren hainbat efektuekin erlazionatu dute (prostata-minbizia agertzeko aukeraren igoerarekin, esate baterako) [4, 5]. Emaiza kontrajarri horiek alfa-tokoferolaren aktibitate prooxidatzaile potentzialari esker azal litezke. Konposatu horrek lipidoen oxidazioa eragozteko antioxidatzaile bezala jokatzeko duenean, ikusi da sortutako tokoferoxil erradikalek prooxidatzaile bezala joka dezaketela [6]. Ondorioz, amaierako efektua zaila izaten da aurreikusten. Gainera, alfa-tokoferolaren oxidazio-produktu batzuek ere aktibitate prooxidatzailea erakutsi dute [7].

Ahalegin asko egin dira alfa-tokoferolak kondizio suabeetan lipidoen oxidazioa nola atzeratzen duen ikertzeko, baina oraindik eztabaida dago konposatu honen jarduera antioxidatzailearen edota prooxidatzailearen inguruan. Beraz, ez dago argi zein faktorek baldintzatzen duten portaera hori. Ikerketa batzuetan, alfa-tokoferolaren efektu antioxidatzailea oso nabaria izan da: adibidez, aberastutako (≤ 2000 ppm) ekilore-olioaren 55°C-ko termooxidazioan [8] eta arrain-olioaren 30 °C-ko biltegitratzean [9]. Beste ikerlan batzuetan, berriz, alfa-tokoferolaren efektu prooxidatzailea agerian utzi da: esaterako, aberastutako (250-1000 ppm) arto-olioan eta soja-olioan, hurrenenez hurren 60°C-an eta 55°C-an termooxidatuta [10, 11].

Lehen aipatutako artikuluetan, ikertutako oxidazio-kondizio eta lipidoez gain, oxidazio-erreakzioak ebaluatzeko erabilitako metodologiak ere desberdinak dira. Horrek are eta zailago egiten du alfa-tokoferolaren antioxidatzaile/prooxidatzaile jokaeraren inguruan ondorioak ateratzea. Izan ere, aukeratutako oxidazio-markatzailearen arabera (hidroperoxidoak edo aldehidoak), ondorio desberdinak lortzen ziren alfa-tokoferolaren portarari dagokionez [10]. Gauzak horrela, garrantzi handikoa da oxidazio-kon-

posatu guztiei buruzko informazio zehatza ematen duten teknikak erabiltzea, eta ez konposatu horietako bat edo bi bakarrik kontrolatzea. Helburu horrekin, aurreko azterlan batean protoi erresonantzia magnetiko nuklear izeneko teknika (^1H NMR) erabili zen soja-olioaren oxidazioan d,l-alfa-tokoferolak zer-nolako eragina (antioxidatzailea/ prooxidatzailea) zuen aztertzeko [12]. Egileen aburuz, 70°C -an termooxidatutako soja-olioan gehitutako d,l-alfa-tokoferolak (200-50000 ppm) nabarmenki faboratzen du oxidazio-konposatu primarioen eta sekundarioen sorrera. Hala ere, 20 ppm gehitu eta gero, ez zen inolako aldaketarik nabaritu.

Digestioan alfa-tokoferolak duen eraginari dagokionez, orain arte, hiru *in vitro* ikerketan aztertu da zer eragin duen konposatu horrek lipidoen oxidazioan, eta berriro ere emaitza kontrajarriak lortu dira. Aberastutako (500 ppm) koltza-olioaren emultsioaren urdail-hesteetako *in vitro* digestioan, hidroperoxidoak eta malonadialdehidoa neurtuta, oso argi nabarmendu zen alfa-tokoferolaren aktibitate antioxidatzailea [13]. Aberastutako (1000 ppm) bakailao gibelaren olioaren urdail-hesteetako *in vitro* digestioan, berriz, ez zen ikusi diferentzia esanguratsurik aberastutako eta aberastu gabeko olioaren oxidazio-mailen artean, teknika desberdinen bidez hidroperoxidoak eta malonadialdehidoa neurtu ondoren [14]. Aurreko emaitzak kontuan hartuta, komeniko litzateke sakonago aztertzea zer eragin duen alfa-tokoferolak digestioan gertatutako lipidoen oxidazioan. Izan ere, informazio hori, giza osasunean izan dezakeen eragin zuzenagatik, interesgarria izango litzateke ez bakarrik elikagai-industriarentzat, baita kontsumitzaileentzat ere.

Testuinguru honetan, ikerlan honek aztertzen du zer efektu duen liho-olioaren urdail-hesteetako *in vitro* digestioan d,l-alfa-tokoferola gehitzeak (200, 2000 eta 20000 ppm), gertatzen den lipidoen hidrolisian eta oxidazioan batik bat. Horretarako, gertatzen diren aldaketak ^1H NMR teknikaren bidez aztertuko dira aberastutako eta aberastu gabeko liho-olioetan, digestioaren aurretik eta ondoren. Alfa-tokoferolaren kontzentrazio horiek ikuspuntu praktikoko batetik interesgarriak izan daitezkeelako aukeratu dira; izan ere, gaur egun Europan posible da konposatu hau olioetara edozein kontzentrazioan gehitzea, hau da, *ad quantum satis* (olio birjinak eta oliba-olioak izan ezik) [15].

2. MATERIALAK ETA METODOAK

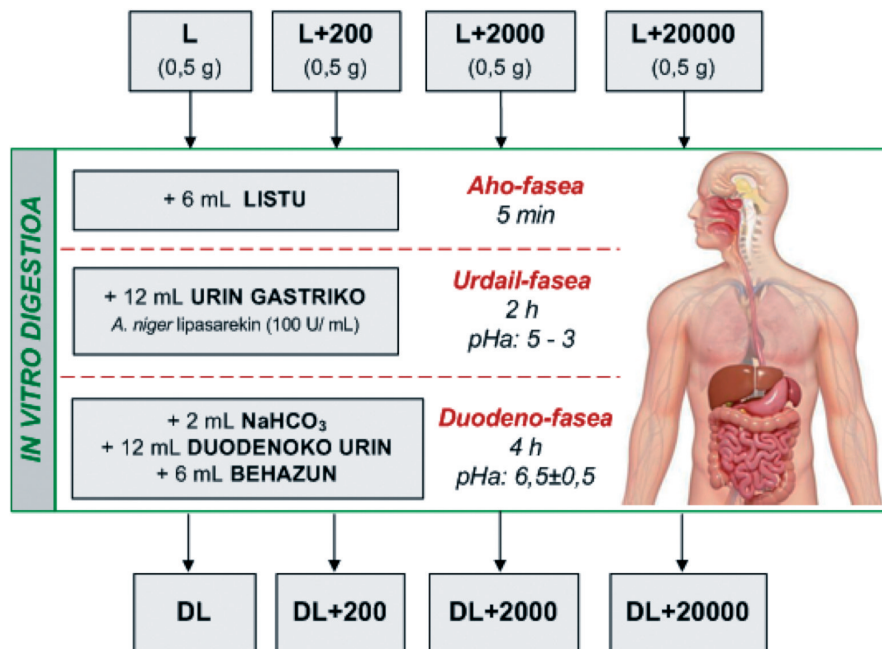
2.1. Hasierako olio-laginak

Liho-olioa (L) supermerkatu batean erosi zen. Olio mota hau linoleniko azilo taldetan (C18:3omega3) oso aberatsa delako, eta ondorioz, azkarrago oxidatzeko joera duelako aukeratu zen. Olio honen hainbat alikuotari d,l-alfa-tokoferola ($\geq 95,5\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB)

gehitu zitzaion kontzentrazio desberdinetan: 200 ppm (L + 200), 2000 ppm (L + 2000) eta 20000 ppm (L + 20000).

2.2. Urdail-hesteetako *in vitro* digestio-esperimentuak

Lehen aipatutako olio-laginak (L, L + 200, L + 2000, L + 20000, 0,5 g bakoitzeko) urdail-hesteetako *in vitro* eredu estatiko baten bidez digeritu ziren [16, 17]. Digestio-uriri guztiak (listua, urin gastrikoa, duodenoko urina eta behazuna) prestatzeko erabilitako erreaktiboak Sigma-Aldrichen erosi ziren. *In vitro* eredu estatiko horrek hiru etapa ditu, ahoan, urdailean eta duodenoan gertatzen diren digestio-prozesuak imitatzeko (ikus 1. irudia). Emaitza fidagarriak lortzeko, lagin bakoitza hiru aldiz digeritu zen, eta lortutako laginak honela izendatu ziren: DL (n = 3), DL + 200 (n = 3), DL + 2000 (n = 3) eta DL + 20000. Digestio-esperimentu bakoitzean, aldi berean lagin zuri bat (Z izenekoa) digeritu zen (digestio-urinekin baina olio eta alfa-tokoferolarik gabe).



1. irudia. Urdail-hesteetako *in vitro* digestioaren eredu estatikoaren eskema [16, 17].

2.3. Lipidoen erauzketa eta protoi erresonantzia magnetiko nuklearra (¹H NMR)

Digeritutako laginen lipidoak diklorometanoarekin erauzi ziren (CH₂Cl₂, HPLC mailakoa, Sigma-Aldrich), aurreko ikerlanetan bezala [18-20]. Disolbatzailea kentzeko, lurrungailu birakaria erabili zen, presio baxuan eta giro-tenperaturan lipidoen oxidazioa eragozteko.

Bai hasierako olio-laginak (L, L + 200, L + 2000, L + 20 000) bai digeritutako laginen lipidoak (DL, DL + 200, DL + 2000, DL + 20 000) protoi erresonantzia magnetiko nuklearren bidez (¹H NMR) aztertu ziren, Bruker Avance 400 espektrometroa erabiliz (400 MHz). Lagin bakoitza, deuteratutako kloroformotan disolbatuta (CDCl₃, Eurisotop, Frantzia), bi esperimenturen bidez aztertu zen birritan: ¹H NMR esperimentu estandarra [20] eta berriago bat, zeinak protoien seinale nagusiak kentzen baititu 5,8-9,8 ppm tartean agertzen diren protoi-seinale txikiak hobeto ikusteko [22]. Hortaz, lagin mota bakoitzetik, guztira, hamabi espektro atera ziren. Espektroen protoi-seinaleen esleipena 1. taulan dago zehaztuta.

Kontuan hartuta, alde batetik, ¹H NMR espektroko seinale bakoitzaren azalera seinale hori sortzen duen protoi-kopuruarekiko proportzionala dela eta, bestetik, ¹H NMR espektro estandarrean protoi guztientzako proportzionaltasun-konstantea berdina dela eta, espektroko seinale batzuen azalerari esker hainbat konposaturen kontzentrazioa zenbatestea posible da [18-23]:

- Digestioan triglizeridoetatik (TG%) sortutako konposatu lipolitikoaren proportzio molarrak (%), hau da, diglizeridoenak (1,2-DG%, 1,3-DG%), monoglizeridoenak (2-MG%, 1-MG%) eta glizerolarena (Gol%).
- Hainbat azilo talderen (AZ) eta gantz-azidoren (GA) proportzio molarrak (%), hau da, AZ eta GA asegabe totalenak, linoleiko AZ eta GAenak, linoleniko AZ eta GAenak, oleiko AZ eta GAenak, AZ eta GA aseanek gehi eraldatutakoenak. Azken hauek hasierako AZ asegabea eta GA dira (linoleikoa, linolenikoa, oleikoa), zeinen estruktura aldatu den oxidazio-erreakzioengatik.
- Oxidazio-konposatu batzuk, bai primarioak (dieno konjugatuak) bai sekundarioak (aldehidoak).

1. taula. Liho-olioaren laginen ^1H NMR espektro-seinaleen desplazamendu kimikoen esleipena eta multiplizitatea, *in vitro* digeritu baino lehen eta ondoren. Seinale horiek hainbat protoik sortu dituzte: glizerido, gantz-azido eta oxidazio-konposatu batzuek [21-33]. Seinaleen hizkiak eta 3. eta 4. irudietan agertzen direnak bat datoz.

Seinalea	Desplazamendu kimikoak (ppm)	Multiplizitatea	Taldea funtzionala	
			Protoi mota	Konposatua
Glizerido eta gantz-azido nagusien seinaleak				
A	0,88	t	$-\text{CH}_3$	Aseak, monoaseak <i>omega-9</i> edota <i>omega-7</i> AZ eta GA
	0,89	t	$-\text{CH}_3$	linoleiko AZ eta GA
B	0,97	t	$-\text{CH}_3$	linoleniko AZ eta GA
C	1,19-1,42	m^s	$-(\text{CH}_2)_n-$	AZ eta GA
D	1,61	m	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	AZ TGetan
	1,62	m	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	AZ 1,2-DGetan
	1,63	m	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	AZ 1,3-DG, 1-MG eta GAetan
	1,64	m	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	AZ 2-MGetan
E	1,92-2,15	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	AZ eta GA
F	2,26-2,36	dt	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$	AZ TGetan
	2,33	m	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$	AZ 1,2-DGetan
	2,35	t	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$, $\text{COOH}-\text{CH}_2-$	AZ 1,3-DG, 1-MG eta GAetan
	2,38	t	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$	AZ 2-MGetan
G	2,77	t	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	linoleiko AZ eta GA
H	2,80	t	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	linoleniko AZ eta GA
I	3,65	ddd	$\text{ROCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1-MGetan
J	3,73	m	$\text{ROCH}_2-\text{CH}(\text{OR}')-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1,2-DGetan
K	3,84	m	$\text{HOCH}_2-\text{CH}(\text{OR})-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 2-MGetan
L	3,94	m	$\text{ROCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1-MGetan
M	4,05-4,21	m	$\text{ROCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OR}'$	glizeril taldea 1,3-DGetan
N	4,18	ddd	$\text{ROCH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1-MGetan
O	4,22	dd,dd	$\text{ROCH}_2-\text{CH}(\text{OR}')-\text{CH}_2\text{OR}''$	glizeril taldea TGetan
P	4,28	ddd	$\text{ROCH}_2-\text{CH}(\text{OR}')-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1,2-DGetan
Q	4,93	m	$\text{HOCH}_2-\text{CH}(\text{OR})-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 2-MGetan
R	5,08	m	$\text{ROCH}_2-\text{CH}(\text{OR}')-\text{CH}_2\text{OH}$	glizeril taldea 1,2-DGetan
S	5,27	m	$\text{ROCH}_2-\text{CH}(\text{OR}')-\text{CH}_2\text{OR}''$	glizeril taldea TGetan
T	5,28-5,46	m	$-\text{CH}=\text{CH}-$	AZ eta GA

*E bitaminaren gehikuntza urdail-hesteetako in vitro digestioan:
efektu antioxidatzailea edo prooxidatzailea?*

Seinalea	Desplazamendu kimikoak (ppm)	Multiplizitatea	Talde funtzionala	
			Protoi mota	Konposatua
Oxidazio-konposatuen seinale nagusiak				
<i>Dieno konjugatuak</i>				
-	5,40	ddt	$-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-$	<i>zis,trans</i> -dieno konjugatuak eta hidroxi talde bat dituzten okta-deka-di/tri-enoiko AZ eta GA
a	5,64	dd		
a	5,94	dd		
a	6,47	ddd		
-	5,51	dtm	$-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-$	<i>zis,trans</i> -dieno konjugatuak eta hidroperoxi talde bat dituzten okta-deka-di/tri-enoiko AZ eta GA
-	5,56	ddm		
b	6,00	ddtd		
b	6,58	dddd		
-	5,58	dd	$-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-$	<i>trans,trans</i> -dieno konjugatuak eta hidroxi talde bat dituzten okta-deka-di/tri-enoiko AZ eta GA
c	5,71	dd		
c	6,03	dd		
c	6,18	dd		
d	5,86-5,92	dt/m	$-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-\underline{\text{CH}} = \underline{\text{CH}}-$	<i>zis,trans</i> - edo <i>trans,trans</i> -dieno konjugatuak eta keto talde bat dituzten okta-deka-di/tri-enoiko AZ eta GA
d	6,12-6,14	t		
d	6,17-6,20	d		
d	7,49-7,53	ddd		
<i>Protoi bis-alilikoak oxigenatutako okta-dekatrienoiko AZ eta GAetan</i>				
a*	2,93	t	$= \text{HC}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH} = \text{CH}-\text{CH} =$	9-hidroxi-10 <i>trans</i> ,12 <i>zis</i> ,15 <i>zis</i> - eta 16-hidroxi-9 <i>zis</i> ,12 <i>zis</i> ,14- <i>trans</i> -okta-dekatrienoiko AZ eta GA
d*	3,05	t	$= \text{HC}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH} = \text{CH}-\text{CH} =$	9-oxo-10 <i>trans</i> ,12 <i>zis</i> ,15 <i>zis</i> - ok-tadekatrienoiko AZ eta GA
<i>Epoxidoak</i>				
e	2,94	m	$-\underline{\text{CHOHC}}-$	monoepoxi-okta-dekadienoiko AZ eta GA
Aldehidoak				
f	9,49	d	$-\underline{\text{CHO}}$	<i>trans</i> -2-alkenalak
g	9,52	d	$-\underline{\text{CHO}}$	<i>trans,trans</i> -2,4-alkadienalak
h	9,55	d	$-\underline{\text{CHO}}$	4,5-epoxi- <i>trans</i> -2-alkenalak
i	9,60	d	$-\underline{\text{CHO}}$	<i>zis,trans</i> -2,4-alkadienalak
j	9,75	t	$-\underline{\text{CHO}}$	alkanalak

Laburdurak: AZ, azilo taldea; GA, gantz-azidoa; t, hirukotea; m, multiplitea; d, bikotea; TG, triglizeridoak; DG, diglizeridoak; MG, monoglizeridoak; s, singletea.

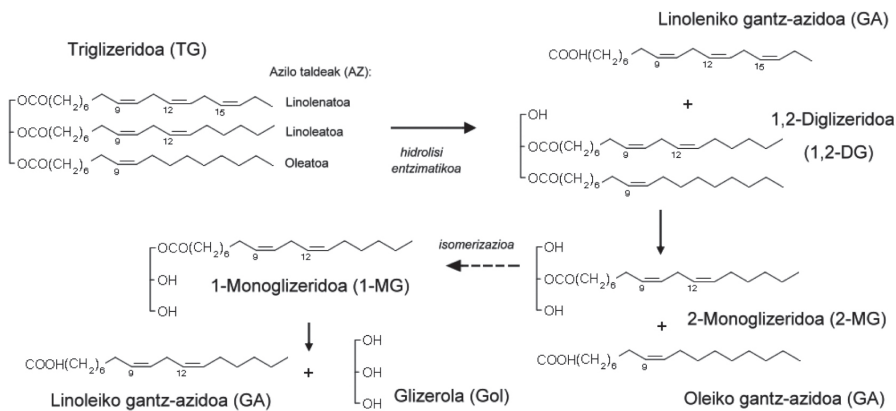
2.4. Analisi estatistikoa

Laginen emaitzen artean aurkitutako desberdintasunak estatistikoki esanguratsuak diren jakiteko, faktore bakarreko bariantza-analisia (ANOVA) eta *Tukey b* testa aplikatu ziren ($p < 0,05$), SPSS softwarea erabiliz (22. bertsioa, IBM, NY, AEB).

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

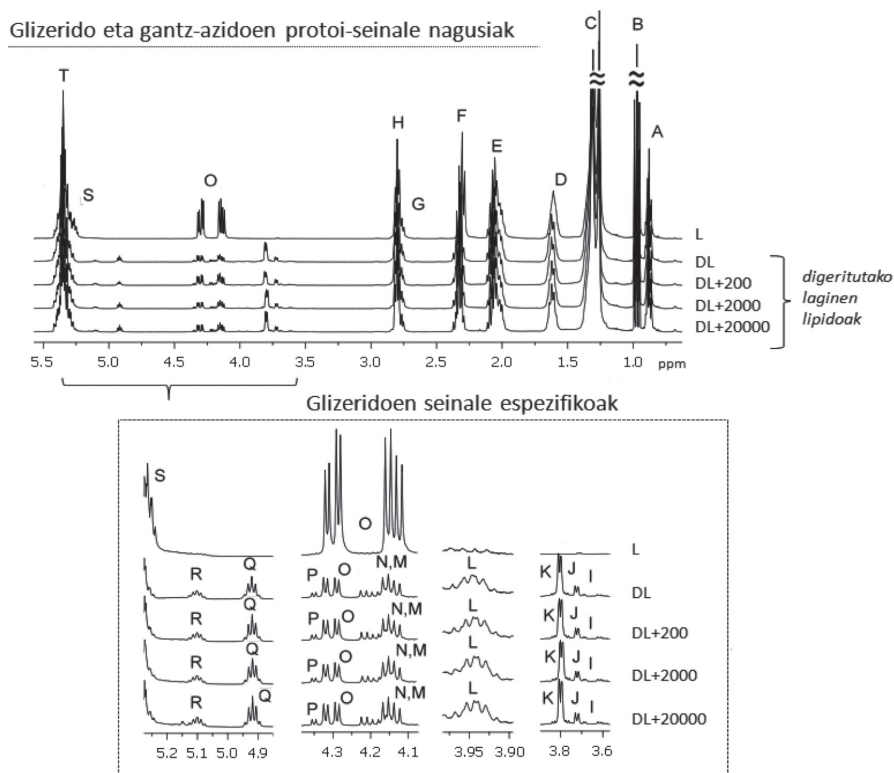
3.1. Alfa-tokoferolaren gehikuntzaren efektua liho-olioaren *in vitro* digestioan gertatutako lipolisian

Triglizeridoak (TG) olioien osagai nagusiak dira, eta digestioan gertatzen den erreakzio nagusienetako bat hauen azilo taldeetako (AZ) ester loturen hidrolisi entzimatikoa da (urdailekoa eta batik bat duodenokoa, lipasek eragina). Adibide gisa, 2. Irudian, lipolisi-prozesu *in vivo* nola gerta daitekeen ikusten da. Lehenik eta behin, lipasek muturrean dagoen azilo talde bat hidrolizatzen dute; ondorioz, dagokion gantz-azidoa eta 1,2-diglizeridoa (1,2-DG) askatzen dira. Ondoren, 1,2-DGak beste hidrolisi bat jasaten du; muturrean dagoen azilo taldea galtzen da, eta 2-monoglizerido (2-MG) molekula bihurtzen da. Erabateko lipolisia ere gerta daiteke, hau da, TG-a glizerol (Gol) eta 3 gantz-azido (GA) bihurtzea. Horretarako, isomerizazio-prozesua, non 2-MG 1-monoglizerido (1-MG) bihurtzen den, beharrezkoa da. Izan ere, lipasa pankreatikoa ez da glizeroleko bigarren karbono atomoan esterifikatuta dagoen azilo taldea apurtzeko gai. Erreakzio honen bilakaera eta sortutako konposatu lipolitikoak ^1H NMR teknika-ren bidez azter daitezke.



2. irudia. Digestioan gerta daitekeen triglizeridoen erabateko hidrolisiaren eskema.

E bitaminaren gehikuntza urdail-hesteetako in vitro digestioan: efektu antioxidatzailea edo prooxidatzailea?



3. irudia. Hasierako liho-olioaren (aberastu gabea, L) eta digeritutako laginen lipidoen (aberastu gabea, DL, eta alfa-tokoferolez aberastua, 200 ppm [DL + 200], 2000 ppm [DL + 2000] eta 20 000 ppm [DL + 20 000]) ^1H NMR espektroak, esperimentu estandarrekin egindakoak. Espektro-tarte batzuk egoki handitu dira seinaleak hobeto ikusteko. Protoi-seinaleen hizkiak 1. taulan daudenekin bat datoz.

3. irudian, zenbait ^1H NMR espektro ikus daitezke: alegia, hasierako liho-olioarena (aberastu gabea, L) eta digeritutako laginen lipidoenak (aberastu gabea, DL, eta aberastua, DL + 200, DL + 2000 eta DL + 20 000). Laginetan aurkitutako lipolisi-produktuen portzentaje molarrak 2. taulan daude bilduta. Espektroetan eta 2. taulako datuetan ikus daitezkeen bezala, lagin guztietan, digestioaren bitartean, TG gehienak hidrolizatu, eta DG, MG eta Gol-ak sortu ziren. Alfa-tokoferolaren gehikuntzak ez zuen eragin nabarmenik izan erreazio honetan. Emaitza hori oso garrantzitsua da, gauza jakina delako hidrolisi-maila zenbat eta altuagoa izan orduan eta errazagoa dela oxidazioa gertatzea (GA > MG > DG > TG). Gauzak horrela, lagin ezberdinen oxidazio-mailen artean aurki daitezkeen desberdintasunak alfa-tokoferolaren presentzia edo gabeziaren eraginaren ondorio izango dira bakarrik (eta ez hidrolisiaren eraginagatik).

2. taula. Konposatu lipolitikoen proportzio molarrak (%) liho-olioan *in vitro* digeritu baino lehen (L) eta gero, alfa-tokoferola gehitu gabe (DL) edo 200 ppm (DL + 200), 2000 ppm (DL + 2000) eta 20000 ppm (DL + 20000) gehituta. Leerro bakoitzean hizki desberdinak agertzen badira, horrek desberdintasun esanguratsuak daudela esan nahi du ($p < 0,05$).

Proportzio molarrak (%)	L	DL	DL + 200	DL + 2000	DL + 20000
TG	97,2 ± 1,4 ^a	21,7 ± 0,3 ^b	25,6 ± 4,0 ^b	22,9 ± 5,3 ^b	24,1 ± 6,2 ^b
1,2-DG	1,3 ± 0,0 ^a	13,9 ± 1,5 ^b	12,3 ± 4,5 ^b	14,9 ± 0,4 ^b	15,9 ± 0,3 ^b
1,3-DG	—	2,2 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,6 ^a	2,4 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,8 ^a
2-MG	—	26,7 ± 0,6 ^a	23,9 ± 4,4 ^a	24,5 ± 5,1 ^a	26,0 ± 5,2 ^a
1-MG	—	9,8 ± 1,9 ^a	8,3 ± 0,4 ^a	9,6 ± 1,8 ^a	8,9 ± 1,6 ^a
Gol	1,5 ± 1,4 ^a	25,7 ± 3,8 ^b	27,5 ± 5,1 ^b	25,7 ± 1,6 ^b	22,9 ± 3,1 ^b

Laburdurak: TG, triglizeridoak; DG, diglizeridoak; MG, monoglizeridoak; Gol, glizerola.

3.2. Alfa-tokoferolaren gehikuntzaren efektua liho-olioaren *in vitro* digestioan gertatutako oxidazioan

Oro har, bai elikagaietan bai edozein sistema biologikotan, lipidoen oxidazioa hasten denean, erradikal askeen eraginez, TGen AZ asegabeen egiturak eraldatzen dira, eta oxidazio-produktu primarioak sortzen. Hasiarako lagina partzialki edo erabat hidrolizatuta badago, substratuak DGen eta MGen AZ asegabeak eta GA asegabeak izango dira. Sortutako oxidazio-produktu primarioak oso erreaktiboak dira eta, arrunki, dieno konjugatuak eta talde oxigenatu bat dituzte. Azken hau oxidazio-kondizioen arabera (tenperatura, denbora, substratu mota...) desberdina izango da; ezagunenak hidroperoxido taldeak dira, baina hidroxi eta keto taldeak ere posible dira. Oxidazio-produktu primario horiek, oso ezegonkorak direnez, azkar degradatzen dira, eta oxidazio-produktu sekundarioak sortzen dira. Horien artean, besteak beste, azidoak, alkoholak, aldehidoak, zetonak eta furanoak daude, zeinak lurrunkorrek edo ez-lurrunkorrek izan daitezkeen, molekulen tamainaren arabera. Era berean, tamaina handiko polimeroak ere sor daitezke. Hortaz, digestioan oxidazioa gertatzen bada, AZen eta GAen degradazioaz gain, oxidazio-konposatuen sorrera ere ikusi behar da.

Erreakzio hori hain konplexua denez, faktore guztien eragina ondo ulertzeko, funtsezkoa da erreakzioaren ikuspegi orokorra lortzea. Horretarako, zer konposatu primario eta sekundario sortu diren jakin behar da, baita zer kantitatetan ere. Gainera, lipido motaren arabera (linoleikoa, oleikoa...) sortutako oxidazio-produktuak desberdinak direnez, prozesu batean lagungarria den oxidazio-markatzaile bat (adibidez, malondialdehidoa edo hexanala) beste prozesu batean ez-baliagarria izan daiteke. Testuinguru horretan, ¹H NMR oso teknika erabilgarria da: azkarra da, eta oxidazio-konposatu pri-

E bitaminaren gehikuntza urdail-hesteetako in vitro digestioan: efektu antioxidatzailea edo prooxidatzailea?

marioen eta sekundarioen gaineko aldibereko informazioa ematen du espek- tro batean, lipido-lagina aldez aurretik aldatzeko beharrik izan gabe.

3.2.1. Azilo talde eta gantz-azido asegabeen degradazioa

3. taulan ikusten den bezala, aberastu gabeko liho-olioa digeritu on- doren linoleniko-kateen portzentaje molarra modu esanguratsuan murriztu zen, oxidatu egin zirelako (konparatu balioak L- eta DL-laginetan). Emaitza hau aurreko ikerlanekin bat dator, jakina baita olio freskoen digestioan oxidazio-erreakzio suabeak gerta daitezkeela [14, 19, 20].

3. taula. Azilo taldeen eta gantz-azidoen portzentaje molarrak liho-olioan *in vitro* digeritu baino lehen (L) eta ondoren, alfa-tokoferola gehitu gabe (DL) edo 200 ppm (DL + 200), 2000 ppm (DL + 2000) eta 20000 ppm (DL + 20000) gehi- tuta. Lerro bakoitzean hizki desberdinak agertzen badira, horrek desberdintasun esanguratsuak daudela esan nahi du ($p < 0,05$).

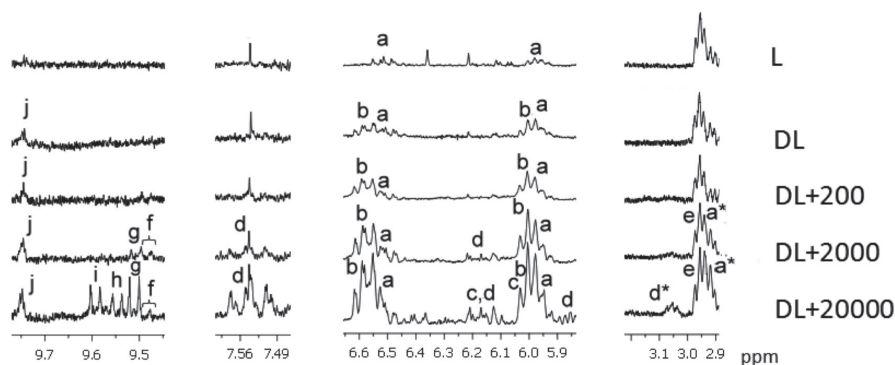
	L	DL	DL + 200	DL + 2000	DL + 20000
Linolenikoa (C18:3omega3)	49,5 ± 0,2 ^a	47,8 ± 0,6 ^{ab}	48,4 ± 1,3 ^{ab}	47,8 ± 1,5 ^{ab}	46,0 ± 1,3 ^b
Linoleikoa (C18:2omega6)	20,6 ± 0,3 ^a	17,8 ± 0,2 ^a	17,8 ± 0,8 ^a	18,3 ± 1,4 ^a	18,4 ± 1,3 ^a
Oleikoa (C18:1omega9)	22,0 ± 0,1 ^a	22,7 ± 1,0 ^a	21,7 ± 0,8 ^a	21,6 ± 0,1 ^a	23,7 ± 0,3 ^a
Asegabe totalak	92,1 ± 0,4 ^a	88,2 ± 0,5 ^b	87,9 ± 0,2 ^b	87,8 ± 0,1 ^b	88,1 ± 0,4 ^b
Aseak gehi eraldatutakoak	7,9 ± 0,4 ^a	11,8 ± 0,5 ^b	12,1 ± 0,2 ^b	12,2 ± 0,1 ^b	11,9 ± 0,4 ^b

Alfa-tokoferolez aberastutako liho-olioetan ere, konposatu hori antio- xidatzailetzat hartzen den arren, linoleniko-kateen portzentaje molarrak gutxitu ziren digestioan. Nabarmena da murriztapen nagusia alfa-tokofe- rol kontzentrazio altuena zuen laginean gertatu zela (DL + 20000), zeinak iradokitzen duen konposatu horrek aktibitate prooxidatzailea zuela esperi- mentu honen kondizioetan.

3.2.2. Oxidazio-konposatuen sorrera

4. irudian ikusten den bezala, digeritu gabeko olioaren ¹H NMR espek- troan (L) «a» seinale txikiak ikusten dira: *zis,trans*-dieno konjugatuak eta hidroxi talde bat dituzten kateek sortutakoak (*Z,E*-CD-OH). Lagin hori di- geritu ondoren, «a» seinaleen intentsitatea handitzen da, eta beste oxidazio- konposatu batzuen seinaleak agertzen dira espektroan (DL): «b» seinaleak, *zis,trans*-dieno konjugatuak eta hidroperoxi talde bat dituzten kateek sor- tuak (*Z,E*-CD-OOH), eta «j» seinalea, alkanal aldehidoek sortuta. Beraz, aberastu gabeko liho-olioaren digestioaren bitartean, oxidazio-konposatu primario eta sekundarioak sortzen direla ondorioztatzen da (haien kontzen- trazioak 4. taulan daude zehaztuta).

Oxidazio-konposatuen protoi-seinaleak



4. irudia. Hasierako liho-olioaren (aberastu gabea, L) eta digeritutako laginen lipidoen (aberastu gabea, DL, eta alfa-tokoferolez aberastua: 200 ppm [DL + 200], 2000 ppm [DL + 2000] eta 20000 ppm [DL + 20000]) ¹H NMR espektro-tarteak. 5,9-9,8 ppm-ko tarteak esperimentu berriarekin egindako espektrokoak dira eta beste tarte guztiak, espektro estandarrekoak.

4. taula. Oxidazio-konposatuen kontzentrazioak liho-olioan *in vitro* digeritu baino lehen (L) eta ondoren, alfa-tokoferola gehitu gabe (DL) edo 200 ppm (DL + 200), 2000 ppm (DL + 2000) eta 20000 ppm (DL + 20000) gehituta. Leerro bakoitzean hizki desberdinak agertzen badira, horrek desberdintasun esanguratsuak daudela esan nahi du ($p < 0,05$).

	L	DL	DL + 200	DL + 2000	DL + 20000
Oxidazio-konposatu primarioak: Dieno konjugatuak (mmol/mol AZ + GA)					
Z,E-CD-OOH	—	2,3 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,3 ^b	11,0 ± 0,4 ^c
Z,E-CD-OH	0,6 ± 0,0 ^a	1,4 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,3 ^b	3,9 ± 0,4 ^c
E,E-CD-OH	—	—	—	—	3,3 ± 0,6
Z,E-CD = O	—	—	—	0,3 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,1 ^b
Dieno konjugatu totalak	0,6 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,4 ^a	4,6 ± 0,0 ^b	7,8 ± 0,6 ^c	19,5 ± 0,5 ^d
Oxidazio-konposatu sekundarioak: Aldehidoak (μmol/mol AZ + GA)					
Alkanalak	—	71,7 ± 2,3 ^a	76,1 ± 11,1 ^a	128,8 ± 2,1 ^b	165,0 ± 45,3 ^b
E-2-alkenalak	—	—	—	47,0 ± 2,6 ^a	74,7 ± 17,5 ^b
E,E-2,4-alkadienalak	—	—	—	80,7 ± 6,7 ^a	280,2 ± 73,0 ^b
Z,E-2,4-alkadienalak	—	—	—	—	255,4 ± 32,7
4,5-epoxi-E-2-alkenalak	—	—	—	—	213,8 ± 23,2
Aldehido totalak	—	71,7 ± 2,3 ^a	76,1 ± 11,1 ^a	256,5 ± 12,7	989,2 ± 126,1 ^c

Laburdurak: AZ, azilo taldeak; GA, gantz-azidoak; Z,E-CD-OOH, *zis,trans*-dieno konjugatuak eta hidroperoxi talde bat dituzten kateak; Z,E- edo E,E-CD-OH, *zis,trans*- edo *trans,trans*-dieno konjugatuak eta hidroxitalde bat dituzten kateak; Z,E-CD = O, *zis,trans*-dieno konjugatuak eta keto talde bat dituzten kateak.

Aberastutako liho-olio laginak digeritu ondoren, ikerlan honen kondizioetan ondorioztatzen da alfa-tokoferolaren presentziak lipidoen oxidazioa areagotzen duela. Oro har, zenbat eta alfa-tokoferol kontzentrazio handiagoa, orduan eta oxidazio handiagoa, 4. irudiko espektroetan eta 4. taulan ikusten den moduan (DL + 20000 > DL + 2000 > DL + 200 > DL). Gainera, beste oxidazio-konposatu berri batzuk ere sortzen dira. 2000 ppm alfa-tokoferol gehitu zenean, lipidoen espektroan (DL + 2000) seinale berri batzuk agertu ziren: «d» seinaleak, dieno konjugatuak eta keto talde bat dituzten kateenak; «g» seinalea, *E,E*-2,4-alkadienalek sortua; eta «f» seinalea, *E*-2-alkanalek sortua. 4. taulan ikusten den bezala, alfa-tokoferolaren gehienezko kontzentrazioan gehitu zenean (DL + 20000) ere lehen aipatutako oxidazio-konposatuak aurkitu ziren (baina kontzentrazio altuagoetan) eta, horiekin batera, zenbait konposatu berri: *E,E*-dieno konjugatuak eta hidroxiki talde bat dituzten kateak («c» seinaleak espektroan), monoepoxi-oktadekadienoiko kateak («e» seinalea), 4,5-epoxi-*E*-2-alkenalak («h» seinalea espektroan) eta *Z,E*-2,4-alkadienalak («i» seinalea espektroan).

4. ONDORIOAK

Ikerlan honek frogatu du, lehenengo aldiz, d,l-alfa-tokoferolak aktibitate prooxidatzailea duela liho-olioaren urdail-hesteetako *in vitro* digestioan, edozein kontzentrazioan gehituta (200-20000 ppm). Aberastu gabeko liho-olioarekin konparatuta, alfa-tokoferolez aberastutakoetan azilo talde asegabeak gehiago degradatu ziren, eta oxidazio-konposatu primario eta sekundario gehiago ere sortu ziren, dosi-mendeko modu batean. Emaitza horiek aintzat hartuta, kontu handia izan behar da E bitaminaren forma hau elikagaiak aberasteko edo elikagai-gehigarri moduan erabiltzen denean, batik bat kontzentrazio altuetan, espero den efektu antioxidatzailearen kontrakoa gerta litekeelako. Hala ere, *in vivo* ikerketa gehiago behar dira *in vitro* ikusi diren emaitza hauek egiaztatzeko, baita gehitutako alfa-tokoferolaren dosi altuak denbora luzez kontsumitzeak zer ondorio potentzial izan ditzakeen jakiteko ere.

5. ESKER ONAK

Artikulu hau Espainiako Ekonomia, Industria eta Lehiakortasuna Ministerioak (MINECO, AGL2015-65450-R), Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Saileko Unibertsitate eta Ikerketa Lan-arloak (EJ-GV, IT-916-16) eta Ekonomiaren Garapen eta Azpiegitura Saileko Nekazaritza, Arrantza eta Elikagai industria Lan-arloak (EJ-GV, PA18/04) finantzatu dute.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] CAROCHO, M. eta FERREIRA, I.C.F.R. 2013. «A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives». *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 15-25.
- [2] AZZI, A. 2017. «Many tocopherols, one vitamin E». *Mol. Aspects Med.*, **in press**, doi: 10.1016/j.mam.2017.06.004
- [3] KAMAL-ELDIN, A. eta APPELQVIST, L.A. 1996. «The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols». *Lipids*, **31(7)**, 671-701.
- [4] KLEIN, E. A., THOMPSON, I. M., TANGEN, C. M., CROWLEY, J. J., LUCIA, M. S., GOODMAN, P. J., MINASIAN, L., FORD, L. F., PARNES, H. L., GAZIANO, J. M., KARP, D. D., LIEBER, M. M., WALTHER, P. J., KLOTZ, L., PARSONS, J. K., CHIN, J. L., DARKE, A. K., LIPPMAN, S. M., GOODMAN, G. E., MEYSKENS, F. L. JR. eta BAKER, L. H. 2011. «Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer: Updated Results of The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)». *Journal of the American Medicine Association*, **306(14)**, 1549-1556.
- [5] VIVEKANANTHAN, D. P., PENN, M. S., SAPP, S. K., HSU, A. eta TOPOL, E. J. 2003. «Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials». *Lancet*, **361(9374)**, 2017-2023.
- [6] CILLARD, J., CILLARD, P. eta CORMIER, M. 1980. «Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of α -tocopherol». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **57(8)**, 255-261.
- [7] KIM, H. J., LEE, H. O., eta MIN, D. B. 2007. «Effects and prooxidant mechanisms of oxidized alpha-tocopherol on the oxidative stability of soybean oil». *Journal of Food Science*, **72(4)**, C223-230.
- [8] FUSTER, M. D., LAMPI, A. M., HOPIA, A. eta KAMAL-ELDIN, A. 1998. «Effects of alpha- and gamma-tocopherols on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids*, **33(7)**, 715-722.
- [9] KULÅS, E. eta ACKMAN, R. G. 2001. «Properties of α -, γ -, and δ -tocopherol in purified fish oil triacylglycerols». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78(4)**, 361-367.
- [10] HUANG, S.-W., FRANKEL, E. N. eta GERMAN, J. B. 1994. «Antioxidant activity of alpha- and gamma-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42(10)**, 2108-2114.
- [11] JUNG, M. Y. eta MIN, D. B. 1990. «Effects of α -, γ -, and δ -Tocopherols on Oxidative Stability of Soybean Oil». *Journal of Food Science*, **55(5)**, 1464-1465.
- [12] MARTIN-RUBIO, A. S., SOPELANA, P., IBARGOITIA, M. L. eta GUILLÉN, M. D. 2018. «Prooxidant effect of α -tocopherol on soybean oil. Global monitoring of its oxidation process under accelerated storage conditions by 1H Nuclear Magnetic Resonance». *Food Chemistry*, **245**, 312-323.

- [13] KENMOGNE-DOMGUIA, H. B., MEYNIER, A., BOULANGER, C. eta GENOT, C. 2012. «Lipid Oxidation in Food Emulsions Under Gastrointestinal-Simulated Conditions: the Key Role of Endogenous Tocopherols and Initiator». *Food Digestion*, **3(1-3)**, 46-52.
- [14] LARSSON, K., CAVONIUS, L., ALMINGER, M. eta UNDELAND, I. 2012. «Oxidation of Cod Liver Oil during Gastrointestinal in Vitro Digestion». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60(30)**, 7556-7564.
- [15] COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives.
- [16] VERSANTVOORT, C. H. M., OOMEN, A. G., VAN DE KAMP, E., ROMPELBERG, C. J. M. eta SIPS, A. J. A. M. 2005. «Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food». *Food and Chemical Toxicology*, **43(1)**, 31-40.
- [17] NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. eta GUILLÉN, M. D. 2016. «A study by ¹H NMR on the influence of some factors affecting lipid *in vitro* digestion». *Food Chemistry*, **211**, 17-26.
- [18] NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. eta GUILLÉN, M. D. 2015. Usefulness of ¹H NMR in assessing the extent of lipid digestion». *Food Chemistry*, **179**, 182-190.
- [19] NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. eta GUILLÉN, M. D. 2017. «¹H NMR and SPME-GC/MS study of hydrolysis, oxidation and other reactions occurring during *in vitro* digestion of non-oxidized and oxidized sunflower oil. Formation of hydroxy-octadecadienoates». *Food Research International*, **91**, 171-182.
- [20] NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E. eta GUILLÉN, M. D. 2017. «*In vitro* gastrointestinal digestion of non-oxidized and oxidized flaxseed oil: Occurrence of epoxidation reactions». *Food Research International*, **97**, 104-1115.
- [21] GUILLÉN, M. D. eta RUIZ, A. 2003. «Edible oils: discrimination by ¹H nuclear magnetic resonance». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83(4)**, 338-346.
- [22] RUIZ-ARACAMA, A., GOICOECHEA, E. eta GUILLÉN, M. D. 2017. «Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. ¹H NMR multisuppression experiment: A powerful tool». *Food Chemistry*, **228**, 301-314.
- [23] NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. eta GUILLÉN, M. D. 2014. «A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures». *Food Research International*, **66**, 379-387.
- [24] CUI, P. H., DUKE, R. K. eta DUKE, C. C. 2008. «Monoepoxy octadecadienoates and monoepoxy octadecatrienoates 1: NMR spectral characterization». *Chemistry and Physics of Lipids*, **152(2)**, 122-130.

- [25] GARDNER, H. W. eta WEISLEDER, D. 1972. «Hydroperoxides from oxidation of linoleic and linolenic acids by soybean lipoxygenase: Proof of the trans-11 double bond». *Lipids*, **7(3)**, 191-193.
- [26] IACAZIO, G. 2003. «Easy access to various natural keto polyunsaturated fatty acids and their corresponding racemic alcohols». *Chemistry and Physics of Lipids*, **125(2)**, 115-121.
- [27] KIKUCHI, M., YAOITA, Y. eta KIKUCHI, M. 2008. «Monohydroxy-Substituted Polyunsaturated Fatty Acids from *Swertia japonica*». *Helvetica Chimica Acta*, **91(10)**, 1857-1862.
- [28] KUKLEV, D. V., CHRISTIE, W. W., DURAND, T., ROSSI, J. C., VIDAL, J. P., KASYANOV, S. P., AKULINA, V. N. eta BEZUGLOV, V. V. 1997. «Synthesis of keto- and hydroxydienoic compounds from linoleic acid». *Chemistry and Physics of Lipids*, **85(2)**, 125-134.
- [29] MURAKAMI, N., SHIRAHASHI, H., NAGATSU, A. eta SAKAKIBARA, J. 1992. «Two unsaturated 9R-hydroxy fatty acids from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae f. flos-aquae*». *Lipids*, **27(10)**, 776-778.
- [30] DUFOUR, C. eta LOONIS, M. 2005. «Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI – mass spectrometry and NMR of the oxidation products». *Chemistry and Physics of Lipids*, **138(1-2)**, 60-68.
- [31] GOICOECHEA, E. eta GUILLÉN, M. D. 2010. «Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by ¹H nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100°C». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58(10)**, 6234-6245.
- [32] GUILLÉN, M. D. eta RUIZ, A. 2004. «Formation of hydroperoxy- and hydroxyalkenals during thermal oxidative degradation of sesame oil monitored by proton NMR». *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106(10)**, 680-687.
- [33] GUILLÉN, M. D. eta URIARTE, P. S. 2012. «Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated α,β unsaturated aldehydes». *Food Chemistry*, **131(3)**, 915-926.